

Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

**Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder des
Mobilfunks auf menschliche Fibroblasten (Gentoxizität)
- Vorhaben 3607S04504**

**Auftragnehmer:
Technische Universität Darmstadt**

**P. Layer
A. Heselich
P. Waldmann
B. Volkmer
D. Pollet
M. Blettner
N. Kuster**

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) und im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz (BfS) durchgeführt.

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMU (UFOPLAN) in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BfS übereinstimmen.

BfS-RESFOR-80/13

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:
urn:nbn:de: 0221-2013062710906

Salzgitter, Juni 2013

Projekt StSch 4504 des BfS:

„Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder des Mobilfunks auf menschliche Fibroblasten (Gentoxizität)“

Abschlussbericht

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Forschungsnehmers wieder und muss nicht mit der Meinung des Auftraggebers (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit) übereinstimmen.

Projektleiter:	Prof. Dr. Paul G. Layer Technische Universität Darmstadt Fachbereich Biologie Entwicklungsbiologie und Neurogenetik Schnittspahnstrasse 13 64287 Darmstadt	TUD
Projektpartner:	Dr. Anja Heselich und weitere Mitarbeiter der AG Layer Technische Universität Darmstadt Fachbereich Biologie Entwicklungsbiologie und Neurogenetik Schnittspahnstrasse 13 64287 Darmstadt	TUD
	Dr. Petra Waldmann und Mitarbeiter Fa. Incos Bote Friedhofstrasse 6 55232 Alzey	INCOS
	Dr. Beate Volkmer Dr. Rüdiger Greinert und Mitarbeiter Elbekliniken Dermatologisches Zentrum Am Krankenhaus 1 21614 Buxtehude	DZB
	Prof. Dr. Dieter Pollet und Mitarbeiter Hochschule Darmstadt Fachbereich Chemie - Biotechnologie Schnittspahnstr. 12 64287 Darmstadt	HDA

Prof. Dr. Maria Blettner,
Dr. Jochem König und Mitarbeiter
Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie
und Informatik (IMBEI)
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität
Obere Zahlbacher Straße 69
55131 Mainz

IMBEI

Prof. Dr. Niels Kuster und Mitarbeiter,
ITIS Foundation for Research on Information Technologies in
Society
Zeughausstrasse 43
CH-8004 Zürich

ITIS

Danksagung

Wir danken Herrn Prof. Bernd Epe (Johannes Gutenberg-Universität Mainz) für die großzügige Bereitstellung der Glykosylase FPG (Formamidopyrimidine DNA-Glycosylase).

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	12
1.1	Elektromagnetische Felder	12
1.2	Gentoxizität und Krebsentstehung	16
1.3	Literatur zu hochfrequenten EMF und Gentoxizität (Stand September 2012)	21
1.4	Studiendesign	33
2	Material und Methoden	34
2.1	Auswahl der Probanden.....	34
2.2	Fragebogen und Anamnese.....	35
2.3	Studienpopulation	35
2.4	Gewinnung der Fibroblastenkulturen.....	37
2.5	Befeldung.....	38
2.6	Pretest	39
2.7	Arbeitsplan für die einzelnen analytischen Endpunkte.....	39
2.7.1	Mikrokern-Test	40
2.7.2	Numerische Chromosomenaberration.....	41
2.7.3	Comet-Assay	43
2.7.4	Oxidative DNA-Schäden	44
2.7.5	Apoptose-Assay:.....	45
2.7.6	Zellzyklusanalyse	46
2.8	Codierung der Proben.....	47
2.9	Auswertung der Präparate	47
2.9.1	Numerische Chromosomenaberration:.....	47
2.9.2	Mikronukleus-Test mit CREST-Analytik.....	48
2.9.3	Comet-Assay	48
2.9.4	Oxidative DNA-Schäden	49
2.9.5	Apoptose.....	49
2.9.6	Zellzyklusanalyse	49
2.10	Statistische Analyse	50
2.10.1	Zielsetzung des statistischen Analyseplans.....	50
2.10.2	Analysestrategie.....	50
2.10.3	Umgang mit multiplen Hypothesentests	51
2.10.4	Spezifikation und Begründung der Analysemethoden	52
2.10.5	Tests auf einen Dosistrend.....	54
3	Ergebnisse.....	56
3.1	Datensichtung.....	56
3.2	Umgang mit Ausreißern, unplausiblen Werten und fehlenden Werten	57
3.2.1	Comet-Assay - Rohdatendarstellung.....	59
3.2.2	Comet-Assay mit FPG-Inkubation – Rohdatendarstellung.....	65
3.2.3	Mikronukleustest mit CREST-Analytik – Rohdatendarstellung.....	70
3.2.4	Erweiterter Mikronukleustest - Rohdatendarstellung	73
3.2.5	numerische Chromosomenaberrationen - Rohdatendarstellung.....	75
3.2.6	TUNEL-Apoptosetest - Rohdatendarstellung.....	77

3.2.7	Zellzyklus – Rohdatendarstellung.....	78
3.3	Dosistrendanalyse - Hauptauswertung.....	80
3.4	Dosistrendanalyse - Sensitivitätsanalysen	92
3.5	Dosistrendanalyse – Differenzen zu Sham.....	94
3.5.1	Comet-Assay	94
3.5.2	Comet-Assay mit FPG-Inkubation	101
3.5.3	Mikronukleustest	106
3.5.4	erweiterter Mikronukleustest	111
3.5.5	numerische Chromosomenaberrationen	114
3.5.6	TUNEL-Apoptosetest	118
3.5.7	Zellzyklus	120
4	Diskussion	123
5	Anhang.....	130
5.1	Fragebogen zur Anamnese.....	130
5.2	Einwilligungserklärung	138
6	Literaturverzeichnis	139
7	Statistischer Abschlussbericht (IMBEI)	145
8	Bericht zur Expositionsanlage (ITIS).....	250

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: typische maximale Werte für die Exposition der Bevölkerung mit elektromagnetischen Feldern [Quelle: http://www.who.int/peh-emf/about/WhatisEMF/en/]	13
Tabelle 2: Grenzwerte gemäß 26. BIMSChV, §2 für hochfrequente Felder wie ortsfeste Sendefunkanlagen mit einer Sendeleistung von 10 Watt EIRP (äquivalente isotrope Strahlungsleistung) oder mehr, die elektromagnetische Felder im Frequenzbereich von 10 Megahertz bis 300.000 Megahertz erzeugen.	14
Tabelle 3: Grenzwerte gemäß 26. BIMSChV, §3 für niederfrequente Felder, wie sie von folgenden Anlagentypen erzeugt werden: Hochspannungsleitungen, Erdkabel, Transformatoren sowie Bahn- und Stromversorgungsanlagen.....	15
Tabelle 4: Zusammenfassung der ICNIRP Expositions Guidelines für elektromagnetische Felder (Quelle WHO; ICNIRP, EMF guidelines, Health Physics 74, 494-522, 1998)	16
Tabelle 5: Übersicht der Publikationen zum Einfluss von EMF auf Fibroblasten in <i>in vitro</i> Experimenten (Auflistung alphanumerisch nach Autor und Erscheinungsjahr).....	21
Tabelle 6: Übersicht über die personenbezogenen Daten, aufgeschlüsselt nach älteren und jüngeren Probanden	36
Tabelle 7: Übersicht der Häufigkeiten vom Geschlecht aller Probanden.....	37
Tabelle 8: Übersicht der Häufigkeiten vom Geschlecht getrennt nach jüngeren und älteren Probanden	37
Tabelle 9: Mittelwert und Standardabweichung von allen Probanden.....	37
Tabelle 10: Mittelwert und Standardabweichung vom Alter getrennt nach jüngeren und älteren Probanden	37

Tabelle 11: Ergebnisse des Permutationstests (zur primären Analyse) für die Zielvariablen für alle Probanden mit n=20, beim erweiterten Mikrokerntest n=4 und bei den Chromosomenaberrationen n=10. P-Werte kleiner als 0.05 werden fett gedruckt dargestellt.	81
Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Comet-Assays und alle Expositionsbedingungen. N=20 Probanden: 10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren	82
Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Mikrokerntests und alle Expositionsbedingungen. Die Zielvariablen MN und Crest-positive MN sind jeweils auf 2.000 ausgewertete Zellen, bzw. beim erweiterten Mikrokerntest auf 10.000 ausgewertete Zellen hochgerechnet. MN: N=20 Probanden: 10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren, extended MN: N=4 Probanden: 4 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren	85
Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Tests für numerische Chromosomenaberrationen und alle Expositionsbedingungen. Die Zielvariablen sind auf 200 ausgewertete Mitosen hochgerechnet. N=10 Probanden: juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren.....	86
Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Tests auf apoptotische Ereignisse mittels TUNEL-Assay und alle Expositionsbedingungen. TUNEL positive cells werden unter 1.000 ausgewerteten Zellen angegeben. N=20 Probanden: 10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren.....	87
Tabelle 16: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Zellzyklustests und alle Expositionsbedingungen. N=20 Probanden: 10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren	87
Tabelle 17: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen. N=20 Probanden (10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren) für die Zielvariablen des Comet-Assays. Der p-Wert wurde exakt bestimmt (Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.....	89
Tabelle 18: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen. N=20 Probanden (10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren) für die Zielvariablen des Mikrokerntests; n=4 Probanden für den erweiterten Mikrokerntest. Der p-Wert wurde exakt bestimmt (Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.	90
Tabelle 19: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen. N=10 Probanden (n=7 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, n=3 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren) für die Zielvariablen der Chromosomenaberration. Der p-Wert wurde exakt bestimmt (Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.....	91
Tabelle 20: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen. N=20 Probanden (10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren) für TUNEL positive Zellen. Der p-Wert wurde exakt bestimmt (Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.	91
Tabelle 21: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen. N=20 Probanden (10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren) für die Zielvariablen des Zellzyklus. Der	

p-Wert wurde exakt bestimmt (Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.....	91
Tabelle 22: Ergebnisse des Page-Trend-Tests (Sensitivitätsanalyse) für die Zielvariablen für alle Probanden (n=20, n=10 für nCA, n=4 für MN extended).	92
Tabelle 23: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielgröße Olive Tail Moment. Ohne Proband 7. N=19 Probanden	93
Tabelle 24: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=10; adult: Alter 50-59 Jahre, n=10), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen des Comet-Assays (Teil 1: 4h, 16h).....	98
Tabelle 25: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=10; adult: Alter 50-59 Jahre, n=10), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen des Comet-Assays (Teil 2: 24h).	99
Tabelle 26: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=10; adult: Alter 50-59 Jahre, n=10), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen des Comet-Assays für 72 h Befeldung, mit und ohne FPG-Inkubation.	104
Tabelle 27: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=10; adult: Alter 50-59 Jahre, n=10), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen des Mikrokerntests (15 h und 72 h).	109
Tabelle 28: Differenzen zur Sham Exposition für alle 4 Probanden getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen des erweiterten Mikrokerntests (72h).	113
Tabelle 29: Differenzen zur Sham Exposition für 10 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=7; adult: Alter 50-59 Jahre, n=3), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen der numerischen Chromosomenaberrationen.	116
Tabelle 30: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=10; adult: Alter 50-59 Jahre, n=10), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen der TUNEL-positiven Zellen.....	119
Tabelle 31: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=10; adult: Alter 50-59 Jahre, n=10), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen Zellzyklusverteilung (G1-, S-, G2-Phase).....	122

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Mechanismen der Krebsentstehung (in Anlehnung an Vijayalaxmi and Obe, 2005 [4]).	18
Abbildung 2: Schemata des Studiendesigns. Beteiligte Institute: TUD – Technische Universität Darmstadt, ITIS - ITIS Foundation for Research on Information Technologies in Society Zürich, INCOS – Incos Bote Mainz, DZB – Dermatologisches Zentrum Buxtehude, HDA – Hochschule Darmstadt, IMBEI - Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik Mainz. (Flusslinien: gepunktet: Zellaustausch, gestrichelt: Präparatefluss, schwarz: Datenfluss).....	34

Abbildung 3: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße <i>Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	59
Abbildung 4: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße <i>Log-Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	60
Abbildung 5: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße <i>Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	60
Abbildung 6: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße <i>Log-Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	61
Abbildung 7: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße <i>Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	61
Abbildung 8: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße <i>Log-Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	62
Abbildung 9: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße <i>Median Head-DNA (%)</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	62
Abbildung 10: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße <i>Log(100-Median Head DNA (%))</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	63
Abbildung 11: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße <i>Median Head-DNA (%)</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	63
Abbildung 12: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße <i>Log(100-Median Head DNA (%))</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	64
Abbildung 13: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße <i>Median Head-DNA (%)</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	64
Abbildung 14: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße <i>Log(100-Median Head DNA (%))</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	65
Abbildung 15: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	66
Abbildung 16: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße <i>Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	66
Abbildung 17: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>Log-Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	67
Abbildung 18: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße <i>Log-Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	67

Abbildung 19: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>Median Head-DNA (%)</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	68
Abbildung 20: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße <i>Median Head-DNA (%)</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	68
Abbildung 21: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>Log(100-Median Head DNA (%))</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	69
Abbildung 22: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße <i>Log(100-Median Head DNA (%))</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	69
Abbildung 23: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße <i>Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	70
Abbildung 24: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	71
Abbildung 25: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße <i>CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	71
Abbildung 26: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	72
Abbildung 27: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße <i>CBPI Proliferationsindex</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle für die Gentoxizität).	72
Abbildung 28: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>CBPI Proliferationsindex</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle für die Gentoxizität).	73
Abbildung 29: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen</i> (PK: 2.000 binukleäre Zellen), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	74
Abbildung 30: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>CREST-positive Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen</i> (PK: 2.000 binukleäre Zellen), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	74
Abbildung 31: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>CBPI Proliferationsindex</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle für die Gentoxizität).	75
Abbildung 32: Darstellung der Rohdaten für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße <i>Zellen mit Chromosomenverlusten in 200 Metaphasen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	76
Abbildung 33: Darstellung der Rohdaten für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße <i>Zellen mit zusätzlichen Chromosomen in 200 Metaphasen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	76

Abbildung 34: Darstellung der Rohdaten für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße <i>aneuploide Zellen insgesamt in 200 Metaphasen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	77
Abbildung 35: Darstellung der Rohdaten für den Test auf apoptotische Ereignisse, Zielgröße <i>TUNEL-positive Zellen in 1.000 Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, HL-60-sham = Kontrollzelllinie, unbehandelt, HL-60 Act = Kontrollzelllinie, Actinomycin D-behandelt).	78
Abbildung 36: Darstellung der Rohdaten für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße <i>G1-Phase-Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg).	79
Abbildung 37: Darstellung der Rohdaten für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße <i>S-Phase-Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg).	79
Abbildung 38: Darstellung der Rohdaten für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße <i>G2-Phase-Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg).	80
Abbildung 39: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße <i>Log-Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	95
Abbildung 40: Darstellung der : Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße <i>Log-Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	95
Abbildung 41: Darstellung der : Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße <i>Log-Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	96
Abbildung 42: Darstellung der : Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße <i>Log(100-Median-Head DNA(%))</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	96
Abbildung 43: Darstellung der : Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße <i>Log(100-Median-Head DNA(%))</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	97
Abbildung 44: Darstellung der : Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße <i>Log(100-Median-Head DNA(%))</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	97
Abbildung 45: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>Log-Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	101
Abbildung 46: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung und FPG-Inkubation, Zielgröße <i>Log-Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	102

Abbildung 47: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay im Vergleich nach 72 h Befeldung ohne (links) und mit (rechts) FPG-Inkubation, Zielgröße <i>Log-Olive-Tail-Moment</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	102
Abbildung 48: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>Log(100-Median-Head DNA(%))</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	103
Abbildung 49: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung und FPG-Inkubation, Zielgröße <i>Log(100-Median-Head DNA(%))</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	103
Abbildung 50: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet- Assay im Vergleich nach 72 h Befeldung ohne (links) und mit (rechts) FPG-Inkubation, Zielgröße <i>Log(100-Median-Head DNA(%))</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	104
Abbildung 51: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße <i>Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	106
Abbildung 52: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	107
Abbildung 53: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße <i>CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	107
Abbildung 54: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	108
Abbildung 55: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße <i>Proliferationsindex CBPI</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	108
Abbildung 56: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>Proliferationsindex CBPI</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	109
Abbildung 57: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen</i> (PK: 2.000 binukleäre Zellen), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	112
Abbildung 58: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>CREST-positive Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen</i> (PK: 2.000 binukleäre Zellen), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	112

Abbildung 59: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße <i>Proliferationsindex CBPI</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	113
Abbildung 60: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße <i>Zellen mit Chromosomenverlusten in 200 Metaphasen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	115
Abbildung 61: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße <i>Zellen mit zusätzlichen Chromosomen in 200 Metaphasen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	115
Abbildung 62: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße <i>aneuploide Zellen insgesamt in 200 Metaphasen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).	116
Abbildung 63: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf apoptotische Ereignisse, Zielgröße <i>TUNEL-positive Zellen in 1.000 Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK1: HL-60-sham = Kontrollzelllinie, unbehandelt, PK2: HL-60 Act = Kontrollzelllinie, Actinomycin D-behandelt).	119
Abbildung 64: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße <i>G1-Phase-Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg). .	120
Abbildung 65: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße <i>S-Phase-Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg). .	121
Abbildung 66: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße <i>G2-Phase-Zellen</i> , (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg). .	121

1 Einleitung

Überall, wo Strom verwendet oder auch erzeugt wird, entstehen elektrische, magnetische und elektromagnetische Felder (EMF); so auch bei der Erzeugung und Verwendung von Rundfunk-, Fernseh- und Mobilfunkfeldern. Diese nieder- und hochfrequenten elektromagnetischen Felder gehören, zusammen mit der optischen Strahlung, zu den sogenannten nichtionisierenden Strahlungen. Sie sind somit, auf Grund ihrer geringen Energiedeposition in den Materialien, die sie durchdringen, nicht in der Lage, Atome oder Moleküle zu ionisieren.

Mit der rasant steigenden Nutzung dieser Technologien im Alltag, vor allem durch die stetig steigende Nachfrage nach neuen Mobilfunktechniken und -geräten, ist die Frage nach möglichen Auswirkungen von nieder- und hochfrequenten elektromagnetischen Feldern auf die Gesundheit des Menschen nicht nur von Bedeutung für die Wissenschaft, sondern auch von großem Interesse für die Öffentlichkeit.

1.1 Elektromagnetische Felder

Ein elektromagnetisches Feld setzt sich, wie bereits der Name sagt, zusammen aus einem elektrischen und einem magnetischen Feld. Elektrische Felder sind physikalische Felder, die durch Coulombkräfte auf elektrische Ladungen wirken. Sie sind damit abhängig von der Spannung: je höher die Spannung, desto stärker das elektrische Feld. Magnetische Felder hingegen entstehen, wenn elektrischer Strom fließt. Auch hier gilt: je größer die Stromstärke, desto stärker das magnetische Feld. Ein elektrisches Feld kann auch ohne Stromfluss vorhanden sein. Fließen Ströme, so variiert die Stärke des magnetischen Feldes mit dem Energieverbrauch, wobei die Stärke des elektrischen Feldes konstant bleibt.

Elektromagnetische Felder werden durch die Wellenlänge (Schwingung), die Frequenz (Schwingungen pro Zeiteinheit) und die Amplitude (Stärke der Schwingung) charakterisiert. Angegeben und unterschieden werden sie in der Regel anhand ihrer Frequenz in Hertz (Hz; $1 \text{ Hz} = 1 \text{ Schwingung/s}$). Im niedrigen Hertz-Bereich von bis zu 300 Hz spricht man von sogenannten ELF-Feldern, entsprechend der englischen Bezeichnung *extremly low frequency*. Höherfrequente Felder im Bereich von 300 Hz bis hin zu 10 MHz bezeichnet man als IF-Felder (*intermediate*

frequency), gefolgt von RF-Feldern (*radio frequency*) mit einem Hertz-Bereich von 10 MHz bis 300 GHz.

Es gibt eine Vielzahl von Quellen natürlichen und nicht-natürlichen Ursprungs für elektromagnetische Felder, welche schlussendlich auch auf den Menschen einwirken können. Als Beispiel für eine natürliche Quelle ist selbstverständlich das statische Erdmagnetfeld zu nennen (siehe auch Tab. 1). Quellen für elektromagnetische Felder nicht-natürlichen Ursprungs sind so ziemlich alle Geräte und Leitungen, durch die elektrischer Strom fließt. Starke elektromagnetische Felder sind an Hauptstromleitungen messbar, wogegen schwache EM-Felder zum Beispiel von Computerbildschirmen ausgestrahlt werden. Einige typische Beispiele für die Exposition der Bevölkerung mit elektromagnetischen Feldern wurden von den WHO veröffentlicht [Quelle: <http://www.who.int/peh-emf/about/WhatisEMF/en/>] und sind hier in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: typische maximale Werte für die Exposition der Bevölkerung mit elektromagnetischen Feldern [Quelle: <http://www.who.int/peh-emf/about/WhatisEMF/en/>]

Quelle	typische maximale Expositionswerte der Bevölkerung	
	elektrisches Feld (V/m)	magnetische Flussdichte (μT)
natürliche Felder	200	70 (Erdmagnetfeld)
Stromleitungen (innerhalb von Wohnhäusern, weit entfernt von Hauptstromleitungen)	100	0.2
Stromleitungen (unterhalb großer Hauptstromleitungen)	10 000	20
elektrische Züge und Straßenbahnen	300	50
TV, Computerbildschirme (nicht Stand-by-Modus)	10	0.7
	typische maximale Expositionswerte der Bevölkerung (W/m^2)	
TV und Radio Transmitter	0.1	
Mobiltelefon Basisstationen	0.1	
Mikrowelle	0.5	

Die in der Bevölkerung prominenteste nicht-natürliche Quelle ist nach wie vor die sogenannte Mobilfunkstrahlung. Diese wird aufgrund ihres Frequenzbereiches von typischerweise 900 bzw. 1.800 MHz den RF-Feldern (*radio frequency*) mit einem Hertz-Bereich von 10 MHz bis 300 GHz zugeordnet.

Für die Exposition mit nieder- und hochfrequenten Feldern wurden vom Staat in der 26. Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (26. BImSchV, 16.12.1996) Grenzwerte zum Schutz der Bevölkerung vor wissenschaftlich nachgewiesenen gesundheitlichen Risiken durch hoch- und niederfrequente elektromagnetische Felder festgelegt. Diese Grenzwerte basieren auf den wissenschaftlichen Risikobewertungen durch internationale und nationale Gremien, wie z.B. die Weltgesundheitsorganisation (WHO), die International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP) und die deutsche Strahlenschutzkommission (SSK). Die zu Rate gezogenen Gremien stellten fest, dass bei schwachen Expositionen, also unterhalb definierter Schwellenwerte, bislang keine Schädigungen von Mensch und Tier wissenschaftlich nachgewiesen werden konnten. Somit sind Expositionen unterhalb dieser Schwellenwerte als unbedenklich einzustufen. Die tatsächlich festgelegten Grenzwerte der 26. BImSchV (siehe Tabelle 2, Tabelle 3) liegen zudem deutlich unter den genannten Schwellenwerten. Obwohl die Verordnung für ortsfeste und gewerblich genutzte Anlagen verfasst wurde, können aufgrund der Frequenzen, die in dieser festgelegt sind, die Grenzwerte auch für andere niederfrequente elektromagnetische Felder sowie für die hochfrequenten Mobilfunkfrequenzen als Richtlinie herangezogen werden.

Tabelle 2: Grenzwerte gemäß 26. BImSchV, §2 für hochfrequente Felder wie ortsfeste Sendefunkanlagen mit einer Sendeleistung von 10 Watt EIRP (äquivalente isotrope Strahlungsleistung) oder mehr, die elektromagnetische Felder im Frequenzbereich von 10 Megahertz bis 300.000 Megahertz erzeugen.

<i>Frequenz (f) [MHz]</i>	<i>Effektivwert der Feldstärke quadratisch gemittelt über 6-Minuten-Intervalle</i>	
	<i>elektrische Feldstärke [V/m]</i>	<i>Magnetische Feldstärke [A/m]</i>
10 – 400	27,5	0,073
400 – 2.000	1,375(Wurzel)f	0,0037(Wurzel)f
2.000 – 300.000	61	0,16

Tabelle 3: Grenzwerte gemäß 26. BIMSchV, §3 für niederfrequente Felder, wie sie von folgenden Anlagentypen erzeugt werden: Hochspannungsleitungen, Erdkabel, Transformatoren sowie Bahn- und Stromversorgungsanlagen.

<i>Frequenz [Hz]</i>	<i>elektrische Feldstärke [kV/m]</i>	<i>Magnetische Flussdichte [μT]</i>
50-Hz-Felder	5	100
16 2/3-Hz-Felder	10	300

In der Regel wird die absorbierte Energie pro Masse, also der Energie, die biologischen Systemen über elektromagnetische Felder zugeführt wird, in Form der spezifischen Absorptionsrate, dem sogenannten SAR-Wert in W/kg angegeben. Wie viel Energie tatsächlich vom Menschen absorbiert wird, hängt dabei von mehrerlei Faktoren, wie Körpergröße, Orientierung des Körpers im EMF und der Frequenz der Strahlung ab.

Zur Festlegung des Grenzwertes wurde in Deutschland eine Empfehlung der Strahlenschutzkommission zugrundegelegt, die als Obergrenze einen Teilkörpergrenzwert von 2 W/kg für Kopf und Rumpf bzw. 4 W/kg für die Gliedmaßen, gemittelt über jeweils 10 g, nennt. Diese Empfehlung basiert wiederum auf einer Leitlinie der Internationalen Kommission zum Schutz vor Nichtionisierender Strahlung (ICNIRP). Die ICNIRP gibt aufgrund der aktuellen Literaturlage Empfehlungen für maximale Expositionen mit nicht-ionisierenden Strahlungen heraus, die sie regelmäßig überprüft und ggf. an neue wissenschaftliche Erkenntnisse anpasst. Die letzte Guideline der ICNIRP in Bezug auf elektromagnetische Felder wurde im April 1998 veröffentlicht. In Tabelle 4 ist eine kurze Zusammenfassung der daraus stammenden Empfehlungen für Expositionsgrenzen für elektromagnetische Felder aufgelistet.

Tabelle 4: Zusammenfassung der ICNIRP Expositions Guidelines für elektromagnetische Felder (Quelle WHO; ICNIRP, EMF guidelines, Health Physics 74, 494-522, 1998)

	<i>europäisches Stromnetz Frequenz</i>		<i>Mobilfunkbasisstationen Frequenz</i>		<i>Mikrowelle Frequenz</i>
<i>Frequenz</i>	50 Hz	50 Hz	900 MHz	1.8 GHz	2.45 GHz
	<i>elektrische s Feld (V/m)</i>	<i>Magnetfeld (μT)</i>	<i>Leistungs- flussdichte (W/m²)</i>	<i>Leistungs- flussdichte (W/m²)</i>	<i>Leistungs- flussdichte (W/m²)</i>
Expositionsgrenzen Bevölkerung	5 000	100	4.5	9	10
Expositionsgrenzen beruflich exponierte Gruppen	10 000	500	22.5	45	

Eine Exposition eines Menschen (gesamter Körper) mit ca. 4 W/kg über einen Zeitraum von 30 Minuten bewirkt eine Temperaturerhöhung von ca. 1°C. Betrachtet man dazu im Vergleich die Freisetzung von 3 bis 5 W/kg Leistung bei normaler Muskelaktivität (www.bfs.de/elektro/nff/recht.html), so scheint dieser Wert vernachlässigbar. Dennoch besteht stets der Vorsatz Expositionen wenn möglich zu Minimieren, entsprechend wurde als Grenzwert zum Schutz von beruflich exponierten Personen auch ein 10-fach niedrigerer Wert von 0,4 W/kg festgelegt. Der Grenzwert für die Allgemeinbevölkerung von 0,08 W/kg unterschreitet diesen noch deutlich.

1.2 Gentoxizität und Krebsentstehung

Die Initiation eines Tumors beginnt mit einer einzelnen Genmutation in einer einzelnen Zelle. Gentoxische chemische oder physikalische Agentien sind in der Lage, solche Mutationen direkt zu induzieren, oder aber über sekundäre Mechanismen auszulösen. Dies kann beispielsweise über die Induktion von DNA-Modifikationen, über Einflüsse auf die DNA-Reparatur oder aber auch die DNA-Rekombination erfolgen. Es können einzelne Gene beeinflusst sein, oder auch strukturelle Aberrationen ganzer Chromosomen auftreten. Nicht letale Mutationen können im Zuge der Zellteilung an die Tochterzellen weitergeben werden. Entstehen Mutationen in Keimbahnzellen, so können diese sogar an die Nachkommen des betroffenen Organismus weitergegeben werden. Von Relevanz für die Entstehung

eines Tumors sind jedoch die erst genannten, somatischen Mutationen. Damit aus einer geschädigten Zelle schließlich ein maligner Tumor werden kann, muss diese proliferieren können. Um eine weitere Progression des Tumors zu ermöglichen, sind zudem zusätzliche Mutationen oder auch Veränderungen in der Expression von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen notwendig. Betrachtet man die klinischen Symptome einer Krebserkrankung, so spiegeln diese die stufenweise Progression des Tumors wider. Diese beginnt mit präneoplastischen Veränderungen, führt über benigne Blastoma bis hin zum prämaligen Tumor und schlussendlich zum infiltrierenden und metastasierenden Tumor. Das Fortschreiten der Erkrankung kann durch nicht-gentoxische Faktoren wesentlich beschleunigt werden. Nach der heutigen Auffassung ist Krebs das Ergebnis eines synergistischen Zusammenwirkens von gentoxischen und nicht-gentoxischen Einflüssen.

Eine Noxe, die nicht gentoxisch wirkt und zur Krebsentstehung beiträgt, verursacht selbst keine DNA-Schäden, sondern wirkt indirekt gentoxisch oder kanzerogen, indem sie z.B. die DNA-Reparatur beeinträchtigt, die Wirkung von Gentoxinen verstärkt, die Proliferation erhöht, Schutzmechanismen, wie die Apoptose negativ beeinflusst oder epigenetische Wirkungen hat [1, 2].

Es zeigt sich also, dass zur Entstehung von Krebs nicht zwangsläufig eine gentoxische Wirkung vorhanden sein muss. Wiederum besagt eine gentoxische Wirkung nicht, dass schlussendlich eine Kanzerogenese eintritt. Es kann somit zwischen primär nicht-gentoxischen und gentoxischen Mechanismen zur Krebsentstehung unterschieden werden (siehe

Abbildung 1). Da sich im Laufe jahrelanger Forschung jedoch immer wieder gezeigt hat, dass die meisten krebserregenden Noxen auch gentoxisch sind [3], werden zur Vorhersage einer potentiellen Kanzerogenität in der Regel Tests auf Gentoxizität und Mutagenität vorgeschrieben und durchgeführt.

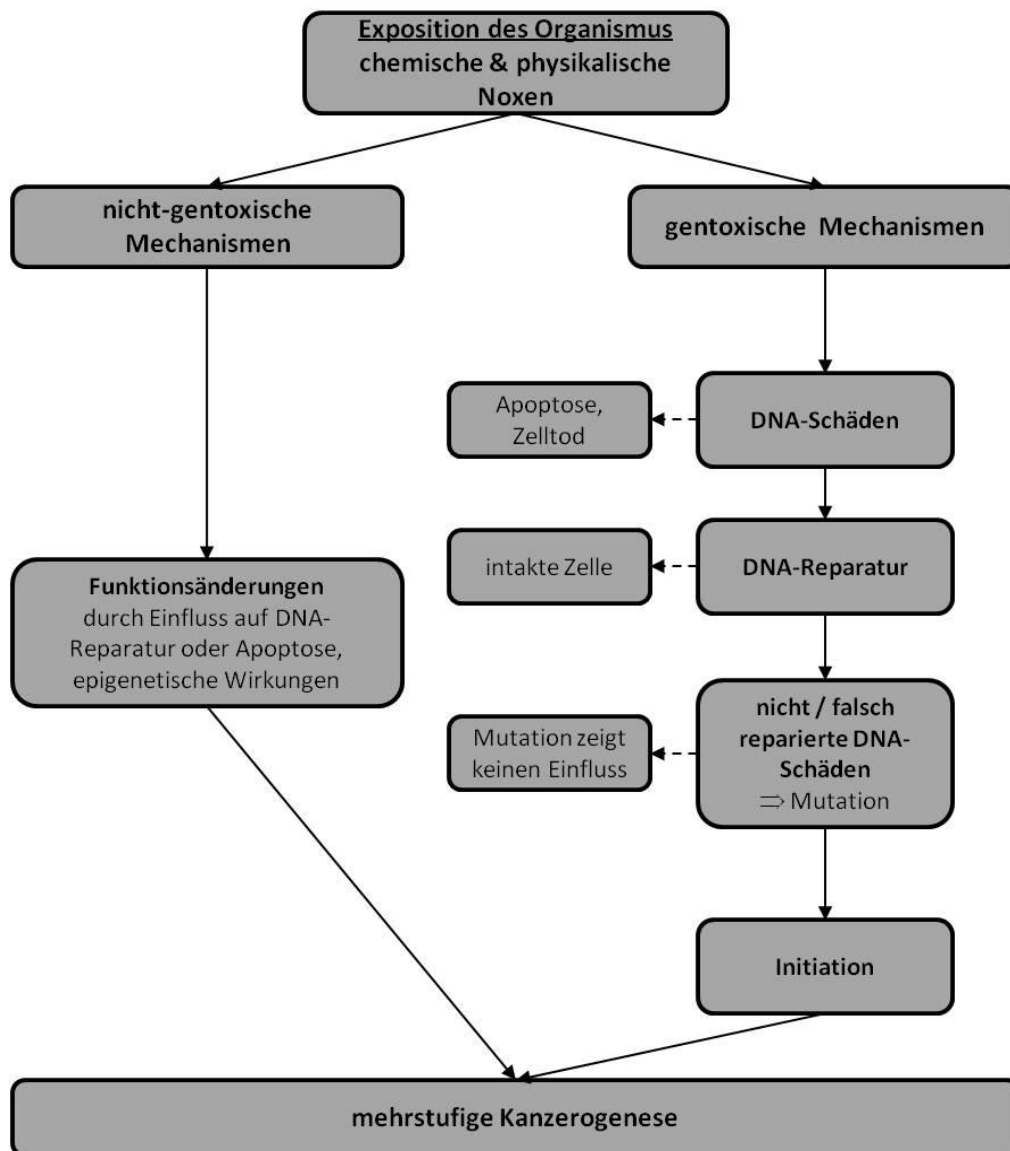


Abbildung 1: Mechanismen der Krebsentstehung (in Anlehnung an Vijayalaxmi and Obe, 2005 [4]).

Im Allgemeinen gilt, dass gentoxische Agentien nicht erst ab einer bestimmten Schwellendosis wirken, sondern die Induktion von DNA-Schäden linear mit der Dosis der Noxe ansteigt. Daraus folgt, dass theoretisch bereits ein einzelnes Molekül eine Mutation verursachen und somit das Risiko der Krebsentstehung erhöhen kann. Eine ganz spezielle Gruppe von gentoxischen Noxen sind Substanzen, die in der Lage sind, Aneuploidien zu induzieren, und welche zudem eindeutig keine Reaktivität mit der DNA zeigen, oder aber klastogen wirken. Die Induktion von Aneuploidien resultiert aus der Interaktion mit spezifischen Proteinen und nicht aus der Interaktion der Substanz bzw. deren Metaboliten mit der DNA. Da Proteine jedoch in der Regel vielfach in der Zelle vorliegen und somit ein Ziel mit hoher Redundanz darstellen, ist die Konsequenz daraus, dass ein Konzentrationsmindestmaß überschritten werden

muss. Es ist also ein bestimmtes minimales Level an geschädigten Proteinen notwendig, bevor Prozesse zur Chromosomensegregation oder –verteilung an die Tochterzellen gestört werden. Unterhalb dieses Schwellenwertes kann davon ausgegangen werden, dass keine Störungen der Chromosomensegregation auftreten und somit auch die Entstehung von Aneuploidien ausbleibt.

Von der europäischen Union wurde hierzu passend eine Empfehlung von drei wissenschaftlichen Komitees (SCHER: Scientific Committee on Health and Environmental Risks, SCCP: Scientific Committee on Consumer Products, SCENIHR: Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks) herausgegeben, die sich vor allem auch mit den Methoden zur Risikoabschätzung für gentoxische und kanzerogene Substanzen beschäftigt (*Risk assessment methodologies and approaches for genotoxic and carcinogenic substances*). Diese weist ebenfalls darauf hin, dass die Unterscheidung zwischen Karzinogenen, welche gentoxisch wirken und Karzinogenen, die über andere Mechanismen verlaufen, also nicht gentoxisch wirken, ein bestimmender Faktor für die Auswahl der Methoden zur Risikobewertung darstellt. In dieser Studie wurden neben dem wissenschaftlichen Hintergrund zur Gentoxizität und Krebsentstehung vor allem auch diverse Analysemethoden für die Untersuchung potentiell gentoxischer und krebserregender chemischer und physikalischer Agentien vorgestellt und empfohlen (Quelle: http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scher/docs/scher_o_113.pdf).

Diese Methoden wurden auch in den meisten Studien mit der Fragestellung, ob EMF DNA-Schäden verursachen könnten, zum Nachweis einer potentiellen Gentoxizität herangezogen. Die entsprechenden Methoden, die in diesem Projekt zur Anwendung kamen, sind im Folgenden aufgeführt:

Chromosomenaberrationstest: Nachweis numerischer Chromosomenaberrationen

Unter numerischen Chromosomenaberrationen versteht man Veränderungen in der Anzahl der Chromosomen pro Zelle. Man unterscheidet zwischen Chromosomenverlusten und Chromosomenzugewinnen. Letztere entstehen zum Beispiel beim Ausbleiben der Zytokinese und der damit einhergehenden Verdopplung des Chromosomensatzes in der Zelle. Man spricht in einem solchen Fall von Polyploidien. Fehlen nur einzelne Chromosomen oder –paare, bzw. sind überzählig, so spricht man von Aneuploidien.

Mikrokerntest (Mikronukleustest)

Durch klastogene oder aneugene Wirkungen der Mutagene wird das Genom geschädigt, und es verbleiben Chromosomenbruchstücke oder ganze Chromosomen im Zytoplasma, während die Chromosomen auf die beiden Tochterzellen verteilt werden. Ein im Zytoplasma verbliebenes Chromosomenfragment wird in der Telophase mit einer eigenen Kernmembran umschlossen und wird als Mikronukleus sichtbar [5]. Die Entstehung von Mikronuklei setzt eine Zellteilung voraus; diese kann unter Umständen durch die Stimulation mit einem Mitogen induziert werden. Eine Modifikation des MNT mit Cytochalasin B, welches die Zellteilung, nicht jedoch die Kernteilung verhindert, ermöglicht die gezielte Auswertung von Zellen, die nach der Mutagenexposition genau eine Mitose durchlaufen haben [6].

Wird der MNT mit der CREST-Analytik kombiniert, kann durch die spezifische Markierung der Centromere zwischen Chromosomen-haltigen und Chromosomenbruch-haltigen Mikrokernen unterschieden werden. So kann die Wirkung der Behandlung nach Aneugenität oder Klastogenität eingestuft werden.

Cometassay

Der Comet-Assay oder auch Einzelzell-Gelelektrophorese (SCGE) genannt, ist eine Methode zum sensitiven Nachweis von Strangbrüchen auf der Ebene einzelner Zellen. In seiner alkalischen Version (pH 13) ermöglicht der Comet-Assay den summarischen Nachweis von Einzel- wie Doppelstrangbrüchen (DSB), sowie auch von alkalilabilen Stellen. Durch Veränderung des pH-Werts der alkalischen Elektrophorese-Lösung lässt sich die Sensitivität des Comet-Assays bezüglich der Detektion von alkalilabilen Stellen und DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen verändern. Hat die verwendete Lösung einen niedrigeren pH-Wert, so steigt die Spezifität für Doppelstrangbrüche. Für den Comet-Assay bei pH 9 und pH 8,3 wurde gezeigt, dass DNA-DSB zu strahleninduzierter Migration der DNA führen [7, 8].

Wird der Comet-Assay in Verbindung mit einem FPG-Verdau angewendet, so lassen sich durch die spezifische Endonukleaseaktivität des FPG-Enzyms an 8-Oxo-2'-deoxyguanosinen durch reaktive Sauerstoffspezies verursachte DNA-Schäden nachweisen.

1.3 Literatur zu hochfrequenten EMF und Gentoxizität (Stand September 2012)

Die Wirkung elektromagnetischer Felder auf biologische Systeme wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht und diskutiert. Verschiedenste Zelltypen unterschiedlichen Ursprungs, wie auch ganze Organismen wurden in *in vitro* und *in vivo* Studien betrachtet. Ebenso heterogen wie die Auswahl an untersuchten biologischen Systemen ist, stellt sich auch die Ergebnislage dar. Während viele Studien keine Einflüsse von elektromagnetischen Feldern nachweisen konnten, zeigen andererseits auch einige Studien Einflüsse durch EMF allein, oder in Kombination mit zusätzlichen Behandlungen. Da sich die hier berichtete Studie mit der Untersuchung von RF-EMF auf primäre humane Fibroblasten beschäftigt, wird der Fokus der nachfolgenden Literaturübersicht (siehe auch Tabelle 5) auf die Wirkung von elektromagnetischer Strahlung auf fibroblastoide Zellen gelegt. Die Publikationen von Diem et al. [9] und Schwarz et al. [10] wurden auf Grund der äußerst unsicheren Datenlage (siehe auch [11-14]) nicht berücksichtigt.

Tabelle 5: Übersicht der Publikationen zum Einfluss von EMF auf Fibroblasten in *in vitro* Experimenten (Auflistung alphanumerisch nach Autor und Erscheinungsjahr)

Quelle	Frequenz	Exposition	Zellen	Effekte
Meltz ML, et al. 1987 [15]	350 MHz, 850 MZ, 1,2 GHz PW, CW ¹	SARs: 390 mW/kg - 2,7 W/kg	MRC-5 humane diploid Fibroblasten	DNA-Synthese, DNA-Reparatur: keine Effekte
Balcer- Kubiczek EK and Harrison GH 1989 [16]	2,45 GHz PW	SAR: 4,4 W/kg, 24 h SAR+TPA	C3H/10T(1/2) murine Fibroblasten	Zelltransformation: kein Effekt; erhöhte Zelltransformation in Verbindung mit TPA
Balcer- Kubiczek EK and Harrison GH 1991 [17]	2,45 GHz PW	SAR: 0,1; 1; 4,4 W/kg, 24 h SAR+TPA SAR+X-ray	C3H/10T(1/2) murine Fibroblasten	Plating Efficiency: kein Effekt Zelltransformation: kein Effekt; erhöhte Zelltransformation in Verbindung mit TPA
Litovitz TA, et al. 1993 [18]	915 MHz amplitude modulation, CW	SAR: 2,5 W/kg	L-929 murine Fibroblasten,	Ornithin-Decarboxylase Aktivität: erhöht bei moduliertem Signal
Cain CD, et al. 1997 [19]	836,55 MHz; PW	SAR: 0,15; 1,5; 15 mW/kg SAR+TPA	C3H/10T(1/2) murine Fibroblasten, UV/TDT10e(10e)	TPA –Zelltrans- formationsfocus: keine Effekte

¹ CW: continuous wave; PW: pulse wave

			murine Fibroblasten	
Malyapa RS, et al. 1997 [20]	2,450 GHz CW	SAR: 0,75; 1,93 W/kg 2, 4, 24 h	C3H/10T(1/2) murine Fibroblasten, U87MG humane Glioblastomazellen	DNA-Schäden (Comet-Assay): keine Effekte
Malyapa RS, et al. 1997 [21]	835,62 MHz CW, 847,74 MHz PW	SAR: 0,6 W/kg 2, 4, 24 h	C3H/10T(1/2) murine Fibroblasten, U87MG humane Glioblastomazellen	DNA-Schäden (Comet-Assay): keine Effekte
Penafiel LM, et al. 1997 [22]	835 MHz amplitude modulation, CW, PW	SAR: 2,5 W/kg	L-929 murine Fibroblasten,	Ornithin Decarboxylase Aktivität: abhängig von der Modulation, bei <i>frequency-modulation</i> kein Effekt, erhöht bei <i>amplitude modulation</i>
Goswami PC, et al. 1999 [23]	835,62 MHz FMCW ² , 847,74 MHz CDMA ³	SAR: 0,6 W/kg 2 h	C3H/10T(1/2) murine Fibroblasten	Genexpression: erhöhte Expression von <i>Fos</i> , keine Effekte für <i>Jun</i> , <i>Myc</i> DNA-Bindeaktivität von AP1, AP2, NFkB Transkriptionspartnern: keine Effekte
Li JR, et al. 1999 [24]	837 MHz CW	SAR: 0,9; 9 W/kg 2 h	humane Fibroblasten, WS1neo humane Fibroblasten mit Neomycinresistenz	p53-Expression: keine Effekte, Morphologische Veränderungen: keine Effekte
Higashikubo R et al. 2001 [25]	835,62 MHz 847,74 MHz CDMA	SAR: 0,6 W/kg bis 13 h, bis 100 h	C3H/10T(1/2) murine Fibroblasten, U87MG humane Glioblastomazellen	Zellzyklus: keine Effekte
Li L, et al. 2001 [26]	835,62 MHz FDMA ⁴ , 847,74 MHz CDMA	SAR: 3,2 – 5,1 W/kg 2, 4, 24 h	C3H/10T(1/2) murine Fibroblasten	DNA-Schäden (Comet-Assay): keine Effekte
Roti Roti JL, et al. 2001 [27]	835,62 MHz FDMA, 847,74 MHz CDMA	SAR: 0,6 W/kg 7, 42 Tage	C3H/10T(1/2) murine Fibroblasten	Zelltransformation: keine Effekte
Bisht KS, et al. 2002 [28]	835,62 MHz FDMA 847,74 MHz CDMA	SAR: 3,2; 4,8; 5,1 W/kg 3, 8, 16, 24 h	C3H/10T(1/2) murine Fibroblasten	Mikrokerntest: keine Effekte
Pacini S, et al. 2002 [29]	902,4 MHz GSM PW	SAR: 0,6 W/kg 1 h	humane dermale Fibroblasten	Veränderungen in der Zellmorphologie, erhöhte Gen-Expression von diversen Schlüsselproteinen, erhöhte DNA-Synthese

²FMCW: Frequency Modulated Continuous Wave

³CDMA: Code Division Multiple Access

⁴FDMA: Frequency Division Multiple Access

Desta AB, et al. 2003 [30]	835 MHz PW	SAR: 1, 5, 10, 15 W/kg 8 h	L-929 murine Fibroblasten	Ornitin-Decarboxylase Aktivität: keine Effekte
Koyama S, et al. 2003 [31]	HF-EMF	SAR: 13, 39, 50, 78, 100 W/kg 18 h	CHO –K1 chinesischer Hamster ovarielle Fibroblasten	Mikrokerntest: kein Effekt < 50 W/kg; Effekt > 50 W/kg
Lagroye I et al. 2004 [32]	2,450 GHz CW	SAR: 1,9 W/kg 2 h	C3H/10T(1/2) murine Fibroblasten	Comet-Assay: keine Effekte
Komatsubara Y, et al. 2005 [33]	2,45 GHz CW/PW	SAR: 5, 10, 20, 50, 100 W/kg	m5S Fibroblasten	strukturelle Chromosomen- aberrationen: keine Effekte
Laszlo A, et al. 2005 [34]	835,62 MHz FDMA; 847,74 MHz CDMA,	SAR: 0,6 W/kg, 5 W/kg	C3H 10T(1/2) murine mesenchymale Vorläufer, HA-1 Hamster ovarielle Fibroblasten, HeLa S3 humane Zervixkarzinomzellen	DNA-Bindeaktivität an <i>Heat Shock</i> -Proteine: kein Effekt
Mahrour N, et al. 2005 [35]	900 MHz GSM PW/CW	SAR: 0,65 W/kg, 5,2 W /kg	B16-F1 murine Melanomzellen; DC- 3F chineser Hamster Lungenfibroblasten; A253 Karzinomzellen	Endozytose: erhöhte Aktivität in allen drei Zelllinien
Wang J, et al. 2005 [36]	2,45 GHz CW	SAR: 5, 10, 20, 50, 100 W/kg; 2 h SAR + Methylchol- anthren, Tetradecanoyl- phorbolacetat	C3H 10T(1/2) murine mesenchymale Vorläufer	Zelltransformation: kein Effekt für SAR<100W/kg, für SAR >100 W/kg Effekt mit Methylcholanthren und TPA
Whitehead TD, et al. 2005 [37]	835,62 Hz FDMA 847,74 Hz CDMA, TDMA	SAR: 5 W/kg 24 h	C3H 10T(1/2) murine mesenchymale Vorläufer	Genexpression <i>c-Fos</i> : kein Effekt
Hirose H, et al. 2006 [38]	2,1425 GHz CW, W-CDMA ⁵	SAR: 80, 250, 800 mW/kg 24, 28, 48 h	IMR-90 humane foetale Lungen- fibroblasten, A172 humane Glioblastomazellen	keine p53-abhängige Apoptose, kein DNA- Schaden, kein Stress- Response
Höytö A, et al. 2006 [39]	900 MHz CW, PW	SAR: 0,2; 0,4 W/kg 2, 8, 24 h	L-929 murine Fibroblasten	Ornitin-Decarboxylase (ODC) Aktivität: keine Effekte
Masuda H, et al. 2006 [40]	900 MHz 1800 MHz GSM	SAR: approx. 5 W/kg	<i>in vivo</i> Haut Ratte, biopsiert nach Exposition	Histologie, Ki67: kein Effekt
Pavčić I, et al. 2006 [41]	864 MHz 935 MHz	SAR: 0,08 W/kg (864	V79 chinesischer Hamster Fibroblasten	Proliferation: verringert Koloniebildungsfähigkeit:

⁵ W-CDMA: Wideband Code Division Multiple Access

		MHz), 0,12 W/kg (935 MHz) 1, 2, 3 h		kein Effekt
Sakuma N, et al. 2006 [42]	2,1425 GHz CW , W-CDMA	SAR: 80, 250, 800 mW/kg 2-24 h	IMR-90 humane foetale Lungenfibroblasten, A172 humane Glioblastomazellen	Comet-Assay: kein Effekt
Sanchez S, et al. 2006 [43]	900 MHz GSM PW	SAR: 2 W/kg 48 h	primäre humane Hautzellen, Epidermishautmodelle	keine reinen RF-Effekte, aber Hsc70-Expression abhängig von den Kulturbedingungen reduziert in RF-exponierten Fibroblasten
Whitehead TD, et al. 2006 [44, 45]	835,62 Hz FDMA 847,74 Hz CDMA	SAR: 5 W/kg 24 h	C3H 10T(1/2) murine mesenchymale Vorläufer	Genexpression: kein Effekt
Xie L, et al. 2006 [46]	1800 MHz GSM moduliert by 217 Hz or 50 Hz, or unmoduliert	SAR: 0,1; 0,5; 1; 2; 4 W/kg	chinesischer Hamster Lungenfibroblasten (CHL)	Clusterbildung von EGFR nach 0,5 W/kg und höher; keine Effekte bei 0,1 W/kg oder bei unmodulierten Signalen
Zhang DY, et al. 2006 [47]	1800 MHz GSM intermittierend: 5 min on/10 min off	SAR: 3,0 W/kg 1 h, 24 h	chinesischer Hamster Lungenfibroblasten (CHL)	signif. erhöhte Anzahl von gamma-H2AX positive Zellen nach 24 h Exposition; kein Effekt nach 1 h
Hirose H, et al. 2007 [48]	2,1425 GHz CW, W-CDMA	SAR: 80, 800 mW/kg 2-48 h	IMR-90 humane foetale Lungenfibroblasten, A172 humane Glioblastomazellen	Hsp27-Phosphorylierung: kein Effekt HSP-Expression: kein Effekt
Höytö A, et al. 2007 [49, 50]	872 MHz CW oder moduliertes GSM 217 Hz 835 MHz CW, PW	SAR: 1,5; 2,5; 6 W/kg 2, 8, 24 h	L-929 murine Fibroblasten, SH-5Y5Y humane Neuroblastomaz., C6 Ratten Glioblastomazellen, primäre Rattenastrozyten	Ornitin-Decarboxylase (ODC) Level vermindert in Astrozyten keine Effekte in den anderen Zelllinien
Sanchez S, 2007 [51]	1800 MHz GSM moduliert 217 Hz	SAR: 2 W/kg 48 h	primäre humane Fibroblasten und Keratinozyten	HSP-Expression, Apoptose: keine Effekte
Speit G, et al. 2007 [52]	1800 MHz CW intermittierend GSM	SAR: 1, 2 W/kg 1, 4, 18, 22, 24 h	ES1 humane Fibroblasten, V79 chinesischer Hamster Fibroblasten	Mikrokerntest: keine Effekte Comet: keine Effekte
Hirose H, et al. 2008 [53]	2,1425 GHz W-CDMA	SAR: 80, 800 mW/kg über 6 Wochen	BALB/3T3 murine Fibroblasten (clone A31-1-1)	maligne Zelltransformation: kein Effekt

Höytö A, et al. 2008 [54]	872 MHz CW oder moduliertes GSM 217 Hz	SAR: 5 W/kg 1 h, 24 h	L-929 murine Fibroblasten	Ornitin-Decarboxylase Aktivität: keine Effekte Caspase 3 Aktivität: keine Effekte
Höytö A, et al. 2008 [55]	872 MHz CW oder moduliertes GSM	SAR: 5 W/kg 1 h, 24 h	L-929 murine Fibroblasten SH-SY5Y humane Neuroblastoma- zellen	CW: keine Effekte GSM: Effekte: Lipidperoxidation durch t- BOOH erhöht in SH-SY5Y, Menadion-induzierte Caspase 3 Aktivität in L929
Karinen A, et al. 2008 [56]	RF-EMF	SAR: 1,3 W/kg	<i>in vivo</i> Haut, biopsiert nach Exposition	Proteinexpression: beeinflusst
Kim JY, et al. 2008 [57]	835 MHz	SAR: 4 W/kg, SAR + Cyclo- phosphamid oder 4- nitroquinoline 1-oxide	chinesischer Hamster Lungenfibroblasten CHL L5178Y Tk ^(+/-) murine Lymphomazellen	Comet-Assay: keine, aber Effekte in Kombination mit Klastogenen; Chromosomen- aberrationen: keine Effekte
Lee JJ, et al. 2008 [58]	849 MHz CDMA	SAR: 2, 10 W/kg	V79 chinesischer Hamster Fibroblasten	Invasion, Migration: Viabilität, Zellteilung, Proliferation: keine Effekte
Pavicić I, Trosic I, 2008 [59]	935 MHz	SAR: 0,12 W/kg 1, 2, 3h	V79 chinesischer Hamster Fibroblasten	Verlangsamung der Zell- proliferation über Störung der Mikrotubulstruktur bei 3 h Exposition
Pavicić I, Trosic I, 2008 [60]	864 MHz 935 MHz	SAR: 0,08 W/kg (864 MHz) 0,12 W/kg (935 MHz) 1, 2, 3h	V79 chinesischer Hamster Fibroblasten	Proliferation: vermindert, Viabilität und klonogenes Überleben: kein Effekt
Schrader, T et al. 2008 [61]	835 MHz CW	Feldstärke (RMS) 90 V/m SAR: approx. 60 mW/kg	FC2 Human-Hamster hybrid (A(L)) Zellen	Spindelstörungen in Ana- und Telophase
Belyaev I, et al. 2009 [62]	905 MHz – 1,9474 GHz GSM, UMTS	SAR: 37 mW/kg	humane mesenchymale Stammzellen, VH-10 primäre humane Fibroblasten	DNA-Doppelstrangbruch- reparatur über 53BP1-Foci: Inhibition der Foci-Bildung in Vorläuferzellen, aber nicht in differenzierten Zellen
Billaudel B, et al. 2009 [63]	835, 900, 1800 MHz DAMPS ⁶ GSM; 217 Hz moduliertes GSM-900 GSM-1800	SAR: 0,5; 1; 2,5; 6 W/kg 2, 7, 8, 24 h	L-929 murine Fibroblasten	Ornitin-Decarboxylase (ODC) Aktivität: kein Effekt
Sannino A, et	900 MHz, GSM	SAR: 1 W/kg	humane Fibroblasten	Mikrokerntest: kein Effekt

⁶ DAMPS: Digital Advanced Mobile Phone System

al. 2009 [64]		SAR: 1 W/kg + 3-chloro-4-(di- chloromethyl)- 5-hydroxy- 2(5h)-furanone		Comet-Assay: kein Effekt
Trosic I, et al. 2009 [65]	935 MHz	SAR: 0,12 W/kg 1, 2, 3 h	V79 chinesischer Hamster Fibroblasten	Verlangsamung der Zell- proliferation über Störung der Mikrotubulstruktur
Bourthoumieu S, et al. 2010 [66]	900 MHz GSM	SAR: 0,25 W/kg 24h	humane Amnionzellen	numerische, strukturelle Chromosomenstörungen: keine Effekte
Gerner C, et al. 2010 [67]	1,8 GHz GSM, PW	SAR: 2 W/kg	Jurkat humane Lymphoblastoid T Zellen, Fibroblasten, primäre humane weiße Blutzellen (ruhend und stimuliert)	Proteinexpression: erhöht in Fibroblasten und Jurkat Zellen, weniger in weißen Blutzellen; Effekte voll reversibel innerhalb von 2 h
Sekijima M, et al. 2010 [68]	2,1425 GHz CW W-CDMA	SAR: 80, 250, 800 W/kg; bis 96h	IMR-90 humane foetale Lungen- fibroblasten A172 humane Glioblastomazellen, H4 humane Neurogliomazellen	keine: (Zellwachstum, - viabilität: keine Genexpression (Affymetrix) <1% Regulation)
Bourthoumieu S, et al. 2011 [69]	900 MHz GSM	SAR: 0,25, 1, 2, 4 W/kg	humane Amnionzellen	Aneuploidien (FISH): keine Effekte
Schrader T, et al. 2011 [70]	900 MHz CW	Feldstärke (RMS) 45, 90 V/m	Human-Hamster hybrid (A(L)) Zellen	Spindelstörungen in Ana- und Telophase des Zellzyklus
Sunkari VG, et al. 2011 [71]	1 GHz	Leistungsfluss- dichte: 5 nWc/m ² 20 min	humane dermale Fibroblasten	Proliferation, Migration, Genexpression (FGF1): alle Endpunkte erhöht durch EMF-Exposition
Bourthoumieu S, et al. 2012 [72]	900 MHz GSM	SAR: 0,25, 1, 2, 4 W/kg	humane Amnionzellen	kein Einfluss auf p53 Expression und Phosphorylierung
Hintzsche H, et al. 2012 [72]	900 MHz CW	Feldstärke (RMS) 5, 10, 30, 90 V/m	HaCaT humane Keratinocyten Human-Hamster hybrid (A(L)) Zellen	Mikrokerntest: kein Effekt
Yang L, et al. 2012 [73]	916 MHz CW	Leistungsfluss- dichte: 10, 50, 90 W/m ²	NIH/3T3 murine Fibroblasten	Neoplastische Transformation: Zeit- und Dosis-abhängige Induktion der neoplastischen Transformation

Insgesamt zeigt sich auch für Fibroblastenzellen über die letzten 25 Jahre hinweg ein eher inhomogenes Bild. Es kann jedoch gesagt werden, dass die Exposition mit sehr hohen SAR-Werten nicht notwendigerweise auch zu positiven

Effekten führt. Betrachtet man die Literatur (Tabelle 5), so wurden die meisten Effekte mit SAR-Expositionen im Bereich von 0,08 – 5 W/kg gefunden [18, 22, 23, 29, 35, 41, 43, 46, 47, 56, 59-62, 65, 67, 70, 71]. Einige Publikationen können keine reinen EMF-Effekte nachweisen, zeigen jedoch einen Einfluss, wenn die Exposition mit einer zusätzlichen Behandlung mit spezifischen Agenzien, wie zum Beispiel Klastogenen, kombiniert wird [16, 17, 36, 55, 57]. Ein Großteil der Untersuchungen über die Exposition fibroblastoider Zellen zeigt allerdings keine Effekte [15, 19-21, 24-28, 30-34, 37-40, 42-45, 48-54, 58, 63, 64, 66, 68, 69, 72, 74].

Eine direkte Beziehung zum Projekt StSch4504 zeigt die Studie von Speit et al. [52], die sich gezielt mit den widersprüchlichen früheren Resultaten von Diem et al. [9] (REFLEX-Studie) befasste. Hier wurden dieselben Zellen, dasselbe Equipment und dieselben Expositionsbedingungen wie in der REFLEX-Studie verwendet. Es wurden ES1-Zellen für verschiedene Zeiten mit RF-EMF behandelt (1800 MHz; SAR 2 W/kg, kontinuierliche Welle mit intermittierender Exposition). Sowohl im alkalischen Comet-Assay (pH>13), als auch im Mikrokern-Test (MNT) wurden eindeutig negative Resultate in unabhängigen Experimenten gezeigt. Auch mit V79-Zellen, einer empfindlichen Chinese Hamster-Zelllinie, welche standardmäßig in Gentoxizitätstests eingesetzt wird, konnten keine gentoxischen Effekte nachgewiesen werden. Angemessene Kontrollen schlossen eine Varianz in der Durchführung der Tests ebenso wie einen Ausfall der RF-EMF-Exposition oder Auswertefehler aus. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch eine ganze Reihe weiterer Gruppen, die ebenfalls den Einfluss einer EMF Exposition auf fibroblastoide Zellen über Comet-Assay und/oder Mikrokerntestanalysen untersuchten [20, 21, 26, 28, 31, 32, 42, 57, 64, 74].

In einer anderen Studie von Whitehead et al. [44, 45] wurden *in vitro*-Experimente mit C3H10T(1/2) Mauszellen durchgeführt, um zu untersuchen, ob Radiofrequenzen, die per *Frequency Division Multiple Access* (FDMA) oder *Code Division Multiple Access* (CDMA) moduliert waren, Veränderungen der Genexpression hervorrufen können. Nachdem die Zellen einer der beiden Modulationen für 24 h bei einer spezifischen Absorptionsrate (SAR) von 5 W/kg ausgesetzt worden waren, wurden RNA-Analysen mittels GenChip der bestrahlten und Schein-behandelten Proben durchgeführt. Die GenChip-Daten wurden mit einem *two-tailed t-Test* ausgewertet, und die erwartete Anzahl der Falschpositiven wurde aus dem T-Test mit 20 Permutationen der 6 Schein-behandelten Proben

abgeschätzt. Während bei Röntgen-bestrahlten Proben 90 Regulationen mit einer mehr als 1.3-fach erhöhten Expressionsrate gegenüber den Falschpositiven nachgewiesen wurden, zeigten Proben nach CDMA- und FDMA-Exposition nur Veränderungen, die kleiner oder gleich der Anzahl an Falschpositiven waren. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass eine 24-Stunden-Exposition mit FDMA- oder CDMA-RF-Strahlung bei 5 W/kg keine statistisch signifikanten Effekte auf die Genexpression hatte. Sekijima et al. [68] konnten auch bei Expositionen mit SAR-Werten, die deutlich über dem Grenzwert liegenden, in einer breit angelegten Affymetrix-Analyse ebenfalls keine signifikante Veränderung in der Genregulation nach EMF nachweisen. In den Studien von Goswami et al. [23] und Pacini et al. [29] wurden Veränderungen der Genexpression nach 2 [23] bzw. 1-stündiger [29] Befeldung mit 0,6 W/kg in Fibroblasten nachgewiesen. Auch auf Transkriptionsebene zeigen zwei Studien einen Einfluss auf die Expression von Proteinen [56, 67]. Karinen et al. [56] zeigen dies für *in vivo* Exposition mit 1,3 W/kg von humaner Haut. Gerner et al. [67] zeigen in *in vitro* Versuchen in mehreren Zellentypen, auch Fibroblasten, einen Einfluss auf die Proteinexpression durch 2 W/kg. Allerdings stellten sie auch fest, dass sich diese Effekte innerhalb von 2 h vollständig als vollständig reversibel zeigten.

Eine Studie von Sanchez et al. [43] befasst sich mit den möglichen Strahlungseffekten von *Global System for Mobile phone communication* bei 900 MHz (GSM-900) auf kultivierte humane Hautzellen, sowie auf rekonstruierte Epidermis aus humanen Keratinozyten. Als Stressmarker wurde die Expression von Hsc70, Hsp27 und Hsp70 Hitzeschockprotein (HSP), die epidermale Dicke sowie die Zellproliferation und die Apoptose verwendet. Die Zellen wurden unter optimalen Bedingungen für 48 h GSM-900-Strahlung bei einer spezifischen Absorptionsrate (SAR) von 2 W/kg ausgesetzt. Die Apoptose wurde in isolierten Zellen nicht induziert, und die Dicke der Epidermis wie auch die Proliferation war nicht verändert. Die HSP-Expression war in isolierten Keratinozyten unverändert. Hingegen war eine leichte, aber signifikante Erhöhung der Hsp70-Expression bei der rekonstruierten Epidermis nach 3 bis 5 Wochen zu verzeichnen. Ferner zeigten, abhängig von den Kulturbedingungen, Fibroblasten eine signifikante Verringerung von Hsc70. Sanchez et al. schließen daraus, dass zwar ein adaptives Verhalten, abhängig vom Zelltyp und den Kulturbedingungen, nach RF-EMF-Exposition auftreten kann, dieses jedoch keine schädlichen Auswirkungen auf Gewebeebene haben dürfte. In einer späteren

Studie mit GSM-1800 konnten Sanchez et al. keine Einflüsse auf die Hsp-Expression feststellen [51]. In wie weit eine Abhängigkeit von der Frequenz tatsächlich gegeben ist, bleibt in diesem Falle unklar. Weitere Studien, die sich mit der Induktion von *heat shock*-Proteinen durch EMF-Befeldung beschäftigten zeigen weder Effekte auf die Expression von Hsp-Proteinen [48] noch auf die Stress-induzierte Bindung dieser an die DNA [34].

Hirose et al. [38] befassten sich in einer groß angelegten *in vitro*-Studie mit der Wirkung von schwachen Radiofrequenzfeldern (RF) von Mobilfunk-Stationen auf Basis von *International Mobile Telecommunication 2000* (IMT-2000)-Systemen. Es sollte die Hypothese getestet werden, ob modulierte RF-Felder Apoptose oder andere zelluläre Stressantworten, wie p53-Expression oder den p53-Signalweg induzieren. Zunächst haben sich die Autoren mit der Antwort von humanen Zellen auf Mikrowellen-Exposition bei einer spezifischen Absorptionsrate (SAR) von 80 mW/kg befasst, was dem Ganzkörper-SAR für die allgemeine Öffentlichkeit entspricht, wie er durch die Richtlinien der *International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection* (ICNIRP) definiert wurde. Zweitens wurde untersucht, ob kontinuierliche Wellen (CW) und RF-Felder durch *wideband code division multiple access* (W-CDMA)-modulierte Signale bei 2.1425 GHz Apoptosen oder irgendwelche Stressanzeigen hervorrufen. Humane IMR-90 Fibroblasten aus fötalen Lungen wurden sowohl W-CDMA- wie auch CW-Strahlung von 80 mW/kg SAR für 28 h ausgesetzt. Unter den oben genannten RF-Feld-Bedingungen wurden keine signifikanten Unterschiede der Rate von apoptotischen Zellen in AnnexinV-Analysen zwischen bestrahlten und scheinbehandelten Proben festgestellt. Ebenso zeigte sich kein Unterschied im Expressions- und Phosphorylierungslevel von p53. Auch zeigten Microarray-Hybridisierung und Real-time-PCR keine Unterschiede in den p53 nachgeschalteten Proteinen der Signalkaskade. Dies zeigt, dass eine schwache Exposition mit RF-Signalen von 80 mW/kg keine p53-abhängige Apoptose, keine DNA-Schädigung oder eine andere Stressantwort in den getesteten humanen Fibroblasten induzierte. Mehrere Gruppen, die sich mit der Induktion von apoptotischen Ereignissen ausschließlich durch EMF-Befeldung beschäftigt haben, konnten trotz Analyse verschiedener Apoptose-assoziiierter Endpunkte, keine Induktion der Apoptose nachweisen. So konnte in Bezug auf die Expression und Aktivierung von p53 und den p53-abhängigen Signalkaskaden kein Einfluss durch EMF nachgewiesen werden [24, 38, 72]. Auch Nachweise der apoptotischen

Ereignisse, induziert durch EMF selbst, konnten bislang nicht erbracht werden [38, 51, 54, 60].

In einer weiteren Studie von Hirose et al. [53] wurde untersucht, ob schwache Mobilfunk-Strahlung (IMT-2000) eine Zelltransformation hervorrufen kann. Hier wurden murine BALB/3T3-Fibroblasten kontinuierlich RF-Feldern von 2.1425 GHz W-CDMA bei SARs von 80 und 800 mW/kg für 6 Wochen ausgesetzt, um dann die maligne Zelltransformation zu bestimmen. Zusätzlich wurden mit 3-Methylcholanthren (MCA)-behandelte Zellen in vergleichbarer Weise der Befeldung ausgesetzt, um die Tumorausbreitung zu analysieren. Zudem wurde der Einfluss von RF-Feldern auf eine gemeinsame Tumorpromotion durch MCA und 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) bestimmt. Es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den verschiedenen bestrahlten versus Schein-behandelten Testansätzen, weder in unbehandelten, noch in MCA- bzw. MCA- plus TPA-behandelten Zellen. Somit ergab sich kein Hinweis auf eine transformierende Wirkung von RF-Befeldung bis zu 800 mW/kg. Vergleichbare Effekte beschrieben Cain et al. bereits 1997 [19] und Roti Roti et al. 2001 [27]. Dem entgegen stehen die Studien von Balcer-Kubiczek et al. [16, 17], die in C3H/10T(1/2) Zellen eine erhöhte Transformationsrate durch EMF-Befeldung in Verbindung mit TPA feststellten. Wang et al. [36] konnten ebenfalls einen EMF-Einfluss auf die Zelltransformation in Verbindung mit Methylcholanthren und TPA feststellen, jedoch erst ab SAR-Werten von 100 W/kg. Eine Vergleichbarkeit zu den Studien von Hirose [53] gestaltet sich somit schwierig. In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Yang et al. wurde eine erhöhte neoplastische Transformation mit befeldeten NIH/3T3 Fibroblasten festgestellt. Die Induktion der Transformation verlief zudem Zeit- und Dosis-abhängig. Allerdings liegt auch hier die niedrigste eingesetzte Leistungsflussdichte von 10 W/m^2 bereits am Strahlenschutzrichtwert und deutlich über den üblicherweise gemessenen Expositionen [75].

Höytö et al. [49, 54, 55] untersuchten in mehreren Studien murine L-929 Fibroblasten, sowie auch diverse andere Zelllinien, bei 872 MHz mit SARs von 1,5 bis 6 W/kg. In diesen Studien zeigten sich gerade die murinen Fibroblasten als unempfindlich gegenüber einer EMF Exposition. Jedoch zeigte sich, dass in Kombination mit einem toxischen Agens eine erhöhte Sensitivität der EMF-befeldeten Zellen nachgewiesen werden kann. Es zeigte sich im Vergleich zu unbefeldeten Fibroblasten eine erhöhte Menadion-induzierte Caspase 3-Aktivität in

exponierten Fibroblasten. Höytö et al. schlussfolgern, dass die erhöhte Sensitivität ein Zufallsbefund sein könnte, jedoch sich wahrscheinlich eher zeigt, dass RF-Effekte nur in Kombination mit einer zusätzlichen Schädigung durch chemische Noxen auftreten. Hierzu passend sind auch die Studien von Balcer-Kubiczek et al. [16, 17], Wang et al. [36] und Kim et al. [57], welche ebenfalls nur dann einen EMF-Effekt beobachten, wenn zusätzlich zur Befeldung ein schädigender Stimulus gegeben wird.

Pavicic und Trosic stellten in mehreren Studien einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation von befeldeten murinen V79 Fibroblasten [41, 59, 60, 65] fest. Als Ursache hierfür sehen Sie die Störung der Mikrotubulstruktur. Signifikante Störungen des Spindelapparates zeigen auch die Studien von Schrader et al. [61, 70]. Sie konnten zeigen, dass die Befeldung mit EMF einer Frequenz von 900 MHz zu Störungen der Spindel in Ana- und Telophase der Zellteilung führt. Eine Reduktion der Mitoserate konnten Schrader et al. allerdings nicht feststellen. So steht die Vermutung, dass es hier Chromosomenverluste geben könnte, die jedoch keinen Einfluss auf die zeitnahe Zellteilung zeigen. Bourthoumieu et al. untersuchten aneuploide Effekte durch 900 MHz GSM bei 0,25 - 4 W/kg SAR, jedoch in humanen Amnionzellen [69]. Sie konnten jedoch Aneuploideeffekte, weder für numerische Chromosomenaberrationen [66], noch über FISH-Analysen für Chromosom 11 und 17 [69] feststellen.

Eine ganze Reihe von Gruppen hat sich auch mit dem Einfluss auf die Ornithin-Decarboxylase (ODC) Aktivität unter EMF-Befeldung beschäftigt. ODC ist ein Schlüsselenzym in der Polyamin-Biosynthese. Dieses ist an essentiellen, zellulären Prozessen wie dem Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und der Proteinbiosynthese beteiligt. Eine erhöhte Expression und Aktivität von ODC ist auch während der neoplastischen Transformation und in Tumorzellen nachweisbar [76]. Litovitz et al. [18] und auch Penafiel et al. [22] zeigten bei Befeldung unter moduliertem EMF-Signalen eine erhöhte Aktivität von ODC in L-929 Fibroblasten. Sie führten die Stimulation der ODC vor allem auf die Modulation zurück. Neuere Studien von Desta, et al. [30], Höytö et al. [39, 49, 50, 54] und Billaudel et al. [63] konnten diese Ergebnisse allerdings nicht bestätigen; in ihren Studien zeigte sich keine veränderte Ornithindecaboxylaseaktivität.

Um einen ausgewogenen Überblick über die Literatur zu EMF-Effekten zu geben, sollten abschließend noch einige Arbeiten erwähnt werden die sich mit Untersuchungen beschäftigten, die nicht an Fibroblastenzellen durchgeführt wurden. Gerade in einigen *in vivo* Studien konnten Veränderungen durch elektromagnetische Befeldung nachgewiesen werden. So zeigten zum Beispiel Ntzouni et al. [77], dass Mäuse, die mit 0,22 W/kg (SAR) befeldet worden sind, im *non-spatial memory task assay* starke Erinnerungsdefizite wenn die Befeldung während der Erinnerungskonsolidierungs-phase erfolgte. Passend dazu wurden kürzlich auch Effekte in Ratten bei einer EMF-Befeldung mit 2,45 GHz und 6 W/kg SAR von Yang et al. [75] gefunden. Eine 2048 Gene umfassende Expressionsstudie zeigte Veränderungen für mehrere relevante Stressgene, einschließlich der Hochregulation von Hsp27 und Hsp70 im Hippocampus. Dies lässt nach Meinung der Autoren schließen, dass EMF-Exposition Stressreaktionen im Hippocampus auslösen kann. Die ebenfalls 2012 erschienene Studie von Tasset et al. [78] zeigt hingegen positive Effekte bei der Exposition mit sogenanntem EL-EMF (*extremely low-frequency EMF*). Es konnten in einem Rattenmodell zur Huntington Krankheit Verbesserung in Bezug auf das Zellüberleben und das Verhalten der befeldeten Tiere nachgewiesen werden. Diese positiven Veränderungen führen die Autoren auf veränderte Level an exprimierten Wachstumsfaktoren, einer Reduktion an oxidativem Stress, sowie einem verringerten Absterben an neuronalen Zellen in den Tieren zurück. Möglicherweise könnte sich hier, nach Meinung von Tasset et al., ein Einsatz in der Therapie positive Effekte für Huntington-Patienten zeigen.

Generell muss die Literatur für eine Risikoabschätzung sehr sorgfältig geprüft werden. So weisen auch Dämvik und Johansson [79] darauf hin, dass im Zuge der Vorbeugung vor Schaden eine Exposition nicht erfolgen sollte, wenn die Sicherheit der betreffenden Behandlung/des betreffenden Agens für die Gesundheit der Betroffenen nicht untersucht worden ist. Ebenso wenig sollte sie aber auch zum Einsatz kommen, wenn ihre Sicherheit nicht eindeutig nachgewiesen wurde. In ihrer Studie stellten sie fest, dass bei der Evaluierung möglicher Risiken durch EMF-Exposition dieses Prinzip häufig nicht ernst genug genommen wird und möglicherweise potentielle Risiken gar ignoriert werden. Daher ist es von großer Bedeutung die Risikoabschätzung zur EMF-Exposition durch gut strukturierte Studien unter definierten Bedingungen zu stützen. Mit Sicherheit sollte zukünftig

auch ein Fokus auf EMF-Befeldung im Zusammenhang mit anderen Noxen gelegt werden, da gerade die vielfache Exposition des Menschen unter unterschiedlichsten Parametern letztendlich ausschlaggebend sein dürfte, wann und ob die Agentien im Einzelnen einen Einfluss ausüben können.

1.4 Studiendesign

Aufgabe des Vorhabens war es, mögliche DNA- oder Chromosomen-schädigende Wirkungen der für Mobilfunksysteme genutzten hochfrequenten elektromagnetischen Felder im Rahmen einer verblindeten Studie zu untersuchen. Als gentoxikologische Endpunkte wurden im Comet-Assay Einzel- und Doppelstrangbrüche, bzw. alkalilabile Stellen, oxidative DNA-Schäden, sowie aneugene Effekte über numerische Chromosomenaberrationen und die Induktion von Mikrokernen mit CREST-Analytik untersucht. Fibroblastenkulturen in niedriger Passage von adulten und juvenilen Spendern wurden mit gepulsten GSM 1800 Mobilfunksignalen befeldet um mögliche Effekte in diesen Zielzellen zu untersuchen.

An dieser Studie waren sechs Institute beteiligt (siehe auch Abbildung 2). Die *TU Darmstadt* übernahm die Projektleitung, sowie auch die Auswertung der Tests zur Aneugenität (num. Chromosomenaberrationen, Mikronukleustest) und Apoptose (TUNEL). Das *DZB* übernahm die Rekrutierung der Probanden, sowie die Biopsierung sowie Anzucht und den Versand der Fibroblasten. Zudem wurden die Zellzyklusanalysen vom *DZB* durchgeführt. Bei *INCOS* erfolgte die verblindete Exposition der Zellen, sowie Herstellung und Versand aller Präparate. An der *HDA* erfolgte die Auswertung der Comet-Assays mit und ohne FPG-Verdau. *ITIS* übernahm die Wartung und Kontrolle der Expositionsanlage, sowie die Entblindung der Befeldungsdatensätze. Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte am *IMBEI*.

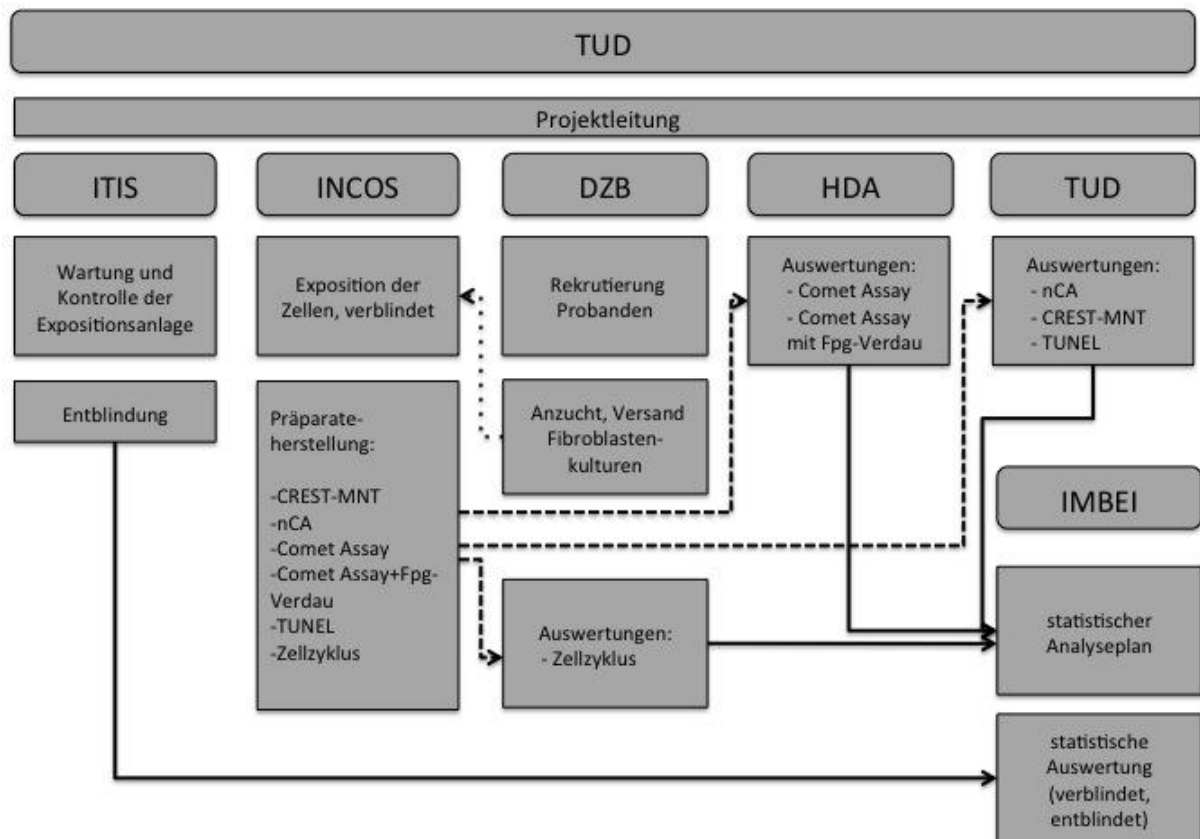


Abbildung 2: Schemata des Studiendesigns. Beteiligte Institute: TUD – Technische Universität Darmstadt, ITIS - ITIS Foundation for Research on Information Technologies in Society Zürich, INCOS – Incos Bote Mainz, DZB – Dermatologisches Zentrum Buxtehude, HDA – Hochschule Darmstadt, IMBEI - Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik Mainz. (Flusslinien: gepunktet: Zellaustausch, gestrichelt: Präparatefluss, schwarz: Datenfluss)

2 Material und Methoden

2.1 Auswahl der Probanden

Die in den Versuchen verwendeten Fibroblastenkulturen wurden aus Biopsieproben gesunder Spender gewonnen. Als Spender sollten 10 Jugendliche unter 18 Jahren und 10 Erwachsene aus der Altersgruppe 50–60 Jahre (allesamt Nichtraucher) rekrutiert werden. Da sich die Rekrutierung von Minderjährigen erfahrungsgemäß als schwierig erweisen würde, hinsichtlich der Ethikkommission als auch der Einverständniserklärung der Eltern (diese musste auf jeden Fall eingeholt werden, da die Biopsienahme ein invasiver Eingriff ist, der anders bewertet wird als beispielsweise eine Blutentnahme), wurde abweichend von der ursprünglichen Projektbeschreibung in Absprache mit dem BfS bei der Gruppe von jungen Spendern auf 19-20jährige zurückgegriffen.

Für die Befragung waren 15 Probanden aus jeder der beiden Gruppen vorgesehen, um eine Probandenanzahl von je 12 pro Alterskollektiv garantieren zu können. Es waren also jeweils zwei Probanden mehr vorgesehen als gefordert, um etwaige Verluste von Präparaten durch Fehler im Labor oder durch Transportschäden schnell durch einen weiteren bereits rekrutierten Probanden ausgleichen zu können. Es wurden insgesamt 10 Probanden im Alter von 18-19 Jahren und 13 Probanden im Alter von 50-60 Jahren biopsiert.

2.2 Fragebogen und Anamnese

Die Anamnese erfolgte auf der Grundlage eines Fragebogens (siehe Anhang 5.1) durch einen Arzt des Dermatologischen Zentrums am Elbeklinikum Buxtehude (*DZB*) vor der ersten Biopsieentnahme. Die Anamnesedaten wurden anonym gespeichert.

Der Fragebogen zielte darauf ab, unter Berücksichtigung der Vorgaben des BfS möglichst homogene Probandengruppen zu erhalten. Dabei wurden Gesundheit, Lebensstil, Ernährung sowie die Inanspruchnahme medizinischer Leistungen nach klaren Ausschlusskriterien abgefragt. Darüber hinaus sollten die Probanden bspw. nicht stark übergewichtig sein, keine besondere Ernährungsform ausüben (vegetarisch, Diät u.a.), keine Extremsportler sein, keinen übermäßigen Alkoholkonsum betreiben, nicht kürzlich geimpft, geröntgt oder operiert worden sein, keine allergischen Beschwerden aufweisen und auch keiner besonderen Medikation unterliegen.

2.3 Studienpopulation

Die folgenden Daten beziehen sich auf den Analysedatensatz mit den 20 Probanden, aus deren Biopsien Fibroblasten befördert wurden. Die Probanden mussten neben der Einverständniserklärung noch einen Fragebogen mit insgesamt 28 Fragen zu personenbezogenen Daten wie Alter, Geschlecht, Beruf, gesundheitlicher Zustand, sowie Fragen zum Alkoholkonsum, Raucherstatus und zur Mobilfunkexposition beantworten.

In den folgenden Tabellen werden die personenbezogenen Daten der Probanden dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht über die personenbezogenen Daten, aufgeschlüsselt nach älteren und jüngeren Probanden

Variable		Ältere Probanden (n=10)	Jüngere Probanden (n=10)
Alter	Mittelwert $\pm$ STD (Min - Max)	54.80 $\pm$ 3.01 (50 - 59)	18.30 $\pm$ 0.48 (18 - 19)
	Weiblich	8	4
Geschlecht	Männlich	2	6
Körpergröße	Mittelwert $\pm$ STD (Min - Max)	170.6 $\pm$ 5.99 (160 - 178)	179.1 $\pm$ 9.28 (163 - 193)
	Gewicht	82.0 $\pm$ 22.95 (59 - 118)	70.2 $\pm$ 8.40 (56 - 83)
seit der Geburt in Hamburg	Ja (Anzahl)	6	8
	Nein (Anzahl)	4	2
Gesundheits- zustand	Sehr gut (Anzahl)	2	2
	gut (Anzahl)	6	6
	zufrieden (Anzahl)	1	2
	keine Angabe (Anzahl)	1	0
Herz- und Kreislauf- erkrankungen	Ja (Anzahl)	2	0
	Nein (Anzahl)	10	10
Diabetes	Ja (Anzahl)	0	0
	Nein (Anzahl)	10	10
Allergien	Ja (Anzahl)	3	1
	Nein (Anzahl)	7	9
Heuschnupfen	Ja (Anzahl)	3	1
	Nein (Anzahl)	7	9
Krebs-erkrankungen	Ja (Anzahl)	0	0
	Nein (Anzahl)	10	10
Sport treiben	Ja (Anzahl)	8	8
	Nein (Anzahl)	2	2
Wieviel Stunden pro Woche Sport	Mittelwert $\pm$ STD (Min - Max)	3.88 $\pm$ 2.03 (1 - 7)	6.80 $\pm$ 2.95 (4 - 11)
	Täglich bis 15 Min bis 1 Std (Anzahl)	0	1
Telefonieren	Täglich < 15 Min (Anzahl)	1	2
	Mehrmals pro Woche (Anzahl)	6	4
	Seltener (Anzahl)	3	3
Wohnen in Nähe eines Sendemasten	Ja (Anzahl)	2	1
	Nein (Anzahl)	5	8
	Weiß nicht (Anzahl)	3	1

Tabelle 7: Übersicht der Häufigkeiten vom Geschlecht aller Probanden

	<i>N</i>	<i>PctN</i>
<i>All</i>	20	100
<i>Geschlecht</i>		
<i>weiblich</i>	12	60.0
<i>männlich</i>	8	40.0

Tabelle 8: Übersicht der Häufigkeiten vom Geschlecht getrennt nach jüngeren und älteren Probanden

	<i>N</i>			<i>PctN</i>		
	<i>Altersgruppe</i>			<i>Altersgruppe</i>		
	<i>All</i>	<i>junge Probanden</i>	<i>ältere Probanden</i>	<i>All</i>	<i>junge Probanden</i>	<i>ältere Probanden</i>
<i>All</i>	20	10	10	100	100	100
<i>Geschlecht</i>						
<i>weiblich</i>	12	4	8	100	33.3	66.7
<i>männlich</i>	8	6	2	100	75.0	25.0

Tabelle 9: Mittelwert und Standardabweichung von allen Probanden

	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
<i>Alter</i>	36.55	18.84	18.00	59.00

Tabelle 10: Mittelwert und Standardabweichung vom Alter getrennt nach jüngeren und älteren Probanden

		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
<i>Alter</i>	<i>Altersgruppe</i>				
	<i>junge Probanden</i>	18.30	.4830	18.00	19.00
	<i>ältere Probanden</i>	54.80	3.011	50.00	59.00

2.4 Gewinnung der Fibroblastenkulturen

Die Entnahme der Proben erfolgte nach Genehmigung der Ethikkommission wie folgt: Die Probanden wurden auf mögliche Risiken bei der Probenentnahme (allergische Reaktion auf das Lokalanästhetikum, Wundheilungsstörung, Infektion, Narbenbildung) hingewiesen, und es wurde eine schriftliche Einwilligung (siehe Anhang 5.2) eingeholt. Die Probennahme erfolgte im Elbeklinikum Buxtehude durch

einen Arzt des Dermatologischen Zentrums. Die Biopsie wurde unter lokaler Betäubung mittels einer 6 mm Stanze am Gesäß des Probanden entnommen. Unter Kulturbedingungen wanderten die Fibroblasten aus dem entnommenen Hautstück aus (Explantatkultur). Nach etwa 4 Wochen hatte sich eine reine Fibroblastenkultur entwickelt. Die Zellen wurden weiter kultiviert und in der 3. - 5. Passage an das Befeldungslabor (*INCOS*) geschickt. Von jeder Kultur wurden bei der letzten Passage vor dem Versand außerdem zwei Proben mit je 5×10^5 Zellen kryokonserviert, damit Zellen für Wiederholungsversuche oder sonstiger Nachuntersuchungen verfügbar waren.

2.5 Befeldung

Das DZB versendete die Fibroblastenkulturen in Zellkulturflaschen (also nicht kryokonserviert) in Passage 3 - 5 an das Befeldungslabor (*INCOS*). Dort erfolgte zunächst eine weitere Kultivierung, die wenigstens zwei Passagen umfasste, um mit der dabei einhergehenden Beobachtung der Kultur eine eventuell während des Transports entstandene Schädigung ausschließen zu können. Die Befeldung erfolgte dann in Passage 7 - 10. Es wurde damit sichergestellt, dass die Untersuchungen mit Kulturen in niedriger Passage durchgeführt wurden, und dass in jedem Versuch alle dabei verwendeten Kulturen (mit verschiedenen Expositionszeiten und Dosen befeldete Kulturen, scheinbefeldete Negativkontrollen, Positivkontrollen) derselben Passage entstammten und auch parallel behandelt wurden. Aufgrund der begrenzten Aufnahmekapazität der bei *INCOS* vorhandenen Befeldungsapparatur war es allerdings nicht möglich, alle Versuche zu den verschiedenen analytischen Endpunkten ebenfalls zeitlich parallel und mit derselben Passage durchzuführen.

Die Exposition erfolgte in einer für das BfS-Projekt FM8823 gebauten Befeldungsanlage der Fa. *ITIS* (Zürich). Das GSM-Signal hatte eine Frequenz von 1800 MHz, und es wurde intermittierend (5 min an, 10 min aus) mit SAR-Werten von 0.2, 2 und 10 W/kg, befeldet. Parallel wurden eine scheinbefeldete Negativkontrolle (sham) sowie eine Positivkontrolle (PK) mitgeführt. Die Zugabe von Substanzen sowie Medienwechsel während der Exposition erfolgte in den Phasen, in denen die Befeldung abgeschaltet war. Die Expositionsanlage verfügte über 8 Kammern, in denen jeweils ein Ständer mit 9 Petrischalen (3,5 cm Durchmesser, 3 ml Medium) exponiert werden konnte. Die Exposition erfolgte pro Experiment mit 3

verschiedenen SAR-Werten und sham (0; 0,2; 2 und 10 W/Kg). Dabei wurden die Schälchen von je 2 Kammern mit den gleichen SAR befeldet. Insgesamt konnten so 18 Petrischalen pro SAR befeldet werden. Alle Kammern befanden sich in einem CO₂-begasten Brutschrank bei 37°C und entsprechender Luftfeuchte. Die SAR-Werte wurden den einzelnen Kammern mittels Computer zufällig zugeteilt, so dass die Exposition blind für das durchführende Labor erfolgte. Die Entblindung der Expositionen erfolgte erst nach Abschluss und Auswertung aller Befeldungen (HDA, TUD, DZB) und einer statistischen Analyse der Blinddaten (IMBEI) durch ITIS.

Feldhomogenität, HF-Leistungskonstanz und Temperatur wurden fortlaufend während der Exposition protokolliert. Größere Abweichungen führten zum Expositionsabbruch. Die Protokoll- oder Expositionsdateien wurden regelmäßig von ITIS auf Abweichungen überprüft (siehe auch Anhang Kap. 8, Expositionsbericht, ITIS).

2.6 Pretest

Zur Überprüfung des gesamten Testprocedere, insbesondere der Logistik und der erforderlichen Präparatequalität, wurden Pretests durchgeführt. Diese wurden mit einer kommerziell bezogenen Fibroblastenkultur (normale humane Fibroblasten in niedriger Passage, mit anonymisierten Spenderdaten) durchgeführt. Über den Pretest wurde ein Bericht angefertigt, in dem alle beteiligten Projektpartner, insbesondere die auswertenden Prüflabore und das für die Wartung der Expositionsanlage zuständige Labor (ITIS, Schweiz), den erfolgreichen Ablauf und eine hinreichende Präparatequalität dokumentierten.

2.7 Arbeitsplan für die einzelnen analytischen Endpunkte

Aus organisatorischen Gründen wurde jeweils nur von 2 Probanden eine Hautprobe entnommen und davon eine Kultur für die Befeldungsversuche angelegt. Erst nach Beginn aller vorgesehenen Befeldungsversuche eines Probanden wurde vom nächsten Probanden eine neue Kultur etabliert. Damit sollte sichergestellt werden, dass keine Zwischenlagerung in Flüssigstickstoff vorgenommen werden musste, die

zellschädigend hätte wirken können und darüber hinaus auch die Passagezahl unnötig erhöhen würde. Aufgrund von Defekten am Befeldungsgerät und sehr unterschiedlichen Wachstumsraten der Fibroblastenkulturen mussten in einigen Fällen doch auf kryokonservierte Zellen zurückgegriffen werden. Es konnten bei diesen Proben keine zellschädigenden Wirkungen durch die Konservierung festgestellt werden.

2.7.1 Mikrokern-Test

Der Test wurde mit der Zytokineseblock-Technik unter Verwendung von Cytochalasin B (CB) durchgeführt, um durch die Auswertung binukleärer Zellen eine hohe Spezifität und Sensitivität zu erhalten. Neben der Befeldungsdauer von 15 h wurde eine zweite, 72 h andauernde Befeldung durchgeführt. Hierdurch wurde sichergestellt, dass sich die Befeldung über alle Phasen des Zellzyklus erstreckt. Die CB-Behandlung erstreckte sich bei beiden Expositionszeiten über 72 h. Als Positivkontrolle diente die Chemikalie Colcemid.

Exposition: 15 und 72 h,
jeweils mit 0.2, 2, 10 W/kg und sham

Positivkontrolle: Colcemid 15 ng/ml 24 h Inkubation gefolgt von 48 h CB-Behandlung

Arbeitsablauf:

- Befeldung (anschl. 72 h Nachinkubation mit CB);
- parallele Befeldung inkl. CB-Behandlung für 72 h.

Anschließend wurden pro Spender genügend Objektträger zur Auswertung von 2000 binukleären Zellen pro Proband pro SAR-Wert und Expositionsdauer (sowie Positivkontrolle und Negativkontrolle) wie folgt parallel aufgearbeitet (*INCOS*):

Das CB-haltige Medium wurde entfernt und die Zellen anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Die Fixierung erfolgte mit 1 mL eiskaltem Methanol (absol.) für 10 min. Die auf Deckgläsern fixierten Zellen wurden 3 x 2 min mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Permeabilisierung und Blockierung unspezifischer

Bindestellen in 3%iger BSA/PBS-Lösung mit 0,25% TritonX-100 für 4 min. Die Erst-Antikörper-Markierung mit dem CREST-Primärantikörper (polyklonaler Human Anti-Centromer Antikörper (#15-235, Acris, 1:100 in 3%BSA/PBS) erfolgte für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde 3 x 5 min mit PBS gewaschen. Danach wurde für 15 min mit 3%iger BSA/PBS-Lösung bei 37°C geblockt. Die Sekundärantikörper-Markierung erfolgte unter Lichtausschluß. Es wurde TRITC-markierter Sekundärantikörper (Tetramethylrhodamine isothiocyanate-konjugierter anti-Human-IgG-Antikörper (R1332T, Acris, 1:100 in 3%BSA/PBS) zugegeben und für 45 min bei 37° in feuchter Kammer inkubiert. Dann wurde mit PBS 3 x 5 min gewaschen und anschließend eine DAPI-Färbung für 10 min mit 0,1 µg/mL durchgeführt. Die Färbelösung wurde entfernt und 2 x 2 min mit dest. H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Präparate auf Objektträger mit Mowiol/DABCO eingedeckt und über Nacht unter Lichtausschluss getrocknet. Die stabilen Präparate wurden mit Angaben zur Probandennummer, Testmethode sowie Datum und Kammer (Nr. 1-4) der Exposition ohne Angaben zur SAR an TUD zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung versandt. Diese Methode ermöglicht den Nachweis von gentoxischen und aneugenischen Ereignissen (Chromosomenbrüche – Mikrokerne ohne Centromer und Chromosomenverluste – Mikrokerne mit Centromer).

2.7.2 Numerische Chromosomenaberration

Wie schon in 2.6.2 dargelegt, können durch die Befeldung induzierte aneugene Effekte, beispielsweise durch Störungen des Spindelapparates, nicht ausgeschlossen werden. In Ergänzung zur CREST-Analytik wurde deshalb bei Giemsa-gefärbten Metaphasespreitungen die Chromosomenzahl mikroskopisch bestimmt.

Als Positivkontrolle dienten die Spindelgifte Colchicin bzw. Colcemid, mit denen sich zuverlässig Aneuploidien induzieren lassen.

Exposition: 72 h,
 jeweils mit 0.2, 2, 10 W/kg und sham

Positivkontrolle: Colcemid 20 ng/ml, 24 h Inkubation.

Arbeitsablauf:

- Befeldung für 72 h;
- Herstellung von Metaphasespreitungen auf OT.

Anschließend wurden pro Spender genügend Objektträger zur Auswertung von 200 Metaphasen pro Proband pro SAR-Wert und Expositionsdauer (sowie Positivkontrolle und Negativkontrolle) wie folgt parallel aufgearbeitet (*INCOS*):

Der Chromosomenabberationstest sollte mit Zellen in der ersten Mitose durchgeführt werden. Daher musste die Zugabe von Colcemid (0,2 mg/ml) ca. 2-3 h vor Ende der Befeldung erfolgen. Zunächst wurde das Colcemid in der Hälfte der vorgesehenen Schälchen (Dosis 1-4, PK) und 1-2 h später in die restlichen Schälchen gegeben. Dies ermöglichte sowohl eine zeitversetzte Bearbeitung der Proben als auch den Erhalt von Zellpräparationen zu 2 Zeitpunkten. Die Colcemidinkubation dauerte 2-3 h.

Die Zellen wurden nach der Befeldung in Einzelzellsuspension gebracht, resuspendiert und je Exposition und Zeit in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zentrifugation erfolgte bei 300 x g für 10 min. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgesaugt, das Pellet resuspendiert und tropfenweise 9 ml hypotone Lösung (75 mM KCl, 37°C) bei gleichzeitigem Vortexen der Suspension zugegeben. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation und die tropfenweise Zugabe von 9 ml Fixativ (Methanol/Eisessig: 3 + 1, -20°C). Der Fixiervorgang wurde wiederholt und der Überstand bis auf 0,5-1 ml abgesaugt. Danach erfolgte das Auftragen mit der Pipette von ca. 30 µL Zellsuspension auf mit Wasser beschichtete Objektträger sowie die Trocknung der Präparate für 24 h. Die Präparate wurden anschließend für 10 min mit Giemsa (5% in Weisepuffer pH= 7,2: NaHPO₄ x 2 H₂O 0,63 g/l; KHPO₄ 0,31 g/l) gefärbt und mit Weisepuffer gespült.

Die Präparate wurden mit Angaben zur Probandennummer, Testmethode sowie Datum und Kammer (Nr. 1-4) der Exposition ohne Angaben zur SAR zur Auswertung an *TUD* versandt. Pro Exposition wurden 200 Metaphasen in der ersten Mitose auf numerische Aberrationen untersucht.

2.7.3 Comet-Assay

Der Comet-Assay ist ein Indikatortest, mit dem sich summarisch sehr unterschiedliche gentoxische Ereignisse erfassen lassen, wie bspw. Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie abasische/ alkalilabile Stellen. Die Strangbrüche können durch klastogene Ereignisse direkt oder intermediär durch Exzisionsreparatur verursacht werden. Als Positivkontrolle diente die Chemikalie 4-Nitrochinolin-1-oxid (4NQO). 4NQO wurde aufgrund ihrer DNA-strangbrechenden Wirkung als geeignete Positivkontrolle für den Comet-Assay eingesetzt.

Exposition: 4, 16 und 24 h,
jeweils mit 0.2, 2, 10 W/kg und sham

Positivkontrolle: 4-NQO, 0,1 μ M

Arbeitsablauf:

- Befeldung für 24 h;
- parallele Befeldung für 16 h;
- parallele Befeldung für 4 h.

Anschließend wurden pro Spender mindestens 2 Objektträger mit 100 Zellen pro Proband pro SAR-Wert und Expositionsdauer (sowie Positivkontrolle und Negativkontrolle) wie folgt parallel aufgearbeitet (*INCOS*):

Nach der Exposition wurden die Zellen vereinzelt, resuspendiert und 30 μ l Zellsuspension in 180 μ l *LowMelt*-Agarose (37°C) pipettiert. Die Agarose-Zellsuspension (100 μ l) wurde auf gekühlte, mit Standardagarose beschichtete Objektträger gegeben und anschließend nochmal mit 100 μ l *LowMelt*-Agarose beschichtet. Die Zellen wurden danach in einer Lyselösung (0,01 M Tris, 0,1 M Na₂-EDTA, 2,5 M NaCl, 1% Na-Sarkosinat, 1% Triton, 10% DMSO, 4°C) für 1 h lysiert. Im Anschluss an die Lyse erfolgte das Entwinden der DNA in Elektrophoreselösung (300 mM NaOH, 1mM Na₂-EDTA, pH=13) für 1 h bei 4 °C. Die Elektrophorese wurde danach in der gleichen Lösung bei 4 °C für 30 min durchgeführt (300 mA, 25 V). Die Präparate wurden neutralisiert, indem sie 3 x 5 min mit Neutralisationspuffer (0,4 M Tris-HCl, pH=7,5) beschichtet wurden. Anschließend erfolgte die Trocknung der Präparate in Ethanol für mindestens 20 min.

Die stabilen Präparate wurden zur Färbung und Auswertung an *HDA* versandt. Ausgewertet wurden die mit Ethidiumbromid-gefärbten Präparate mit dem Komet 4.0 Auswertesystem von Kinetik Imaging. Insgesamt wurden 100 Zellkerne pro Dosis und Proband vermessen.

Der Viabilitätstest wurde mit 20 µl der restlichen Zellsuspension direkt nach der Zentrifugation durchgeführt. Es wurden dabei 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Ethidiumbromid-Fluoresceindiacetat-Lösung auf einem Objektträger gemischt und 200 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop gezählt. Rote mit Ethidiumbromid gefärbte Zellen wurden als tot, grüne mit Fluorescein gefärbte Zellen als vital gewertet. Die Viabilität der Zellen lag bei allen Proben über 90%.

2.7.4 Oxidative DNA-Schäden

Als oxidativer Schaden wird, in Anlehnung an die REFLEX-Studie, 8oxo-Guanin in der DNA zunächst unter Verwendung eines monoklonalen Antikörpers durchflusszytometrisch nachgewiesen (bei DZB). Da sich zeigte, dass die getesteten Antikörper gegen 8oxo-Guanin nur ungenügend zu Detektion geeignet waren, wurde der Comet-Assay mit FPG-Inkubation genutzt, um FPG-sensitive Schäden als Maß für oxidative DNA-Schäden nachzuweisen. Der Comet-Assay mit der Glycosylase FPG (Formamidopyrimidine DNA Glycosylase) wurde von Incos durchgeführt. Das Enzym FPG entfernt oxidierte Purine wie 8oxo-Guanin und erzeugt so im Comet-Assay Einzelstrangbrüche.

Exposition: 72 h (circa 1,5fache Populationsverdopplungszeit zur gesicherten Befeldung in allen Zellzyklusphasen), jeweils mit 0.2, 2, 10 W/kg und sham.

Positivkontrolle: 30 mM Bromat, 15 min

Arbeitsablauf:

- Befeldung für 72 h;
- kurz vor Beendigung der Befeldung wird die Positivkontrolle für 15 min in einer 30 mM Kaliumbromat-PBS-Lösung inkubiert

- anschließend Durchführung Comet-Assay mit FPG-Inkubation.

Anschließend wurden pro Spender 3 Objektträger mit mindestens 100 Zellen pro Proband pro SAR-Wert (sowie Positivkontrolle und Negativkontrolle) jeweils einmal ohne die Einwirkung von FPG-Verdau und einmal mit FPG-Verdau wie folgt parallel aufgearbeitet (*INCOS*):

Die Methode wurde in Anlehnung an Collins et al. [80] durchgeführt. Nach der Exposition wurden die Zellen vereinzelt, resuspendiert und 140 µl Zellsuspension in 660 µl *LowMelt*-Agarose (37°C) pipettiert. Die Agarose-Zellsuspension (100µl) wurde auf gekühlte, mit Standardagarose beschichtete Objektträger gegeben und anschließend nochmal mit 100 µl *LowMelt*-Agarose beschichtet. Die Zellen wurden danach in einer Lyselösung (0,01 M Tris, 0,1 M Na₂-EDTA, 2,5 M NaCl, 1% Na-Sarkosinat, 1% Triton, 10% DMSO, 4°C) für 1 h lysiert. Im Anschluss an die Lyse erfolgte die Inkubation mit und ohne FPG für 30 min (1µg oder 0µg FPG/ml BE1-Puffer – Tris 2,4 g/l, NaCl 5,8 g/l, 1mM Na₂-EDTA). Daraufhin erfolgte das Entwinden der DNA in Elektrophoreselösung (300 mM NaOH, 1mM Na₂-EDTA, pH=13) für 1 h bei 4°C. Die Elektrophorese wurde danach in der gleichen Lösung bei 4°C für 30 min durchgeführt (300 mA, 25 V). Die Präparate wurden neutralisiert, indem sie 3 x 5 min mit Neutralisationspuffer beschichtet wurden. Anschließend erfolgte die Trocknung der Präparate in Ethanol für mindestens 20 min.

Die stabilen Präparate wurden verblindet zur Färbung und Auswertung an *HDA* versandt. Ausgewertet wurden die mit Ethidiumbromid-gefärbten Präparate mit dem Komet 4.0 Auswertesystem von Kinetik Imaging. Insgesamt wurden 100 Zellkerne pro SAR, FPG-Gabe und Proband vermessen.

2.7.5 Apoptose-Assay:

Ebenfalls parallel zu den laufenden Befeldungen für den Comet-Assay wurden bei *INCOS* auch stabile Präparate für den TUNEL Assay (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) als Apoptose-Test bei *TUD* hergestellt. Die auf Deckgläsern gewachsenen Zellen wurden für 10 min mit 4%PFA/PBS fixiert und anschließend 3x10 min mit PBS gewaschen. Die fixierten Präparate wurden an die *TUD* geliefert und dort wie folgt gefärbt.

Die Deckgläser mit den fixierten Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Zur Permeabilisierung wurde für 5 min in 0,2% TritonX-100/PBS inkubiert. Anschließend wurde 2 x 5 min in PBS gewaschen. Es wurden ca. 100 µL Equilibrierungspuffer auf Parafilm vorgelegt und die Deckgläser mit der Zellseite nach unten auf den Puffer aufschwimmen gelassen. Die Equilibrierung erfolgte für 10 min bei Raumtemperatur. Nach Entfernen des Equilibrierungspuffer wurden die Präparate auf 50 µL Inkubationspuffer (45 µL Equilibrierungspuffer, 5 µL Nukleotid-Mix, 1 µL rTDT-Enzym) überführt und für 60 min bei 37°C in feuchter Kammer unter Lichtausschluss inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde für 15 min mit 2x SSC-Puffer bei RT gewaschen. Anschließend wurde 3 x 5 min in PBS gewaschen. Es folgte eine Kernfärbung mit DAPI (0,1 g/mL) für 5 min. Die Färbelösung wurde entfernt und 2 min mit dest. H₂O gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser mit Mowiol/DABCO auf Objektträger gedeckt und über Nacht unter Lichtausschluss getrocknet.

Parallel wurden Färbekontrollen in Form von unbehandelten und Actinomycin D behandelten, auf Objektträger fixierten HL60 Zellen mitgeführt und ebenfalls ausgewertet. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop. Es wurde der Anteil an TUNEL-positiven Zellen in 1.000 Zellen erfasst.

2.7.6 Zellzyklusanalyse

Weitgehend parallel zu den laufenden Befeldungen für den Comet-Assay wurden bei *INCOS* auch stabile Präparate für durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen (*DZB*) wie folgt hergestellt.

Es wurden mittels Trypsin (0,1 %) Einzelzellsuspensionen von den Proben hergestellt. Diese wurden einmal durch Zentrifugation (300 x g, 10 min) gewaschen und die Zellen in 200 µl PBS resuspendiert. Die Zellzahl wurde bestimmt und anschließend mit absolutem Ethanol auf 50.000 bis 100.000 eingestellt und fixiert. Die Proben wurden gesammelt und bis zum Versand an *DZB* bei -20°C im Fixativ gelagert. Die stabilen Präparate wurden gesammelt und anschließend verblindet zur Färbung und Auswertung an *DZB* versandt.

Die Proben wurden zentrifugiert, 1x mit PBS gewaschen und anschließend mit 0,5 mg/mL Propidiumjodid und 50 µg/mL RNaseA für 30 min gefärbt. Die Analyse erfolgte im Durchflusszytometer.

2.8 Codierung der Proben

Jedem Spender wurden in den Fragebögen, die weder Adresse noch den Namen des Spenders enthielten, Code-Nummern zugeteilt.

Die Inkubation und Befeldung sowie die Herstellung der stabilen Präparate erfolgte mit dem Probanden-Code, der Expositions-kammerangabe, des Befeldungsdatums und des jeweiligen Endpunktes der Untersuchung.

2.9 Auswertung der Präparate

Während Befeldung und Herstellung der stabilen Präparate wie beschrieben im Befeldungslabor (*INCOS*) erfolgten, fand die nachfolgende Auswertung der verblindeten Präparate in örtlich und personell davon getrennten Auswertelaboren (*TUD*, *HDA*, *DZB*) statt. Die Präparate wurden, soweit technisch möglich, nach erfolgter Auswertung für eventuell notwendig werdende Nachuntersuchungen vom jeweils auswertenden Labor bis drei Monate nach Projektabschluss aufbewahrt. Die Gele der Comet-Assays wurden hierfür wieder entfärbt und getrocknet.

2.9.1 Numerische Chromosomenaberration:

Von 10 Spendern wurden 200 Metaphasen pro Behandlungsgruppe (Positivkontrolle, scheinbefeldete Negativkontrolle und drei unterschiedliche SAR-Werte) ausgewertet. Die Auswertung der Giemsa-gefärbten Metaphasespreitungen erfolgte bei 1.000facher Vergrößerung durch einen geschulten Auswerter.

2.9.2 Mikronukleus-Test mit CREST-Analytik

Von jedem Spender wurden 2.000 binukleäre Zellen pro Behandlungsgruppe (Positivkontrolle, scheinbefeldete Negativkontrolle und drei unterschiedliche SAR-Werte) und Expositionszeit bei 630- bis 1.000facher Vergrößerung im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Für den Mikrokerntest mit 5-fachem Stichprobenumfang zur Erfassung sehr kleiner Effekte wurden zusätzlich für 4 Probanden 10.000 binukleäre Zellen für die scheinbefeldete Negativkontrolle sowie für die drei unterschiedlichen SAR-Werten analysiert. Der Umfang für die Positivkontrolle blieb unverändert.

Für die Identifikation der Mikrokerne wurden einheitlich die von Fenech et al. [5, 6] beschriebenen Kriterien zugrunde gelegt. Durch parallele Zählung mono-, bi- und multinukleärer Zellen wurde der Kernteilungsindex CBPI bestimmt, um damit auch eine Aussage über mögliche Zellzykluseffekte der Befeldung zu erhalten. Insbesondere wurden die Mikrokerne auf eine CREST-Markierung analysiert und der Anteil CREST-positiver Mikrokerne zur Unterscheidung aneugener von klastogenen Effekten bestimmt. Die Auswertung erfolgte im o.g. Umfang mit fluoreszenzmarkierten Präparaten per DAPI-Kernfärbung und CREST-Antiserum mit geeignetem Fluorochrom-markierten Sekundärantikörper.

2.9.3 Comet-Assay

Von jedem Spender wurden 100 Zellen von zwei Objektträgern pro Behandlungsgruppe (Positivkontrolle, scheinbefeldete Negativkontrolle und drei unterschiedliche SAR-Werte) und Expositionszeit ausgewertet. Bei der bildanalytischen Auswertung der „Kometen“ als relatives Maß für DNA-Strangbruchhäufigkeit wurden die Parameter *tail length*, prozentuale DNA-Verteilung auf Zellkern und Komet sowie *tail moment* parallel erfasst. Die Auswertung erfolgte auf Grundlage der von Tice, [81] sowie Hartmann [82] beschriebenen Kriterien. Die Auswertung erfolgte an einem Epifluoreszenzmikroskop („Axiolmager“, Zeiss) mit 40x-Ölimmersionsobjektiv und elektronisch stabilisierter Spannungsquelle für die Fluoreszenzanregung. Zur Bildanalyse wurde das „Komet“ Analyseprogramm von *Kinetic Imaging Ltd.* in der Version 4 verwendet; in Kombination mit der von *Kinetic Imaging* hierfür mitgelieferten Mikroskopkamera TM765E von *Pulnix*.

2.9.4 Oxidative DNA-Schäden

Für die Auswertung des Comet-Assays zum Nachweis von oxidativen Schäden wurden - entsprechend den anderen Endpunkten - Präparate von scheinbefeldeten und befeldeten Proben sowie einer Positivkontrolle hergestellt. Der Nachweis der oxidativen Schäden erfolgt durch eine - im Unterschied zum herkömmlichen Comet-Assay - zusätzliche Inkubation mit der Glycosylase FPG, die oxidierte Purinbasen aus der DNA entfernt und so die oxidativen Schäden in Einzelstrangbrüche überführt. Vom Befeldungslabor (*INCOS*) wurden von allen Proben Präparate mit und ohne Einwirkung von FPG hergestellt, um die oxidativen Schäden von Schäden anderer Art unterscheiden zu können. Hierbei wurden von jedem Spender 100 Zellen von zwei Objektträgern pro Behandlungsgruppe bei der *HDA* ausgewertet. Die bildanalytische Auswertung erfolgte analog der zuvor beschriebenen Comet-Assay Auswertung.

2.9.5 Apoptose

Von jedem Spender wurden 1.000 Zellen pro Behandlungsgruppe (Positivkontrolle, scheinbefeldete Negativkontrolle und drei unterschiedliche Bestrahlungsdosen) und Expositionszeit im Epifluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Auswertung der TUNEL-markierten Präparate erfolgte bei 630facher Vergrößerung durch einen geschulten Auswerter.

2.9.6 Zellzyklusanalyse

Vom Befeldungslabor (*INCOS*) wurden Positiv- und scheinbefeldete Kontrollen sowie befeldete Proben hergestellt und als Ethanol-fixierte Zellsuspension an das *DZB* verschickt. Die Zellzyklusanalyse erfolgte nach Anfärbung der DNA mit dem DNA-Farbstoff Propidiumjodid durch Bestimmung des DNA-Gehaltes anhand der Fluoreszenzintensität im Durchflusszytometer und anschließender Auswertung der Daten mit Hilfe der Software Multiplus (Phoenix Flow Systems).

2.10 Statistische Analyse

2.10.1 Zielsetzung des statistischen Analyseplans

Auf Grundlage des niedergelegten Analyseplans aus der Vorgängerstudie FM8823 wurde eine Inspektion der verblindeten Daten vorgenommen (blind data review), mit der Zielsetzung, die Daten auf Vollständigkeit und Plausibilität zu überprüfen sowie die Verteilungsannahmen zu spezifizieren.

Ziel des hiermit vorgelegten Analyseplans ist eine genaue Spezifikation der statistischen Modelle und Analysemethoden auf Basis des Blind-Data-Review. Dies schließt auch ggf. den Umgang mit fehlenden Werten und extremen Werten (statistischen Ausreißern) mit ein.

Im Folgenden wird zunächst die Analysestrategie übergreifend über alle fünf Endpunkte beschrieben. Danach werden für jeden der Assays wesentliche Ergebnisse des Blind Data Review benannt, Analyse-Modell und -Methode spezifiziert, und die Wahl der Methodik begründet.

2.10.2 Analysestrategie

Die Hauptfragestellung ist die nach dem Bestehen eines Befeldungseffektes. Dazu sind innerhalb jedes Probanden die Messergebnisse aus vier Dosisgruppen zu berücksichtigen. Dazu wird primär ein statistischer Test auf Trend durchgeführt. Anschließend werden Effektschätzer für jede der Dosisgruppen und für paarweise Differenzen zur Negativkontrolle (sham) mit 95%-Konfidenzintervallen präsentiert.

Daneben wird der Kontrast zwischen Negativkontrolle und Positivkontrolle – ebenfalls als Effektschätzung mit 95%-Konfidenzintervall – gestellt.

In die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse sollten neben dem formalen Test auf Trend, auch die Form des Dosistrends (Monotonie), die Größe des Trendeffektes und das Verhältnis zwischen Dosistrend und Abstand zwischen Negativ- und Positiv-Kontrolle einfließen.

Für die Hauptfragestellung zum Bestehen eines Befeldungseffektes wurde aufgrund von multiplen Testens eine Korrektur des Signifikanzniveaus vorgenommen. Die Hauptfragestellung wurde anhand eines exakten Permutationstests auf einen Dosistrend überprüft. Wie mit dem multiplen Testen umgegangen wurde, wird im folgenden Abschnitt erklärt.

2.10.3 Umgang mit multiplen Hypothesentests

Mit insgesamt 22 Zielvariablen aus fünf Assays liegen damit auch 22 statistische Test- und Schätzprobleme vor. Dabei setzen sich die 22 Variablen zusammen aus 10 Zielvariablen des Comet-Assays, jeweils 2 für 4 Zeitpunkte und 2 für FPG, 6 Zielvariablen des Mikrokerntests, jeweils 3 für 2 Zeitpunkte, 2 Zielvariablen der Chromosomenaberration (Chromosomenverlust und Chromosomenzugewinn), 1 Zielvariable des TUNEL-Tests (TUNEL_pos/ausgew_zellen) und 3 Zielvariablen des Zellzyklustests.

Da im günstigen Fall ein Beleg für die Abwesenheit von Befeldungseffekten angestrebt wird, ist die stärkste Aussage in diesem Sinne ein Beibehalten der Nullhypothese in 22 Tests mit Konfidenzintervallen, welche relevante Effekte ausschließen.

Primär wurden daher p-Werte nicht für multiples Testen adjustiert und zweiseitige Konfidenzintervalle zur (unadjustierten) Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95% angegeben.

Die Chance eines solchen Nachweises ist auch unter der globalen Nullhypothese (Gültigkeit aller 22 Nullhypothesen) nicht hoch. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Nullhypothese unter den 22 fälschlicherweise abgelehnt und dafür die falsche Alternativhypothese angenommen wird, liegt bei bis zu $P(H1|H0)=1-(1-0.05)^{22}=0.68 = 68\%$.

Als Hilfe zur Interpretation solcher möglicher Zufallsbefunde wird zusätzlich eine Bonferroni-Korrektur auf Assay-Ebene vorgenommen. Das bedeutet, das globale Signifikanzniveau pro Assay wird auf 5% gesetzt, die lokalen Signifikanzniveaus sind dann folgendermaßen definiert:

Comet-Assay:	$0.05/10=0.005$
Mikrokerntest:	$0.05/6=0.0083$
Chromosomenaberrationen:	$0.05/2=0.025$
TUNEL-Apoptose-Test:	0.05
Zellzyklusanalyse:	$0.05/3=0.0167$

Schließlich sind die lokalen Signifikanz-Niveaus für eine Bonferroni-Korrektur über alle Assays hinweg nochmals durch fünf zu dividieren.

Comet-Assay:	$0.05/50 = 0.0010$
Mikrokerntest:	$0.05/30 = 0.0017$
Chromosomenaberrationen:	$0.05/10 = 0.0050$
TUNEL-Apoptose-Test:	$0.05/5 = 0.0100$
Zellzyklusanalyse:	$0.05/15=0.0033.$

Der Begriff der statistischen Signifikanz wird in diesem Bericht nur bezogen auf die primäre Analyse der Hauptfragestellungen verwendet, sofern, entsprechend der oben angegebenen Schranken, ein p-Wert das angegebene lokale Niveau unterschreitet. Für alle anderen Ergebnisse wird keine Kontrolle des multiplen Fehlers erster Art angestrebt; sie werden als statistisch auffällig bezeichnet, wenn der p-Wert das lokale Niveau von 5% unterschreitet.

Zur Beurteilung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Dosis und Wirkung sind dabei jeweils die Mittelwerte und die Differenzen zur Sham-Befeldung je Dosisstufe (mit 95% Konfidenzintervall) heranzuziehen. Die Abwesenheit eines monotonen Zusammenhangs wird dann als Hinweis gewertet, dass der Effekt ein Zufallsbefund ist.

Alle Nebenanalysen werden als explorativ betrachtet. P-Werte, die das lokale Niveau unterschreiten, haben dann keinen konfirmativen, sondern einen Hypothesen-generierenden Charakter.

2.10.4 Spezifikation und Begründung der Analysemethoden

Zielvariable

Folgende Zielvariablen werden in der statistischen Analyse berücksichtigt:

Comet-Assay

- Olive Tailmoment (Log-Olive-Tail-Moment)

- Medianer Anteil DNA im Kopf (%) (Log(100-Median Head DNA (%)))
- Beide Zielvariablen werden zu 4 Zeitpunkten untersucht, sowie jeweils einmal zum Zeitpunkt nach 72h mit dem FPG Wert
- Die zwei Zielgrößen des Comet-Assays sind stark miteinander korreliert und werden jeweils transformiert. Die Zielgröße „CoA_olive_tailm“ wird logarithmiert und die Zielgröße „mediane DNA im Kopf (%) (DNA_Head)“ wird folgendermaßen transformiert: $DNA_Head_LN = \log_{10}((100 - DNA_Head)/100)$.

Mikrokerntest

- Anzahl der Mikrokerne in 2000 Zellen. (Errechnet als $MNI = ((mn_1 + 2*mn_2 + 3*mn_3plus)/mn_ausg_zellen)*2000$)
- Anzahl der Mikrokerne mit CREST in 2000 Zellen (Errechnet als $MNI_crest = ((mn_1_crest + mn_2_crest + mn_3_plus_crest)/mn_ausg_zellen)*2000$)
- CBPI

Chromosomenaberrationen

- Anteil unter 200 Mitosen (oberhalb): (Errechnet als $chrom_46_plus = chrom_46_plus / ausgew_mitosen * 200$)
- Anteil unter 200 Mitosen (unterhalb): (Errechnet als $chrom_46_minus = chrom_46_minus / ausgew_mitosen * 200$)
- Anteil unter 200 Mitosen (unterhalb oder oberhalb) : aneuploid cells (Errechnet als $chrom_all = (chrom_46_plus + chrom_46_minus) / ausgew_mitosen * 200$)

TUNEL-Apoptose-Test

- Anzahl TUNEL positiver Zellen (Errechnet als $Tunel_pos = Tunel_pos / ausgewertete\ Zellen * 1000$)

Zellzyklusanalyse

- G1
- G2
- S

2.10.5 Tests auf einen Dosistrend

Bei allen 5 Assays wird analog vorgegangen. Es werden zunächst Permutationstests auf einen Dosistrend über die 4 SAR-Stufen „sham“, „low“, „medium“ und „high“ als primäre Analyse durchgeführt. Als Sensitivitätsanalyse werden sekundär zusätzlich Page-Trend Tests berechnet.

Die Analysen werden separat für alle Zielvariablen der 5 Assays durchgeführt.

Begründung: Da unter der Nullhypothese der Abwesenheit eines Befeldungseffektes die Verteilung der Zielvariablen in den 4 Expositionsbedingungen gleich ist, sind die Voraussetzungen für Permutationstests erfüllt.

Aufgrund folgender Punkte lassen sich der Permutationstest und der Page-Trend-Test bei dieser Fragestellung auf einen Dosistrend begründen:

- Beides sind Trend-Tests.
- Beide Tests untersuchen, ob mit steigender Exposition die Werte in den Zielvariablen steigen. Beide Tests sind also sensitiv für die Trend-Alternativhypothese von dosisabhängigen geordneten Erwartungswerten.
- Keiner der Tests setzt eine Normalverteilung voraus.

Der Permutationstest verwendet die Originalwerte der Zielvariablen, während der Page-Trend-Test eine Rangskala der Zielvariablen verwendet. Als Prüfgröße wird die Summe der Dosistrendscores über alle Probanden gebildet:

$$T = \sum_{i=1}^{20} \sum_{j=1}^4 jY_{ij} ,$$

oder äquivalent dazu:

$$T = \frac{1}{20} \sum_i T_i; \text{ mit}$$
$$T_i = \frac{1}{10} (-3Y_{i1} - Y_{i2} + Y_{i3} + 3Y_{i4}) .$$

Dabei ist Y_{ij} der Wert einer Zielvariable bei Proband i unter Befeldungsdosis j. (Die Leerdosis ist hier als j=1 enthalten, die Positivkontrolle ist nicht einbezogen.)

Dies ist die gleiche Prüfgröße, die sich auch unter Annahme eines Poisson-Modells als Score-Test ergibt. Die zweite, skalierte Variante wird zur Quantifizierung des Dosistrends verwendet. Mittelwerte mit t-test-basierten 95%-Konfidenzintervallen ergeben dann eine Schätzung der durchschnittlichen Differenz zwischen zwei Dosisstufen.

Als Sensitivitätsanalyse ist zusätzlich noch der Page-Trend-Test vorgesehen. Der Page-Trend oder Page-L-Test ist ein Test auf Dosistrend mit der Teststatistik $T = \sum_{ij} jR_{ij}$, wobei j der Dosisindex (1-4) und R_{ij} der Rang der Zielvariablen der j-ten Dosis innerhalb eines Probanden ist. Für die Permutationstests wird das R-Paket „coin“ verwendet (für den Permutationstest die Funktion `independence_test`, für den Page-Test die Funktion `„friedman_test“`).

Der Permutationstest wird als primäre Analysemethode gewählt, da dieser mit den originalskalierten Werten zu den aufgeführten Schätzern und Konfidenzintervallen passt, da diese auch für die Originalskala berechnet wurden.

Der Page-Trend-Test dient lediglich dazu, um zu überprüfen, ob die Ergebnisse des Permutationstests von der spezifischen Methodenwahl abhängig sind. Aus den Erfahrungen des Vorgängerprojekts FM8823 sind keine relevanten Unterschiede in den Ergebnissen der beiden Trendtests zu erwarten.

Subgruppenanalyse:

Es werden Subgruppenanalysen für die beiden Altersgruppen durchgeführt. Dazu wird wie in der primären Analyse ein statistischer Test auf Trend (exakter Permutationstest) durchgeführt. Dazu werden Effektschätzer mit 95% Konfidenzintervallen, welche rein asymptotisch berechnet wurden, angegeben. Es werden ebenfalls paarweise Differenzen zur Negativkontrolle (sham) berechnet und mit 95%-Konfidenzintervallen präsentiert.

3 Ergebnisse

Nachfolgend sind die Ergebnisse der statistischen Analysen für die entblindeten Daten aus dem Comet-Assay, dem Comet-Assay mit FPG-Inkubation, dem Mikrokerntest mit CREST-Analytik (Standard und erweitert), den numerischen Chromosomenaberrationen, dem TUNEL-Assay und den Zellzyklusanalysen dargestellt. Weiterhin wird die genaue Vorgehensweise zur statistischen Analyse der genannten Daten beschrieben und zu den graphischen Darstellungen die zugehörigen Tabellen mit den statistischen Werten vorgestellt.

3.1 Datensichtung

Für alle statistischen Analysen wurden die folgenden Zielvariablen festgelegt:

Comet-Assay

- Olive Tailmoment (Log-Olive-Tail-Moment)
- Medianer Anteil DNA im Kopf (%) ($\text{Log}(100 - \text{Median Head DNA } (\%))$)
- Beide Zielvariablen werden nach 4 Expositionszeiten untersucht, sowie jeweils einmal zum Zeitpunkt nach 72h mit dem FPG Wert

Damit gibt es 10 Zielvariablen des Comet-Assays. Die zwei Zielgrößen des Comet-Assays sind stark miteinander korreliert und werden jeweils transformiert. Die Zielgröße „CoA_olive_tailm“ wird logarithmiert und die Zielgröße „mediane DNA im Kopf (%) (DNA_Head)“ wird folgendermaßen transformiert: $\text{DNA_Head_LN} = \log_{10}((100 - \text{DNA_Head})/100)$

Mikrokerntest

- Anzahl der Mikrokerne in 2000 Zellen. (Errechnet als $\text{MNI} = ((\text{mn}_1 + 2 * \text{mn}_2 + 3 * \text{mn}_{3\text{plus}}) / \text{mn_ausg_zellen}) * 2000$)
- Anzahl der Mikrokerne mit crest in 2000 Zellen (Errechnet als $\text{MNI_crest} = ((\text{mn}_1_{\text{crest}} + \text{mn}_2_{\text{crest}} + \text{mn}_3_{\text{plus_crest}}) / \text{mn_ausg_zellen}) * 2000$)
- CBPI

Es existieren 6 Zielvariablen des Mikrokerntests

- Zusätzlich 3 Zielgrößen für den erweiterten Mikrokerntest

Chromosomenaberrationen

- Anteil unter 200 Mitosen (oberhalb): cell chromosome loss (Errechnet als $\text{chrom_46_plus} = (\text{chrom_46_plus} / \text{ausgew_mitosen}) * 200$)
- Anteil unter 200 Mitosen (unterhalb): cell chromosome increase (Errechnet als $\text{chrom_46_minus} = (\text{chrom_46_minus} / \text{ausgew_mitosen}) * 200$)
- Anteil unter 200 Mitosen (unterhalb oder oberhalb) : aneuploid cells (Errechnet als $\text{chrom_all} = (\text{chrom_46_plus} + \text{chrom_46_minus}) / \text{ausgew_mitosen} * 200$)

Damit gibt es 3 Zielvariablen bei den Chromosomenaberrationen

TUNEL-Apoptose-Test

- TUNEL_pos/ausgewertete Zellen: tunel positive cells (Errechnet als $\text{TUNEL_pos} = (\text{Tunel_pos} / \text{ausgewertete Zellen}) * 1000$)

Der TUNEL-Apoptose-Test resultiert in einer Zielvariablen

Zellzyklusanalyse

- G1
- G2
- S

Innerhalb des Zellzyklus werden somit 3 Zielvariablen untersucht.

Insgesamt kommt man nun auf 23 Zielvariablen

3.2 Umgang mit Ausreißern, unplausiblen Werten und fehlenden Werten

Ein wichtiger Schritt vor der statistischen Analyse ist, die Daten auf fehlende Werte zu untersuchen, da es bei der Nichtbeachtung von fehlenden Werten zu verzerrten Ergebnissen kommen kann.

Fehlende Werte in den Zielvariablen:

Bei den Zielvariablen der verschiedenen Assays kamen keine fehlenden Werte vor. Damit muss die Analyse nicht auf fehlende Werte angepasst werden.

Ausreißer und auffällige Werte:

Ein weiterer wichtiger Schritt vor der eigentlichen Hauptanalyse war die Überprüfung auf Ausreißer und andere auffällige Werte.

Bei den Zielgrößen ergaben sich keine unplausiblen Werte. Beim Comet-Assay traten vereinzelte Ausreißer bei einigen Zeitpunkten in den Daten auf, daher werden im Folgenden die Analysen des Comet-Assays immer für die log-transformierten Werte durchgeführt. Ein Proband wies bei der Zielvariablen *Olive Tail Moment* in zwei Expositionsgruppen Werte über 40 auf, die normalerweise bei der Auswertung nicht berücksichtigt werden, wenn ein solcher Wert wie hier bei der Sham-Exposition auftritt. Daher wurde eine Sensitivitätsanalyse ohne diese Werte durchgeführt. Der erweiterte Mikrokernstest wurde lediglich an 4 Probanden untersucht. Hier ist die Streuung der Daten relativ groß.

Um dies auch graphisch darzustellen, wird in den folgenden Abbildungen jede Zielvariable der unterschiedlichen Assays in einem Diagramm dargestellt. Dabei gibt die x-Achse jeweils die Expositionsgruppe Sham bis High (entsprechend den SAR-Werten: Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg), sowie die Positivkontrolle an. Zur besseren Veranschaulichung der Werte der Positivkontrolle werden diese in rot dargestellt.

3.2.1 Comet-Assay - Rohdatendarstellung

Für die beiden Zielgrößen des Comet-Assays sind jeweils die eigentlichen Rohdaten und die logarithmierten Werte aufgeführt. Als Zielvariablen für Endanalyse gelten im Folgenden aber immer nur die log-transformierten Werte.

Nachfolgend dargestellt sind die graphisch aufgetragenen Rohdaten des Comet-Assays für die Befeldungsgruppen Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle; für 4, 16 und 24 h Befeldung. Dargestellt sind im ersten Teil für jede Befeldungsdauer jeweils *Olive-Tail-Moment* und *Log-Olive-Tail-Moment* (Abbildung 3-8). Im Anschluss daran sind die Rohdaten für den Median des DNA-Gehaltes im Kometenkopf (Kern), dem sogenannten *Median Head-DNA (%)* bzw. *Log-Median-Head-DNA (%)* aufgetragen (Abbildung 9-14).

Zielgröße: Olive-Tail-Moment / Log-Olive-Tail-Moment

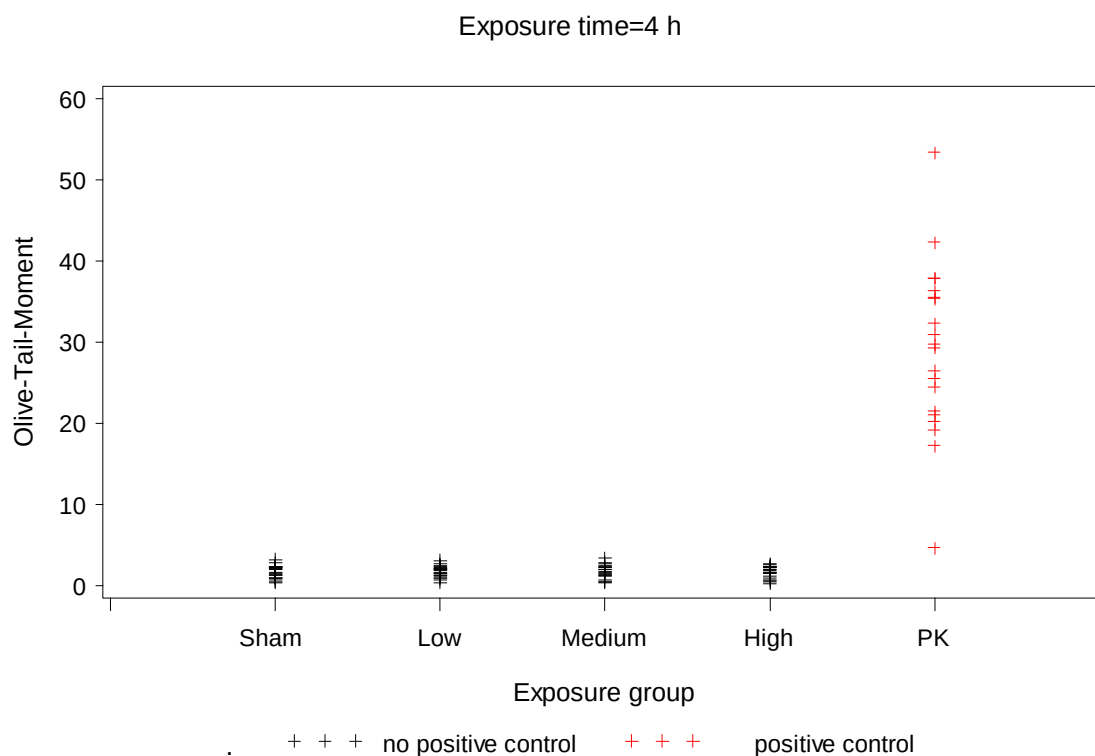


Abbildung 3: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße *Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

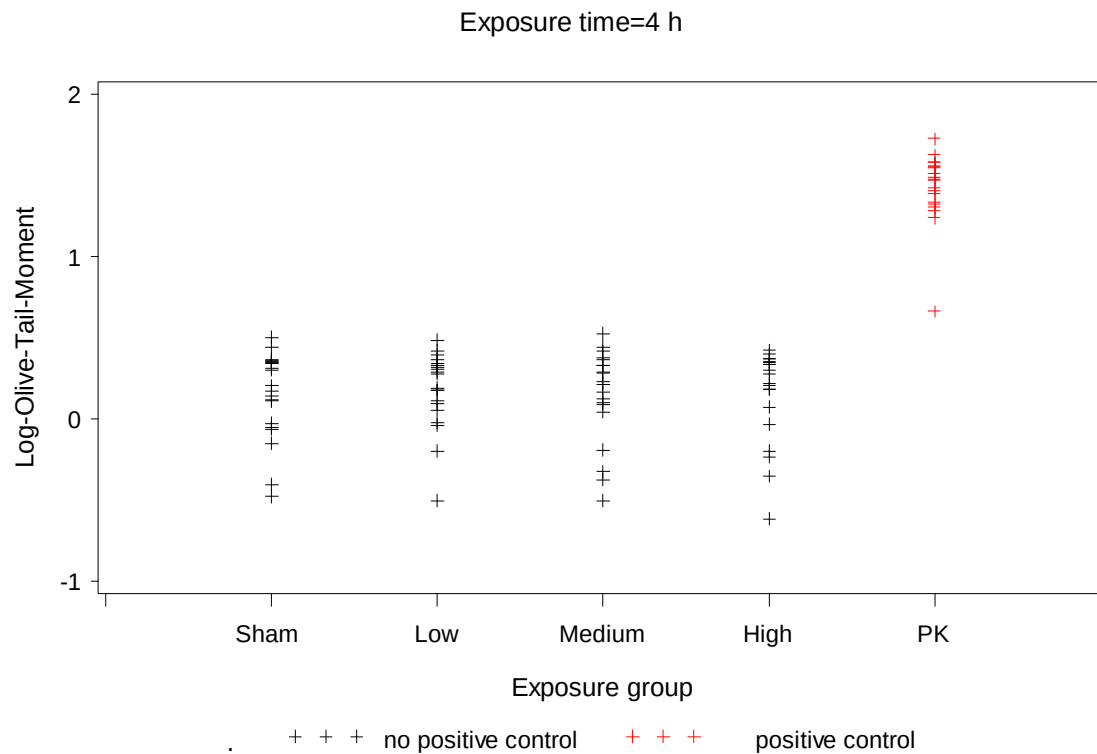


Abbildung 4: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße *Log-Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

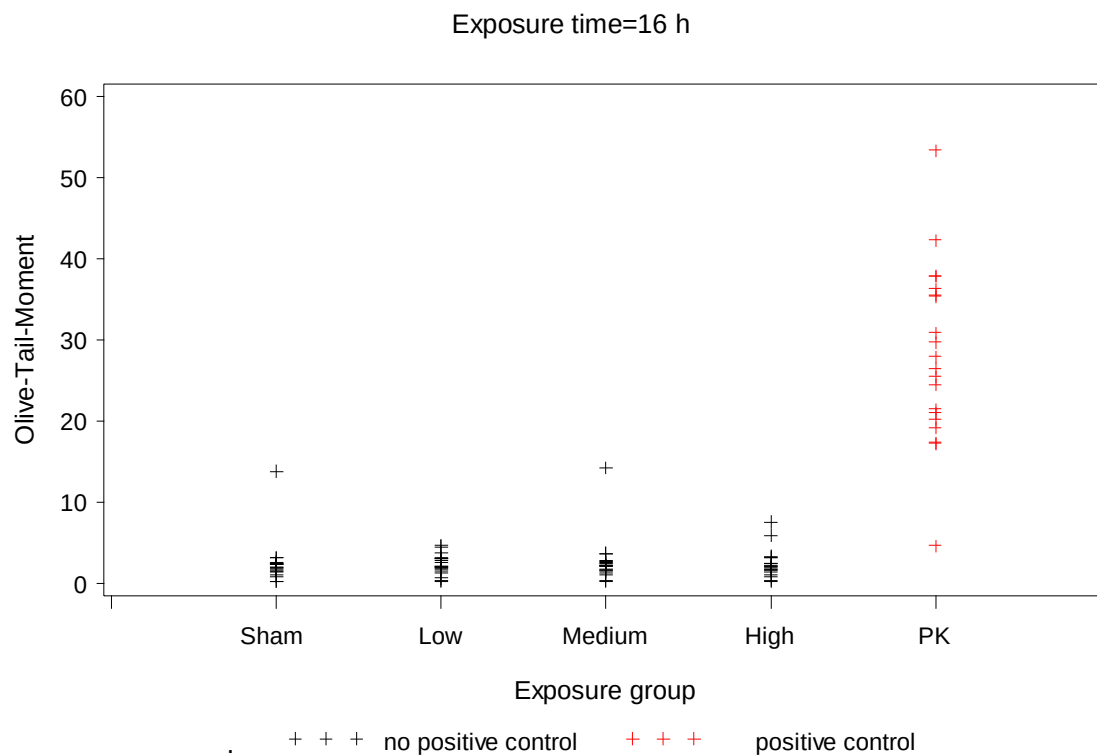


Abbildung 5: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße *Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

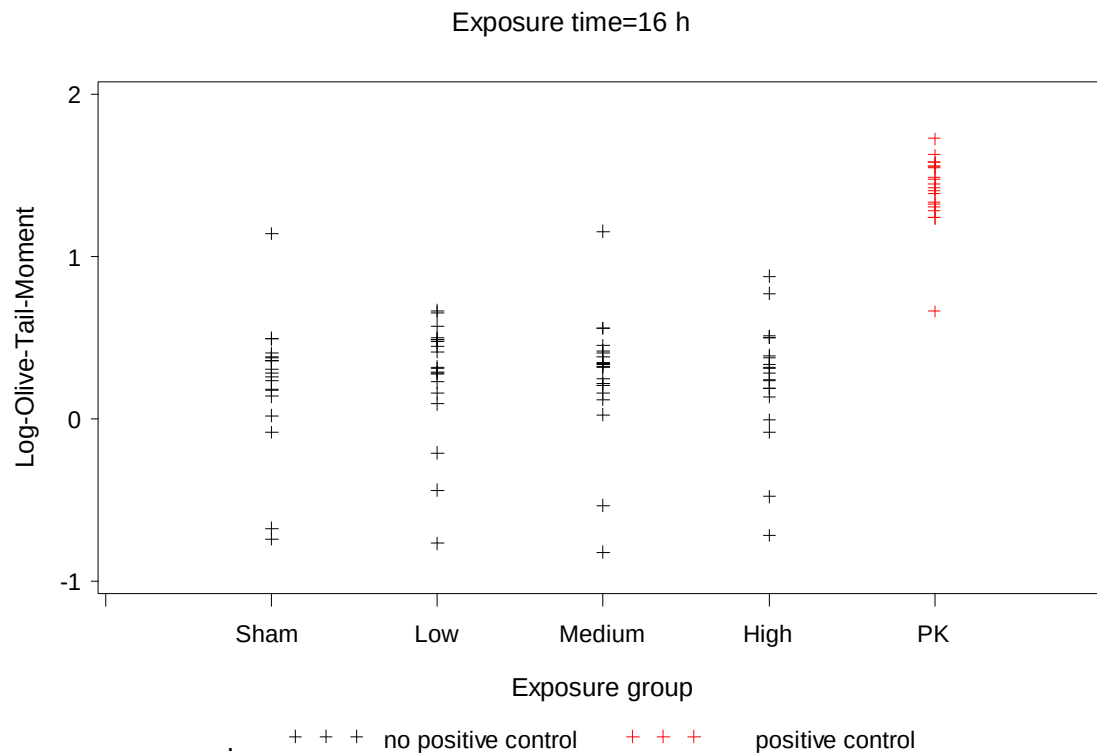


Abbildung 6: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße *Log-Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

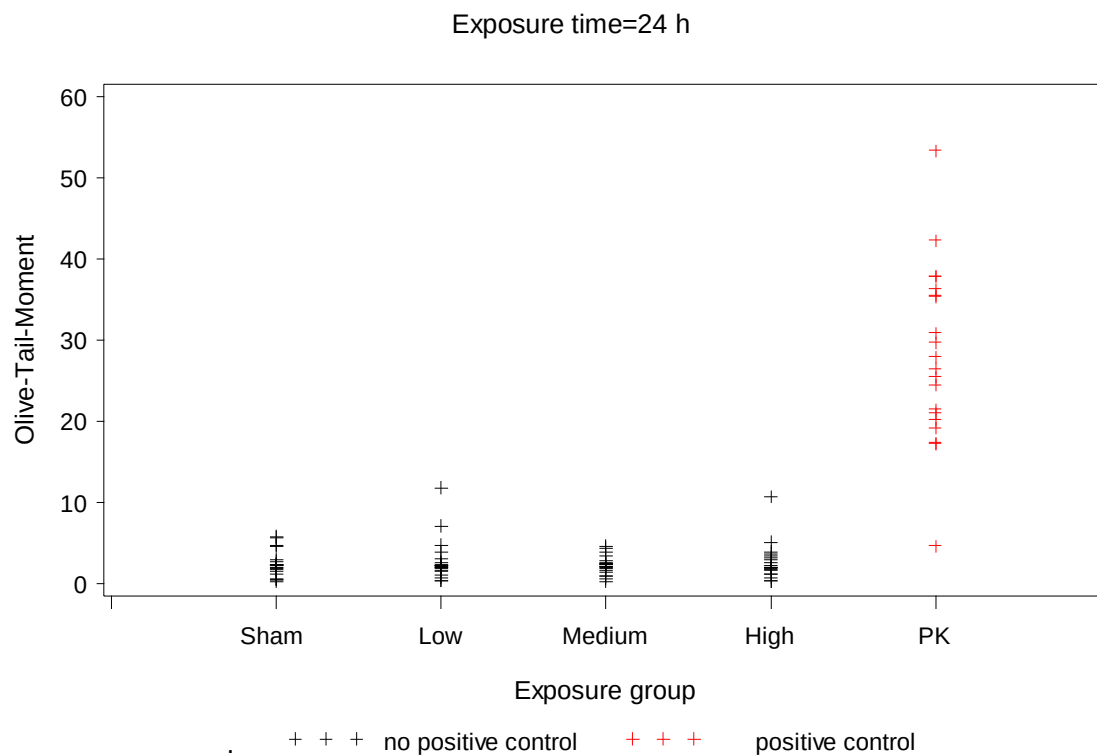


Abbildung 7: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße *Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

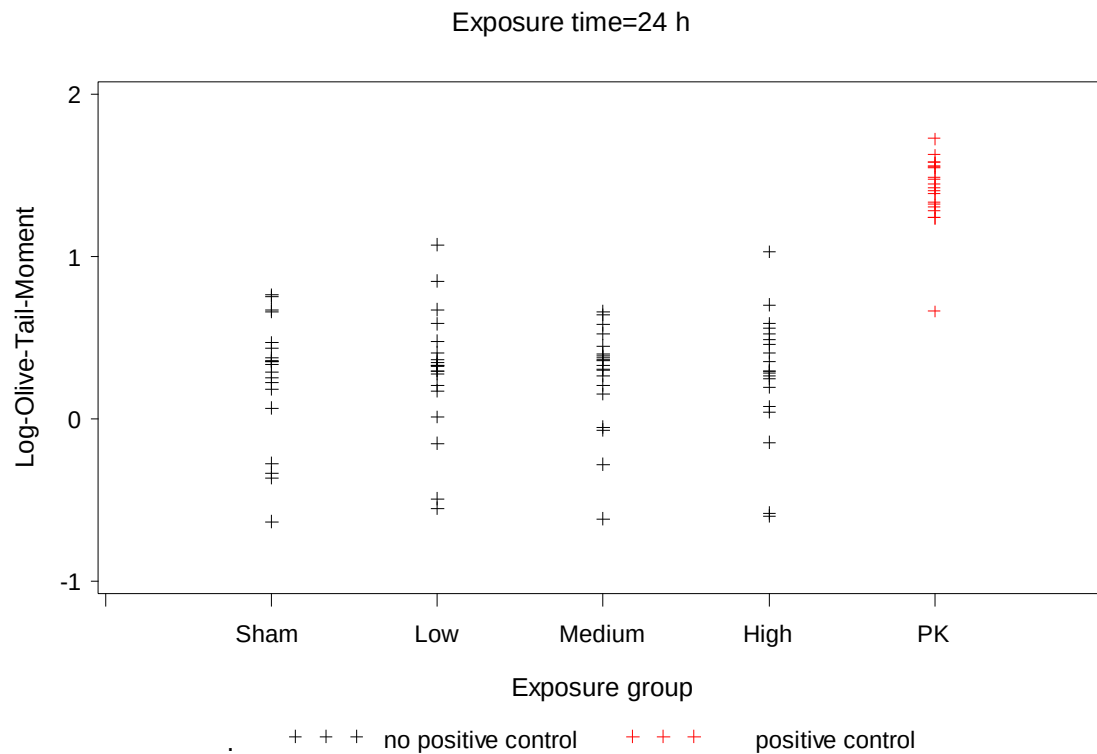


Abbildung 8: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße *Log-Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

Zielgröße: *Median Head-DNA (%) / Log(100-Median Head DNA (%))*

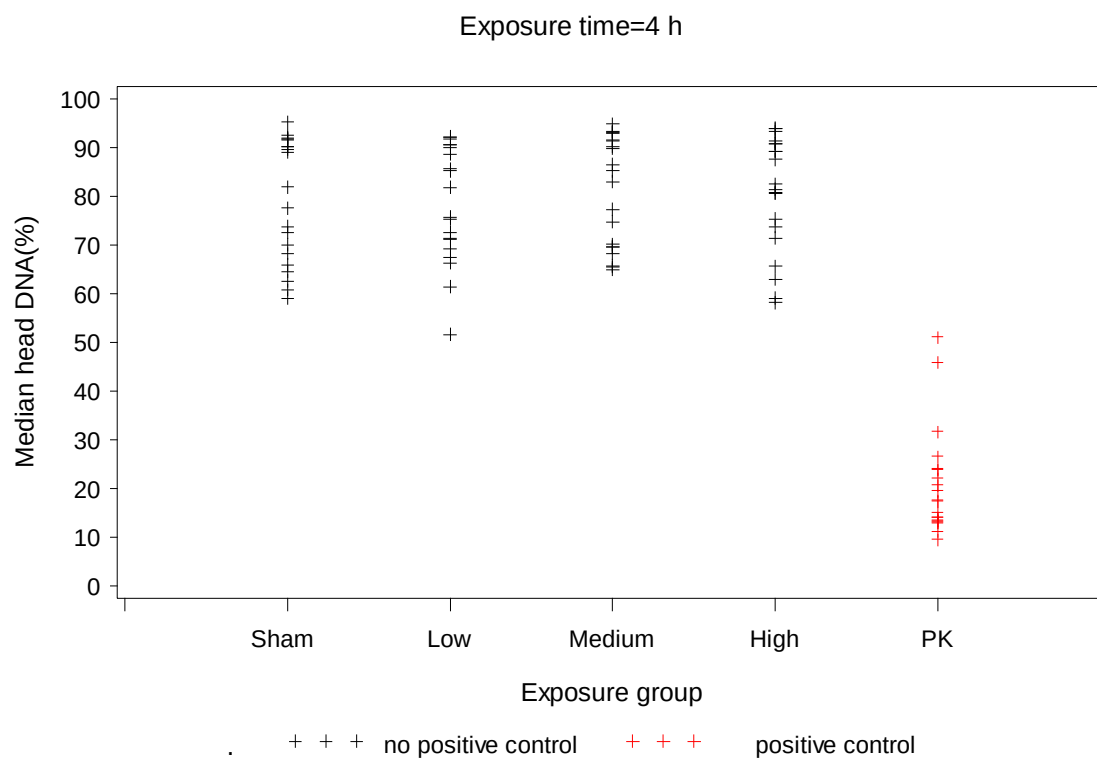


Abbildung 9: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße *Median Head-DNA (%)*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

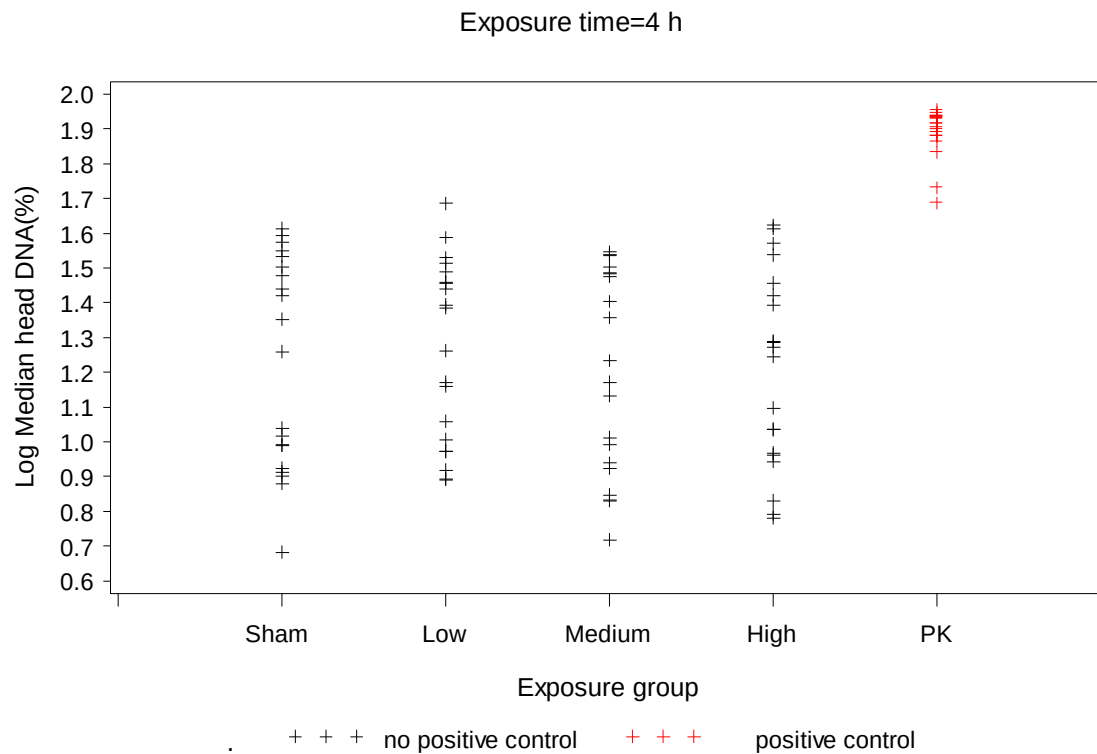


Abbildung 10: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße *Log(100-Median Head DNA (%))*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

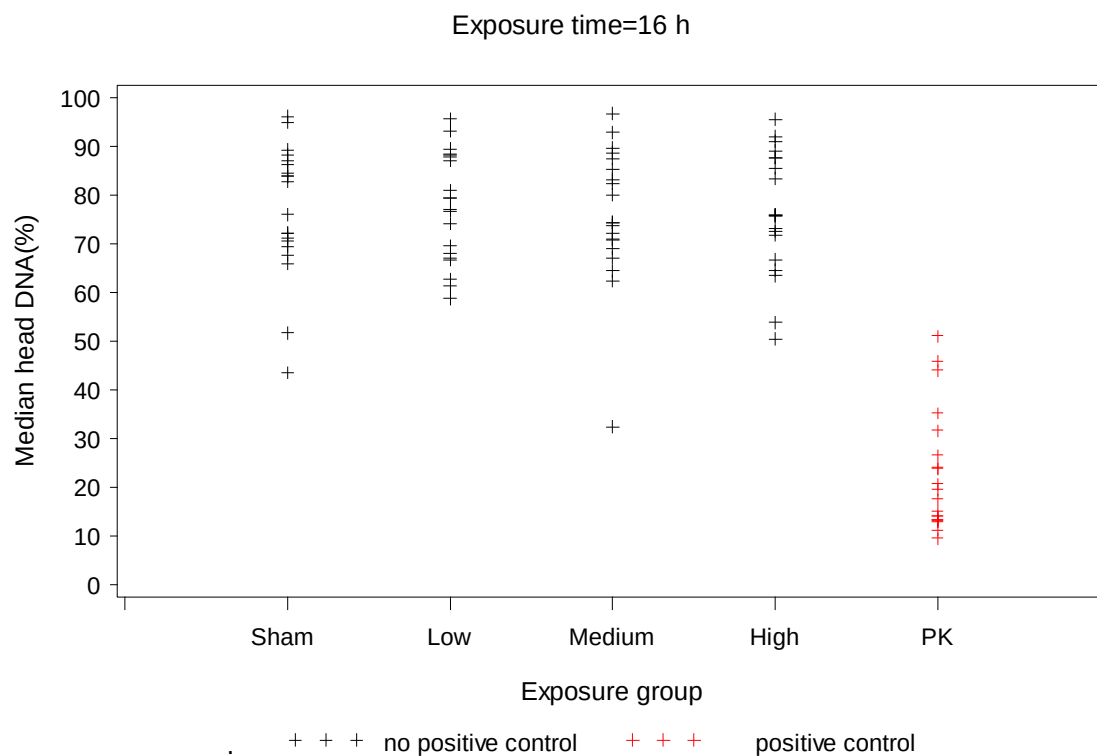


Abbildung 11: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße *Median Head-DNA (%)*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

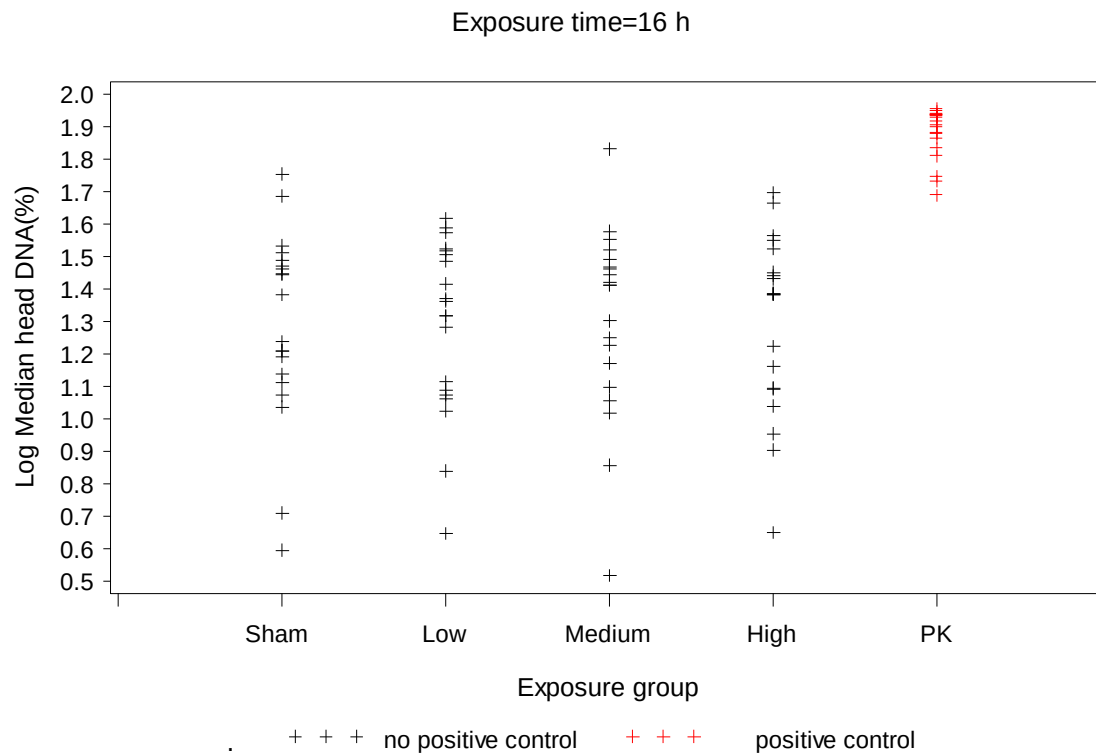


Abbildung 12: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße *Log(100-Median Head DNA (%))*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

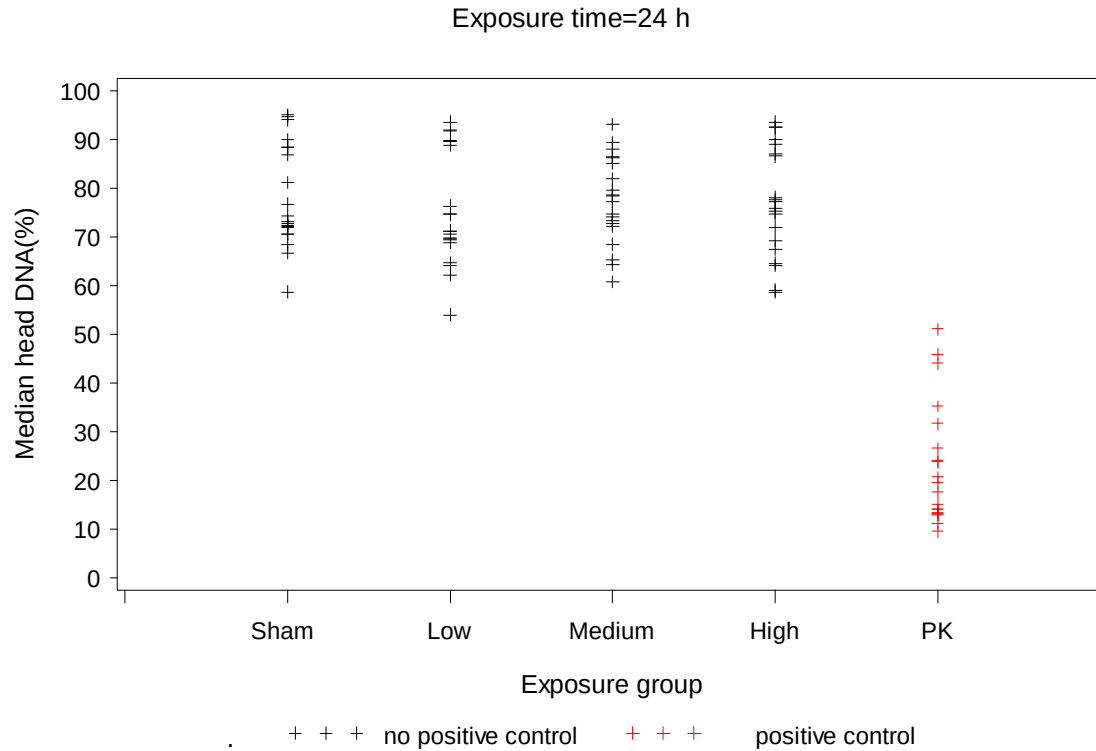


Abbildung 13: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße *Median Head-DNA (%)*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

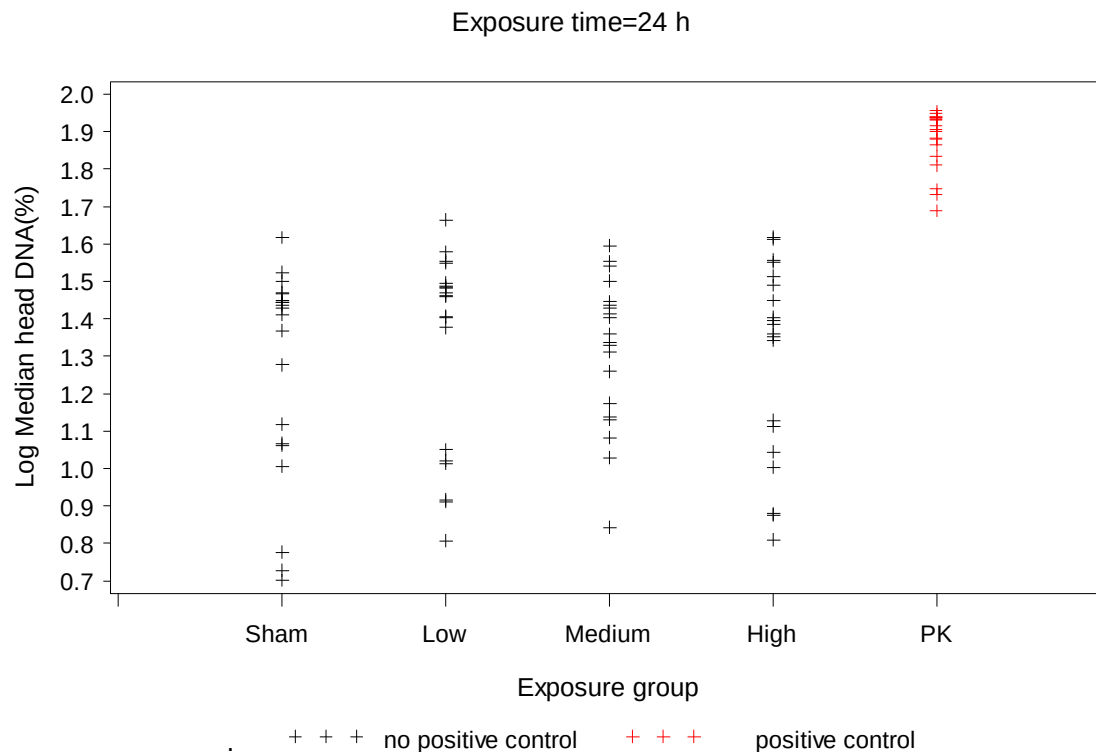


Abbildung 14: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße $\text{Log}(100\text{-Median Head DNA } (\%))$, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

3.2.2 Comet-Assay mit FPG-Inkubation – Rohdatendarstellung

Für die beiden Zielgrößen des Comet-Assays mit FPG-Inkubation sind, analog zum Comet-Assay, jeweils die eigentlichen Rohdaten und die logarithmierten Werte aufgeführt. Als Zielvariablen für die Endanalyse gelten auch hier im Folgenden aber immer nur die log-transformierten Werte.

Nachfolgend dargestellt sind die graphisch aufgetragenen Rohdaten des Comet-Assays für die Befeldungsgruppen Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle; für 72h Befeldung und 72h Befeldung mit anschließender FPG-Inkubation. Dargestellt sind im ersten Teil für den Comet-Assay ohne und mit FPG-Inkubation jeweils *Olive-Tail-Moment* und *Log-Olive-Tail-Moment* (Abbildung 15-18). Im Anschluss daran sind die Rohdaten für den Median des DNA-Gehaltes im Kometenkopf (Kern), dem sogenannten *Median Head-DNA (%)* bzw. *Log-Median-Head-DNA (%)* aufgetragen (Abbildung 19-22).

Zielgröße: Olive-Tail-Moment / Log-Olive-Tail-Moment

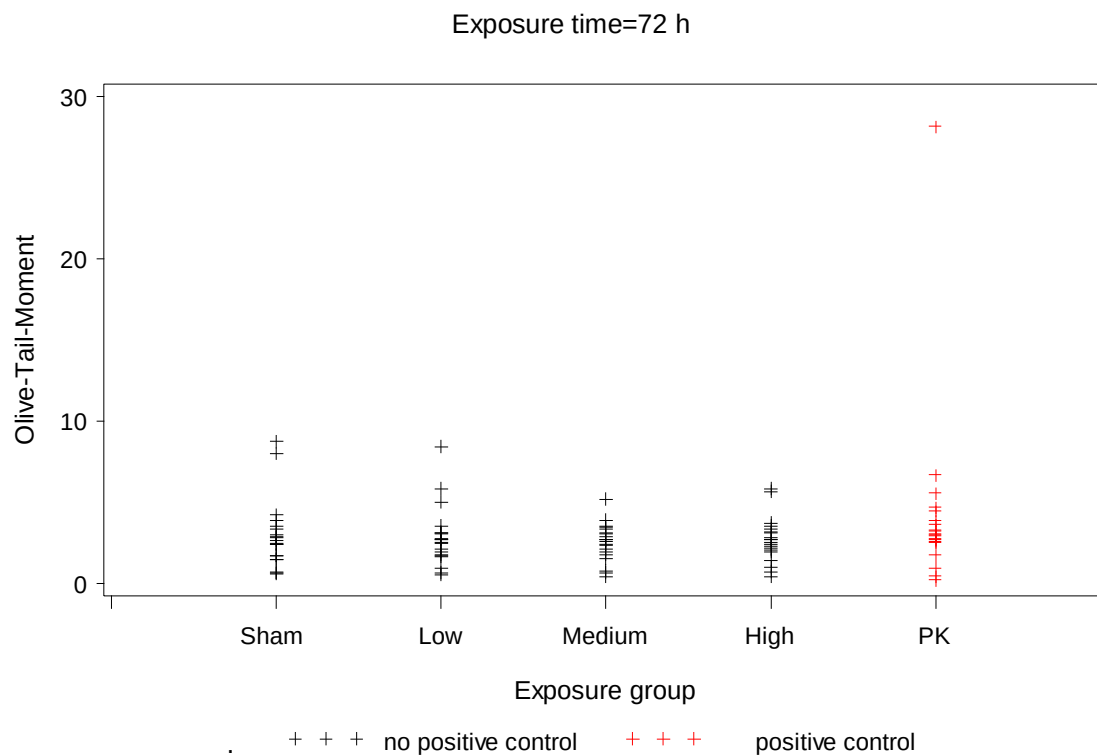


Abbildung 15: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße *Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

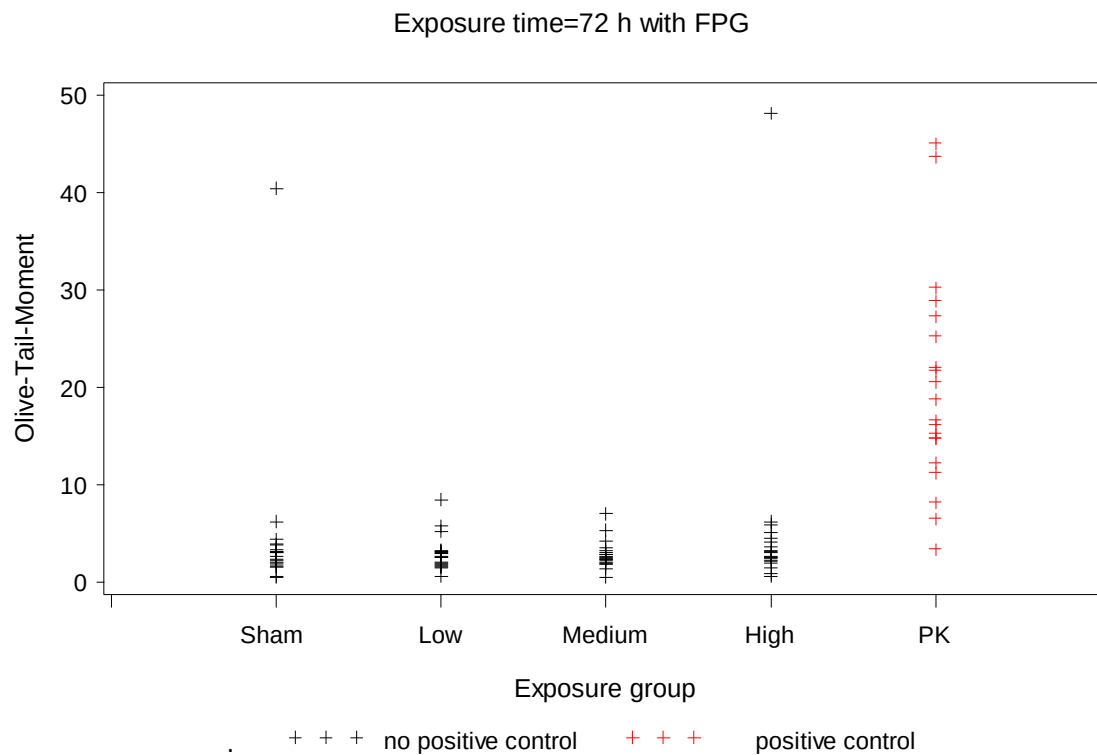


Abbildung 16: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße *Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

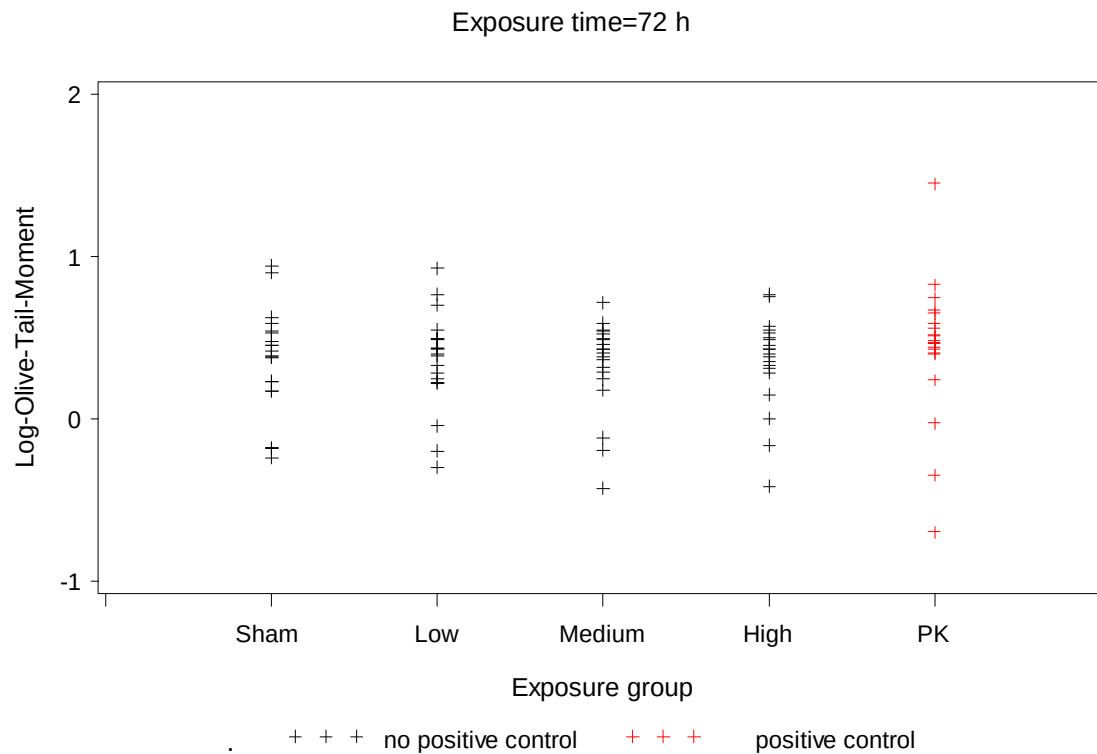


Abbildung 17: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße *Log-Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

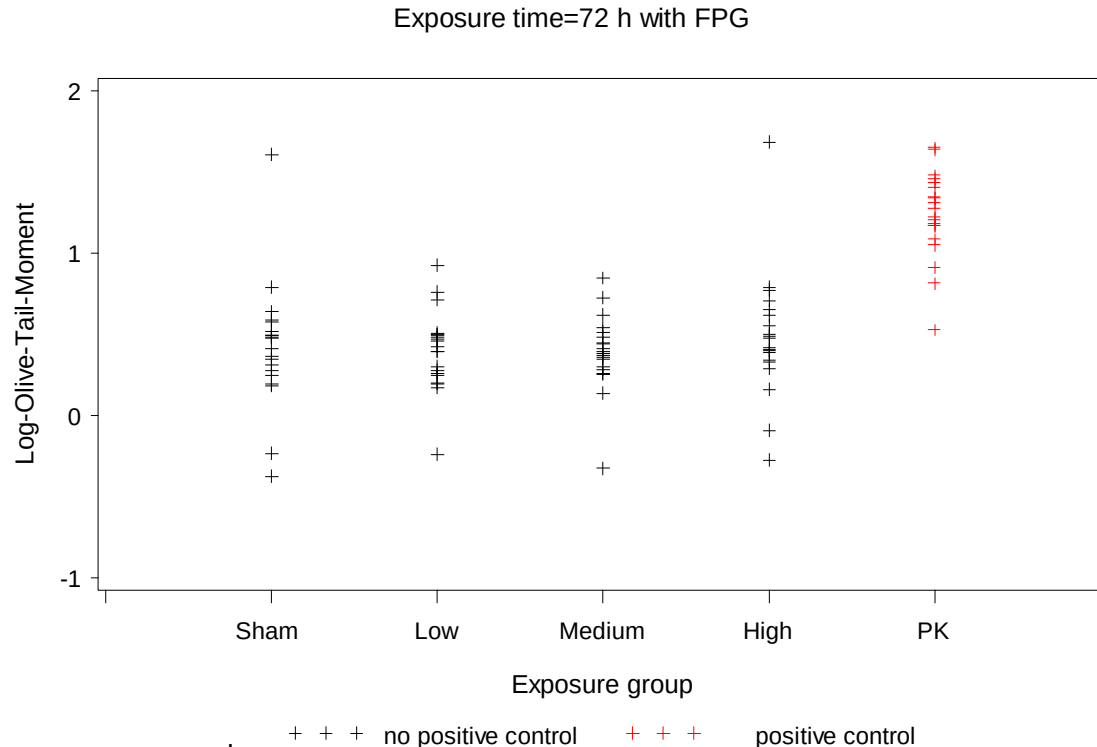


Abbildung 18: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße *Log-Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

Zielgröße: Median Head-DNA (%) / Log(100-Median Head DNA (%))

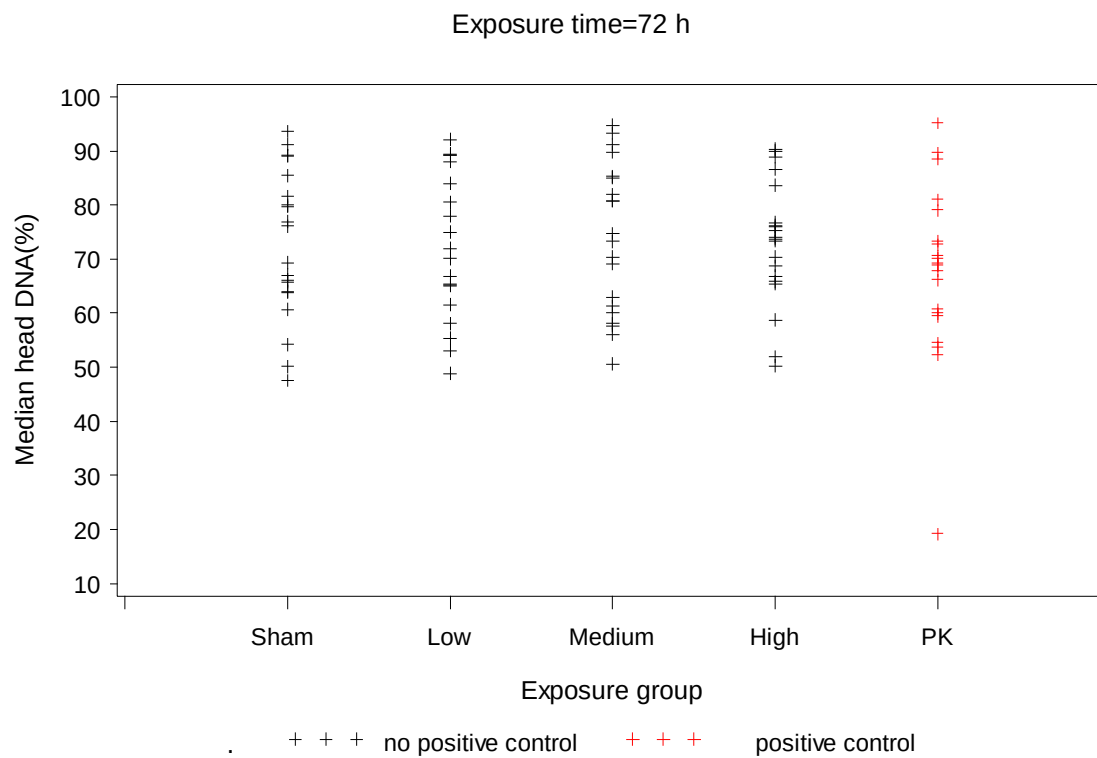


Abbildung 19: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße *Median Head-DNA (%)*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

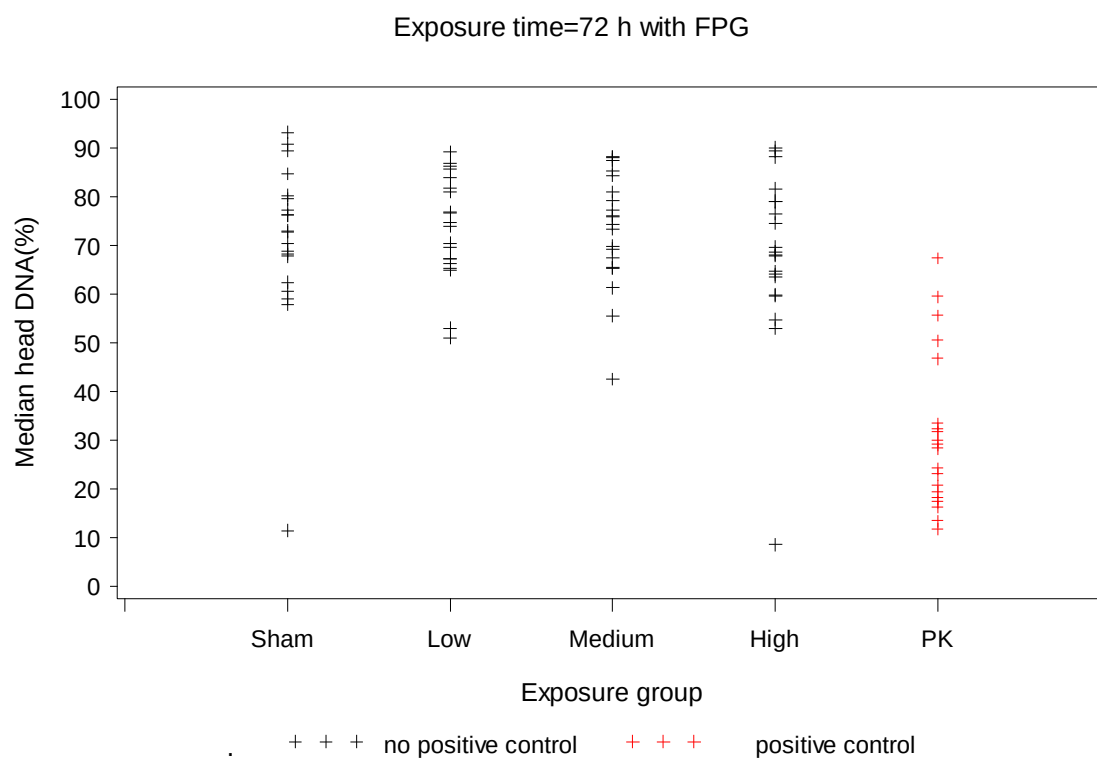


Abbildung 20: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße *Median Head-DNA (%)*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

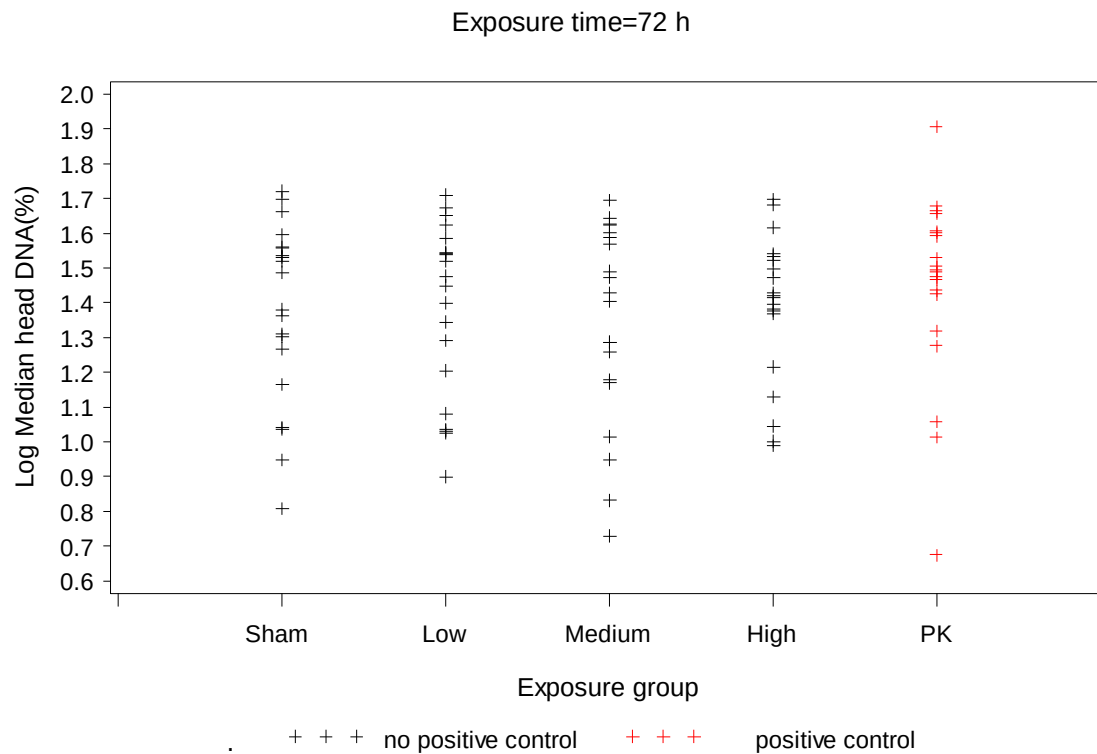


Abbildung 21: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße $\text{Log}(100\text{-Median Head DNA } (\%))$, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

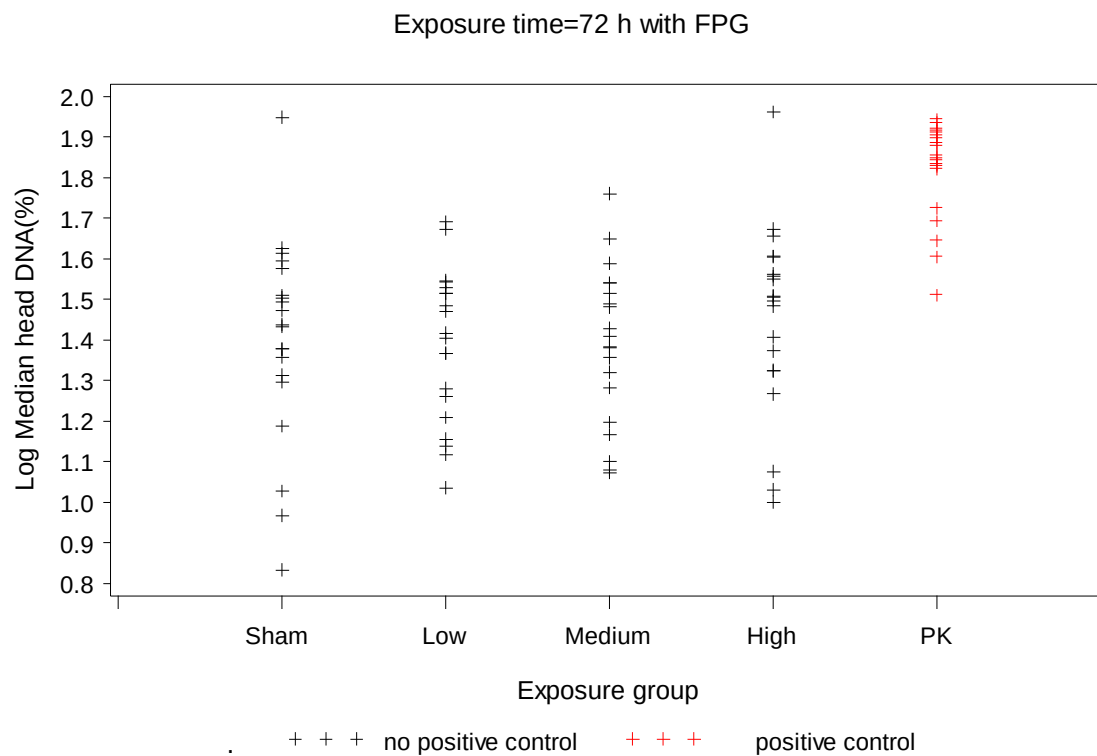


Abbildung 22: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße $\text{Log}(100\text{-Median Head DNA } (\%))$, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

3.2.3 Mikronukleustest mit CREST-Analytik – Rohdatendarstellung

In den nachfolgenden Abbildungen sind die Rohdaten des Mikronukleustests mit CREST-Analytik für die Befeldungsgruppen Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle; für 15 und 72h Befeldung graphisch aufgetragen. Dargestellt wurden jeweils die Anzahl der Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen (Abbildung 23-24), die Anzahl der CREST-positiven Mikrokerne (Abbildung 25-26), sowie die, anhand des CBPI bestimmten, Proliferationsindizes (Abbildung 27-28).

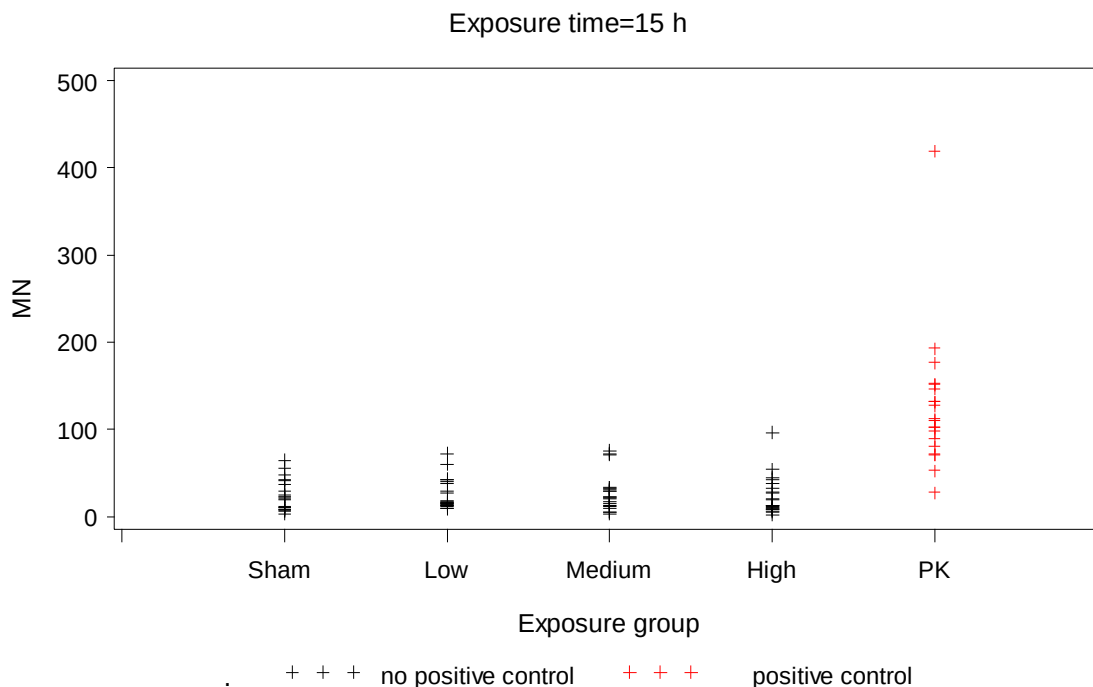


Abbildung 23: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße *Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

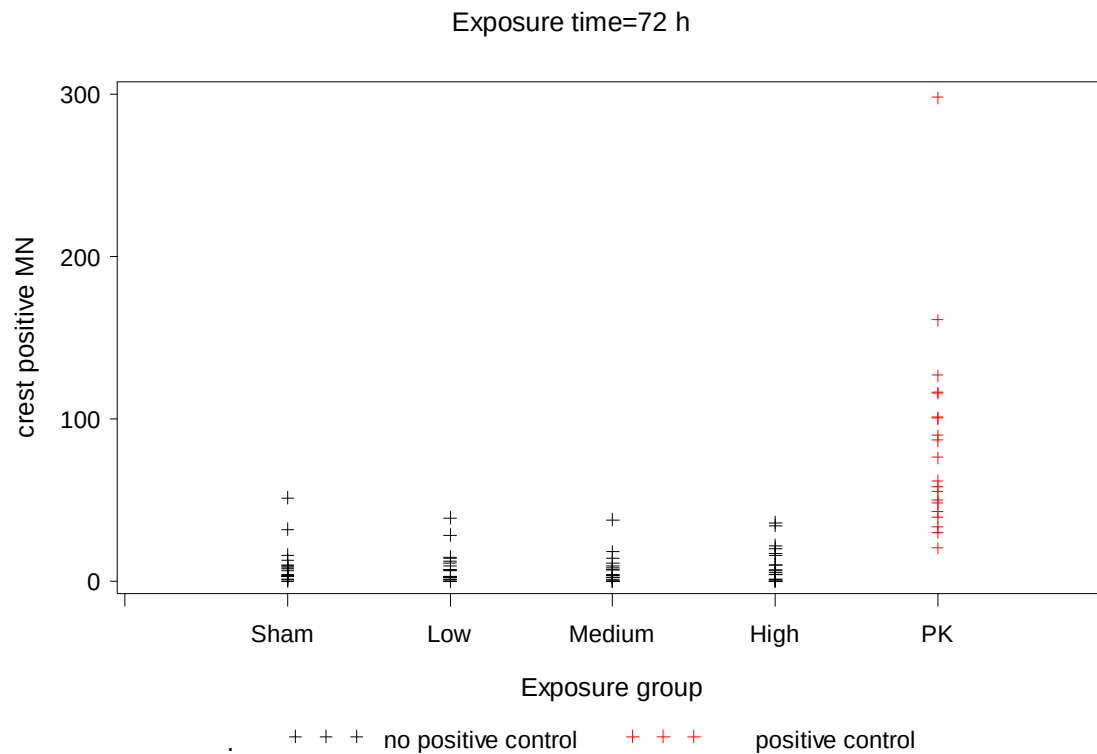


Abbildung 26: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße *CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

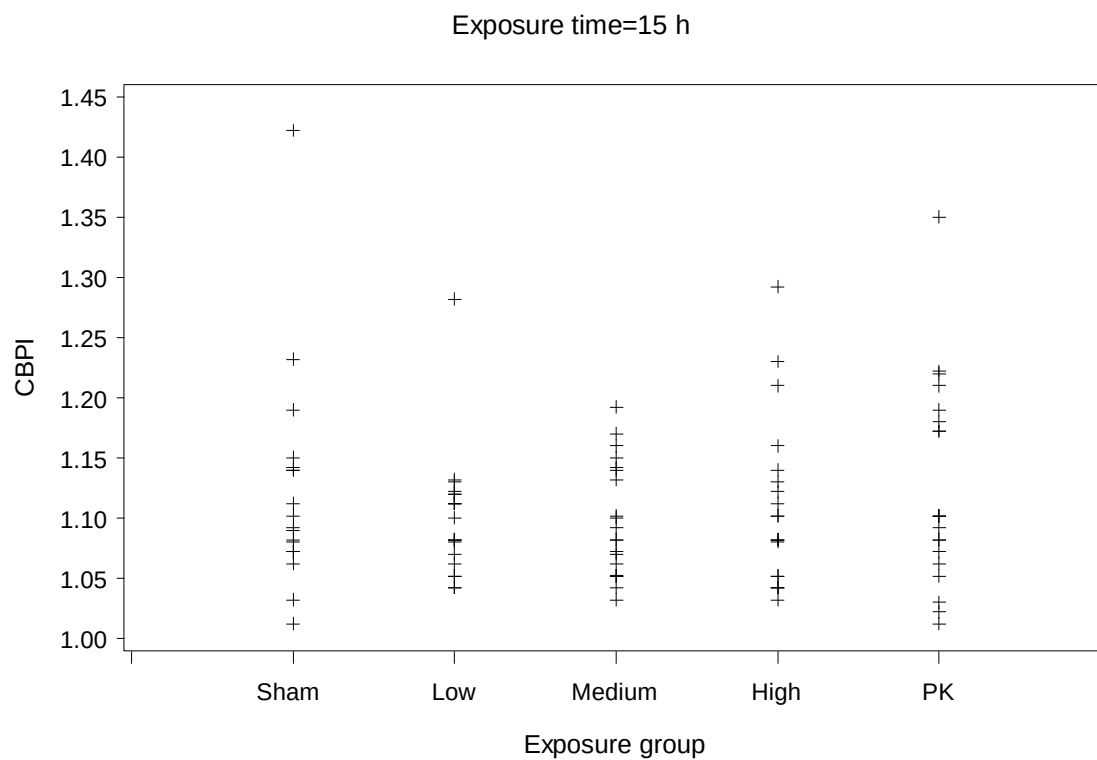


Abbildung 27: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße *CBPI Proliferationsindex*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle für die Gentoxizität).

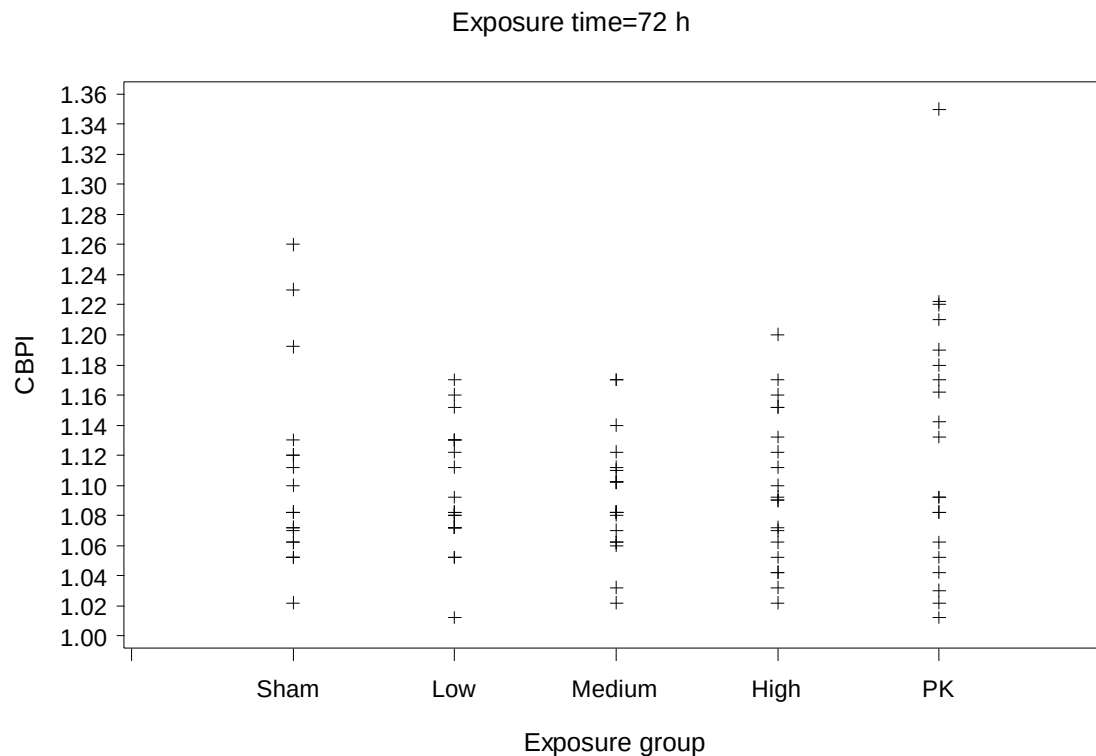


Abbildung 28: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße *CBPI Proliferationsindex*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle für die Gentoxizität).

3.2.4 Erweiterter Mikronukleustest - Rohdatendarstellung

Graphisch dargestellt sind im Folgenden die Rohdaten des erweiterten Mikronukleustests mit CREST-Analytik für die Befeldungsgruppen Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle; für 72h Befeldung. Auch hier wurden analog dem vorher beschriebenen, standardmäßig durchgeführten Mikrokerntest jeweils die Anzahl der Mikrokerne, hier jedoch in 10.000 binukleären Zellen für die EMF-exponierten Zellen, sowie 2.000 binukleären Zellen für die Positivkontrolle (Abbildung 29), die Anzahl der CREST-positiven Mikrokerne (Abbildung 30), sowie die, anhand des CBPI bestimmten, Proliferationsindizes (Abbildung 31) dargestellt. Zu beachten ist, dass für den erweiterten Mikrokerntest, welcher als Ergänzung zum numerischen Chromosomenaberrationstest durchgeführt wurde, aufgrund des hohen Stichprobenumfangs von 10.000 binukleären Zellen, nur Proben von 4 Probanden befeldet und ausgewertet wurden.

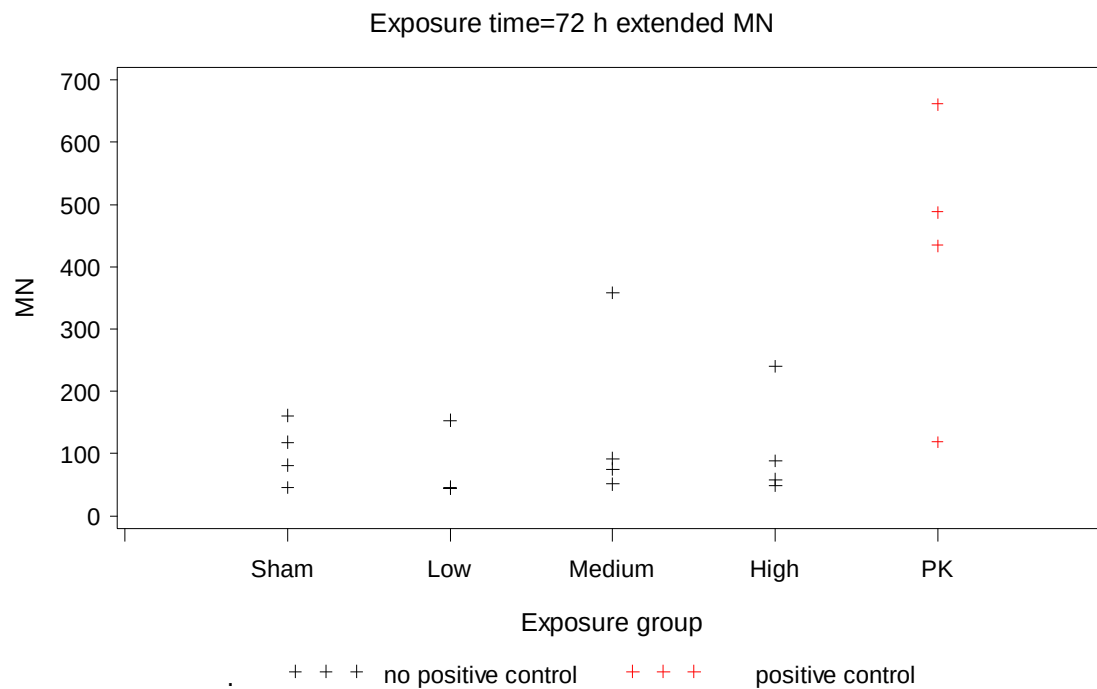


Abbildung 29: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße *Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen* (PK: 2.000 binukleäre Zellen), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

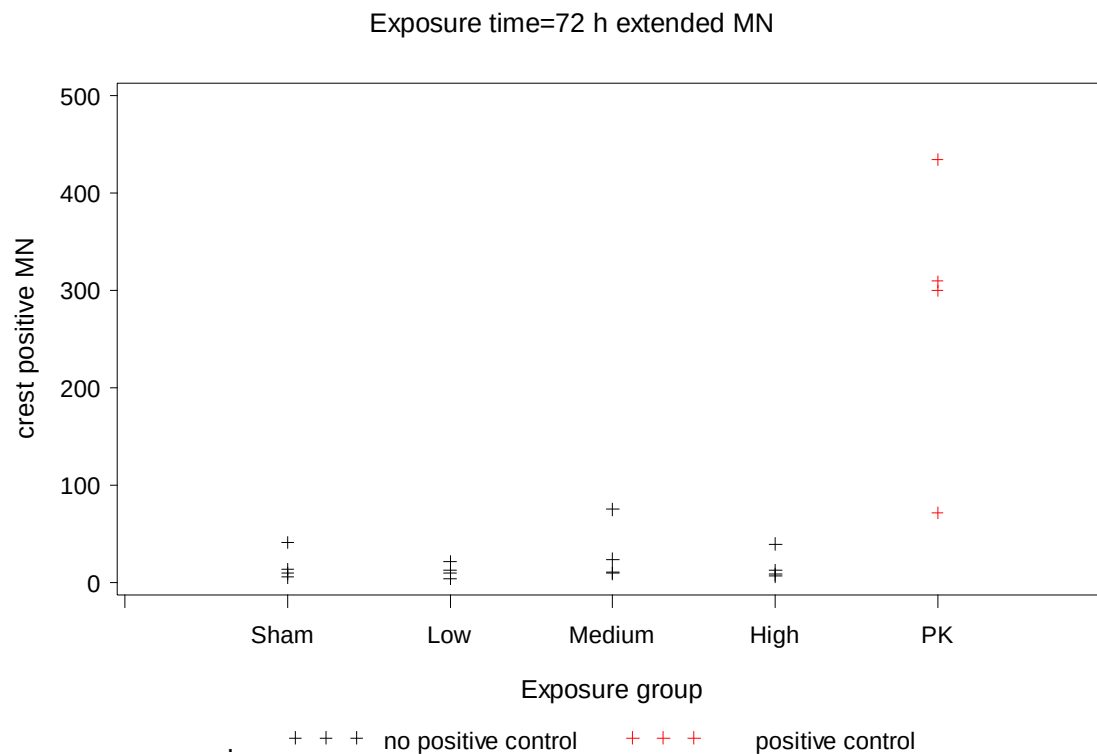


Abbildung 30: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße *CREST-positive Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen* (PK: 2.000 binukleäre Zellen), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

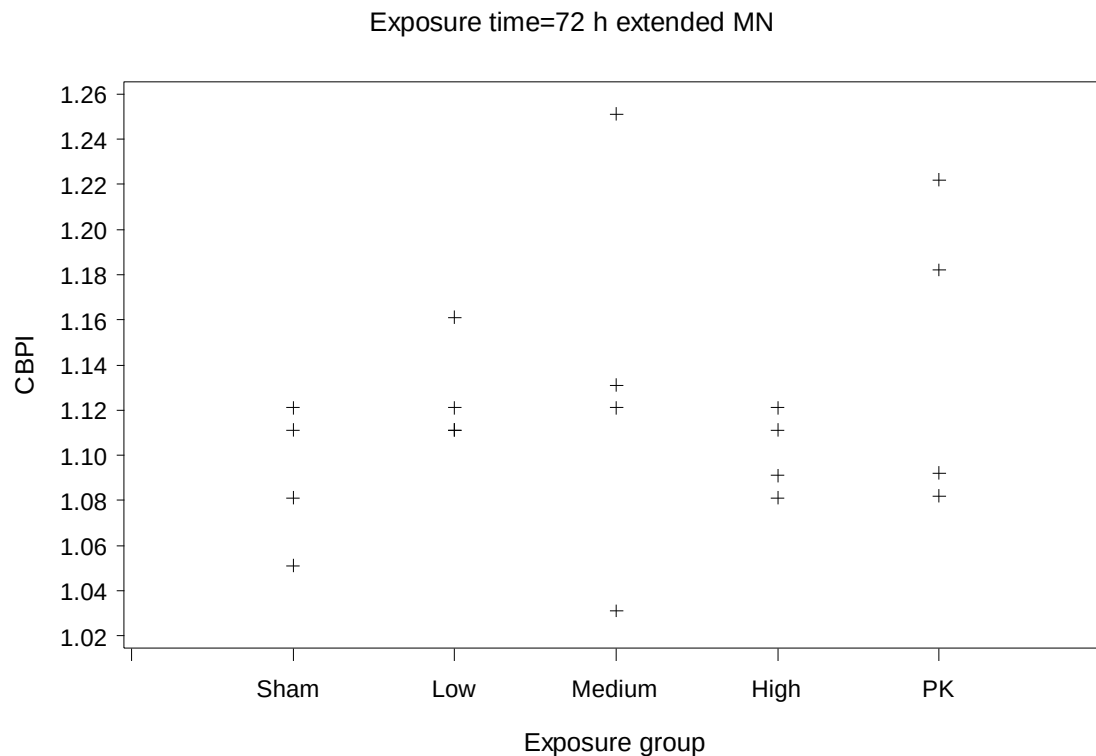


Abbildung 31: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße *CBPI Proliferationsindex*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle für die Gentoxizität).

3.2.5 numerische Chromosomenaberrationen - Rohdatendarstellung

Die Rohdaten der Chromosomenaberrationsanalyse auf numerische Aberrationen für die Befeldungsgruppen Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle sind in den nachfolgenden Abbildungen dargestellt. In Abbildung 32 ist die Anzahl der Zellen mit Chromosomenverlusten, in Abbildung 33 die Anzahl der Zellen mit zusätzlichen Chromosomen und in Abbildung 34 die Gesamtzahl aneuploider Zellen dargestellt. Zu beachten ist, dass aufgrund der hohen Streuung des Tests, in Absprache mit dem BfS, nur 10 Probanden befeldet und ausgewertet wurden. Ersatzweise für die nicht-befeldeten 10 Probanden wurde der erweiterte Mikrokerntest mit 5-fachem Stichprobenumfang (Analyse von 10.000 statt 2.000 binukleären Zellen je Dosis je Proband) durchgeführt und ausgewertet.

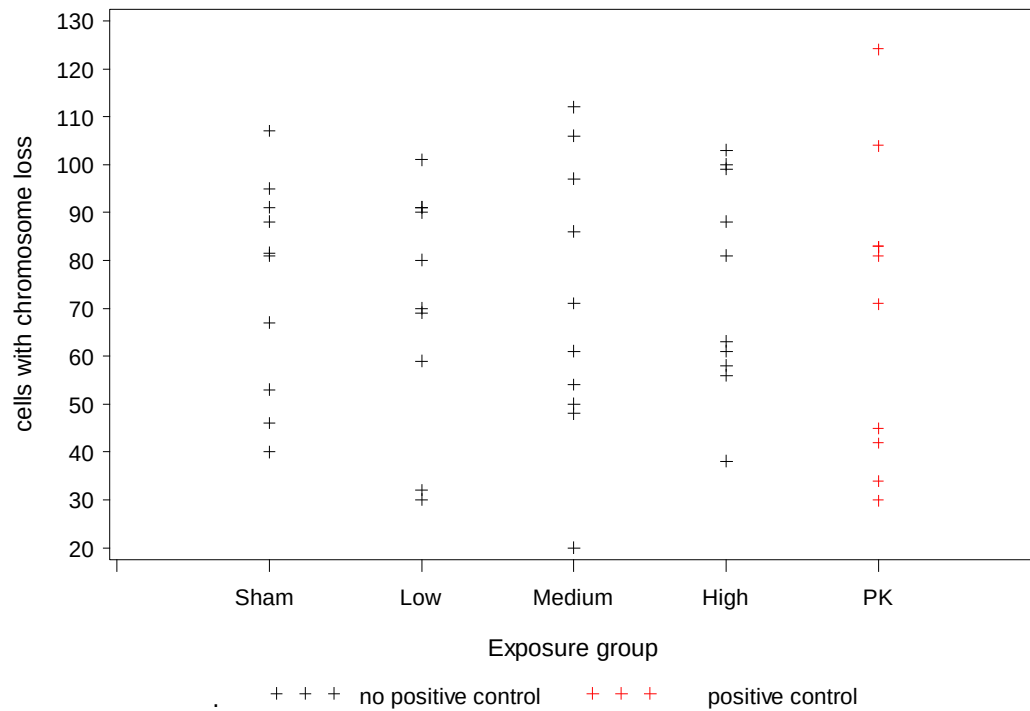


Abbildung 32: Darstellung der Rohdaten für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße *Zellen mit Chromosomenverlusten in 200 Metaphasen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

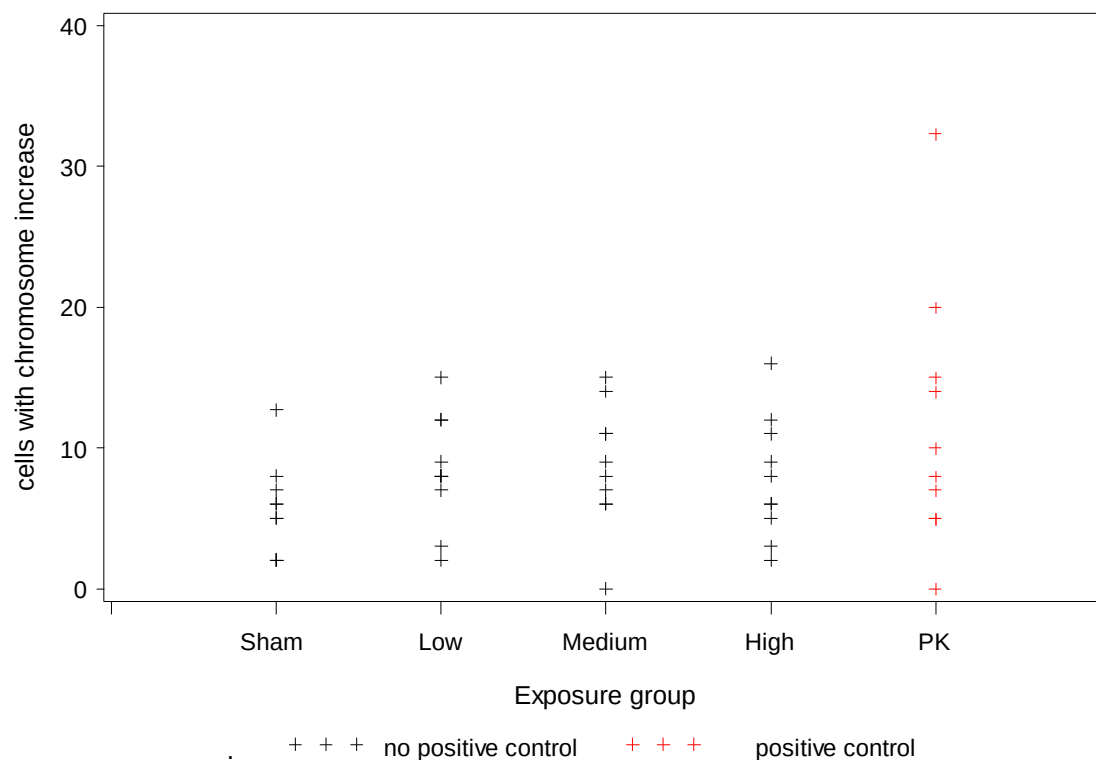


Abbildung 33: Darstellung der Rohdaten für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße *Zellen mit zusätzlichen Chromosomen in 200 Metaphasen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

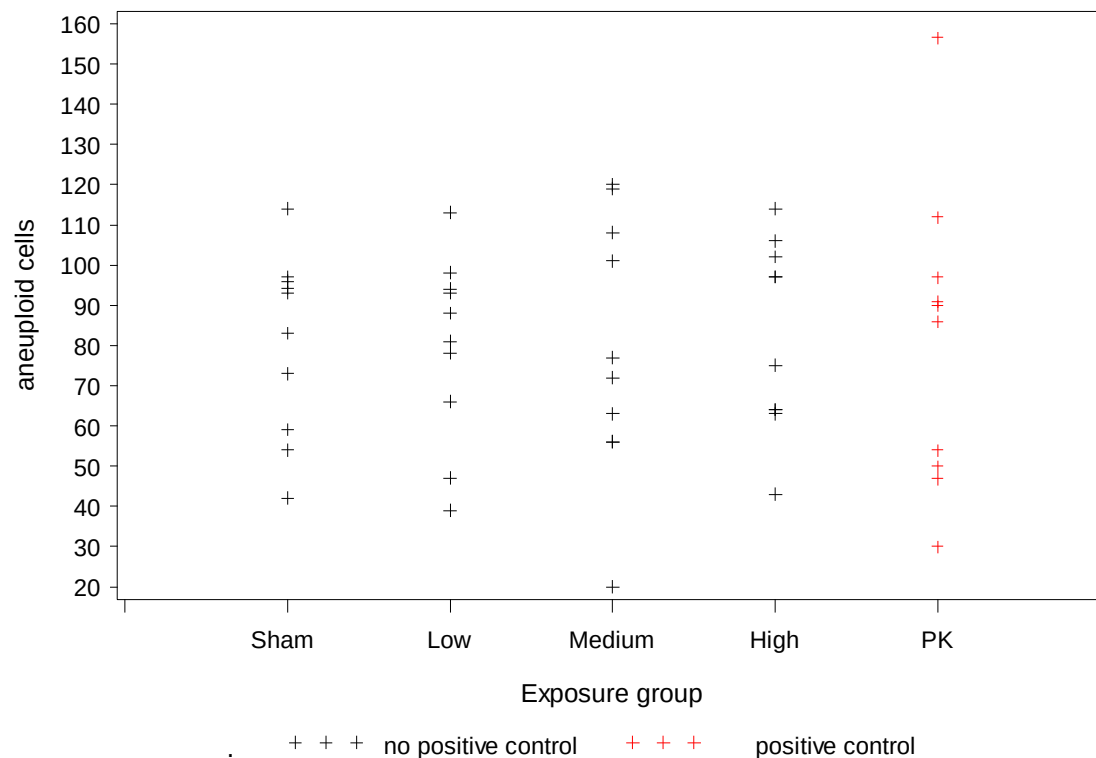


Abbildung 34: Darstellung der Rohdaten für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße *aneuploide Zellen insgesamt in 200 Metaphasen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

3.2.6 TUNEL-Apoptosetest - Rohdatendarstellung

Die Rohdaten des TUNEL-Tests auf apoptotische Ereignisse für die Befeldungsgruppen Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle sind in Abbildung 35 dargestellt. Da sich eine Induktion der Apoptose in den Fibroblasten mit chemischen Agenzien nur sehr schwer ohne sekundäre Effekte, wie massive akute Zytotoxizität, durchführen ließ, wurde hier auf die leicht induzierbare Kontrollzelllinie HL-60 zurück gegriffen. Daher sind in der Abbildung zusätzlich die Werte für die Testkontrolle von nicht-induzierten HL-60 (HL-60 sham) sowie Actinomycin D-induzierten HL-60 (HL-60-Act) dargestellt.

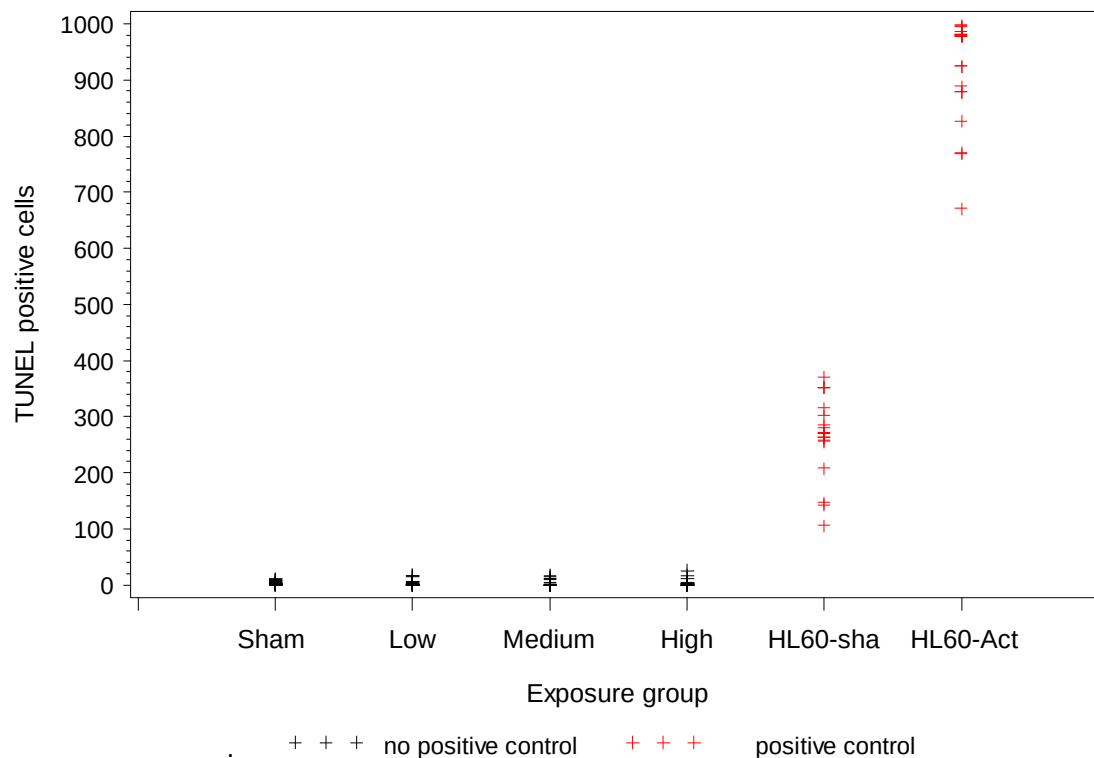


Abbildung 35: Darstellung der Rohdaten für den Test auf apoptotische Ereignisse, Zielgröße *TUNEL-positive Zellen in 1.000 Zellen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, HL-60-sham = Kontrollzelllinie, unbehandelt, HL-60 Act = Kontrollzelllinie, Actinomycin D-behandelt).

3.2.7 Zellzyklus – Rohdatendarstellung

Die Zellzyklusrohdaten, aufgeschlüsselt nach G1-, S- und G2-Phase, für die Befeldungsgruppen Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle sind in den Abbildungen 37-39 dargestellt. Eine Positivkontrolle wurde für die Kontrolle der Zellzyklusverteilung der befeldeten Zellen nicht geplant und entsprechend auch nicht durchgeführt.

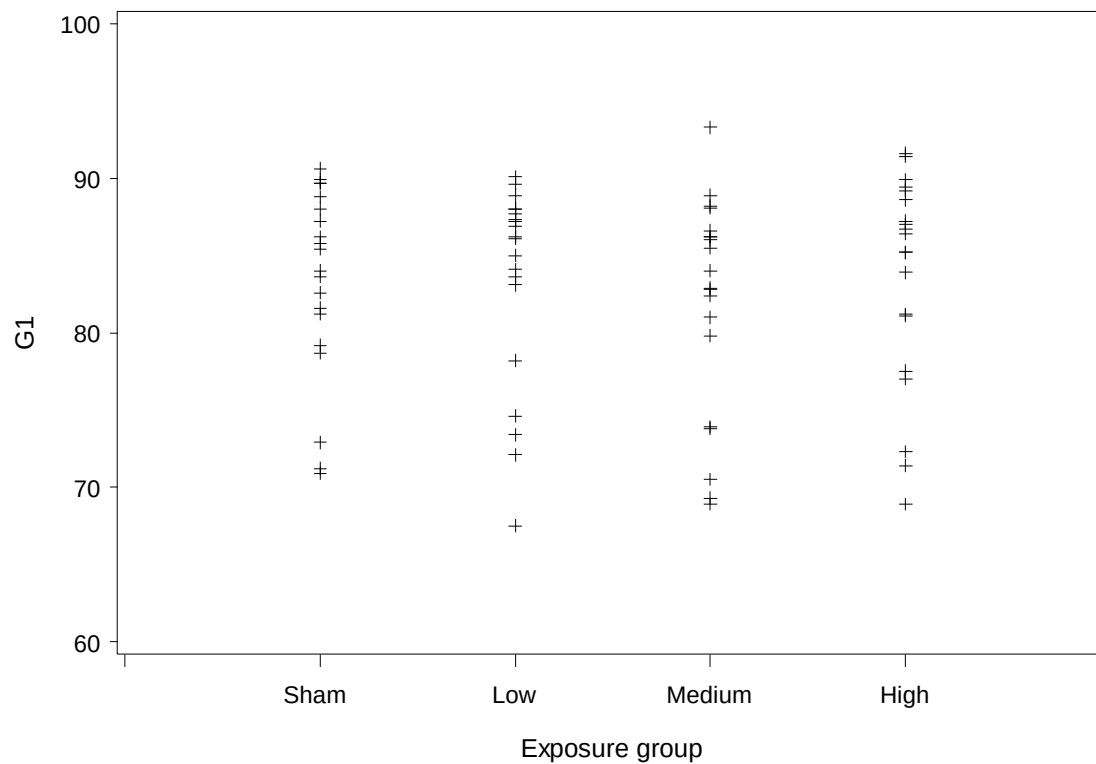


Abbildung 36: Darstellung der Rohdaten für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße G1-Phase-Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg).

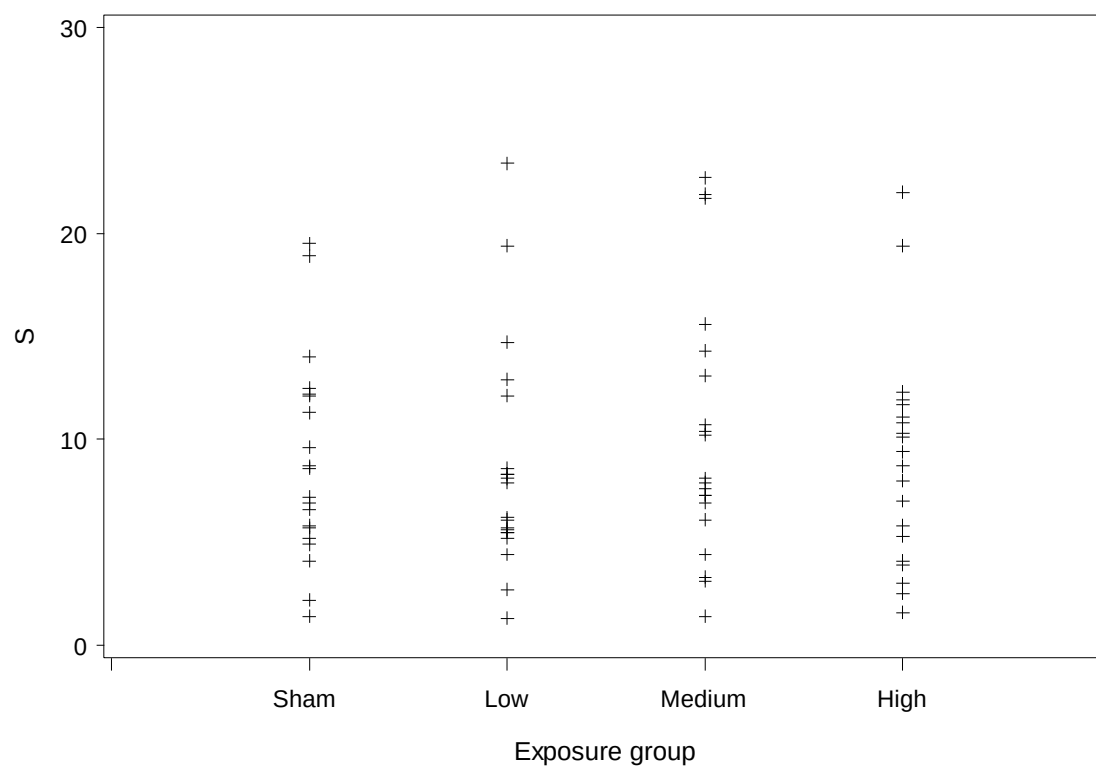


Abbildung 37: Darstellung der Rohdaten für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße S-Phase-Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg).

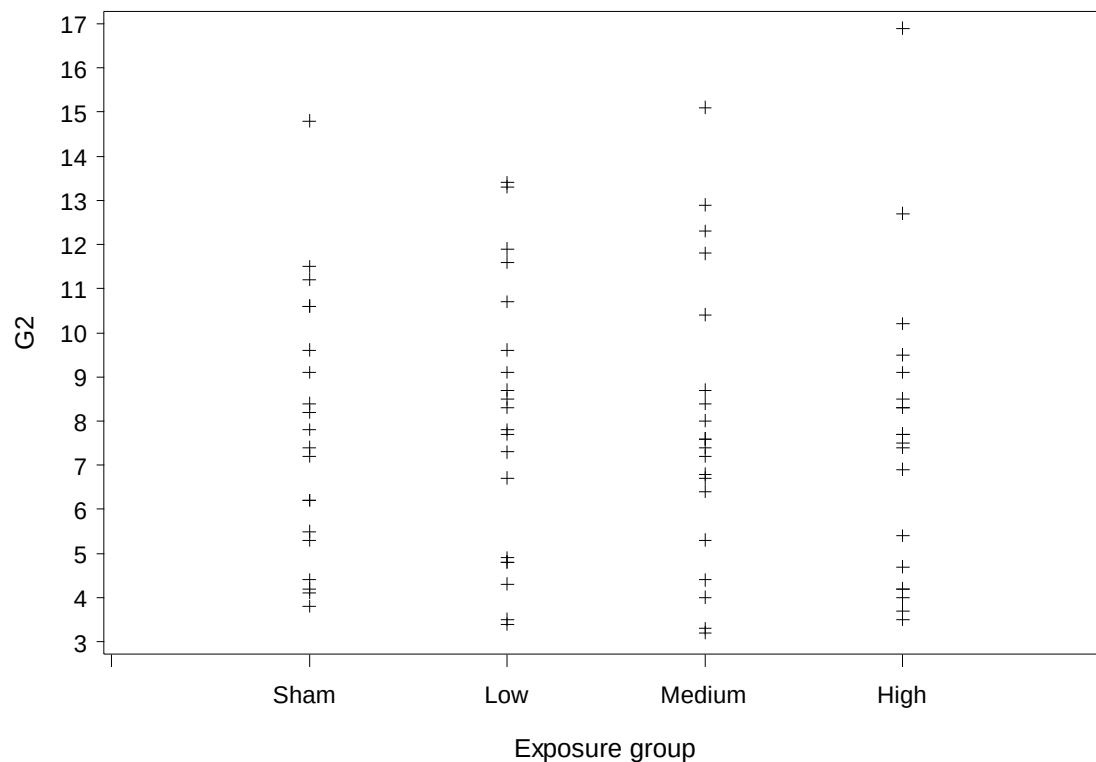


Abbildung 38: Darstellung der Rohdaten für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße G2-Phase-Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg).

3.3 Dosistrendanalyse - Hauptauswertung

Für die Hauptauswertung zum Testen eines Dosiseffekts wurden 26 Zielvariablen verwendet. Diese 26 Zielvariablen setzen sich aus den 23 bereits festgelegten Zielvariablen, sowie den 3 Zielvariablen für die Analysen für den erweiterten Mikrokerntest (MN, crest positive MN und CBPI) zusammen. Da die Ergebnisse der Variablen des erweiterten Mikrokerntests aufgrund der kleinen Fallzahl schwer zu interpretieren sind, wurden diese zwar immer mit berichtet, werden aber nur explorativ beurteilt.

Für die verschiedenen Assays wurden im Analyseplan jeweils ein primärer Test auf einen Dosistrend und ein Test als Sensitivitätsanalyse festgelegt. Für alle Zielvariablen der unterschiedlichen Assays wurde als primärer Test ein Permutationstest durchgeführt.

In Tabelle 11 sind die Ergebnisse des Permutationstests (für alle Zielvariablen) zum Testen eines Dosistrends zwischen den verschiedenen Expositionsgruppen aufgeführt. Der Permutationstest wurde mit den entblindeten Daten mit dem R-Paket „coin“ und der zugehörigen Funktion „independence_test“ mit

B= 100000 Wiederholungen durchgeführt. Die Positivkontrolle wurde bei dieser Analyse nicht mit berücksichtigt.

Tabelle 11: Ergebnisse des Permutationstests (zur primären Analyse) für die Zielvariablen für alle Probanden mit n=20, beim erweiterten Mikrokerntest n=4 und bei den Chromosomenaberrationen n=10. P-Werte kleiner als 0.05 werden fett gedruckt dargestellt.

Variable	Z-Test-Statistik	p-Wert
Log(100-Median Head DNA (%)) after 4 h	-0.5025	0.6173
Log(100-Median Head DNA (%)) after 16 h	0.2041	0.8399
Log(100-Median Head DNA (%)) after 24 h	0.2912	0.7724
Log(100-Median Head DNA (%)) after 72 h	-0.0126	0.99
Log(100-Median Head DNA (%)) after 72 h FPG	0.7144	0.478
Log-Olive-Tail-Moment after 4 h	-0.0892	0.9298
Log-Olive-Tail-Moment after 16 h	-0.0072	0.9943
Log-Olive-Tail-Moment after 24 h	0.1491	0.8826
Log-Olive-Tail-Moment after 72 h	-0.1958	0.8461
Log-Olive-Tail-Moment after 72 h FPG	0.5383	0.597
MN after 15 h	0.004	0.9968
MN after 72 h	0.314	0.7561
MN extended after 72 h	0.4846	0.6652
crest positive MN after 15 h	0.3564	0.7248
crest positive MN after 72 h	0.0218	0.9827
crest positive MN extended after 72 h	0.3784	0.7458
CBPI after 15 h	-0.4198	0.6824
CBPI after 72 h	-0.2712	0.7888
CBPI extended after 72 h	0.347	0.7753
NCA cell chromosome loss	-0.0455	0.9655
NCA cell chromosome increase	1.22	0.2289
NCA aneuploid cells	0.1551	0.8795
TUNEL positive cells	0.4937	0.6271
Zellzyklus G1	-0.134	0.8947
Zellzyklus S	0.3361	0.7404
Zellzyklus G2	-0.3198	0.752

Die Permutationstests zeigen keine Auffälligkeiten. Es gibt keine p-Werte, die nach der Korrektur des Fehlers erster Art als signifikant gelten. Die p-Werte liegen alle zwischen 0.05 und 1, somit sind keine statistische Auffälligkeit zu erkennen. Die Werte vom erweiterten Mikrokerntest sind unter Vorbehalt zu beachten, da die Fallzahl mit 4 Probanden sehr klein ist.

In den nachfolgenden Tabellen 12-16 sind die zugehörigen Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Tests, Zielvariablen und Dosisgruppen für alle Probanden insgesamt, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen (Alter 18-19 Jahre) und adulten Probanden (Alter 50-59) aufgeführt.

Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Comet-Assays und alle Expositionsbedingungen. N=20 Probanden: 10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren

		<i>exposure time</i>									
		<i>4 h</i>		<i>16 h</i>		<i>24 h</i>		<i>72 h</i>		<i>72 h with FPG</i>	
		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>
<i>total (n=20)</i>											
<i>Olive-Tail-Moment</i>	<i>Exposure group</i>										
	<i>Sham</i>	1.62	0.79	2.50	2.76	2.36	1.64	2.91	2.13	4.55	8.54
	<i>Low</i>	1.68	0.70	2.28	1.23	2.75	2.62	2.81	1.85	2.89	1.76
	<i>Medium</i>	1.65	0.83	2.58	2.87	2.21	1.17	2.50	1.16	2.76	1.42
	<i>High</i>	1.64	0.74	2.45	1.83	2.58	2.25	2.65	1.38	5.28	10.19
	<i>PK</i>	29.06	10.63	26.09	12.55	28.24	10.91	4.31	5.83	20.14	11.00
<i>Median head DNA(%)</i>	<i>Exposure group</i>										
	<i>Sham</i>	78.93	12.71	76.41	13.35	78.31	10.63	72.53	13.78	70.94	17.40
	<i>Low</i>	78.50	11.97	77.52	11.24	75.27	11.57	72.32	13.51	73.56	10.81
	<i>Medium</i>	80.85	11.24	75.86	14.19	77.45	8.92	73.81	13.85	73.31	11.78
	<i>High</i>	80.53	11.94	75.97	12.30	77.20	11.32	73.11	11.52	67.96	17.80
	<i>PK</i>	20.84	11.06	27.31	19.44	22.82	12.52	67.65	16.53	31.48	16.22
<i>Log-Olive-Tail-Moment</i>	<i>Exposure group</i>										
	<i>Sham</i>	0.14	0.27	0.24	0.40	0.24	0.39	0.36	0.32	0.42	0.39
	<i>Low</i>	0.18	0.24	0.26	0.36	0.29	0.39	0.36	0.30	0.39	0.25
	<i>Medium</i>	0.14	0.29	0.26	0.40	0.26	0.31	0.33	0.28	0.39	0.24
	<i>High</i>	0.14	0.29	0.27	0.37	0.27	0.39	0.35	0.29	0.48	0.39
	<i>PK</i>	1.42	0.22	1.32	0.38	1.41	0.22	0.44	0.43	1.23	0.27

		exposure time									
		4 h		16 h		24 h		72 h		72 h with FPG	
		Mean	StdDev	Mean	StdDev	Mean	StdDev	Mean	StdDev	Mean	StdDev
Log(100-Median Head DNA (%))	Exposure group										
	Sham	1.23	0.30	1.29	0.29	1.26	0.28	1.37	0.26	1.40	0.25
	Low	1.26	0.26	1.29	0.27	1.33	0.26	1.38	0.25	1.39	0.19
	Medium	1.20	0.29	1.30	0.29	1.32	0.20	1.34	0.29	1.39	0.19
	High	1.21	0.28	1.31	0.27	1.29	0.26	1.39	0.21	1.45	0.23
	PK	1.89	0.07	1.83	0.19	1.88	0.08	1.44	0.27	1.82	0.12
juvenile (age 18-19 years, n=10)											
Olive-Tail-Moment	Exposure group										
	Sham	1.71	0.64	3.18	3.77	2.52	1.77	2.98	2.15	2.56	1.38
	Low	1.77	0.44	2.51	1.01	3.42	3.39	3.04	1.35	2.56	1.12
	Medium	1.83	0.83	2.06	0.48	2.40	1.02	2.65	1.07	2.66	0.77
	High	1.90	0.55	2.50	1.87	3.22	2.88	2.76	1.14	2.84	0.98
	PK	23.50	8.97	21.86	8.45	21.86	8.45	3.32	1.41	18.69	9.93
Median head DNA(%)	Exposure group										
	Sham	79.73	12.43	74.68	12.23	77.93	9.71	71.08	10.98	73.34	9.63
	Low	77.87	11.27	75.66	10.56	71.52	11.62	68.55	12.55	73.07	10.26
	Medium	80.42	12.42	77.38	8.59	75.21	9.58	70.86	13.47	71.87	9.16
	High	77.66	12.37	75.71	12.43	74.05	13.09	69.49	12.39	68.66	10.80
	PK	26.51	12.92	30.50	13.43	30.50	13.43	66.90	9.74	29.21	14.18
Log-Olive-Tail-Moment	Exposure group										
	Sham	0.20	0.17	0.37	0.30	0.30	0.32	0.41	0.24	0.37	0.18
	Low	0.23	0.12	0.37	0.16	0.40	0.34	0.45	0.17	0.38	0.17
	Medium	0.21	0.25	0.30	0.11	0.34	0.20	0.40	0.16	0.41	0.12
	High	0.25	0.18	0.33	0.24	0.39	0.33	0.41	0.16	0.43	0.16
	PK	1.32	0.25	1.29	0.24	1.29	0.24	0.49	0.16	1.22	0.21
Log(100-Median Head DNA (%))	Exposure group										
	Sham	1.22	0.29	1.35	0.23	1.29	0.27	1.43	0.20	1.40	0.18
	Low	1.28	0.26	1.34	0.21	1.41	0.24	1.46	0.19	1.40	0.18
	Medium	1.19	0.32	1.32	0.18	1.36	0.18	1.42	0.23	1.43	0.15
	High	1.28	0.26	1.33	0.25	1.35	0.28	1.44	0.21	1.46	0.19
	PK	1.86	0.08	1.83	0.09	1.83	0.09	1.50	0.13	1.84	0.10

		exposure time									
		4 h		16 h		24 h		72 h		72 h with FPG	
		Mean	StdDev	Mean	StdDev	Mean	StdDev	Mean	StdDev	Mean	StdDev
adult (age 50-59 years, n=10)											
Olive-Tail-Moment	Exposure group										
	Sham	1.52	0.94	1.64	0.99	2.21	1.58	2.85	2.22	6.53	11.97
	Low	1.59	0.91	2.06	1.43	2.08	1.43	2.58	2.30	3.22	2.25
	Medium	1.47	0.84	3.11	4.06	2.01	1.33	2.34	1.28	2.87	1.90
	High	1.37	0.83	2.12	1.68	1.94	1.22	2.55	1.65	7.73	14.32
	PK	34.62	9.45	34.62	9.45	34.62	9.45	5.30	8.22	21.59	12.34
Median head DNA(%)	Exposure group										
	Sham	78.12	13.61	78.96	15.11	78.69	11.99	73.99	16.60	68.55	23.11
	Low	79.13	13.21	79.38	12.14	79.03	10.79	76.10	14.01	74.05	11.88
	Medium	81.28	10.58	74.34	18.60	79.69	8.06	76.76	14.28	74.74	14.30
	High	83.39	11.39	77.40	13.37	80.36	8.77	76.72	9.86	67.25	23.47
	PK	15.16	4.43	15.15	4.43	15.15	4.43	68.41	21.93	33.75	18.51
Log-Olive-Tail-Moment	Exposure group										
	Sham	0.08	0.34	0.08	0.44	0.18	0.45	0.32	0.39	0.47	0.53
	Low	0.12	0.31	0.15	0.47	0.18	0.42	0.27	0.37	0.41	0.31
	Medium	0.08	0.32	0.21	0.56	0.18	0.39	0.27	0.37	0.37	0.32
	High	0.04	0.35	0.16	0.46	0.15	0.43	0.29	0.37	0.53	0.53
	PK	1.52	0.12	1.52	0.12	1.52	0.12	0.38	0.60	1.24	0.33
Log(100-Median Head DNA (%))	Exposure group										
	Sham	1.24	0.33	1.21	0.35	1.24	0.31	1.32	0.32	1.40	0.32
	Low	1.24	0.28	1.23	0.32	1.25	0.28	1.30	0.29	1.37	0.20
	Medium	1.20	0.27	1.28	0.38	1.27	0.21	1.27	0.33	1.35	0.23
	High	1.13	0.29	1.27	0.31	1.24	0.24	1.33	0.21	1.43	0.28
	PK	1.93	0.02	1.93	0.02	1.93	0.02	1.39	0.36	1.80	0.14



Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Mikrokerntests und alle Expositionsbedingungen. Die Zielvariablen MN und Crest-positive MN sind jeweils auf 2.000 ausgewertete Zellen, bzw. beim erweiterten Mikrokerntest auf 10.000 ausgewertete Zellen hochgerechnet. MN: N=20 Probanden: 10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren, extended MN: N=4 Probanden: 4 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren

		exposure time					
		15 h		72 h		72 h extended MN	
		Mean	StdDev	Mean	StdDev	Mean	StdDev
		total (n=20)				total (n=4)	
	Exposure group						
MN in 2000 binucleated cells	Sham	24.70	17.93	31.18	28.27	101.1	49.88
	Low	25.88	17.71	31.33	25.91	71.59	54.29
	Medium	26.97	21.85	27.11	24.00	143.8	143.6
	High	24.37	22.64	35.46	32.49	108.4	89.30
	PK	127.7	80.07	135.1	80.84	426.2	226.3
crest positive MN in 2000 binucleated cells	Sham	6.63	6.97	9.06	12.23	16.87	16.11
	Low	5.58	5.09	8.30	9.93	11.48	7.16
	Medium	8.29	8.23	6.39	8.92	29.16	31.02
	High	6.56	7.60	9.77	10.96	16.23	15.37
	PK	85.04	61.38	85.51	62.44	278.8	151.2
CBPI	Sham	1.12	0.09	1.10	0.06	1.09	0.03
	Low	1.10	0.05	1.10	0.04	1.13	0.02
	Medium	1.10	0.05	1.09	0.04	1.13	0.09
	High	1.11	0.07	1.10	0.05	1.10	0.02
	PK	1.13	0.09	1.13	0.09	1.14	0.07
juvenile (age 18-19 years, n=10)							
	Exposure group						
MN in 2000 binucleated cells	Sham	18.16	11.62	22.82	17.50		
	Low	21.68	12.10	27.40	20.84		
	Medium	20.14	20.52	19.15	14.74		
	High	13.70	8.38	22.71	20.03		
	PK	145.1	106.1	148.7	101.7		
crest positive MN in 2000 binucleated cells	Sham	4.92	6.51	6.19	5.33		
	Low	5.81	5.19	6.53	5.71		
	Medium	4.82	5.60	3.55	4.59		
	High	3.16	3.23	5.69	6.70		
	PK	92.71	78.14	89.10	79.16		

		<i>exposure time</i>					
		<i>15 h</i>		<i>72 h</i>		<i>72 h extended MN</i>	
		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>
<i>CBPI</i>	<i>Sham</i>	1.12	0.07	1.11	0.08		
	<i>Low</i>	1.10	0.03	1.10	0.05		
	<i>Medium</i>	1.10	0.05	1.10	0.05		
	<i>High</i>	1.11	0.05	1.11	0.06		
	<i>PK</i>	1.15	0.10	1.15	0.10		
		<i>adult (age 50-59 years, n=10)</i>				<i>adult (n=4)</i>	
	<i>Exposure group</i>						
<i>MN in 2000 binucleated cells</i>	<i>Sham</i>	31.25	21.19	39.54	35.00	101.1	49.88
	<i>Low</i>	30.08	21.82	35.26	30.80	71.59	54.29
	<i>Medium</i>	33.80	21.98	35.06	29.29	143.8	143.6
	<i>High</i>	35.03	27.54	48.21	38.29	108.4	89.30
	<i>PK</i>	110.2	39.92	121.5	55.18	426.2	226.3
<i>crest positive MN in 2000 binucleated cells</i>	<i>Sham</i>	8.34	7.33	11.94	16.40	16.87	16.11
	<i>Low</i>	5.36	5.25	10.07	12.99	11.48	7.16
	<i>Medium</i>	11.76	9.22	9.24	11.36	29.16	31.02
	<i>High</i>	9.96	9.26	13.85	13.10	16.23	15.37
	<i>PK</i>	77.38	41.45	81.92	43.99	278.8	151.2
<i>CBPI</i>	<i>Sham</i>	1.12	0.11	1.09	0.04	1.09	0.03
	<i>Low</i>	1.10	0.07	1.09	0.03	1.13	0.02
	<i>Medium</i>	1.10	0.05	1.08	0.03	1.13	0.09
	<i>High</i>	1.11	0.09	1.09	0.04	1.10	0.02
	<i>PK</i>	1.11	0.06	1.10	0.06	1.14	0.07

Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Tests für numerische Chromosomenaberrationen und alle Expositionsbedingungen. Die Zielvariablen sind auf 200 ausgewertete Mitosen hochgerechnet. N=10 Probanden: juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren

		<i>total</i>		<i>juvenile</i>		<i>adult</i>	
		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>
<i>cell chromosome loss</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	74.95	22.46	83.14	18.11	55.83	22.42
	<i>Low</i>	71.30	24.70	81.57	15.43	47.33	28.31
	<i>Medium</i>	70.50	29.37	75.86	23.26	58.00	43.86
	<i>High</i>	74.70	22.48	80.71	20.09	60.67	25.32
	<i>PK</i>	69.72	31.38	71.00	25.28	66.75	49.95

		<i>total</i>		<i>juvenile</i>		<i>adult</i>	
		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>
<i>cell chromosome increase</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	5.570	3.300	4.714	1.976	7.566	5.362
	<i>Low</i>	8.400	3.978	7.429	3.910	10.67	3.786
	<i>Medium</i>	8.700	4.373	9.286	3.302	7.333	7.024
	<i>High</i>	7.800	4.315	8.000	5.132	7.333	2.082
	<i>PK</i>	11.63	9.284	8.429	5.192	19.11	13.68
<i>aneuploid cells</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	80.52	22.82	87.86	17.97	63.39	27.33
	<i>Low</i>	79.70	23.12	89.00	15.34	58.00	26.29
	<i>Medium</i>	79.20	32.41	85.14	24.15	65.33	50.65
	<i>High</i>	82.50	23.63	88.71	20.99	68.00	27.22
	<i>PK</i>	81.36	37.39	79.43	28.77	85.86	61.34

Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Tests auf apoptotische Ereignisse mittels TUNEL-Assay und alle Expositionsbedingungen. TUNEL positive cells werden unter 1.000 ausgewerteten Zellen angegeben. N=20 Probanden: 10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren

		<i>total</i>		<i>juvenile</i>		<i>adult</i>	
		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>
<i>TUNEL positive cells</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	2.633	3.231	1.635	1.859	3.632	4.045
	<i>Low</i>	3.639	5.593	1.151	1.603	6.128	7.050
	<i>Medium</i>	3.565	5.672	1.273	2.703	5.857	6.995
	<i>High</i>	3.536	6.617	0.7597	1.007	6.312	8.618
	<i>HL60-sham</i>	266.4	71.09	268.9	63.14	263.9	81.66
	<i>HL60-Actinomycin</i>	918.5	93.65	930.6	78.26	906.5	109.9

Tabelle 16: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Zellzyklustests und alle Expositionsbedingungen. N=20 Probanden: 10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren

		<i>total</i>		<i>juvenile</i>		<i>adult</i>	
		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>
<i>G1</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	83.36	6.156	84.06	6.692	82.66	5.841
	<i>Low</i>	83.38	6.568	83.59	7.595	83.17	5.770
	<i>Medium</i>	81.92	7.052	82.60	7.072	81.23	7.345
	<i>High</i>	83.56	6.833	84.29	7.459	82.82	6.459

		<i>total</i>		<i>juvenile</i>		<i>adult</i>	
		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>
<i>S</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	8.870	4.946	9.010	6.008	8.730	3.936
	<i>Low</i>	8.595	5.480	9.400	6.941	7.790	3.711
	<i>Medium</i>	10.20	6.283	10.81	6.735	9.590	6.096
	<i>High</i>	8.945	5.264	8.980	6.630	8.910	3.812
<i>G2</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	7.805	2.963	6.950	2.008	8.660	3.588
	<i>Low</i>	8.015	3.119	7.020	2.144	9.010	3.707
	<i>Medium</i>	7.875	3.259	6.590	1.699	9.160	3.984
	<i>High</i>	7.520	3.314	6.760	1.929	8.280	4.264

In den folgenden Tabellen 17-21 sind nun die Ergebnisse der Hauptanalyse anhand von Trendscores zum Testen auf einen Dosistrend bei den 20 Probanden aufgeführt. Es sind jeweils der Mittelwert, die 95% Konfidenzintervallgrenzen sowie der exakte p-Wert des Permutationstests für die Zielvariablen der verschiedenen Assays dargestellt. Dabei wurden jeweils Trendscores der Zielvariablen verwendet. Die Positivkontrolle wurde bei dieser Analyse nicht mit berücksichtigt. Da der exakte Permutationstest auf einen Dosistrend keine Schätzer und Konfidenzintervalle berechnet, werden diese rein asymptotisch berechnet und werden in den folgenden Tabellen präsentiert. Die Daten werden jeweils für alle Probanden insgesamt, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen (Alter 18-19 Jahre) und adulten Probanden (Alter 50-59) aufgeführt.

Tabelle 17: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen. N=20 Probanden (10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren) für die Zielvariablen des Comet-Assays. Der p-Wert wurde exakt bestimmt (Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

	<i>exposure time</i>	<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>	<i>Probt</i>
<i>total (n=20)</i>					
<i>Log-Olive-Tail-Moment</i>	<i>4 h</i>	-0.00	-0.02	0.02	0.9298
	<i>16 h</i>	0.01	-0.01	0.04	0.9943
	<i>24 h</i>	0.01	-0.02	0.03	0.8826
	<i>72 h</i>	-0.01	-0.04	0.03	0.8461
	<i>72 h with FPG</i>	0.02	-0.01	0.04	0.597
<i>Log(100-Median Head DNA (%))</i>	<i>4 h</i>	-0.01	-0.04	0.01	0.6173
	<i>16 h</i>	0.03	-0.02	0.07	0.8399
	<i>24 h</i>	0.01	-0.02	0.03	0.7724
	<i>72 h</i>	-0.00	-0.03	0.03	0.99
	<i>72 h with FPG</i>	0.02	-0.01	0.04	0.478
<i>juvenile (age 18-19 years, n=10)</i>					
<i>Log-Olive-Tail-Moment</i>	<i>4 h</i>	0.01	-0.01	0.04	0.631
	<i>16 h</i>	-0.02	-0.05	0.02	0.5299
	<i>24 h</i>	0.02	-0.02	0.06	0.6366
	<i>72 h</i>	-0.00	-0.05	0.04	0.9106
	<i>72 h with FPG</i>	0.02	-0.02	0.07	0.3294
<i>Log(100-Median Head DNA (%))</i>	<i>4 h</i>	0.01	-0.01	0.03	0.8203
	<i>16 h</i>	-0.01	-0.03	0.02	0.7415
	<i>24 h</i>	0.01	-0.02	0.05	0.6872
	<i>72 h</i>	0.00	-0.04	0.04	0.9672
	<i>72 h with FPG</i>	0.02	-0.02	0.06	0.3423
<i>adult (age 50-59 years, n=10)</i>					
<i>Log-Olive-Tail-Moment</i>	<i>4 h</i>	-0.02	-0.04	0.01	0.7043
	<i>16 h</i>	0.03	-0.00	0.06	0.6438
	<i>24 h</i>	-0.01	-0.04	0.02	0.8775
	<i>72 h</i>	-0.01	-0.06	0.04	0.8706
	<i>72 h with FPG</i>	0.01	-0.01	0.04	0.8374
<i>Log(100-Median Head DNA (%))</i>	<i>4 h</i>	-0.04	-0.07	-0.00	0.3640
	<i>16 h</i>	0.02	-0.00	0.05	0.6387
	<i>24 h</i>	0.00	-0.04	0.04	0.9853
	<i>72 h</i>	-0.00	-0.04	0.04	0.964
	<i>72 h with FPG</i>	0.01	-0.01	0.03	0.8371

Tabelle 18: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen. N=20 Probanden (10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren) für die Zielvariablen des Mikrokerntests; n=4 Probanden für den erweiterten Mikrokerntest. Der p-Wert wurde exakt bestimmt (Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

	<i>exposure time</i>	<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>	<i>Probt</i>
<i>total (n=20, ext. MN: n=4)</i>					
<i>MN in 2000 binucleated cells</i>	<i>15 h</i>	0.01	-1.88	1.90	0.9968
	<i>72 h</i>	0.86	-1.21	2.93	0.7561
	<i>72 h extended MN</i>	9.39	-40.2	59.01	0.6652
<i>crest positive MN in 2000 binucleated cells</i>	<i>15 h</i>	0.25	-0.85	1.35	0.7248
	<i>72 h</i>	0.02	-1.02	1.06	0.9827
	<i>72 h extended MN</i>	1.58	-3.24	6.39	0.7458
<i>CBPI</i>	<i>15 h</i>	-0.00	-0.01	0.01	0.6824
	<i>72 h</i>	-0.00	-0.01	0.00	0.7888
	<i>72 h extended MN</i>	0.00	-0.01	0.01	0.7753
<i>juvenile (age 18-19 years, n=10)</i>					
<i>MN in 2000 binucleated cells</i>	<i>15 h</i>	-1.49	-4.47	1.48	0.4629
	<i>72 h</i>	-0.86	-2.14	0.43	0.741
<i>crest positive MN in 2000 binucleated cell</i>	<i>15 h</i>	-0.63	-1.90	0.64	0.4000
	<i>72 h</i>	-0.45	-1.34	0.45	0.5772
<i>CBPI</i>	<i>15 h</i>	-0.00	-0.01	0.01	0.8241
	<i>72 h</i>	-0.00	-0.01	0.01	0.8575
<i>adult (age 50-59 years, n=10, ext. MN: n=4)</i>					
<i>MN in 2000 binucleated cells</i>	<i>15 h</i>	1.51	-0.98	4.00	0.6409
	<i>72 h</i>	2.58	-1.43	6.59	0.5824
	<i>72 h extended MN</i>	9.39	-40.2	59.01	0.6653
<i>crest positive MN in 2000 binucleated cells</i>	<i>15 h</i>	1.13	-0.73	2.98	0.3263
	<i>72 h</i>	0.49	-1.58	2.57	0.7973
	<i>72 h extended MN</i>	1.58	-3.24	6.39	0.746
<i>CBPI</i>	<i>15 h</i>	-0.00	-0.02	0.01	0.7402
	<i>72 h</i>	-0.00	-0.01	0.01	0.8247
	<i>72 h extended MN</i>	0.00	-0.01	0.01	0.7748

Tabelle 19: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen. N=10 Probanden (n=7 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, n=3 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren) für die Zielvariablen der Chromosomenaberration. Der p-Wert wurde exakt bestimmt (Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Probt
<i>total (n=10)</i>	<i>cell chromosome loss</i>	-0.15	-4.83	4.52	0.9655
	<i>cell chromosome increase</i>	0.70	-0.62	2.02	0.2289
	<i>aneuploid cells</i>	0.54	-4.47	5.56	0.8795
<i>juvenile (age 18-19 years, n=7)</i>	<i>cell chromosome loss</i>	-1.30	-8.14	5.54	0.6872
	<i>cell chromosome increase</i>	1.17	-0.72	3.07	0.0808
	<i>aneuploid cells</i>	-0.13	-7.78	7.52	0.9717
<i>adult (age 50-59 years, n=3)</i>	<i>cell chromosome loss</i>	2.52	-6.34	11.38	0.733
	<i>cell chromosome increase</i>	-0.40	-1.30	0.50	0.7448
	<i>aneuploid cells</i>	2.12	-5.88	10.11	0.795

Tabelle 20: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen. N=20 Probanden (10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren) für TUNEL positive Zellen. Der p-Wert wurde exakt bestimmt (Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

<i>TUNEL positive cells</i>	Mean	95_LCLM	95_UCLM	Probt
<i>total (n=20)</i>	0.26	-0.24	0.77	0.6271
<i>juvenile (age 18-19 years, n=10)</i>	-0.25	-0.47	-0.03	0.3585
<i>adult (age 50-59 years, n=10)</i>	0.78	-0.17	1.72	0.4201

Tabelle 21: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen. N=20 Probanden (10 juvenile Probanden im Alter von 18-19 Jahren, 10 adulte Probanden im Alter von 50-59 Jahren) für die Zielvariablen des Zellzyklus. Der p-Wert wurde exakt bestimmt (Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Probt
<i>total (n=20)</i>	<i>G1</i>	-0.09	-0.35	0.17	0.8947
	<i>S</i>	0.18	-0.09	0.45	0.7404
	<i>G2</i>	-0.10	-0.27	0.07	0.752
<i>juvenile (age 18-19 years, n=10)</i>	<i>G1</i>	-0.03	-0.32	0.26	0.9768
	<i>S</i>	0.13	-0.15	0.42	0.886
	<i>G2</i>	-0.10	-0.26	0.06	0.7136
<i>adult (age 50-59 years, n=10)</i>	<i>G1</i>	-0.15	-0.64	0.35	0.8708
	<i>S</i>	0.23	-0.29	0.76	0.7125
	<i>G2</i>	-0.10	-0.44	0.24	0.8567

Die exakten p-Werte, berechnet anhand des Permutationstests zum Testen auf einen Dosistrend, sowie die Konfidenzintervalle zeigen keine Auffälligkeiten in Richtung eines Dosistrends.

3.4 Dosistrendanalyse - Sensitivitätsanalysen

In Tabelle 22 sind die Ergebnisse der Sensitivitätsanalyse anhand des Page-Trend-Tests zum Testen auf einen Dosistrend zwischen den verschiedenen Expositionsgruppen aufgeführt. Die Ergebnisse sind für alle Zielvariablen dargestellt. Der Page-Trend-Test wurde mit den entblindeten Daten mit dem R-Paket „coin“ und der zugehörigen Funktion „friedman_test“ mit B= 100000 Wiederholungen durchgeführt. Die Positivkontrolle wurde für die Analyse nicht berücksichtigt.

Kein p-Wert erweist sich als signifikant, damit ist von keinem Trend über die 4 Dosisgruppen auszugehen. Die Ergebnisse der primären Analyse werden somit durch die Sensitivitätsanalyse bestätigt.

Tabelle 22: Ergebnisse des Page-Trend-Tests (Sensitivitätsanalyse) für die Zielvariablen für alle Probanden (n=20, n=10 für nCA, n=4 für MN extended).

Variable	Chi-Quadrat-Teststatistik	p-Wert
Log(100-Median Head DNA (%)) after 4 h	1.944	0.1768
Log(100-Median Head DNA (%)) after 16 h	0.60	0.4643
Log(100-Median Head DNA (%)) after 24 h	0.486	0.5131
Log(100-Median Head DNA (%)) after 72 h	0.216	0.673
Log(100-Median Head DNA (%)) after 72 h FPG	1.536	0.2318
Log-Olive-Tail-Moment after 4 h	0.0242	0.8934
Log-Olive-Tail-Moment after 16 h	0.1234	0.742
Log-Olive-Tail-Moment after 24 h	0.0965	0.7678
Log-Olive-Tail-Moment after 72 h	0.0136	0.9276
Log-Olive-Tail-Moment after 72 h FPG	1.099	0.3082
MN after 15 h	0.096	0.7881
MN after 72 h	0	1
MN extended after 72 h	0.03	0.9323
crest positive MN after 15 h	0.4959	0.4974
crest positive MN after 72 h	0.1038	0.764
crest positive MN extended after 72h	0	1

Variable	Chi-Quadrat-Teststatistik	p-Wert
CBPI after 15 h	0.6486	0.4349
CBPI after 72 h	0.1043	0.763
CBPI extended after 72 h	0.0353	0.8984
nCA cell chromosome loss	0.0273	0.899
nCA cell chromosome increase	1.0681	0.3190
nCA aneuploid cells	0.5121	0.5019
TUNEL positive cells	1.2217	0.2807
Zellzyklus G1	0	1
Zellzyklus S	0.4446	0.5209
Zellzyklus G2	2.9633	0.08887

Sensitivitätsanalyse für den Comet-Assay

Beim Comet-Assay gab es bei der Zielvariablen *Olive Tail Moment* einen Ausreißer, der einen Wert über 40 hatte. Dieser Proband (Proband 7) wurde für die folgende Analyse herausgenommen.

Aufgeführt ist in Tabelle 23 das Ergebnis der Trendscores mit Mittelwert 95% Konfidenzintervall und dem zugehörigen p-Wert. Wie auch bei der primären Analyse zeigt sich kein signifikanter Trend, wenn man den Probanden mit Ausreißern aus der Analyse ausschließt.

Tabelle 23: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielgröße Olive Tail Moment. Ohne Proband 7. N=19 Probanden

<i>All</i>		<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>	<i>Probt</i>
<i>Olive-Tail-Moment</i>	<i>time</i>				
	<i>After 4 h</i>	0.01	-0.04	0.06	0.5898
	<i>After 16 h</i>	-0.02	-0.34	0.31	0.9109
	<i>After 24 h</i>	0.03	-0.17	0.23	0.7582
	<i>After 72 h</i>	-0.12	-0.44	0.19	0.4172
	<i>After 72 h with FPG</i>	0.09	-0.10	0.28	0.3250
<i>Log-Olive-Tail-Moment</i>	<i>time</i>				
	<i>After 4 h</i>	-0.00	-0.02	0.02	0.9055
	<i>After 16 h</i>	0.00	-0.02	0.03	0.7621
	<i>After 24 h</i>	0.01	-0.02	0.03	0.5070
	<i>After 72 h</i>	-0.01	-0.04	0.03	0.6260
	<i>After 72 h with FPG</i>	0.02	-0.01	0.04	0.1964

3.5 Dosistrendanalyse – Differenzen zu Sham

Ein wichtiger Untersuchungsparameter ist die Differenz der Daten aus befeldeten Proben zu sham-exponierten.

In den folgenden Abbildungen werden die Differenzen zur Shamgruppe graphisch dargestellt. Damit die Differenzen der Expositionen Low bis High zur Sham Exposition besser sichtbar werden, wurden bei den folgenden Abbildungen die y-Achsen angeglichen.

Für die folgenden Abbildungen gilt:

An erster Stelle steht jeweils die Differenz von Sham zu Sham (was definitionsgemäß 0 ist), an zweiter Stelle die Differenz von Low zu Sham, an dritter Stelle die Differenz von Medium zu Sham, an vierter Stelle die Differenz von High zu Sham und an letzter Stelle von der Positivkontrolle zu Sham. Desweiteren sind in den folgenden Tabellen noch die Mittelwertsdifferenzen und deren Konfidenzintervalle für alle Zielvariablen getrennt nach Expositionsgruppe aufgeführt. Die Daten werden jeweils für alle Probanden insgesamt, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen (Alter 18-19 Jahre) und adulten Probanden (Alter 50-59) aufgeführt.

3.5.1 Comet-Assay

Im Comet-Assay wiesen für die jüngeren Probanden die beiden Zielvariablen jeweils zum Zeitpunkt nach 24 Stunden Exposition bei der Befeldung mit 0,2 W/kg eine statistische auffällige Differenz zur Sham auf (siehe Tabelle 25). Der Trend ist aber nicht monoton; bei mittlerer und höherer Dosis wird ein schwächerer und statistisch unauffälliger Effekt beobachtet. Der Test auf Trend ist statistisch unauffällig. Es zeigt sich außerdem bei den älteren Probanden in der Zielgröße *Log-Olive-Tail-Moment* eine auffällige Differenz zur Sham bei Befeldung mit 10 W/kg nach 16 Stunden Exposition (siehe Tabelle 24). Bei der Analyse für alle Probanden zeigt sich für keine der Befeldungen (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg) ein Einfluss auf die Entstehung von DNA-Schäden.

Die Mittelwertsdifferenzen in Bezug auf die Sham-Exposition für die beiden Zielgrößen und die 3 Befeldungszeiten sind nachfolgend in Abbildung 39-44 dargestellt. In Tabelle 24 werden zudem die Mittelwertsdifferenzen und deren

Konfidenzintervalle getrennt nach Expositionsgruppe für alle Probanden insgesamt, sowie aufgeschlüsselt nach Alterskollektiv aufgeführt.

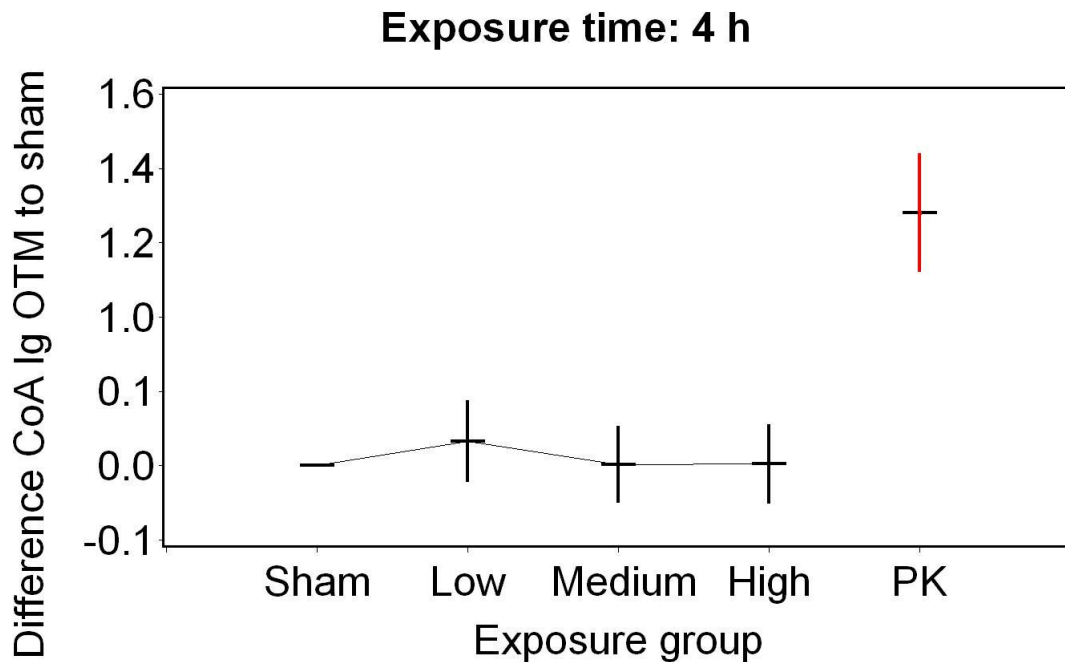


Abbildung 39: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße *Log-Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

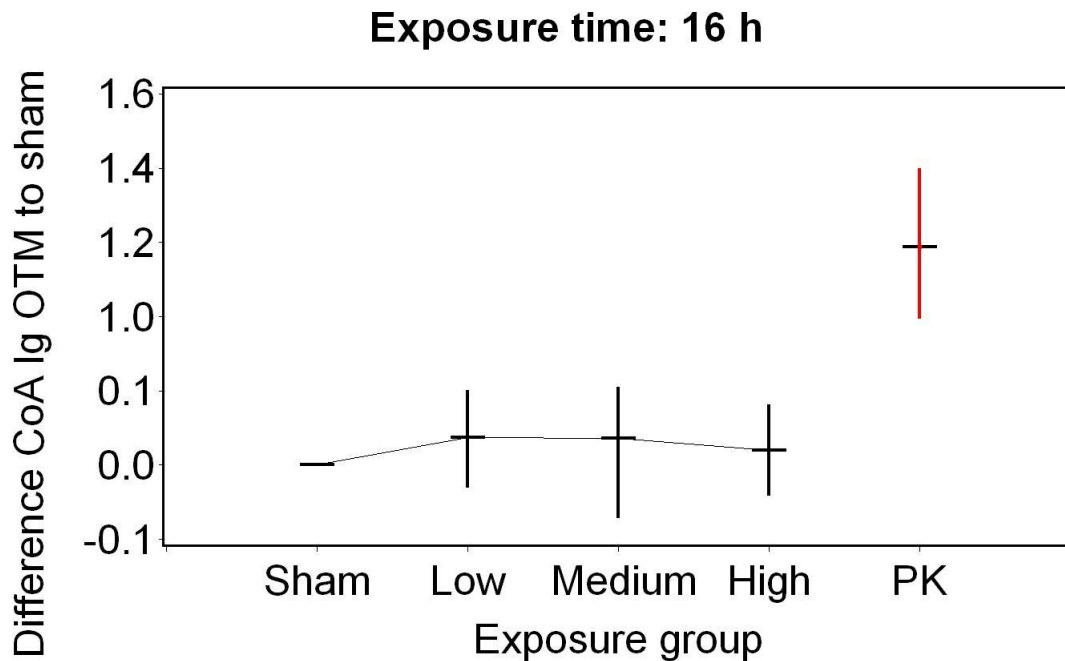


Abbildung 40: Darstellung der : Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße *Log-Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

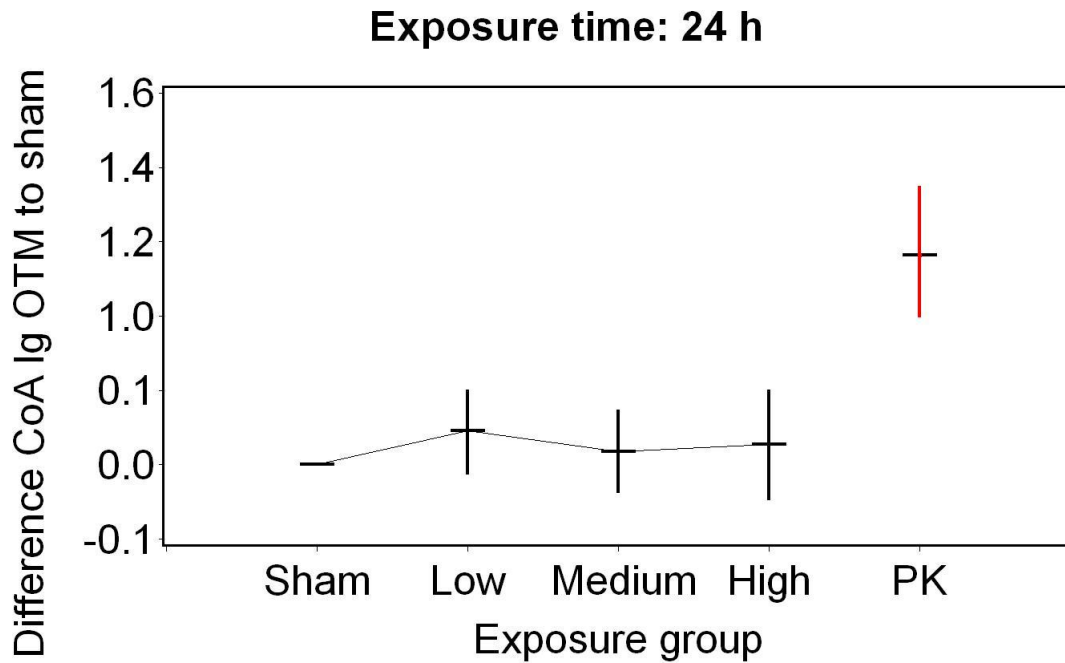


Abbildung 41: Darstellung der : Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße *Log-Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

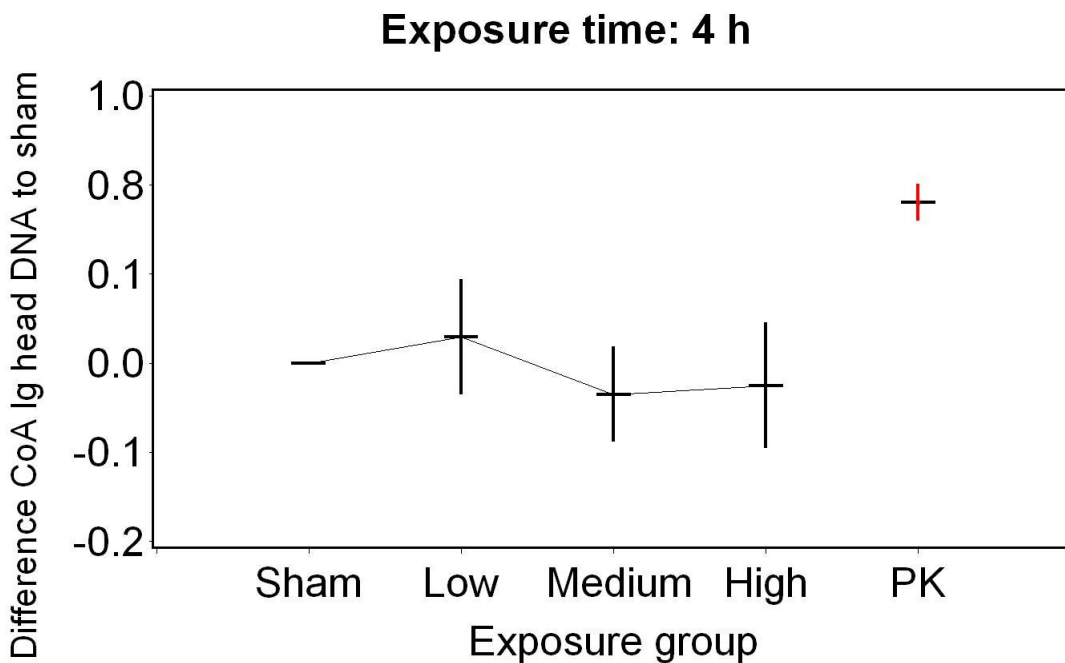


Abbildung 42: Darstellung der : Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße *Log(100-Median-Head DNA(%))*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

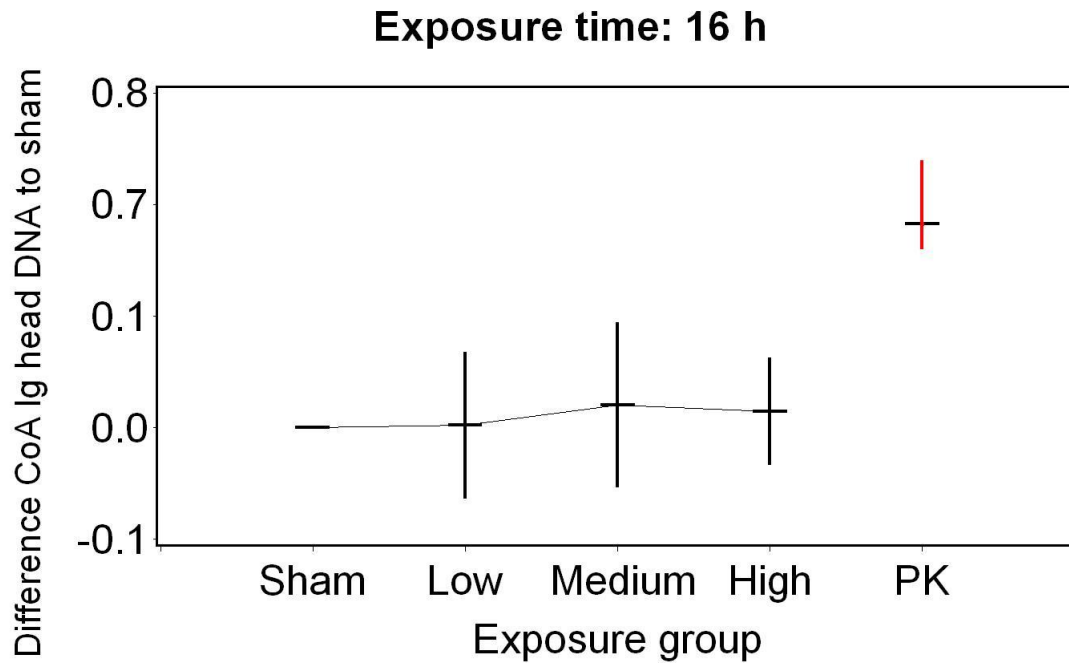


Abbildung 43: Darstellung der : Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße *Log(100-Median-Head DNA(%))*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

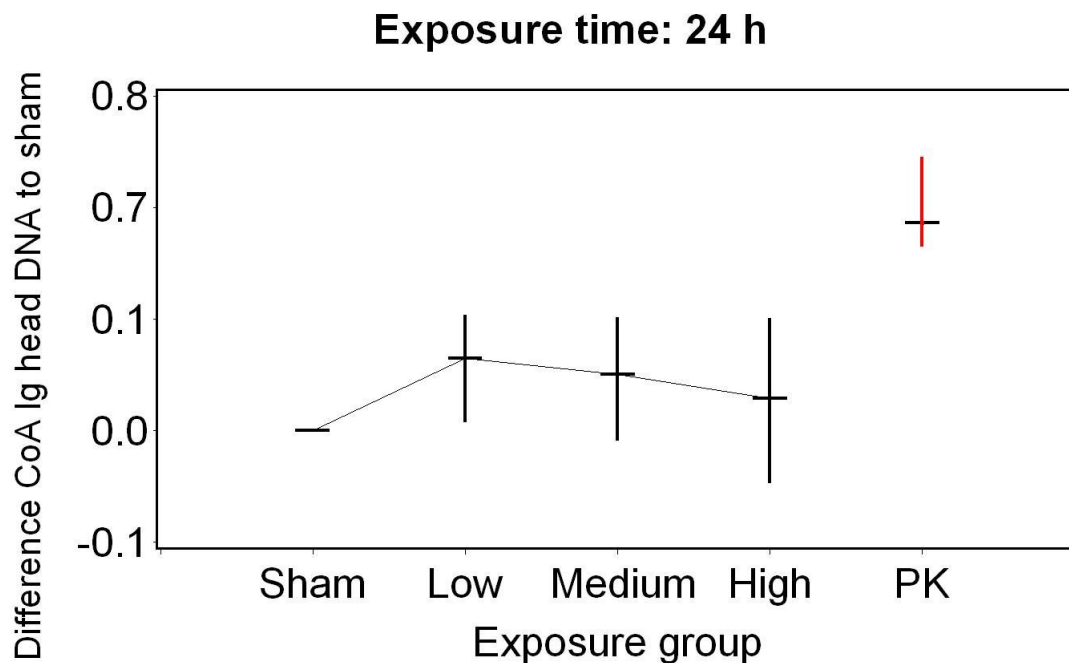


Abbildung 44: Darstellung der : Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße *Log(100-Median-Head DNA(%))*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

Tabelle 24: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=10; adult: Alter 50-59 Jahre, n=10), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen des Comet-Assays (Teil 1: 4h, 16h).

		<i>exposure time</i>					
		<i>4 h</i>			<i>16 h</i>		
		<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>	<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>
<i>total (n=20)</i>							
<i>Difference CoA Ig OTM to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0330	-.025	.0908	.0375	-.034	.1095
	<i>Medium</i>	.0017	-.052	.0556	.0366	-.076	.1496
	<i>High</i>	.0025	-.053	.0584	.0204	-.044	.0846
	<i>PK</i>	1.281	1.122	1.441	1.187	.9755	1.399
<i>Difference CoA Ig head DNA to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0296	-.038	.0975	.0020	-.067	.0710
	<i>Medium</i>	-.035	-.091	.0214	.0199	-.058	.0974
	<i>High</i>	-.025	-.099	.0484	.0145	-.036	.0651
	<i>PK</i>	.6612	.5208	.8017	.5978	.4563	.7393
<i>juvenile (age 18-19 years, n=10)</i>							
<i>Difference CoA Ig OTM to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0309	-.072	.1333	.0039	-.128	.1361
	<i>Medium</i>	.0055	-.098	.1091	-.065	-.230	.1004
	<i>High</i>	.0505	-.029	.1297	-.042	-.140	.0569
	<i>PK</i>	1.120	.9327	1.307	.9264	.7067	1.146
<i>Difference CoA Ig head DNA to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0587	-.045	.1622	-.008	-.097	.0810
	<i>Medium</i>	-.030	-.105	.0451	-.031	-.153	.0915
	<i>High</i>	.0595	-.013	.1323	-.026	-.093	.0417
	<i>PK</i>	.6361	.4366	.8356	.4817	.3437	.6198

		exposure time					
		4 h			16 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Mean	95_LCLM	95_UCLM
adult (age 50-59 years, n=10)							
<i>Difference CoA Ig OTM to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0351	-.042	.1126	.0711	-.011	.1537
	<i>Medium</i>	-.002	-.061	.0574	.1378	-.018	.2931
	<i>High</i>	-.046	-.126	.0352	.0824	.0033	.1615
	<i>PK</i>	1.443	1.196	1.689	1.448	1.139	1.757
<i>Difference CoA Ig head DNA to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0004	-.105	.1056	.0122	-.112	.1363
	<i>Medium</i>	-.040	-.140	.0602	.0705	-.038	.1790
	<i>High</i>	-.110	-.226	.0053	.0546	-.025	.1338
	<i>PK</i>	.6863	.4480	.9246	.7138	.4601	.9675

Tabelle 25: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=10; adult: Alter 50-59 Jahre, n=10), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen des Comet-Assays (Teil 2: 24h).

		exposure time		
		24 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM
total (n=20)				
<i>Difference CoA Ig OTM to sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0454	-.016	.1073
	<i>Medium</i>	.0178	-.041	.0770
	<i>High</i>	.0273	-.052	.1065
	<i>PK</i>	1.165	.9797	1.350
<i>Difference CoA Ig head DNA to sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0648	.0046	.1249
	<i>Medium</i>	.0506	-.012	.1132
	<i>High</i>	.0290	-.051	.1089
	<i>PK</i>	.6167	.4881	.7453

		exposure time		
		24 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM
juvenile (age 18-19 years, n=10)				
Difference CoA Ig OTM to sham	Exposure group			
	Sham	.0000	.	.
	Low	.0936	.0040	.1833
	Medium	.0394	-.059	.1383
	High	.0843	-.034	.2024
	PK	.9892	.7975	1.181
Difference CoA Ig head DNA to sham	Exposure group			
	Sham	.0000	.	.
	Low	.1198	.0478	.1918
	Medium	.0756	-.014	.1650
	High	.0610	-.051	.1724
	PK	.5486	.3893	.7079
adult (age 50-59 years, n=10)				
Difference CoA Ig OTM to sham	Exposure group			
	Sham	.0000	.	.
	Low	-.003	-.093	.0877
	Medium	-.004	-.087	.0797
	High	-.030	-.145	.0857
	PK	1.340	1.029	1.652
Difference CoA Ig head DNA to sham	Exposure group			
	Sham	.0000	.	.
	Low	.0097	-.086	.1058
	Medium	.0255	-.078	.1286
	High	-.003	-.137	.1308
	PK	.6847	.4591	.9103

3.5.2 Comet-Assay mit FPG-Inkubation

Im Comet-Assay mit FPG-Inkubation zeigt sich für keine der Befeldungen (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg) ein Einfluss auf die Entstehung von oxidativen DNA-Schäden, die im Comet-Assay nach FPG-Inkubation nachgewiesen werden. Auch ein Einfluss durch die längere Befeldungsdauer (72h) lässt sich in den analysierten Zielgrößen (*Log-Olive-Tail-Moment*, *Log(100-Median Head DNA (%))*) nicht feststellen. Die Mittelwertsdifferenzen in Bezug auf die Sham-Exposition für die beiden Zielgrößen und die Analyse des Comet-Assay mit und ohne FPG-Inkubation sind nachfolgend in Abbildung 45-49 dargestellt.

In Tabelle 26 werden zudem die Mittelwertsdifferenzen und deren Konfidenzintervalle getrennt nach Expositionsgruppe für alle Probanden insgesamt, sowie aufgeschlüsselt nach Alterskollektiv aufgeführt.

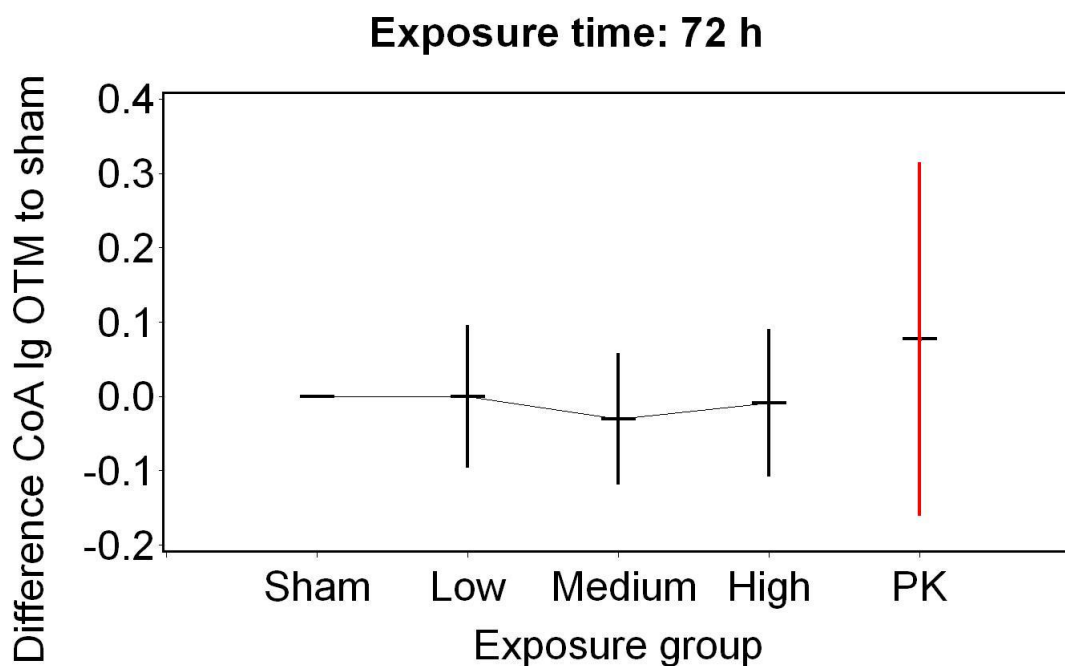


Abbildung 45: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße *Log-Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

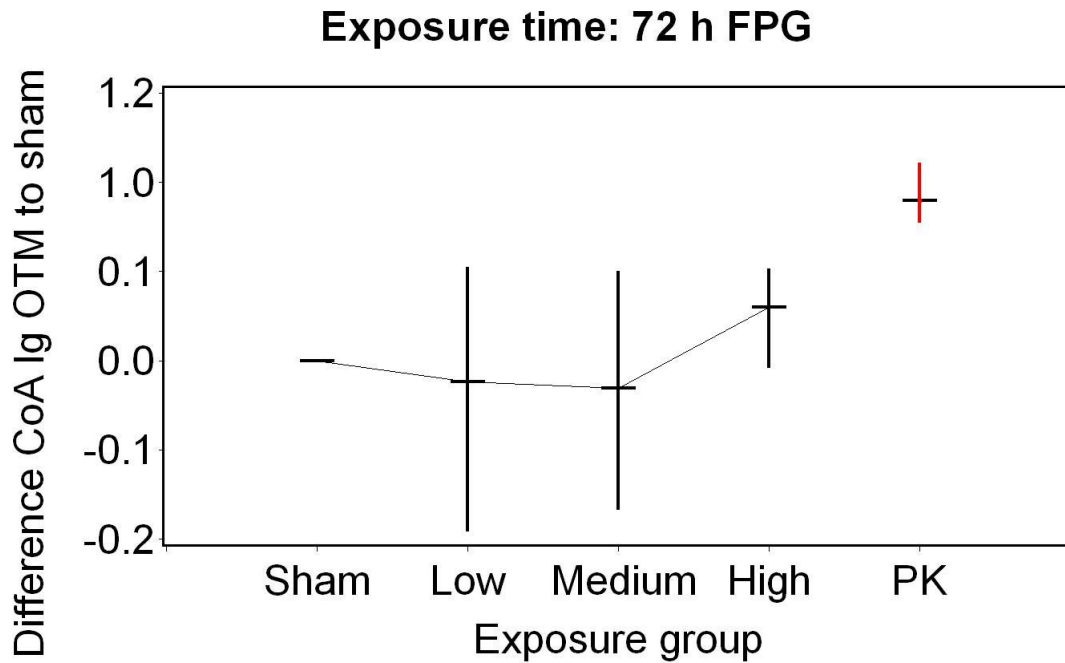


Abbildung 46: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung und FPG-Inkubation, Zielgröße *Log-Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

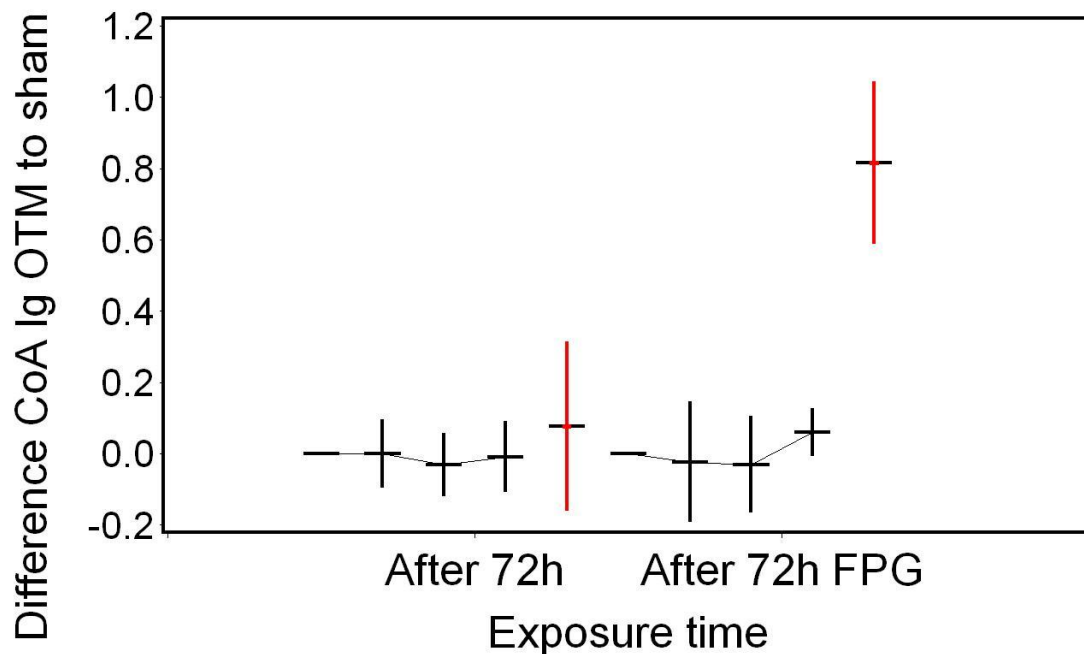


Abbildung 47: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay im Vergleich nach 72 h Befeldung ohne (links) und mit (rechts) FPG-Inkubation, Zielgröße *Log-Olive-Tail-Moment*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

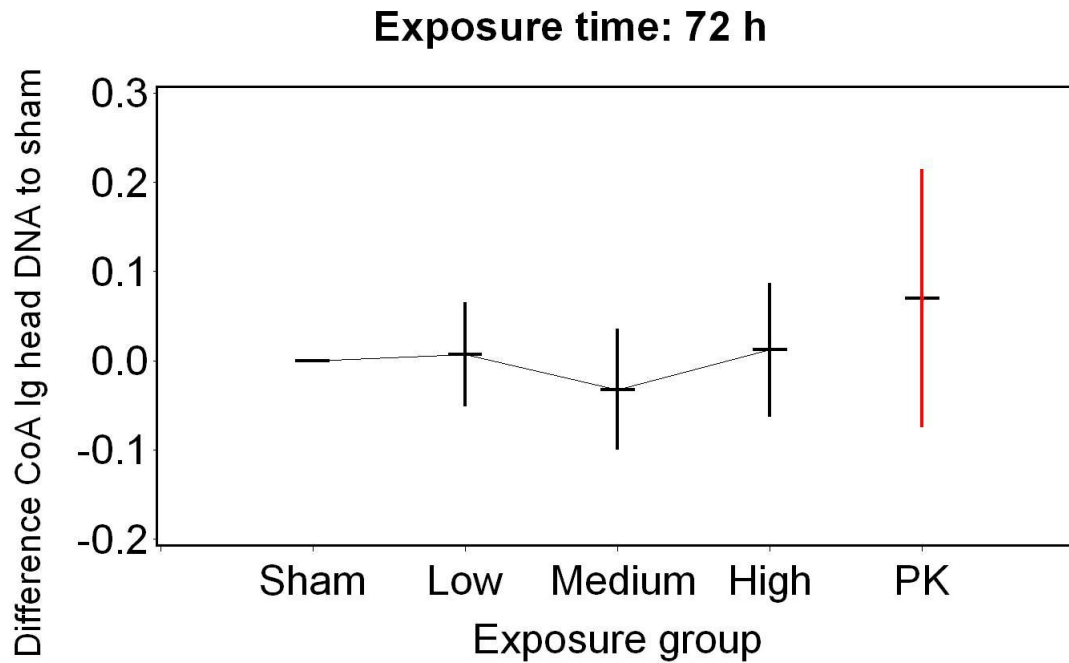


Abbildung 48: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße *Log(100-Median-Head DNA(%))*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

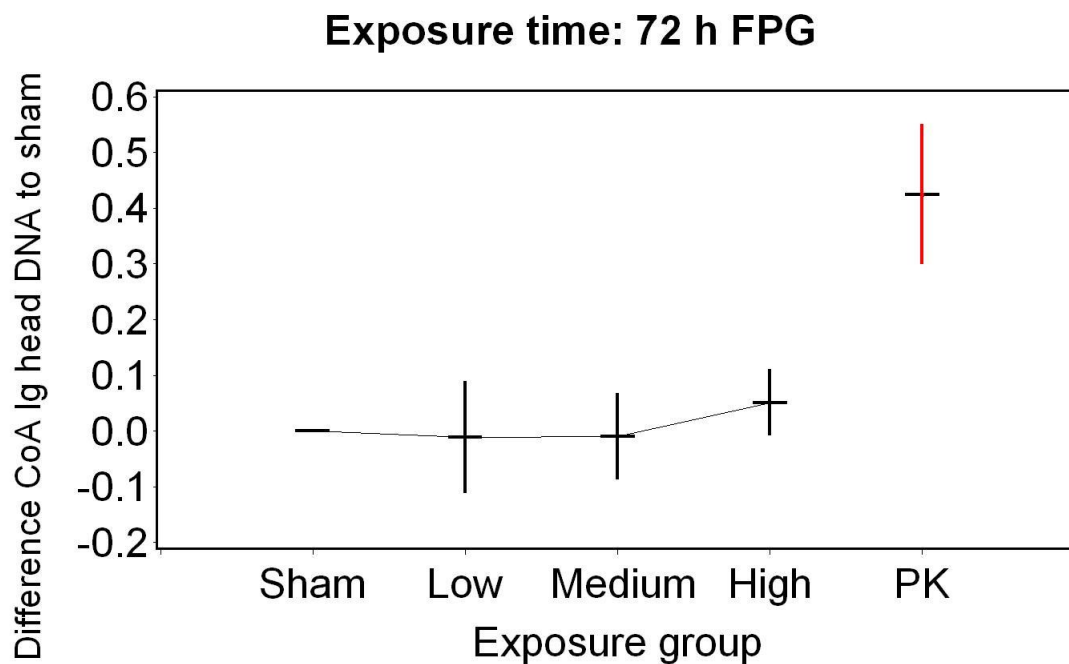


Abbildung 49: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung und FPG-Inkubation, Zielgröße *Log(100-Median-Head DNA(%))*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

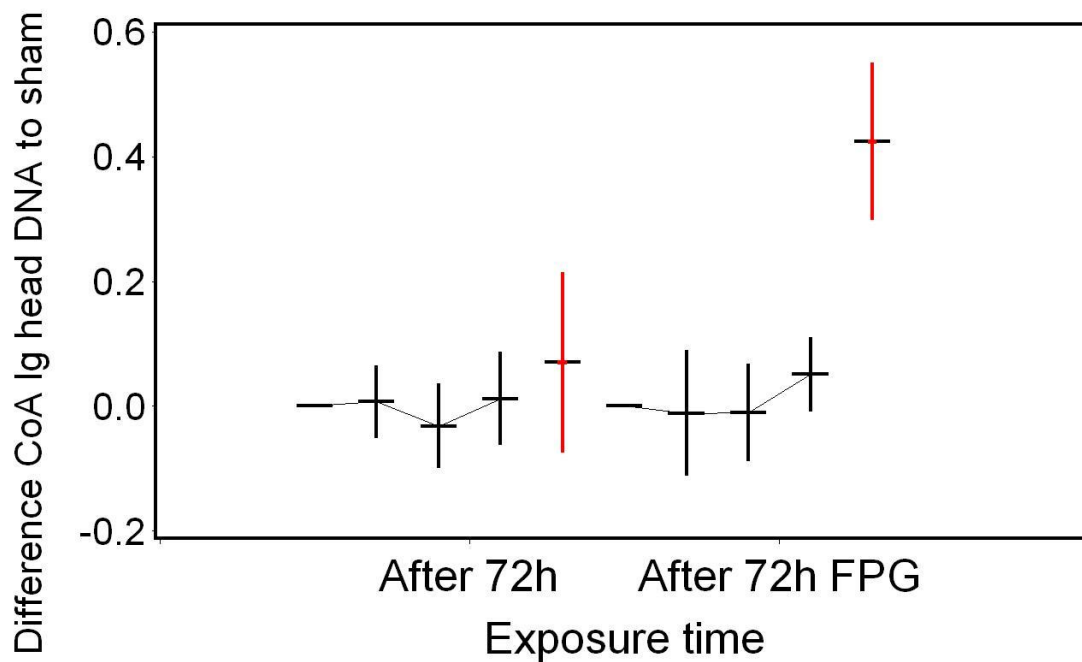


Abbildung 50: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet- Assay im Vergleich nach 72 h Befeldung ohne (links) und mit (rechts) FPG-Inkubation, Zielgröße $\text{Log}(100\text{-Median-Head DNA}(\%))$, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

Tabelle 26: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=10; adult: Alter 50-59 Jahre, n=10), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen des Comet-Assays für 72 h Befeldung, mit und ohne FPG-Inkubation.

		exposure time					
		72 h			72 h with FPG		
		Mean	95_ LCLM	95_ UCLM	Mean	95_ LCLM	95_ UCLM
		total (n=20)					
Difference CoA Ig OTM to sham	Exposure group						
	Sham	.0000			.0000	.	.
	Low	-.000	-.100	.0999	-.023	-.200	.1531
	Medium	-.030	-.123	.0623	-.031	-.173	.1121
	High	-.009	-.113	.0954	.0598	-.011	.1311
	PK	.0769	-.161	.3150	.8163	.5888	1.044

		exposure time					
		72 h			72 h with FPG		
		Mean	95_ LCLM	95_ UCLM	Mean	95_ LCLM	95_ UCLM
<i>Difference CoA Ig head DNA to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000			.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0069	-.054	.0676	-.011	-.116	.0939
	<i>Medium</i>	-.032	-.103	.0389	-.010	-.092	.0709
	<i>High</i>	.0120	-.067	.0906	.0512	-.011	.1137
	<i>PK</i>	.0699	-.075	.2143	.4247	.2987	.5507
<i>juvenile (age 18-19 years, n=10)</i>							
<i>Difference CoA Ig OTM to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0441	-.110	.1987	.0079	-.110	.1255
	<i>Medium</i>	-.009	-.159	.1419	.0419	-.049	.1329
	<i>High</i>	.0080	-.145	.1607	.0611	-.079	.2016
	<i>PK</i>	.0868	-.141	.3144	.8569	.6709	1.043
<i>Difference CoA Ig head DNA to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0369	-.053	.1271	.0039	-.088	.0955
	<i>Medium</i>	-.010	-.115	.0961	.0321	-.072	.1360
	<i>High</i>	.0195	-.102	.1405	.0684	-.057	.1938
	<i>PK</i>	.0763	-.049	.2016	.4450	.3369	.5531
<i>adult (age 50-59 years, n=10)</i>							
<i>Difference CoA Ig OTM to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.044	-.197	.1080	-.055	-.427	.3177
	<i>Medium</i>	-.052	-.191	.0863	-.103	-.397	.1904
	<i>High</i>	-.026	-.199	.1475	.0586	-.014	.1314
	<i>PK</i>	.0669	-.410	.5443	.7757	.3079	1.243
<i>Difference CoA Ig head DNA to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.023	-.118	.0718	-.026	-.240	.1877
	<i>Medium</i>	-.055	-.170	.0602	-.053	-.193	.0876
	<i>High</i>	.0045	-.121	.1302	.0340	-.023	.0906
	<i>PK</i>	.0634	-.232	.3586	.4044	.1471	.6617

3.5.3 Mikronukleustest

Im Mikrokerntest mit CREST-Analytik zeigt sich für keine der Befeldungen (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg) ein Einfluss auf die Entstehung von Mikrokernen oder aneuploiden Ereignissen, markiert durch die CREST-Analytik. Auch ein Einfluss durch eine längere Befeldungsdauer (72 h) lässt sich in den analysierten Zielgrößen (*Mikrokernrate*, *Rate an CREST-positiven Mikrokernen*) nicht feststellen. Die Mittelwertsdifferenzen in Bezug auf die Sham-Exposition für die beiden Zielgrößen und Befeldungszeiten sind nachfolgend in Abbildung 51-54 dargestellt.

Es lässt sich zudem auch kein Einfluss auf die Proliferationsrate, bestimmt über den CBPI, durch die Befeldung feststellt (siehe Abbildung 55-56).

In Tabelle 27 werden zudem die Mittelwertsdifferenzen und deren Konfidenzintervalle getrennt nach Expositionsgruppe für alle Probanden insgesamt, sowie aufgeschlüsselt nach Alterskollektiv aufgeführt.

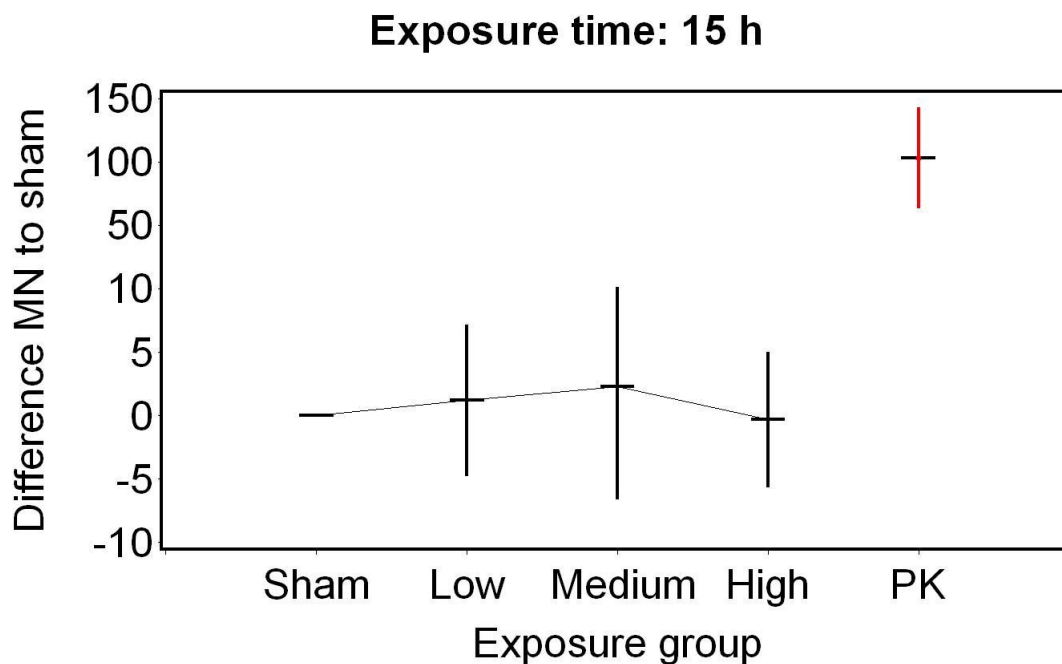


Abbildung 51: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße *Mikrokernrate in 2.000 binukleären Zellen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

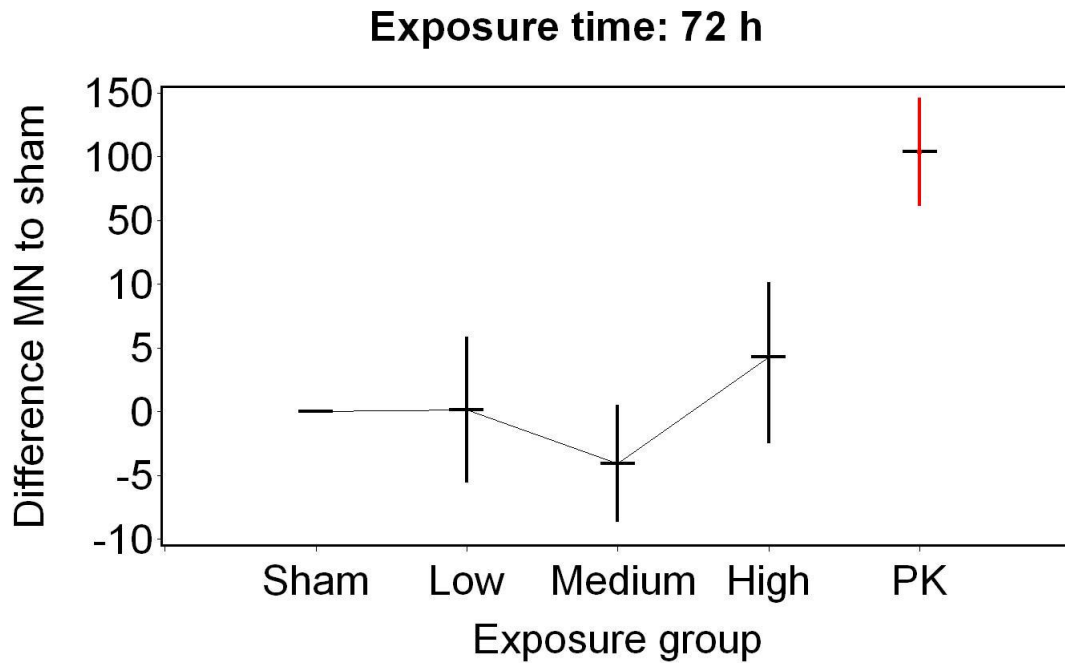


Abbildung 52: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße *Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

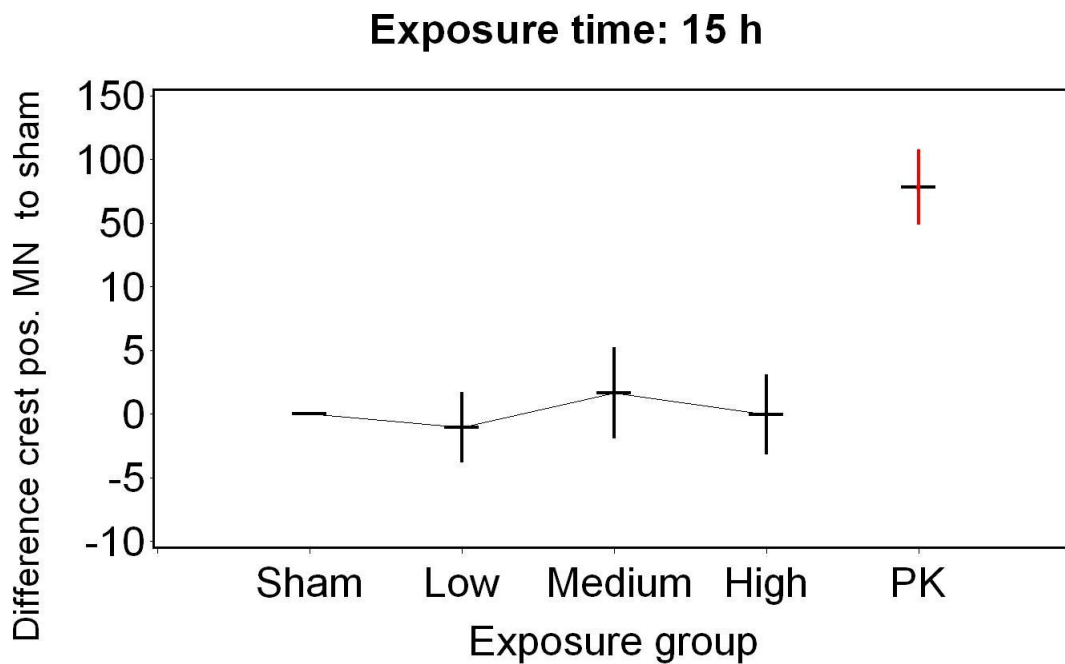


Abbildung 53: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße *CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

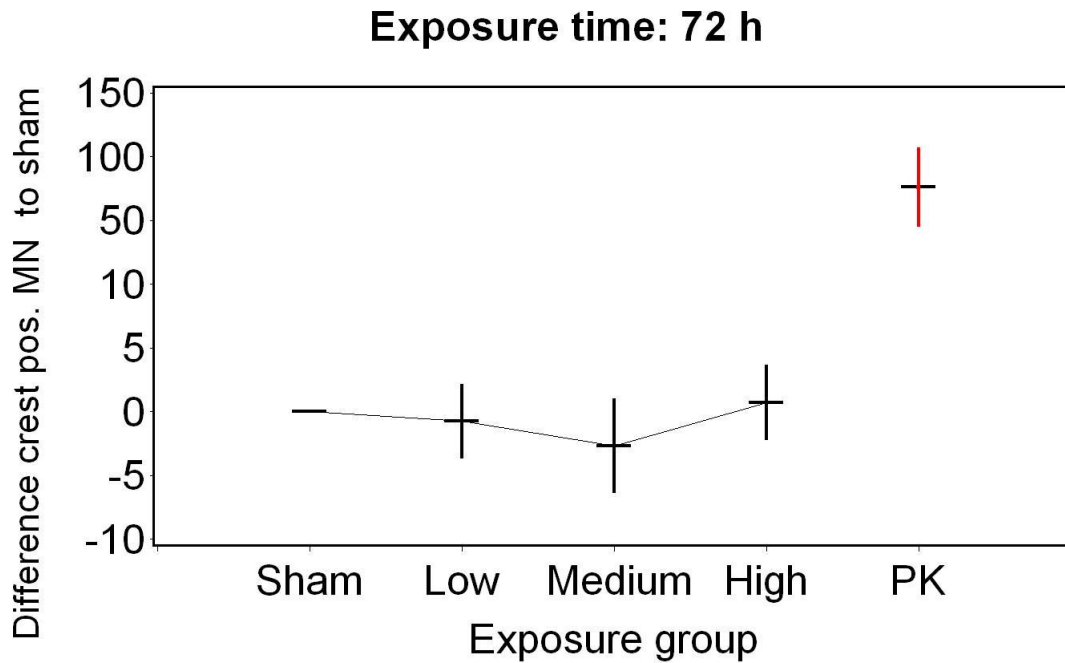


Abbildung 54: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße *CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

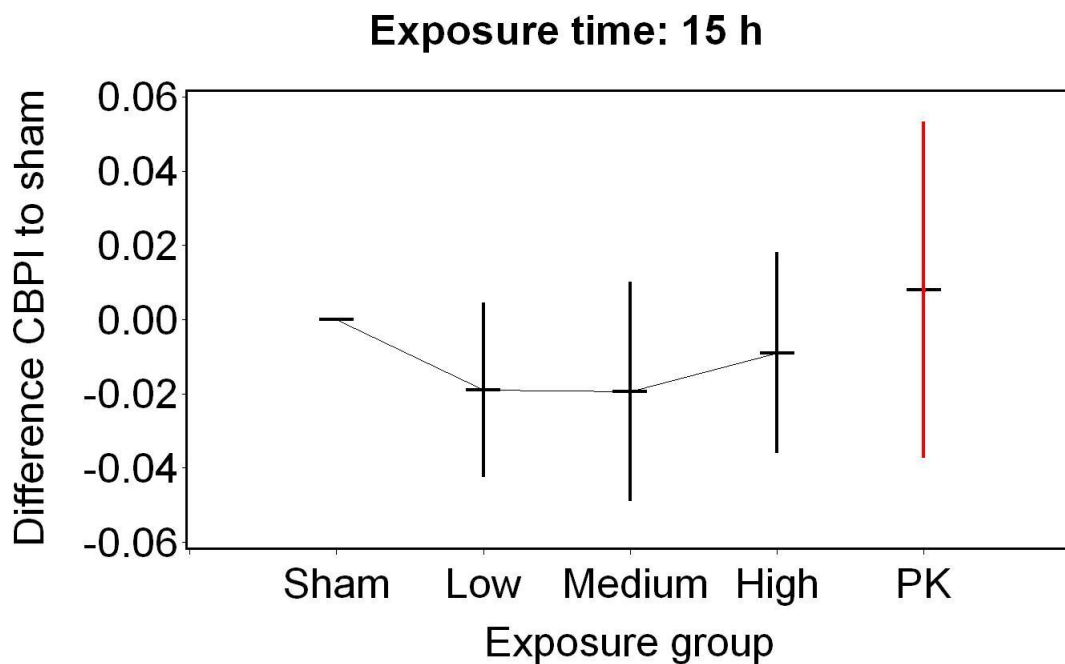


Abbildung 55: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße *Proliferationsindex CBPI*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

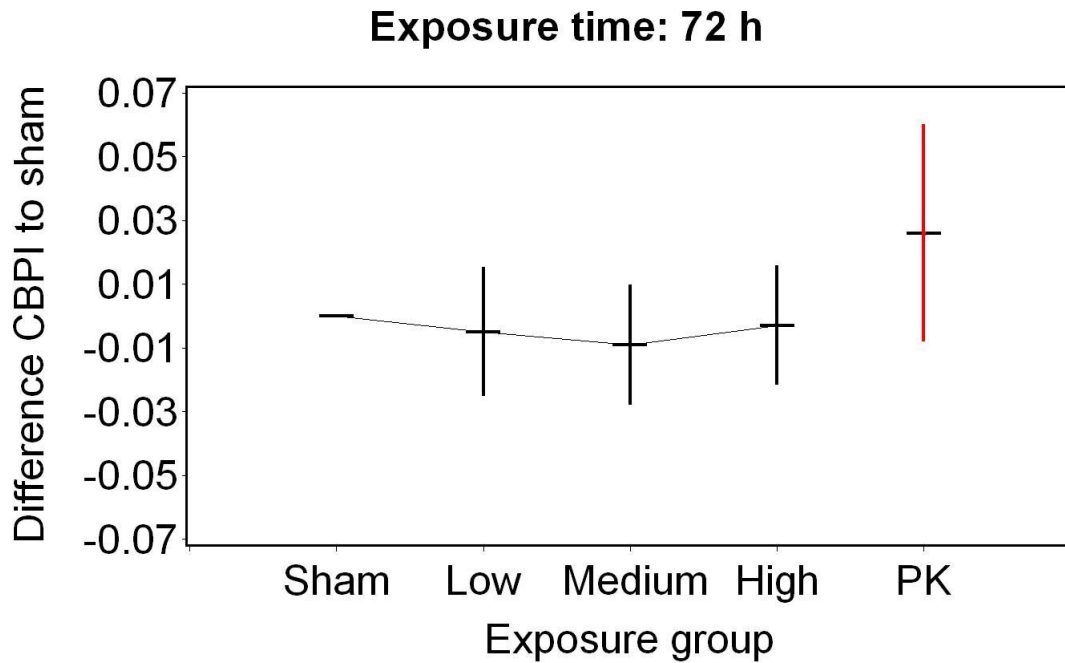


Abbildung 56: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße *Proliferationsindex CBPI*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

Tabelle 27: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=10; adult: Alter 50-59 Jahre, n=10), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen des Mikrokerntests (15 h und 72 h).

		exposure time					
		15 h			72 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Mean	95_LCLM	95_UCLM
		total (n=20)					
Difference MN to sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	1.178	-5.10	7.452	.1575	-5.85	6.161
	Medium	2.269	-7.06	11.59	-4.07	-8.88	.7372
	High	-.337	-5.95	5.280	4.285	-2.79	11.36
	PK	103.0	63.02	142.9	103.9	61.41	146.4
Difference crest positive MN to sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	-1.05	-3.96	1.862	-.764	-3.80	2.273
	Medium	1.660	-2.08	5.396	-2.67	-6.55	1.210
	High	-.070	-3.36	3.218	.7114	-2.37	3.795
	PK	78.41	49.13	107.7	76.45	45.66	107.2

		exposure time					
		15 h			72 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference CBPI to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.019	-.044	.0056	-.005	-.026	.0162
	<i>Medium</i>	-.019	-.050	.0114	-.009	-.029	.0107
	<i>High</i>	-.009	-.037	.0193	-.003	-.023	.0166
	<i>PK</i>	.0080	-.037	.0533	.0260	-.008	.0601
<i>juvenile (age 18-19 years, n=10)</i>							
<i>Difference MN to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	3.525	-4.36	11.41	4.589	-1.90	11.08
	<i>Medium</i>	1.982	-15.6	19.60	-3.67	-8.35	1.012
	<i>High</i>	-4.46	-12.0	3.099	-.103	-4.50	4.299
	<i>PK</i>	127.0	48.46	205.5	125.9	48.00	203.8
<i>Difference crest positive MN to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.8886	-2.07	3.850	.3421	-2.95	3.638
	<i>Medium</i>	-.095	-4.32	4.128	-2.64	-5.99	.7092
	<i>High</i>	-1.76	-5.39	1.871	-.491	-2.66	1.678
	<i>PK</i>	87.79	30.35	145.2	82.92	24.39	141.4
<i>Difference CBPI to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.018	-.061	.0248	-.009	-.045	.0274
	<i>Medium</i>	-.016	-.055	.0235	-.009	-.039	.0212
	<i>High</i>	-.006	-.044	.0316	-.005	-.038	.0276
	<i>PK</i>	.0290	-.039	.0973	.0410	-.028	.1098
<i>adult (age 50-59 years, n=10)</i>							
<i>Difference MN to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-1.17	-12.4	10.04	-4.27	-14.9	6.371
	<i>Medium</i>	2.556	-8.32	13.43	-4.47	-14.1	5.114
	<i>High</i>	3.787	-5.11	12.68	8.672	-5.66	23.01
	<i>PK</i>	78.94	46.61	111.3	81.92	34.09	129.7

		exposure time					
		15 h			72 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference crest positive MN to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-2.98	-8.34	2.376	-1.87	-7.64	3.896
	<i>Medium</i>	3.414	-3.48	10.31	-2.70	-10.6	5.238
	<i>High</i>	1.621	-4.45	7.694	1.914	-4.45	8.282
	<i>PK</i>	69.03	40.22	97.85	69.98	35.29	104.7
<i>Difference CBPI to sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.020	-.054	.0141	-.001	-.030	.0285
	<i>Medium</i>	-.023	-.079	.0330	-.009	-.041	.0225
	<i>High</i>	-.012	-.062	.0383	-.001	-.030	.0279
	<i>PK</i>	-.013	-.083	.0574	.0110	-.016	.0383

3.5.4 Erweiterter Mikronukleustest

Im erweiterten Mikrokerntest mit CREST-Analytik (10.000 binukleären Zellen/Dosis; PK: 2.000 binukleäre Zellen) zeigt sich für keine der Befeldungen (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg) ein Einfluss auf die Entstehung von Mikrokernen oder aneuploiden Ereignissen, markiert durch die CREST-Analytik. Die Mittelwertsdifferenzen in Bezug auf die Sham-Exposition für die beiden Zielgrößen und Befeldungszeiten sind nachfolgend in Abbildung 57-58 dargestellt. Größere Schwankungen als im vorher beschriebenen Mikrokerntest mit 2.000 analysierten Binukleaten je Dosis je Proband ergeben sich aus der geringeren Probandenanzahl von nur 4 statt 20.

Es lässt sich zudem auch kein Einfluss auf die Proliferationsrate, bestimmt über den CBPI, durch die Befeldung feststellen (siehe Abbildung 59).

In Tabelle 28 werden die Mittelwertsdifferenzen und deren Konfidenzintervalle getrennt nach Expositionsgruppe für alle Probanden insgesamt, sowie aufgeschlüsselt nach Alterskollektiv aufgeführt.

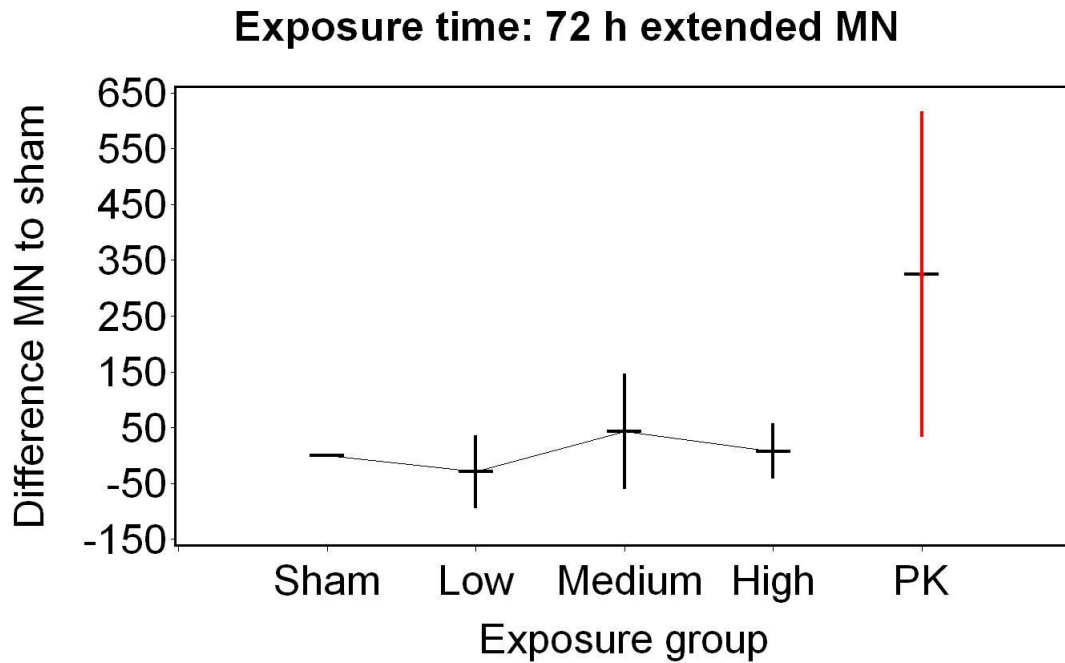


Abbildung 57: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den erweiterten Mikrokernstest nach 72 h Befeldung, Zielgröße *Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen* (PK: 2.000 binukleäre Zellen), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

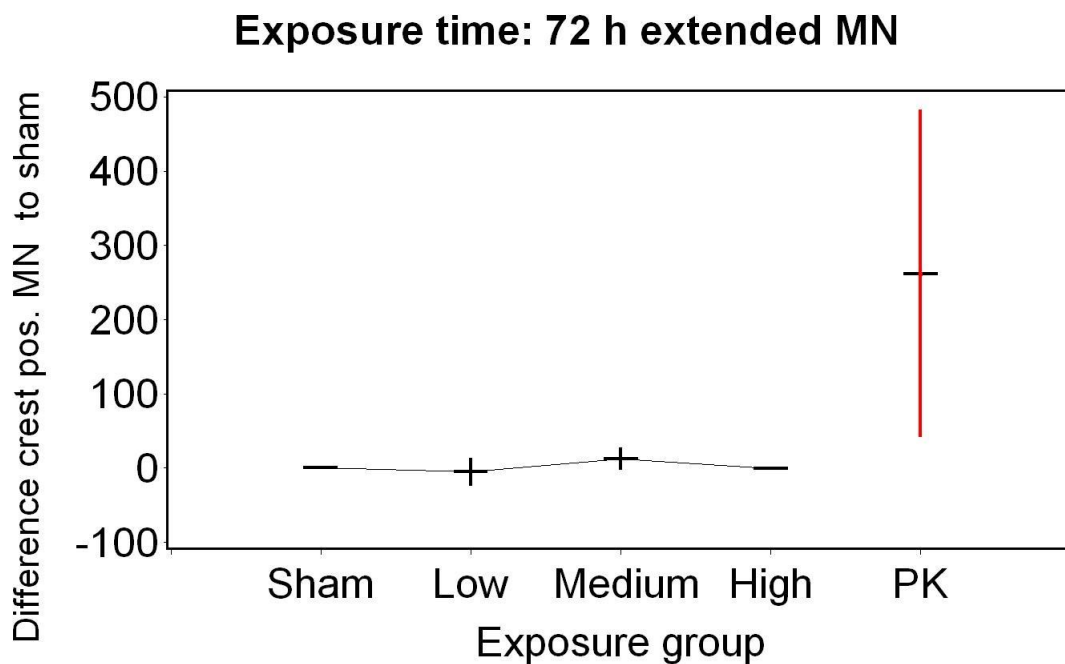


Abbildung 58: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den erweiterten Mikrokernstest nach 72 h Befeldung, Zielgröße *CREST-positive Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen* (PK: 2.000 binukleäre Zellen), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

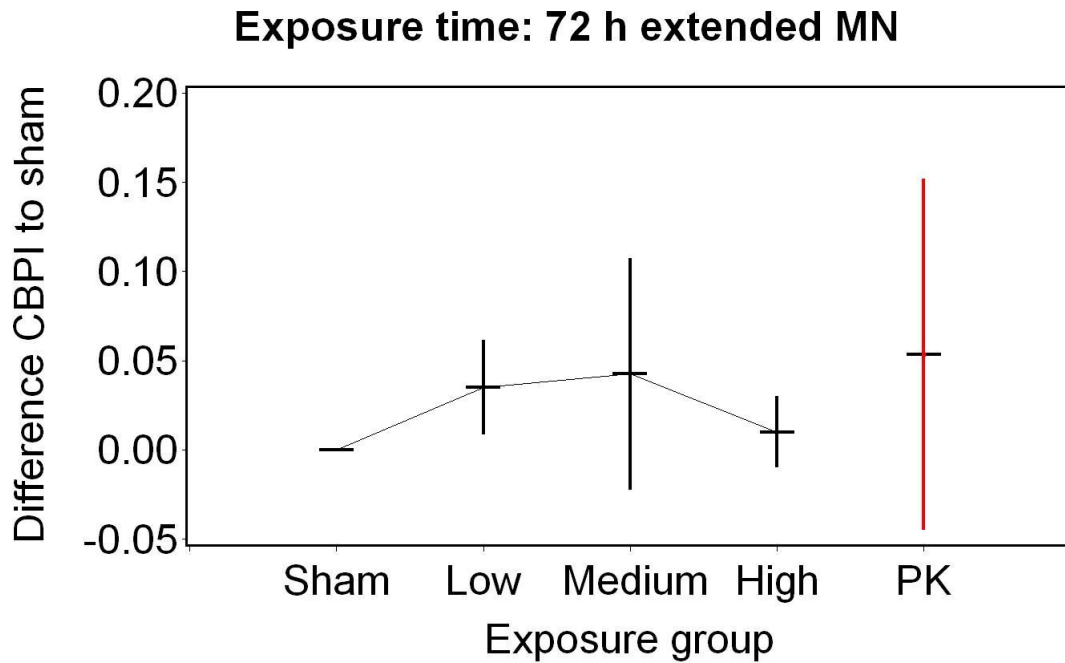


Abbildung 59: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße Proliferationsindex CBPI, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

Tabelle 28: Differenzen zur Sham Exposition für alle 4 Probanden getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen des erweiterten Mikrokerntests (72h).

		exposure time		
		72 h extended MN		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM
Difference MN to sham	Exposure group			
	Sham	.0000	.	.
	Low	-29.5	-134	74.63
	Medium	42.71	-122	207.3
	High	7.213	-71.9	86.34
	PK	325.1	33.52	616.6
Difference crest positive MN to sham	Exposure group			
	Sham	.0000	.	.
	Low	-5.39	-34.7	23.93
	Medium	12.30	-11.7	36.25
	High	-.637	-2.42	1.143
	PK	262.0	41.26	482.7

		<i>exposure time</i>		
		<i>72 h extended MN</i>		
		<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>
<i>Difference CBPI to sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0350	-.007	.0771
	<i>Medium</i>	.0425	-.061	.1459
	<i>High</i>	.0100	-.022	.0418
	<i>PK</i>	.0535	-.045	.1519

3.5.5 Numerische Chromosomenaberrationen

Im Test auf numerische Chromosomenaberrationen wurden (nach Vereinbarung mit dem BfS) nur 10 Probanden analysiert. Hier zeigt sich für keine der Befeldungen (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg) ein Einfluss auf die Induktion von aneuploiden Ereignissen; weder auf Chromosomenverluste, noch auf den Zugewinn von Chromosomen durch asymmetrische Teilung. Die Mittelwertsdifferenzen in Bezug auf die Sham-Exposition sind nachfolgend in Abbildung 60-62 dargestellt.

In Tabelle 29 werden die Mittelwertsdifferenzen und deren Konfidenzintervalle getrennt nach Expositionsgruppe für alle Probanden insgesamt, sowie aufgeschlüsselt nach Alterskollektiv aufgeführt.

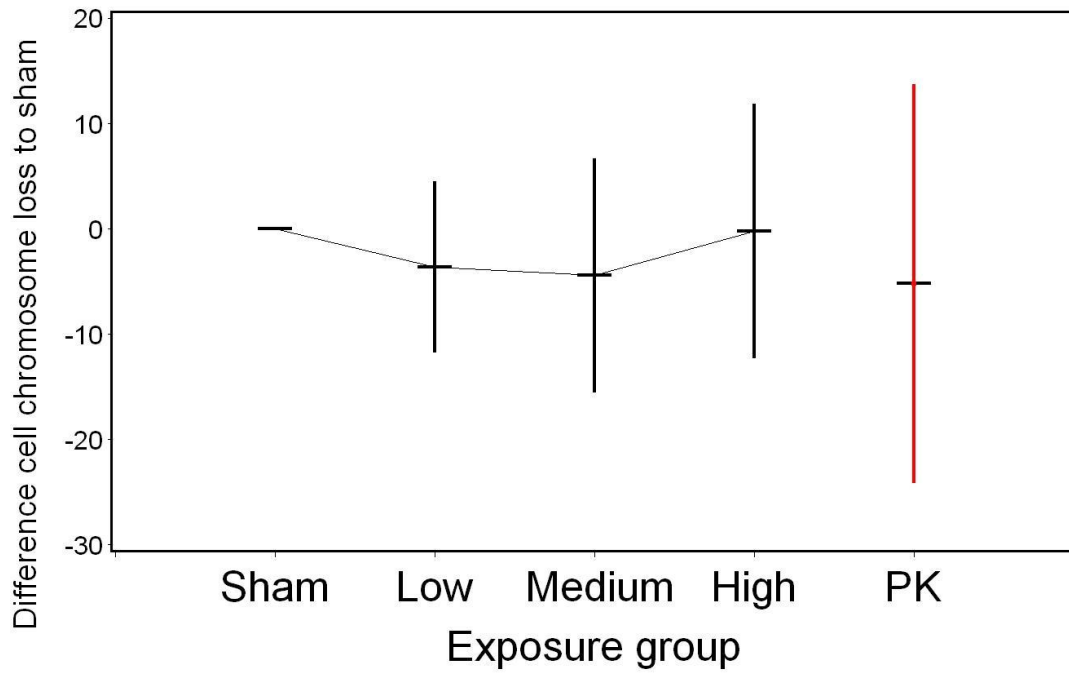


Abbildung 60: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße *Zellen mit Chromosomenverlusten in 200 Metaphasen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

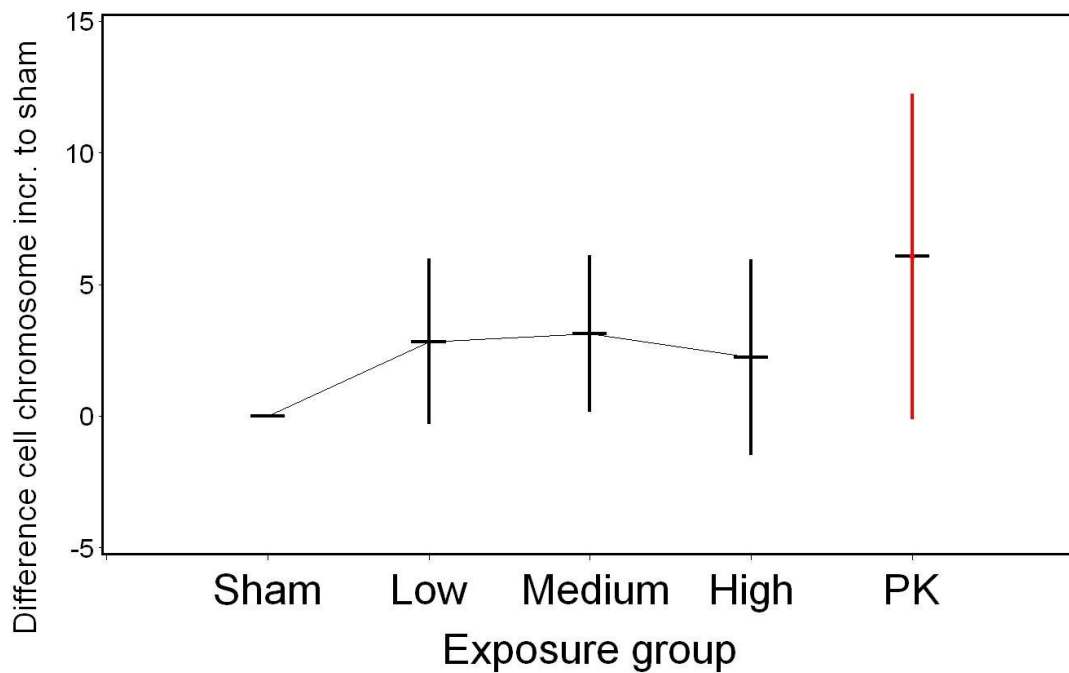


Abbildung 61: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße *Zellen mit zusätzlichen Chromosomen in 200 Metaphasen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

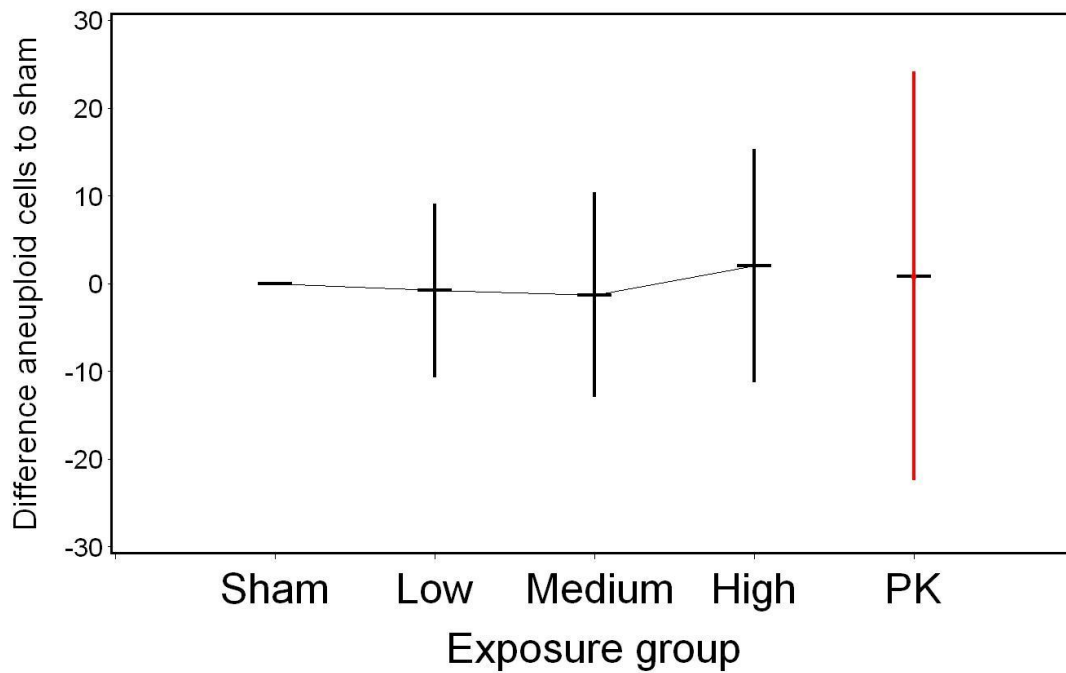


Abbildung 62: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße *aneuploide Zellen insgesamt in 200 Metaphasen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

Tabelle 29: Differenzen zur Sham Exposition für 10 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=7; adult: Alter 50-59 Jahre, n=3), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen der numerischen Chromosomenaberrationen.

		Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>total (n=10)</i>				
<i>Difference cell chromosome loss to sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-3.65	-12.8	5.532
	<i>Medium</i>	-4.45	-17.0	8.102
	<i>High</i>	-.248	-13.9	13.41
	<i>PK</i>	-5.22	-24.1	13.69
<i>Difference cell chromosome increase to sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	2.830	-.715	6.375
	<i>Medium</i>	3.130	-.240	6.500
	<i>High</i>	2.230	-1.98	6.442
	<i>PK</i>	6.062	-.122	12.25

		Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference aneuploid cells to sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.818	-12.0	10.37
	<i>Medium</i>	-1.32	-14.5	11.90
	<i>High</i>	1.982	-13.0	17.00
	<i>PK</i>	.8386	-22.5	24.14
<i>juvenile (age 18-19 years, n=10)</i>				
<i>Difference cell chromosome loss to sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	2.429	-15.9	20.71
	<i>Medium</i>	-8.71	-21.9	4.427
	<i>High</i>	-8.00	-27.4	11.43
	<i>PK</i>	-12.1	-35.0	10.68
<i>Difference cell chromosome increase to sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	2.143	-1.50	5.781
	<i>Medium</i>	4.143	-.110	8.395
	<i>High</i>	4.167	-1.48	9.815
	<i>PK</i>	3.714	-1.95	9.383
<i>Difference aneuploid cells to sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	4.571	-15.7	24.80
	<i>Medium</i>	-4.57	-18.2	9.093
	<i>High</i>	-3.83	-26.9	19.19
	<i>PK</i>	-8.43	-35.1	18.20
<i>adult (age 50-59 years, n=3)</i>				
<i>Difference cell chromosome loss to sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-6.33	-18.1	5.406
	<i>Medium</i>	2.173	-53.1	57.47
	<i>High</i>	6.840	-15.5	29.21
	<i>PK</i>	10.92	-57.6	79.46
<i>Difference cell chromosome increase to sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	8.667	-.738	18.07
	<i>Medium</i>	-.233	-4.36	3.898
	<i>High</i>	1.767	-10.6	14.10
	<i>PK</i>	11.54	-19.8	42.89

		Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference aneuploid cells to sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	2.333	-9.14	13.81
	<i>Medium</i>	1.940	-57.5	61.34
	<i>High</i>	8.607	-20.3	37.51
	<i>PK</i>	22.46	-66.6	111.5

3.5.6 TUNEL-Apoptosetest

Im Test auf apoptotische Ereignisse durch TUNEL-Analyse zeigt sich für keine der Befeldungen (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg) ein Einfluss auf die Induktion von apoptotischen Ereignissen. Die Funktionalität des Tests ist durch Nachweis und Induktion von apoptotischen Ereignissen in der Kontrollzelllinie HL-60 (PK1: HL-60-sham = Kontrollzelllinie, unbehandelt, PK2: HL-60 Act = Kontrollzelllinie, Actinomycin D-behandelt) gewährleistet. Die Mittelwertsdifferenzen in Bezug auf die Sham-Exposition sind nachfolgend in Abbildung 63 dargestellt.

In Tabelle 30 werden die Mittelwertsdifferenzen und deren Konfidenzintervalle getrennt nach Expositionsgruppe für alle Probanden insgesamt, sowie aufgeschlüsselt nach Alterskollektiv aufgeführt.

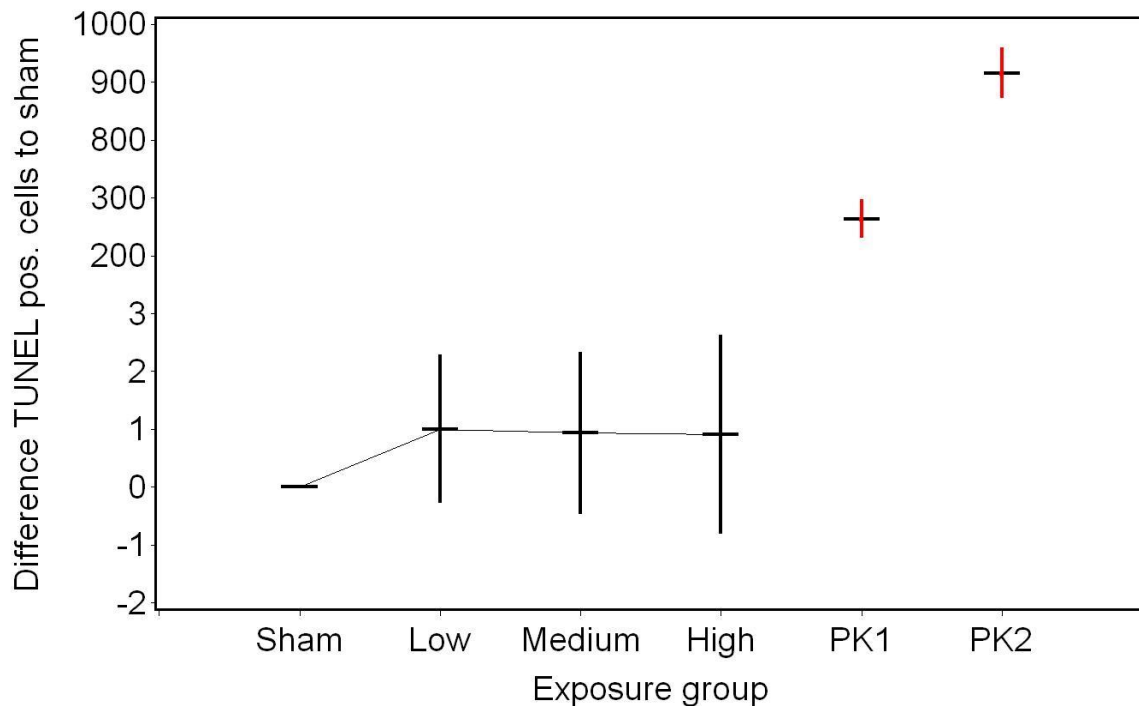


Abbildung 63: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf apoptotische Ereignisse, Zielgröße *TUNEL-positive Zellen in 1.000 Zellen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK1: HL-60-sham = Kontrollzelllinie, unbehandelt, PK2: HL-60 Act = Kontrollzelllinie, Actinomycin D-behandelt).

Tabelle 30: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=10; adult: Alter 50-59 Jahre, n=10), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen der TUNEL-positiven Zellen.

		Mean	95_LCLM	95_UCLM
total (n=20)				
Difference TUNEL positive cells to sham	Exposure group			
	Sham	.0000	.	.
	Low	1.006	-.331	2.343
	Medium	.9321	-.531	2.395
	High	.9028	-.898	2.703
	HL60-sham	263.8	230.8	296.7
	HL60-Actinomycin	915.9	872.2	959.5
juvenile (age 18-19 years, n=10)				
Difference TUNEL positive cells to sham	Exposure group			
	Sham	.0000	.	.
	Low	-.100	-1.56	1.357
	Medium	-1.07	-4.61	2.471
	High	-1.53	-4.40	1.329
	HL60-sham	267.3	222.2	312.4
	HL60-Actinomycin	928.9	873.1	984.8

<i>adult (age 50-59 years, n=10)</i>				
<i>Difference TUNEL positive cells to sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	3.583	-.440	7.607
	<i>Medium</i>	4.093	-.666	8.853
	<i>High</i>	3.380	-1.03	7.793
	<i>HL60-sham</i>	260.3	202.7	317.8
	<i>HL60-Actinomycin</i>	902.8	824.9	980.8

3.5.7 Zellzyklus

Die Analysen des Zellzyklus (siehe auch Abbildung 64-66) zeigten für die Mittelwertsdifferenzen bei den älteren Probanden in der Zielgröße G2 eine auffällige Differenz zur Sham nach Befeldung mit 2 W/kg.

Alle übrigen Werte zeigen keine statistischen Auffälligkeiten. In Tabelle 31 werden die Mittelwertsdifferenzen und deren Konfidenzintervalle getrennt nach Expositionsgruppe für alle Probanden insgesamt, sowie aufgeschlüsselt nach Alterskollektiv aufgeführt.

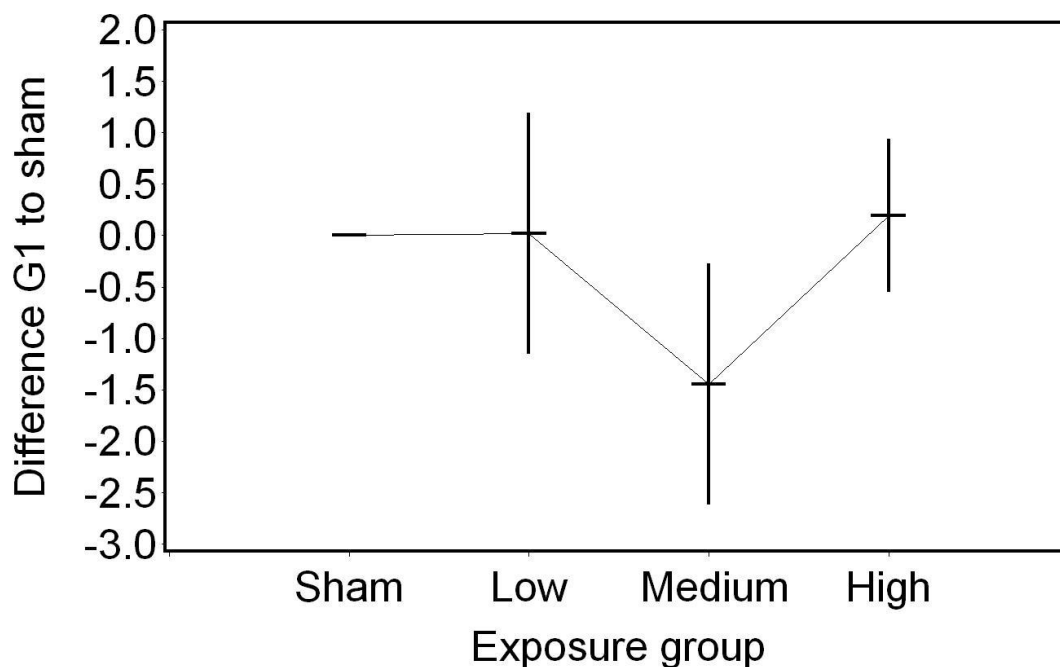


Abbildung 64: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße *G1-Phase-Zellen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg).

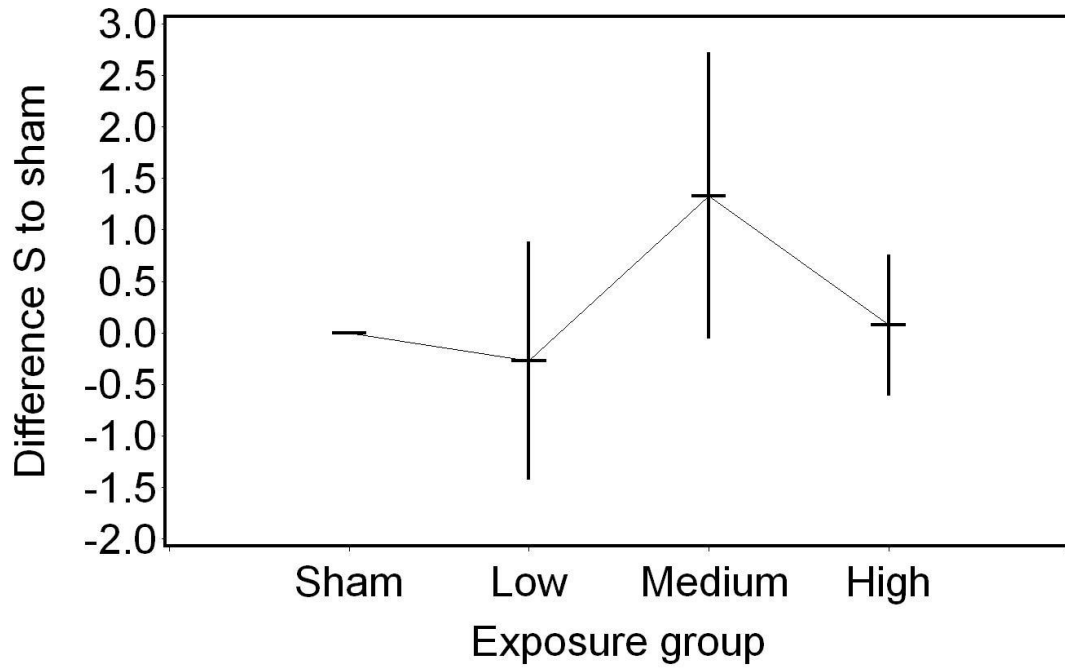


Abbildung 65: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße *S-Phase-Zellen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg).

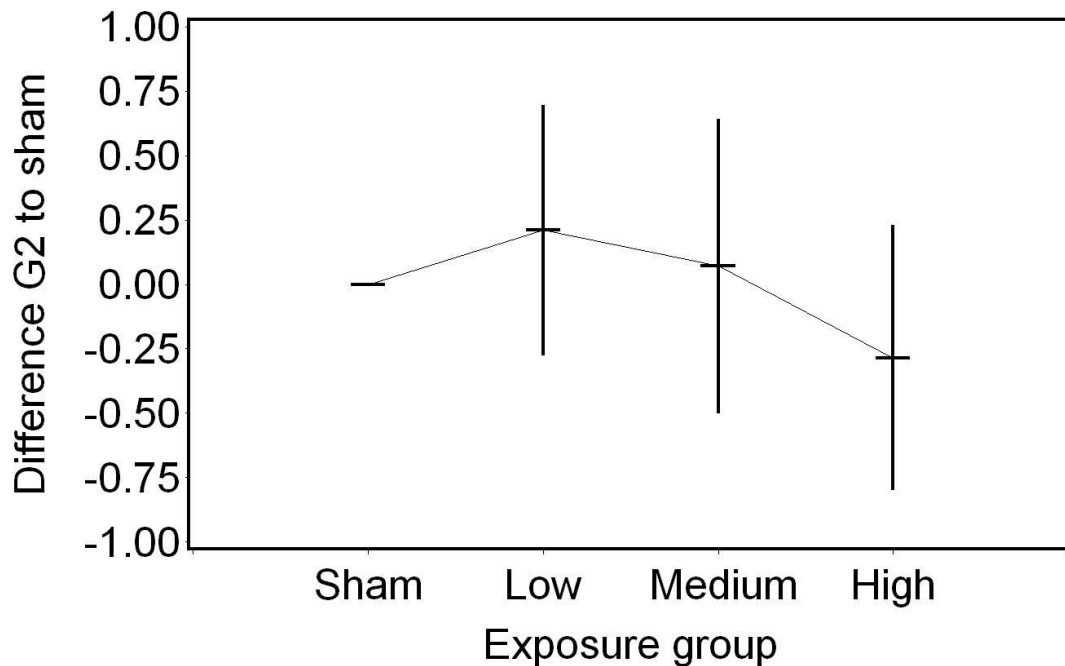


Abbildung 66: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße *G2-Phase-Zellen*, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg).

Tabelle 31: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden, sowie aufgeschlüsselt nach juvenilen und adulten Probanden (juvenil: Alter 18-19 Jahre, n=10; adult: Alter 50-59 Jahre, n=10), getrennt nach Expositionsgruppe für die Zielvariablen Zellzyklusverteilung (G1-, S-, G2-Phase).

		Mean	95_ LCLM	95_ UCLM	Mean	95_ LCLM	95_ UCLM	Mean	95_ LCLM	95_ UCLM
		total (n=20)			juvenile (n=10)			adult (n=10)		
<i>Difference G1 to sham</i>	<i>Exposure group</i>									
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0200	-1.21	1.248	-1.17	-5.15	2.813	.8800	-5.46	7.221
	<i>Medium</i>	-1.45	-2.67	-.220	-2.80	-5.98	.3814	-.830	-5.53	3.871
	<i>High</i>	.1950	-.584	.9739	-1.08	-4.85	2.689	1.720	-.150	3.590
<i>Difference S to sham</i>	<i>Exposure group</i>									
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.275	-1.48	.9346	1.800	-1.42	5.017	-1.31	-5.63	3.006
	<i>Medium</i>	1.330	-.124	2.784	2.700	-.749	6.149	-.240	-5.40	4.921
	<i>High</i>	.0750	-.644	.7940	1.310	-2.13	4.754	-1.35	-3.50	.8035
<i>Difference G2 to sham</i>	<i>Exposure group</i>									
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.2100	-.299	.7191	-.640	-2.54	1.258	.3500	-3.09	3.786
	<i>Medium</i>	.0700	-.529	.6690	.0800	-1.05	1.206	1.070	.1657	1.974
	<i>High</i>	-.285	-.825	.2547	-.220	-2.35	1.910	-.470	-2.44	1.500

4 Diskussion

In diesem Projekt wurde der Einfluss einer EMF-Befeldung (GSM 1800) mit SAR-Werten von 0,2; 2 und 10 W/kg im Vergleich zu einer Sham-exponierten Kontrolle, sowie einer Positivkontrolle, auf primäre humane dermale Fibroblasten *in vitro* untersucht. Die Induktion von DNA-Schäden wurde unter Verwendung des Comet-Assays nach 4, 16 und 24 h Befeldung untersucht. Des Weiteren wurde die Bildung von, durch reaktive Sauerstoffspezies induzierten, DNA-Addukten wie 8-oxo-Guanin über einen Comet-Assay mit zusätzlicher FPG-Inkubation nach 72 h Befeldung detektiert. Die potentielle Gentoxizität der EMF-Befeldung wurde über den Mikrokerntest nach 15 und 72 h Exposition analysiert. Das Auftreten aneugener Ereignisse wurde darüber hinaus durch eine zusätzliche CREST-Analytik in den Mikrokernen sowie der Bestimmung numerischer Chromosomenaberrationen in Metaphasen untersucht. Ein Einfluss auf die Apoptoserate wurde über den TUNEL-Assay ebenfalls bestimmt. Des Weiteren wurde ein Einfluss auf die Zellzyklusverteilung in durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen sowie durch Bestimmung des Proliferationsindex CBPI im Mikrokerntest überprüft. Insgesamt wurden in diesem Projekt 23 Probanden rekrutiert und die Zellen von 20 Probanden aus Biopsien isoliert, befeldet und analysiert.

Basis für die gewählten Parameter dieser Studie war die von der europäischen Union ins Leben gerufene und geförderte REFLEX-Studie. Im Rahmen der REFLEX-Studie waren vermehrt DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche im Comet-Assay nach 16 h intermittierender EMF-Befeldung in humanen primären Fibroblasten nachgewiesen worden [9]. Die zugehörigen Veröffentlichungen der an der REFLEX-Studie beteiligten Arbeitsgruppe der Klinischen Abteilung für Arbeitsmedizin der Medizinischen Universität Wien (Diem et al. [9] und Schwarz et al. [10]) wurden von Vijayalaxmi et al. [83] Lerchl [13] bzw. Lerchl und Wilhelm [14] stark kritisiert. Die Punkte, die bemängelt wurden, waren, dass keine Untersuchungen zur Apoptose, keine Zellzyklusbestimmungen, keine Bestimmung der Viabilität der Zellen durchgeführt wurden und wenig vertrauenswürdige Streuungen der Ergebnisse vorlagen. Der betroffenen Arbeitsgruppe wurden Datenmanipulationen vorgeworfen. Dieser Vorwurf wurde durch Untersuchungen der Medizinischen Universität Wien unterstützt. In der entsprechenden Pressemitteilung der Universität vom 23. Mai 2008 (http://www.meduniwien.ac.at/homepage/news-und-topstories/?tx_ttnews

%5Btt_news%5D=231&cHash=66bfe7e901; http://www.emf-portal.de/PDF/11910_K.pdf) forderte der amtierende Rektor Prof. Dr. Wolfgang Schütz die Autoren zur Rücknahme der Publikationen auf. Die Manipulationen wurden zwar auch teilweise in geringem Umfang eingeräumt, die Publikationen sind jedoch bis heute zugänglich. Mehrere Arbeitsgruppen versuchten die aus der Arbeitsgruppe von Prof. H. Rüdiger veröffentlichten Effekte nach EMF Befeldung [9, 10, 84] zu bestätigen. Im Bezug auf die Arbeiten aus dem Niederfrequenzbereich konnten von Sarfi et al. [85] keine Effekte reproduziert werden, von Focke et al. [86] jedoch im Comet-Assay geringe aber signifikante Effekte festgestellt werden, die laut der Autoren aber vermutlich aufgrund eines Einflusses auf die Replikation der DNA, denn auf die DNA selbst entstehen. In Hinblick auf Arbeiten die Effekte im Mobilfunkfrequenzbereich zeigen, konnte die Gruppe um Speit et al. jedoch keine Effekte im Comet-Assay oder Mikrokerntest reproduzieren [52].

Im Rahmen dieser Studie wurden daher die Expositionsbedingungen (GSM 1800 MHz, intermittierend, Expositionszeiten von 4, 16 und 24 h für den Comet-Assay – 15 und 72 h für den Mikrokerntest) und Zielzellen (primäre humane Fibroblasten) gewählt, die denen der REFLEX-Studie entsprechen. In Anlehnung an Schwarz et al. [10] wurden auch Fibroblasten von Probanden verschiedenen Alters verwendet. Parallel zum Comet-Assay wurde der TUNEL-Assay als Nachweis für Apoptose durchgeführt, und es wurden Untersuchungen zum Zellzyklus implementiert, um bei erhöhten Werten im Comet-Assay ausschließen zu können, dass diese von einer apoptotischen Fragmentierung der DNA oder von einer erhöhten Zahl an S-Phase-Zellen herrühren. Zum Ausschluss von zytotoxischen Effekten wurden die Zellen für den Comet-Assay nach der Exposition auf Viabilität geprüft. Mit Fibroblasten von 20 Probanden war die Studienpopulation zwar nicht groß, aber deutlich höher als bei anderen Studien dieser Art. Die Befeldung mit den drei SAR-Werten von 0,2; 2; und 10 W/kg decken einen SAR-Bereich von deutlich unterhalb des Grenzwertes, dem Grenzwert entsprechend und bis deutlich über dem von der ICNIRP empfohlenen Teilkörper-SAR-Grenzwert von 2 W/kg ab und erlaubt so die Erfassung von möglichen Dosis-Wirkungs-Beziehungen.

Die Durchführung des Projektes selbst unterlag einigen Problemen, die auch mit den Vorgaben durch die REFLEX-Studie zusammenhängen, und schlussendlich zu einer deutlichen Verzögerung geführt haben. Zum einen wurde der Zeitplan aufgrund

wiederholter größerer Ausfälle der Befeldungsapparatur dramatisch verzögert. Angezogene Kulturen wurden dann nur teilbefeldet und mussten daher verworfen werden. Das erneute Expandieren der Kulturen bis zur möglichen Verwendung war dabei aufgrund des sehr langsamen Wachstums, insbesondere der Fibroblastenzellen von älteren Probanden, sehr zeitaufwändig. Teilweise konnten die Kulturen aufgrund der zu hohen Passage gar nicht verwendet werden und mussten erst aus jüngeren Passagen neu angezogen werden. Es zeigte sich zum anderen, dass die durch die REFLEX-Studie bedingte Verwendung von primären Fibroblasten aufgrund der niedrigen Teilungsaktivität der Zellen eher ungeeignet für diese Art Untersuchungen ist. Viele Versuche mussten wiederholt werden, um die erforderlichen Zahlen an Metaphasen (numerische Chromosomenaberrationen) oder binukleären Zellen (Mikrokerntest) zu erreichen. Teilweise mussten Probanden aus der Studie ausgeschlossen werden, da die Teilungsraten viel zu niedrig waren. Schlussendlich wurden von 23 rekrutierten Probanden Kulturen von 20 Probanden befeldet und Präparate angefertigt, ausgewertet und statistisch analysiert.

Die statistischen Analysen zeigten für keinen der in diesem Projekt untersuchten Endpunkte statistisch signifikante Einflüsse durch die EMF-Befeldung mit SAR-Werten von 0,2; 2 und 10 W/kg.

Für die Ergebnisse der Analysen des Comet-Assays, der Mikrokerntests, des TUNEL-Assays und den Zellzyklusanalysen, sowie für die verschiedenen Befeldungszeiten wurden Permutationstests mit den Ergebnissen der zwanzig Probandenzellkulturen durchgeführt. Die Analysen für die numerischen Chromosomenanalysen umfassten, wie zuvor bereits beschrieben, nur zehn Probanden und für den erweiterten Mikrokerntest nur 4 Probanden. Die Permutationstests zeigen keinerlei Auffälligkeiten. Es gibt keine p-Werte, die nach der Korrektur des Fehlers erster Art als signifikant gelten. Die p-Werte liegen alle zwischen 0.05 und 1, somit ist keine statistische Auffälligkeit zu erkennen. Die Werte vom erweiterten Mikrokerntest sind unter Vorbehalt zu betrachten, da die Fallzahl mit 4 Probanden sehr klein ist. In der Sensitivitätsanalyse, welche mit den gleichen Fallzahlen wie die Permutationstests durchgeführt wurde, erweist sich ebenfalls kein p-Wert als signifikant. Damit ist von keinem Trend über die 4 Dosisgruppen (sham, 0,2; 2 und 10 W/kg) hinweg auszugehen. Die Ergebnisse der primären Analyse werden somit durch die Sensitivitätsanalyse bestätigt.

Im Zuge einer detaillierten Betrachtung wurden die einzelnen Analysen zusätzlich nach den beiden Alterskollektiven, juvenil (18-19 Jahre) und adult (50-59 Jahre), getrennt untersucht. In den Dosistrendanalysen, zeigen die nach den Permutationstests bestimmten, exakten p-Werte, sowie die asymptotisch bestimmten Konfidenzintervalle keine Auffälligkeiten in Richtung eines positiven Dosistrends.

Die Analysen des Zellzyklus zeigten für die Mittelwertsdifferenzen zur Sham bei den älteren Probanden in der Zielgröße G2 eine auffällige Differenz zur Sham nach Befeldung mit 2 W/kg. Es zeigt sich außerdem bei den älteren Probanden im Comet-Assay in der Zielgröße *Log-Olive-Tail-Moment* eine auffällige Differenz zur Sham bei Befeldung mit 10 W/kg nach 16 Stunden Exposition. Die jüngeren Probanden wiesen im Comet-Assay in beiden Zielvariablen jeweils zum Zeitpunkt nach 24 Stunden Exposition bei der Befeldung mit 0,2 W/kg eine statistisch auffällige Differenz zur Sham auf. Dieser Trend ist aber nicht monoton; bei mittlerer und höherer Dosis wird ein schwächerer und statistisch unauffälliger Effekt beobachtet. Der Trend-Test ist damit statistisch unauffällig.

Generell zeigt sich keine Dosis-Wirkungsbeziehung oder generell festzustellende Empfindlichkeit des einen oder anderen Alterskollektivs. Auch lässt sich kein signifikanter Zusammenhang mit der Befeldungsdauer feststellen. Es lässt sich also kein statistisch signifikanter Einfluss durch die EMF-Befeldung nachweisen, weder für die Betrachtung des gesamten Kollektivs, noch innerhalb der beiden Alterskollektive.

Die in diesem Projekt erhobenen Daten weisen auf keine durch EMF induzierten gentoxischen Effekte hin. Trotz analoger Testbedingungen zur Reflexstudie, und dem darüber hinaus größeren Umfang der Studie, konnten weder im Comet-Assay noch im Mikrokerntest die Ergebnisse der Reflexstudie bestätigt werden. Es konnten keine statistisch signifikanten Einflüsse auf die Induktion von DNA-Strangbrüchen über den Comet-Assay nachgewiesen werden, unabhängig von Befeldungsintensität und -dauer. Es war auch keine vermehrte Bildung von ROS-induzierten DNA-Addukten nach 72-stündiger Befeldung nachzuweisen. Gentoxische Effekte über die Bildung von Mikrokernen über die Spontanrate hinaus waren ebenfalls nicht nachweisbar. Die Spontanraten der Mikrokern von durchschnittlich 1,4% (0,1-5,65%, N=20, 15 und 72 h Befeldung) entsprechen zudem den in der Literatur vorgestellten Werten für *in vitro* Versuche an primären humanen Fibroblasten [87-

90], welche Werte von z. B. durchschnittlich 1,5% für NHDF [88] bzw. 3% (0-7%) [87] für primäre humane Fibroblasten aus Patientenbiopsien zeigen. Auch zeigt sich erwartungsgemäß eine höhere Mikrokernspontanrate bei den älteren (3,1%) im Vergleich zu den jüngeren Probanden (1,8%).

Der Test auf aneugene Effekte durch die Analyse numerischer Chromosomenaberrationen in gespreiteten Metaphasen ergab keinen Hinweis auf Aneugenität durch EMF-Befeldung. Im Zuge der Analysen zeigte sich allerdings, dass dieser Test für Fibroblastenkulturen ohne eine mFISH-Analytik für sehr kleine Änderungen nur bedingt ausreichend sensitiv ist. Bereits die Negativkontrolle zeigte eine sehr große Schwankungsbreite, so dass mögliche Effekte in dieser Streuung unentdeckt bleiben würden. Ebenso reagierten die Zellen äußerst sensibel auf die Behandlung mit Colcemid, welches als Positivkontrolle für Aneugenität eingesetzt wurde. Teilweise zeigte sich Probanden-abhängig kein positiver Effekt durch die Positivsubstanz. Eine Erhöhung der Konzentration führte jedoch zum Teilungsarrest der Zellen, so dass nicht ausreichend Metaphasen für die Analysen gespreitet werden konnten. Insgesamt hat sich im Verlaufe des Projektes herausgestellt, dass primäre humane Fibroblasten für zytogenetische Untersuchungen aufgrund ihrer geringen Teilungsaktivität und auch geringen Robustheit bei den Präparationen nur bedingt geeignet sind. Dies gilt vor allem für den Chromosomenaberrationstest, bei dem die Zellen mehrfach zentrifugiert werden mussten.

Der Test zum Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen wird nur noch selten durchgeführt und mit primären humanen Fibroblasten gibt es keine Publikationen. Ohnehin wird in der Regel der Mikrokerntest zum Nachweis für aneugene Effekte verwendet. Auch in der OECD-Guideline 473 ist der Nachweis von numerischen CAs nicht routinemäßig vorgesehen, da der Test nicht als ausreichend belastbar für den Nachweis zur Untersuchung aneugener Wirkungen angesehen wurde. Anwendung findet der Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen - auch in Fibroblasten - bei Fruchtwasseruntersuchungen, um mögliche erbliche Defekte auszuschließen. Hier kommt jedoch in der Regel die bereits erwähnte Sensitivierung des Tests durch den Einsatz der mFISH-Technik hinzu. Desweiteren treten bei einem positiven Befund auch in fast allen präparierten Metaphasen einer Probe die gleichen Aneuploidien auf. Auch in der Literatur finden sich hohe Aneuploidien in den Negativkontrollen, so zeigten z. B. Holmes et al., in einer humanen Lungenfibroblastenzelllinie Abweichungen von 5-15% in der

Chromosomenzahl der Metaphasen [91]. Für primäre humane dermale Fibroblasten finden sich in der Literatur keine Vergleichswerte.

Da mit dem Mikrokerntest mit CREST-Markierung eine besser geeignete Methode zum Nachweis von aneugenischen Effekten zur Verfügung stand, wurde in Absprache mit dem Bundesamt für Strahlenschutz dieser Test nur mit 10 Probanden durchgeführt und im zweiten Teil des Projektes auf den numerischen Chromosomenaberrationstest verzichtet und ersatzweise für die 10 fehlenden Analysen CREST-Mikrokerntests von vier Probanden mit fünffachem Stichprobenumfang analysiert.

Über die deutlich sensitivere Methode der CREST-Markierung von Mikrokernen waren allerdings ebenfalls keine aneugenischen Effekte nachweisbar. Bei dieser Methode werden über spezifische CREST-Antikörper die Zentromere der Chromosomen markiert. CREST-positive Mikrokernkerne zeigen demnach Mikrokernkerne, die ganze Chromosomen enthalten und CREST-negative Mikrokernkerne enthalten dementsprechend Chromosomenfragmente. Da die Mikrokernkerne in der Folge weiterer Zellteilungen verlustig gehen, verliert die Zelle im gleichen Zuge das betreffende im Mikrokern verpackte Chromosom bzw. Chromosomenfragmente. Dies ist eine äußerst sensitive Methode, um neben der genotoxischen Wirkung auch eine aneugene Wirkung nachzuweisen, bevor das betreffende Chromosom verloren gegangen ist. Zusätzlich zu den CREST-Mikrokerntests von 20 Probanden nach 15 und 72 h Befeldung mit 2.000 auszuwertenden Binukleaten wurden, wie bereits erwähnt, von vier Probanden CREST-Mikrokerntests nach 72 h Befeldung mit 10.000 auszuwertenden Binukleaten durchgeführt. Diese hohe Anzahl an auszuwertenden Zellen wurde aufgrund der von Schrader et al. [61] gezeigten Anaphase-Störungen gewählt. Da es sich dabei um seltene Ereignisse handelt, musste ein entsprechend hoher Stichprobenumfang festgelegt werden, um potentiell auftretende aneugene Effekte statistisch erfassen zu können. Es zeigte sich jedoch auch bei Erhöhung der auszuwertenden Stichprobenanzahl von 2.000 auf 10.000 binukleäre Zellen je SAR und Proband kein Hinweis auf aneugene Effekte durch RF-EMF Exposition.

In dieser Studie wurden außerdem die in der Reflexstudie fehlenden Analysen der Endpunkte Apoptose und Zellzyklus durchgeführt. Eine Induktion von Apoptosen durch die Befeldung, nachgewiesen über TUNEL-Markierung, ließ sich nicht feststellen. Die Zellzyklusanalyse der befeldeten Kulturen zeigte auch keinen

biologisch oder statistisch relevanten Einfluss auf die Zellzyklusverteilung der primären Fibroblasten durch eine Befeldung.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass in dieser *in vitro*-Studie kein Einfluss einer GSM1800-Exposition auf primäre humane dermale Fibroblasten nachgewiesen werden konnte. Gentoxische Schädigung von Fibroblastenzellen durch reine *in vitro* EMF-Befeldung konnten, nach den Daten dieser Studie, aus biologischer Sicht nicht festgestellt werden. Die hier vorgestellten Daten, sowie auch die daraus zu ziehenden Schlussfolgerungen sind im Einklang mit einer Vielzahl an anderen Studien an Fibroblastenzellen [15, 19-21, 24-28, 30-34, 37-40, 42-45, 48-54, 58, 63, 64, 66, 68, 69, 72, 74].

Im Hinblick auf die in diesem Bericht vorgestellte Literaturstudie sollten jedoch diejenigen Arbeiten nicht unbeachtet bleiben, die erst dann einen Einfluss von EMF-Feldern zeigten, wenn die Zellen mit einer zusätzlichen Noxe behandelt worden sind [16, 17, 36, 55, 57]. Da Menschen nur selten nur der Exposition mit nur einem einzigen Agens – sei es chemisch oder physikalisch – ausgesetzt sind, darf eine mögliche Wechselwirkung verschiedener Einflüsse nicht unbeachtet bleiben. Eine solche Wechselwirkung bleibt auch aus biologischer Sicht äußerst interessant und könnte daher Gegenstand weiterer Forschungen sein.

5 Anhang

5.1 Fragebogen zur Anamnese

Code-Nr.:

Fragebogen

**Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder des Mobilfunks auf
menschliche Fibroblasten (Gentoxizität)**

Angaben zu den Personen

1	Zu welcher Altersgruppe gehören Sie?
☐	18-19 Jahre
☐	50 -69 Jahre
☐	Weder noch

2	Geburtsdatum
/...../..... TT/MM/JJJJ	

3	Geschlecht
☐	Männlich
☐	Weiblich

4	In welchem Land sind Sie geboren?
☐	Deutschland
☐	In einem anderen Land, nämlich:.....

5	Seit wann leben Sie im Einzugsgebiet Großraum Hamburg?
☐	Seit meiner Geburt
☐	Seit dem Jahr:.....

6	Welcher beruflichen Tätigkeit gehen Sie nach?
☐	Ich bin Schüler
☐	Ich bin Student
☐	Ich arbeite als:.....
☐	Ich bin Rentner

Gesundheitszustand / Krankheiten

7	Wie würden Sie Ihren Gesundheitszustand im allgemeinen beschreiben?
☐	sehr gut
☐	gut
☐	zufriedenstellend
☐	weniger gut
☐	schlecht
☐	weiß nicht

8	Leiden Sie zurzeit an einer <i>akuten</i> Krankheit?		
	Bitte jede Zeile beantworten		
	ja	nein	weiß nicht
Bronchitis	☐	☐	☐
Akute Erkältungskrankheit	☐	☐	☐
Neu aufgetretene allergische Erkrankung (z.B. Kontakt- ekzem)	☐	☐	☐
Andere akute Erkrankungen, falls ja, welche:	☐	☐	☐

9	Wie häufig litten Sie in den letzten 6 Monaten unter akuten Infektionen jeglicher Art, bzw. wie oft hatten Sie Fieber? Falls Sie keine Infektion oder Fieber hatten, tragen Sie bitte eine 0 ein!	
Akute Infektionen insgesamt	 mal	☐ weiß nicht
Wie oft hatten Sie in den letzten 6 Monaten Fieber (mehr als 38,5 °C)	 mal	☐ weiß nicht

10 Sind Sie in den vergangenen 3 Monaten geimpft worden?	
☐ ja	
Falls ja, welche Impfung:.....	Datum:/...../.....
.....	Datum:/...../.....
☐ nein	

11 Leiden Sie zur Zeit an einer der folgenden Krankheiten? Bitte jede Zeile beantworten.			
	ja	nein	weiß nicht
Herz- und Kreislauferkrankungen (z.B. Herzinfarkt, Schlaganfall, Bluthochdruck)	☐	☐	☐
Zuckerkrankheit (Diabetes mellitus Typ I oder II)	☐	☐	☐
Lebererkrankung (Infektiös oder andere)	☐	☐	☐
Anfallsleiden (z.B. Epilepsie)	☐	☐	☐
Krebs	☐	☐	☐
Falls ja, welcher Art?			
Blutarmut (durch Eisenmangel oder andere)	☐	☐	☐
Asthma	☐	☐	☐
Chronische Bronchitis	☐	☐	☐
Allergische Erkrankung, chronischer Art: (zutreffendes bitte unterstreichen oder angeben!): Heuschnupfen, Lebensmittelallergie, Neurodermitis, andere:	☐	☐	☐
HIV-positiv	☐	☐	☐
Andere chronische Erkrankung, falls ja, welche:	☐	☐	☐

12 Ware Sie früher schon einmal schwer erkrankt? Bitte jede Zeile beantworten.			
	ja	nein	weiß nicht
Krebs	☐	☐	☐
Schwere <i>allergische</i> Reaktion	☐	☐	☐
Schwere <i>infektiöse</i> Erkrankung (wie Keuchhusten, Hepatitis C, Tuberkulose)	☐	☐	☐
Salmonellen-Infektionen	☐	☐	☐
Andere ansteckende Krankheiten.	☐	☐	☐
Falls ja, welche:			

Medikamente

13 Notieren Sie bitte, welche Medikamente Sie regelmäßig, d.h. täglich oder wöchentlich einnehmen.			
Name/Bezeichnung	Dosierung/Stärke, soweit bekannt	Anzahl	
		täglich	pro Woche
1.		mal	mal
2.		mal	mal
3.		mal	mal
4.		mal	mal
5.		mal	mal

Röntgenaufnahme/Computertomographien

14 Notieren Sie bitte alle Röntgenuntersuchungen einschließlich Computertomographien (Schichtaufnahmen), die Sie in den letzten 10 Jahren hatten. Geben Sie für Aufnahmen im letzten Jahr bitte auch den Monat an. Jugendliche bitten wir um die Angabe aller Aufnahmen seit Geburt.
(außer zahn- und kieferorthopädischen Behandlungen)

		(Monat)/Jahr
1.		/.....
2.		/.....
3.		/.....
4.		/.....
5.		/.....

Fehlbildungen / Erbkrankheiten*

* gemeint sind vor der Geburt entstandene oder angelegte Fehlgestaltung eines Organs, z. B. Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte, Herzfehler oder auch vererbliche Stoffwechselerkrankungen wie Phenylketonurie oder Bluterkrankheit. Nicht gemeint sind genetisch bedingte Veranlagungen für Krankheiten wie z. B. Bluthochdruck.

15 Haben Sie eine Fehlbildung oder eine Erbkrankheit?
(z. B. angeborene Stoffwechselerkrankungen)

- ☐ ja
Falls ja, geben Sie bitte an welche?
.....
- ☐ nein

16	Sind in Ihrer Familie (Eltern, Geschwister und deren Kinder) Fehlbildungen oder Erbkrankheiten bekannt?
☐	ja Falls ja, welche? mütterlicherseits: väterlicherseits:
☐	nein
☐	Weiß nicht

Freizeit

17	Treiben Sie Sport?
☐	ja Falls ja, welche Sportarten sind das? Wie viele Stunden pro Woche betreiben Sie durchschnittlich Sport?Stunden
☐	nein
18	Würden Sie sich selbst als Hochleistungssportler bezeichnen?
	ja nein weiß nicht
	☐ ☐ ☐

19	Nutzen Sie Solarien?
☐	ja Falls ja, wie häufig? Zuletzt vor
☐	nein
20	Nehmen Sie häufig ein Sonnenbad?
☐	ja Falls ja, wie häufig? Zuletzt vor
☐	nein

Ernährung

21	Bitte nennen Sie uns Ihre Körpergröße und Ihr Gewicht:		
Größe: cm			
Gewicht: kg			
22	Ernähren Sie sich zurzeit nach einer folgenden Ernährungsformen? (falls ja, weiter mit Frage 23, sonst mit 24)		
Bitte jede Zeile beantworten		ja	nein
			weiß nicht
Vegetarisch: vegan, d. h. ohne Fleisch, Wurst, Fisch, Eier- und Milchprodukte		☐	☐
Vegetarisch: lakto-vegetarisch, d. h. mit Milchprodukten		☐	☐
Vegetarisch: ovo-lakto-vegetarisch, d. h. mit Eier- und Milchprodukten		☐	☐

23	In welchem Alter haben Sie mit der in Frage 22 angegebenen Ernährungsform begonnen?
☐	Im Alter von Jahren

☐	ja
	Falls ja, wie häufig?
	Zuletzt vor
☐	nein

Rauchen, Alkohol

24	Rauchen Sie?
☐	Ja
	Falls ja, wie viel rauchen Sie durchschnittlich pro Tag?
	Zigaretten
	Zigarren
	Pfeife

25	Was und wie viele alkoholische Getränke trinken Sie zurzeit <u>pro Woche</u>? Bitte bei allen Arten von Getränken, die Sie zu sich nehmen, die jeweils am nächsten kommende Kategorie ankreuzen.				
☐	Bier	☐ bis 2 l	☐ bis 2-6 l	☐ 6 - 10 l	☐ >10 l
☐	Wein/Sekt	☐ bis 0,75 l	☐ 0,75 - 2,5 l	☐ 2,5 - 4 l	☐ > 4 l
☐	Cocktails/ Alcopops	☐ 1-2 Stück	☐ 3-5 Stück	☐ 6-9 Stück	☐ >10 St.
☐	Hochprozentiges/ Schnaps	☐ 2-4 cl	☐ 6 -10 cl	☐ 12 - 18 cl	☐ >20 cl

Mobilfunk - Exposition

26	Benutzen Sie ein Handy?
☐	Ja falls ja: seit wann: / (Monat/Jahr)
☐	nein
☐	weiß nicht

27	Wie viel telefonieren Sie mit dem Handy (ohne SMS oder Spiele)? Bitte nur eine, d.h. die am nächsten kommende Möglichkeit ankreuzen.
☐	Täglich: pro Tag 1 Std. und länger
☐	Täglich ca. 15 min bis 1 Std.
☐	Täglich: unter 15 Minuten
☐	Mehrmals pro Woche
☐	Seltener
☐	Weiß nicht

28	Wohnen Sie in unmittelbarer Nähe eines Mobilfunkmastes?
☐	Ja falls ja: in welcher Entfernung? Ca.m
☐	nein
☐	weiß nicht

5.2 Einwilligungserklärung

Einwilligungserklärung

Ich, _____
Name, Vorname, Geburtsdatum

erkläre hiermit, über den Versuchsablauf und die möglichen Komplikationen (allergische Reaktion auf das Lokalanästhetikum, Wundheilungsstörung, Infektion, Narbenbildung) der Studie „Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder des Mobilfunks auf menschliche Fibroblasten (Gentoxizität)“ aufgeklärt worden zu sein. Ich habe die schriftliche Aufklärung gelesen und verstanden.

Die Einwilligung kann jederzeit ohne Angabe von Gründen und ohne persönliche Nachteile widerrufen werden.

Buxtehude, den _____

Unterschrift Studienteilnehmer

Name des Arztes / Studienleiters

Buxtehude, den _____

Unterschrift Arzt/Studienleiter

6 Literaturverzeichnis

Onlinequellen

- <http://www.who.int/peh-emf/about/WhatisEMF/en/>
- Sechszundzwanzigste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (Verordnung über elektromagnetische Felder – 26. BImSchV) vom 16.12.96 (BGBl. I S. 1966 ff.)
http://www.bmu.de/strahlenschutz/rechtsvorschriften_technische_regeln/doc/4536.php
- http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scher/docs/scher_o_113.pdf
- http://www.meduniwien.ac.at/homepage/news-und-topstories/?tx_ttnews%5Btt_news%5D=231&cHash=66bfe7e901
- http://www.emf-portal.de/PDF/11910_K.pdf

Primärliteratur

1. Cohen, S.M. and L.B. Ellwein, *Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis*. Cancer Res, 1991. **51**(24): p. 6493-505.
2. Rodenhiser, D. and M. Mann, *Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications*. CMAJ, 2006. **174**(3): p. 341-8.
3. Tennant, R.W. and E. Zeiger, *Genetic toxicology: current status of methods of carcinogen identification*. Environ Health Perspect, 1993. **100**: p. 307-15.
4. Vijayalaxmi and G. Obe, *Controversial cytogenetic observations in mammalian somatic cells exposed to extremely low frequency electromagnetic radiation: a review and future research recommendations*. Bioelectromagnetics, 2005. **26**(5): p. 412-30.
5. Fenech, M., *The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations*. Mutat Res, 1993. **285**(1): p. 35-44.
6. Fenech, M., *The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method*. Mutat Res, 1997. **392**(1-2): p. 11-8.
7. Singh, N.P. and R.E. Stephens, *Microgel electrophoresis: sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching*. Mutat Res, 1997. **383**(2): p. 167-75.
8. Wojewodzka, M., I. Buraczewska, and M. Kruszewski, *A modified neutral comet assay: elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody*. Mutat Res, 2002. **518**(1): p. 9-20.
9. Diem, E., et al., *Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro*. Mutat Res, 2005. **583**(2): p. 178-83.
10. Schwarz, C., et al., *Radiofrequency electromagnetic fields (UMTS, 1,950 MHz) induce genotoxic effects in vitro in human fibroblasts but not in lymphocytes*. Int Arch Occup Environ Health, 2008. **81**(6): p. 755-67.
11. Baan, R.A., *Letter of concern*. Mutat Res, 2010. **695**(1-2): p. 1.

12. Drexler, H. and K.H. Schaller, *Expression of concern*. Int Arch Occup Environ Health, 2009. **82**(2): p. 143-4.
13. Lerchl, A., *Comments on "Radiofrequency electromagnetic fields (UMTS, 1,950 MHz) induce genotoxic effects in vitro in human fibroblasts but not in lymphocytes" by Schwarz et al. (Int Arch Occup Environ Health 2008: doi: 10.1007/s00420-008-0305-5)*. Int Arch Occup Environ Health, 2009. **82**(2): p. 275-8.
14. Lerchl, A. and A.F. Wilhelm, *Critical comments on DNA breakage by mobile-phone electromagnetic fields [Diem et al., Mutat. Res. 583 (2005) 178-183]*. Mutat Res, 2010. **697**(1-2): p. 60-5.
15. Meltz, M.L., K.A. Walker, and D.N. Erwin, *Radiofrequency (microwave) radiation exposure of mammalian cells during UV-induced DNA repair synthesis*. Radiat Res, 1987. **110**(2): p. 255-66.
16. Balcer-Kubiczek, E.K. and G.H. Harrison, *Induction of neoplastic transformation in C3H/10T1/2 cells by 2.45-GHz microwaves and phorbol ester*. Radiat Res, 1989. **117**(3): p. 531-7.
17. Balcer-Kubiczek, E.K. and G.H. Harrison, *Neoplastic transformation of C3H/10T1/2 cells following exposure to 120-Hz modulated 2.45-GHz microwaves and phorbol ester tumor promoter*. Radiat Res, 1991. **126**(1): p. 65-72.
18. Litovitz, T.A., et al., *The role of coherence time in the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity*. Bioelectromagnetics, 1993. **14**(5): p. 395-403.
19. Cain, C.D., D.L. Thomas, and W.R. Adey, *Focus formation of C3H/10T1/2 cells and exposure to a 836.55 MHz modulated radiofrequency field*. Bioelectromagnetics, 1997. **18**(3): p. 237-43.
20. Malyapa, R.S., et al., *Measurement of DNA damage after exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation*. Radiat Res, 1997. **148**(6): p. 608-17.
21. Malyapa, R.S., et al., *Measurement of DNA damage after exposure to electromagnetic radiation in the cellular phone communication frequency band (835.62 and 847.74 MHz)*. Radiat Res, 1997. **148**(6): p. 618-27.
22. Penafiel, L.M., et al., *Role of modulation on the effect of microwaves on ornithine decarboxylase activity in L929 cells*. Bioelectromagnetics, 1997. **18**(2): p. 132-41.
23. Goswami, P.C., et al., *Proto-oncogene mRNA levels and activities of multiple transcription factors in C3H 10T 1/2 murine embryonic fibroblasts exposed to 835.62 and 847.74 MHz cellular phone communication frequency radiation*. Radiat Res, 1999. **151**(3): p. 300-9.
24. Li, J.R., et al., *TP53 tumor suppressor protein in normal human fibroblasts does not respond to 837 MHz microwave exposure*. Radiat Res, 1999. **151**(6): p. 710-6.
25. Higashikubo, R., et al., *Radiofrequency electromagnetic fields do not alter the cell cycle progression of C3H 10T and U87MG cells*. Radiat Res, 2001. **156**(6): p. 786-95.
26. Li, L., et al., *Measurement of DNA damage in mammalian cells exposed in vitro to radiofrequency fields at SARs of 3-5 W/kg*. Radiat Res, 2001. **156**(3): p. 328-32.
27. Roti Roti, J.L., et al., *Neoplastic transformation in C3H 10T(1/2) cells after exposure to 835.62 MHz FDMA and 847.74 MHz CDMA radiations*. Radiat Res, 2001. **155**(1 Pt 2): p. 239-247.
28. Bisht, K.S., et al., *The effect of 835.62 MHz FDMA or 847.74 MHz CDMA modulated radiofrequency radiation on the induction of micronuclei in C3H 10T(1/2) cells*. Radiat Res, 2002. **157**(5): p. 506-15.

29. Pacini, S., et al., *Exposure to global system for mobile communication (GSM) cellular phone radiofrequency alters gene expression, proliferation, and morphology of human skin fibroblasts*. *Oncol Res*, 2002. **13**(1): p. 19-24.
30. Desta, A.B., R.D. Owen, and L.W. Cress, *Non-thermal exposure to radiofrequency energy from digital wireless phones does not affect ornithine decarboxylase activity in L929 cells*. *Radiat Res*, 2003. **160**(4): p. 488-91.
31. Koyama, S., et al., *Effects of high frequency electromagnetic fields on micronucleus formation in CHO-K1 cells*. *Mutat Res*, 2003. **541**(1-2): p. 81-9.
32. Lagroye, I., et al., *Measurements of alkali-labile DNA damage and protein-DNA crosslinks after 2450 MHz microwave and low-dose gamma irradiation in vitro*. *Radiat Res*, 2004. **161**(2): p. 201-14.
33. Komatsubara, Y., et al., *Effect of high-frequency electromagnetic fields with a wide range of SARs on chromosomal aberrations in murine m5S cells*. *Mutat Res*, 2005. **587**(1-2): p. 114-9.
34. Laszlo, A., et al., *The heat-shock factor is not activated in mammalian cells exposed to cellular phone frequency microwaves*. *Radiat Res*, 2005. **164**(2): p. 163-72.
35. Mahrour, N., et al., *In vitro increase of the fluid-phase endocytosis induced by pulsed radiofrequency electromagnetic fields: importance of the electric field component*. *Biochim Biophys Acta*, 2005. **1668**(1): p. 126-37.
36. Wang, J., et al., *Effects of 2450 MHz electromagnetic fields with a wide range of SARs on methylcholanthrene-induced transformation in C3H10T1/2 cells*. *J Radiat Res*, 2005. **46**(3): p. 351-61.
37. Whitehead, T.D., et al., *Expression of the proto-oncogene Fos after exposure to radiofrequency radiation relevant to wireless communications*. *Radiat Res*, 2005. **164**(4 Pt 1): p. 420-30.
38. Hirose, H., et al., *Phosphorylation and gene expression of p53 are not affected in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW or W-CDMA modulated radiation allocated to mobile radio base stations*. *Bioelectromagnetics*, 2006. **27**(6): p. 494-504.
39. Hoyto, A., et al., *Modest increase in temperature affects ODC activity in L929 cells: Low-level radiofrequency radiation does not*. *Radiat Environ Biophys*, 2006. **45**(3): p. 231-5.
40. Masuda, H., et al., *Effect of GSM-900 and -1800 signals on the skin of hairless rats. I: 2-hour acute exposures*. *Int J Radiat Biol*, 2006. **82**(9): p. 669-74.
41. Pavicic, I., I. Trosic, and A. Sarolic, *Comparison of 864 MHz and 935 MHz microwave radiation effects on cell culture*. *Arh Hig Rada Toksikol*, 2006. **57**(2): p. 149-54.
42. Sakuma, N., et al., *DNA strand breaks are not induced in human cells exposed to 2.1425 GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields allocated to mobile radio base stations*. *Bioelectromagnetics*, 2006. **27**(1): p. 51-7.
43. Sanchez, S., et al., *Human skin cell stress response to GSM-900 mobile phone signals. In vitro study on isolated primary cells and reconstructed epidermis*. *FEBS J*, 2006. **273**(24): p. 5491-507.
44. Whitehead, T.D., et al., *Gene expression does not change significantly in C3H 10T(1/2) cells after exposure to 847.74 CDMA or 835.62 FDMA radiofrequency radiation*. *Radiat Res*, 2006. **165**(6): p. 626-35.
45. Whitehead, T.D., et al., *The number of genes changing expression after chronic exposure to code division multiple access or frequency DMA radiofrequency radiation does not exceed the false-positive rate*. *Proteomics*, 2006. **6**(17): p. 4739-44.

46. Xie, L., et al., *[GSM 1,800 MHz radiofrequency electromagnetic fields induced clustering of membrane surface receptors and interference by noise magnetic fields]*. Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi, 2006. **24**(8): p. 461-4.
47. Zhang, D.Y., et al., *[Effects of GSM 1800 MHz radiofrequency electromagnetic fields on DNA damage in Chinese hamster lung cells]*. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2006. **40**(3): p. 149-52.
48. Hirose, H., et al., *Mobile phone base station-emitted radiation does not induce phosphorylation of Hsp27*. Bioelectromagnetics, 2007. **28**(2): p. 99-108.
49. Hoyto, A., J. Juutilainen, and J. Naarala, *Ornithine decarboxylase activity is affected in primary astrocytes but not in secondary cell lines exposed to 872 MHz RF radiation*. Int J Radiat Biol, 2007. **83**(6): p. 367-74.
50. Hoyto, A., J. Juutilainen, and J. Naarala, *Ornithine decarboxylase activity of L929 cells after exposure to continuous wave or 50 Hz modulated radiofrequency radiation-a replication study*. Bioelectromagnetics, 2007. **28**(7): p. 501-8.
51. Sanchez, S., et al., *In vitro study of the stress response of human skin cells to GSM-1800 mobile phone signals compared to UVB radiation and heat shock*. Radiat Res, 2007. **167**(5): p. 572-80.
52. Speit, G., P. Schutz, and H. Hoffmann, *Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible*. Mutat Res, 2007. **626**(1-2): p. 42-7.
53. Hirose, H., et al., *Mobile phone base station radiation does not affect neoplastic transformation in BALB/3T3 cells*. Bioelectromagnetics, 2008. **29**(1): p. 55-64.
54. Hoyto, A., et al., *Radiofrequency radiation does not significantly affect ornithine decarboxylase activity, proliferation, or caspase-3 activity of fibroblasts in different physiological conditions*. Int J Radiat Biol, 2008. **84**(9): p. 727-33.
55. Hoyto, A., et al., *Proliferation, oxidative stress and cell death in cells exposed to 872 MHz radiofrequency radiation and oxidants*. Radiat Res, 2008. **170**(2): p. 235-43.
56. Karinen, A., et al., *Mobile phone radiation might alter protein expression in human skin*. BMC Genomics, 2008. **9**: p. 77.
57. Kim, J.Y., et al., *In vitro assessment of clastogenicity of mobile-phone radiation (835 MHz) using the alkaline comet assay and chromosomal aberration test*. Environ Toxicol, 2008. **23**(3): p. 319-27.
58. Lee, J.J., et al., *Acute radio frequency irradiation does not affect cell cycle, cellular migration, and invasion*. Bioelectromagnetics, 2008. **29**(8): p. 615-25.
59. Pavicic, I. and I. Trosic, *In vitro testing of cellular response to ultra high frequency electromagnetic field radiation*. Toxicol In Vitro, 2008. **22**(5): p. 1344-8.
60. Pavicic, I. and I. Trosic, *Impact of 864 MHz or 935 MHz radiofrequency microwave radiation on the basic growth parameters of V79 cell line*. Acta Biol Hung, 2008. **59**(1): p. 67-76.
61. Schrader, T., et al., *Spindle disturbances in human-hamster hybrid (AL) cells induced by mobile communication frequency range signals*. Bioelectromagnetics, 2008. **29**(8): p. 626-39.
62. Belyaev, I., E. Markova, and L. Malmgren, *Microwaves from Mobile Phones Inhibit 53BP1 Focus Formation in Human Stem Cells Stronger than in Differentiated Cells: Possible Mechanistic Link to Cancer Risk*. Environ Health Perspect, 2009.
63. Billaudel, B., et al., *Effects of exposure to DAMPS and GSM signals on ornithine decarboxylase (ODC) activity: I. L-929 mouse fibroblasts*. Int J Radiat Biol, 2009. **85**(6): p. 510-8.

64. Sannino, A., et al., *Human fibroblasts and 900 MHz radiofrequency radiation: evaluation of DNA damage after exposure and co-exposure to 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5h)-furanone (MX)*. Radiat Res, 2009. **171**(6): p. 743-51.
65. Trosic, I. and I. Pavicic, *Disturbance of cell proliferation in response to mobile phone frequency radiation*. Arh Hig Rada Toksikol, 2009. **60**(1): p. 109-15.
66. Bourthoumieu, S., et al., *Cytogenetic studies in human cells exposed in vitro to GSM-900 MHz radiofrequency radiation using R-banded karyotyping*. Radiat Res, 2010. **174**(6): p. 712-8.
67. Gerner, C., et al., *Increased protein synthesis by cells exposed to a 1,800-MHz radio-frequency mobile phone electromagnetic field, detected by proteome profiling*. Int Arch Occup Environ Health, 2010. **83**(6): p. 691-702.
68. Sekijima, M., et al., *2-GHz band CW and W-CDMA modulated radiofrequency fields have no significant effect on cell proliferation and gene expression profile in human cells*. J Radiat Res, 2010. **51**(3): p. 277-84.
69. Bourthoumieu, S., et al., *Aneuploidy studies in human cells exposed in vitro to GSM-900 MHz radiofrequency radiation using FISH*. Int J Radiat Biol, 2011. **87**(4): p. 400-8.
70. Schrader, T., et al., *Spindle disturbances in human-hamster hybrid (A(L)) cells induced by the electrical component of the mobile communication frequency range signal*. Bioelectromagnetics, 2011. **32**(4): p. 291-301.
71. Sunkari, V.G., et al., *Effects of a low-intensity electromagnetic field on fibroblast migration and proliferation*. Electromagn Biol Med, 2011. **30**(2): p. 80-5.
72. Bourthoumieu, S., et al., *Study of p53 expression and post-transcriptional modifications after GSM-900 radiofrequency exposure of human amniotic cells*. Bioelectromagnetics, 2012.
73. Yang, L., et al., *Cellular neoplastic transformation induced by 916 MHz microwave radiation*. Cell Mol Neurobiol, 2012. **32**(6): p. 1039-46.
74. Hintzsche, H., et al., *900 MHz radiation does not induce micronucleus formation in different cell types*. Mutagenesis, 2012. **27**(4): p. 477-83.
75. Yang, X.S., et al., *Exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields elicits an HSP-related stress response in rat hippocampus*. Brain Res Bull, 2012. **88**(4): p. 371-8.
76. Shantz, L.M. and V.A. Levin, *Regulation of ornithine decarboxylase during oncogenic transformation: mechanisms and therapeutic potential*. Amino acids, 2007. **33**(2): p. 213-23.
77. Ntzouni, M.P., et al., *Short-term memory in mice is affected by mobile phone radiation*. Pathophysiology, 2011. **18**(3): p. 193-9.
78. Tasset, I., et al., *Neuroprotective effects of extremely low-frequency electromagnetic fields on a Huntington's disease rat model: effects on neurotrophic factors and neuronal density*. Neuroscience, 2012. **209**: p. 54-63.
79. Damvik, M. and O. Johansson, *Health risk assessment of electromagnetic fields: a conflict between the precautionary principle and environmental medicine methodology*. Rev Environ Health, 2010. **25**(4): p. 325-33.
80. Collins, A.R., et al., *Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker?* Environ Health Perspect, 1996. **104 Suppl 3**: p. 465-9.
81. Tice, R.R., et al., *Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. Environ Mol Mutagen, 2000. **35**(3): p. 206-21.

82. Hartmann, A., et al., *Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop*. Mutagenesis, 2003. **18**(1): p. 45-51.
83. Vijayalaxmi, J.P. McNamee, and M.R. Scarfi, *Comments on: "DNA strand breaks" by Diem et al. [Mutat. Res. 583 (2005) 178-183] and Ivancsits et al. [Mutat. Res. 583 (2005) 184-188]*. Mutat Res, 2006. **603**(1): p. 104-6; author reply 107-9.
84. Ivancsits, S., et al., *Cell type-specific genotoxic effects of intermittent extremely low-frequency electromagnetic fields*. Mutat Res, 2005. **583**(2): p. 184-8.
85. Scarfi, M.R., et al., *Evaluation of genotoxic effects in human fibroblasts after intermittent exposure to 50 Hz electromagnetic fields: a confirmatory study*. Radiat Res, 2005. **164**(3): p. 270-6.
86. Focke, F., et al., *DNA fragmentation in human fibroblasts under extremely low frequency electromagnetic field exposure*. Mutat Res, 2010. **683**(1-2): p. 74-83.
87. O'Driscoll, M.C., et al., *Radiation-induced micronuclei in human fibroblasts in relation to clonogenic radiosensitivity*. Br J Cancer, 1998. **78**(12): p. 1559-63.
88. Xu, B., et al., *Replication stress induces micronuclei comprising of aggregated DNA double-strand breaks*. PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18618.
89. Müller, M., *Vergleich von in-vitro-Ergebnissen im Mikrokerntest und den klinischen Beobachtungen nach Bestrahlung*, in *Medizinische Fakultät*. 2004, Bayerische Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg: Würzburg. p. 64.
90. Rudd, N.L., et al., *Micronucleus assay in human fibroblasts: a measure of spontaneous chromosomal instability and mutagen hypersensitivity*. Environ Mol Mutagen, 1988. **12**(1): p. 3-13.
91. Holmes, A.L., et al., *Chronic exposure to zinc chromate induces centrosome amplification and spindle assembly checkpoint bypass in human lung fibroblasts*. Chem Res Toxicol, 2010. **23**(2): p. 386-95.

7 Statistischer Abschlussbericht (IMBEI)

Statistischer Abschlussbericht über die Auswertung der Studie

Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder des Mobilfunks auf menschliche Fibroblasten (Gentoxizität)

erstellt von

Dr. Jochem König, Veronika Weyer

Stand: 24.1.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Die Studie	154
1.1	Hintergrund der Studie und Studiendesign	154
1.2	Studienpopulation	154
2	Statistische Methoden	156
2.1	Statistischer Analyseplan	156
2.2	Analysestrategie	156
2.3	Umgang mit multiplen Hypothesentests	156
2.4	Spezifikation und Begründung der Analysemethoden	157
2.5	Tests auf einen Dosistrend	158
2.6	Subgruppenanalyse	159
3	Datensichtung	160
3.1	Fehlende Werte, Ausreißer und auffällige Werte	161
3.2	Rohdaten	161
3.2.1	Comet-Assay	162
3.2.2	Comet-Assay nach 72h Bestrahlung mit und ohne FPG	168
3.2.3	Mikrokerntest	174
3.2.4	Chromosomenaberration	180
3.2.5	TUNEL-Apoptose-Test	182
3.2.6	Zellzyklus	183
3.3	Tabellarische Darstellung der Rohdaten	185
4	Dosistrendanalyse	193
4.1	Hauptauswertung	193
4.2	Sensitivitätsanalysen	200
4.3	Sensitivitätsanalyse für den Comet-Assay	201
4.4	Differenzen zu Sham	202
4.4.1	Comet-Assay	202
4.4.2	Comet-Assay nach 72h Bestrahlung mit und ohne FPG	206
4.4.3	Mikrokerntest	209
4.4.4	Chromosomenaberration	213
4.4.5	TUNEL-Apoptose-Test	215
4.4.6	Zellzyklus	216
5	Subgruppenanalyse	223
5.1	Mittelwerte und Standardabweichungen für jüngere und ältere Probanden	223
5.2	Dosistrendanalysen für jüngere und ältere Probanden	230
5.3	Differenzen zu Sham für jüngere und ältere Probanden	235
Anhang: Statistischer Analyseplan Fibroblasten-Studie		245
1	Zielsetzung des statistischen Analyseplans	246
2.1	Umgang mit multiplen Hypothesentests	246
2.2	Umgang mit Ausreißern, unplausiblen Werten und fehlenden Werten	247
3	Spezifikation und Begründung der Analysemethoden	247
3.1	Zielvariablen	247
3.2	Tests auf einen Dosistrend	248

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Personenbezogene Daten der älteren und der jüngeren Probanden	155
Tabelle 2: Zielvariablen des Comet-Assays (Rohdaten).....	185
Tabelle 3: Zielvariablen des Mikrokerntests (Rohdaten).....	189
Tabelle 4: Zielvariablen der Chromosomenaberration (Rohdaten).....	190
Tabelle 5: Zielvariablen TUNEL Apoptose Tests (Rohdaten).....	191
Tabelle 6: Zielvariablen des Zellzyklus Tests (Rohdaten).....	192
Tabelle 7: Ergebnisse des Permutationstests (zur primären Analyse) für die Zielvariablen für alle Probanden.	193
Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Comet-Assays und alle Expositionsbedingungen	194
Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Mikrokerntests und alle Expositionsbedingungen	195
Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen der Chromosomenaberration und alle Expositionsbedingungen..	196
Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichung für TUNEL positive Zellen und alle Expositionsbedingungen.....	196
Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Zellzyklustests und alle Expositionsbedingungen	197
Tabelle 13: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Comet-Assays.....	197
Tabelle 14: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Mikrokerntests.....	198
Tabelle 15: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen der Chromosomenaberration.	198
Tabelle 16: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für TUNEL positive Zellen. N=20 Probanden	199
Tabelle 17: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Zellzyklus.	199
Tabelle 18: Ergebnisse des Page-Trend-Tests (Sensitivitätsanalyse) für die Zielvariablen für alle Probanden (n=20, jedoch beim erweiterten Mikrokerntest n=4 und bei der Chromosomenaberration n=10).....	200
Tabelle 19: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielgröße Olive Tail Moment. Ohne Proband 7. N=19 Probanden	201
Tabelle 20: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Comet-Assays.....	218
Tabelle 21: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Mikrokerntests.....	220
Tabelle 22: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen der Chromosomenaberration	221
Tabelle 23: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für TUNEL positive Zellen	222
Tabelle 24: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Zellzyklus	222
Tabelle 25: Jüngere Probanden (n=10):Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Comet-Assays und alle Expositionsbedingungen	223
Tabelle 26: Jüngere Probanden (n=10):Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Mikrokerntests und alle Expositionsbedingungen	224

Tabelle 27: Jüngere Probanden (n=7):Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen der Chromosomeneaberration und alle Expositonsbedingungen.....	225
Tabelle 28: Jüngere Probanden (n=10): Mittelwerte und Standardabweichung für TUNEL positive Zellen und alle Expositonsbedingungen..	225
Tabelle 29: Jüngere Probanden (n=10): Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Zellzyklustests und alle Expositonsbedingungen	226
Tabelle 30: Ältere Probanden (n=10): Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Comet-Assays und alle Expositonsbedingungen	227
Tabelle 31: Ältere Probanden (n=10): Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Mikrokerntests und alle Expositonsbedingungen	228
Tabelle 32: Ältere Probanden (n=3): Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen der Chromosomeneaberration und alle Expositonsbedingungen.....	228
Tabelle 33: Ältere Probanden (n=10): Mittelwerte und Standardabweichung für TUNEL positive Zellen und alle Expositonsbedingungen..	229
Tabelle 34: Ältere Probanden (n=10): Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Zellzyklustests und alle Expositonsbedingungen	229
Tabelle 35: Jüngere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Comet-Assays.....	230
Tabelle 36: Jüngere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Mikrokerntests.....	231
Tabelle 37: Jüngere Probanden (n=7): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen der Chromosomenaberration...	231
Tabelle 38: Jüngere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für TUNEL positive Zellen.....	231
Tabelle 39: Jüngere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Zellzyklus.....	232
Tabelle 40: Ältere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Comet-Assays.....	232
Tabelle 41: Ältere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Mikrokerntests.....	233
Tabelle 42: Ältere Probanden (n=3): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen der Chromosomenaberration...	234
Tabelle 43: Ältere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für TUNEL positive Zellen.....	234
Tabelle 44: Ältere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Zellzyklus.....	234
Tabelle 45: Jüngere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Comet-Assays.....	235
Tabelle 46: Jüngere Probanden (n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Mikrokerntests.....	237
Tabelle 47: Jüngere Probanden(n=7): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen der Chromosomenaberration	237
Tabelle 48: Jüngere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition nach Expositionsgruppe (EG) für TUNEL positive Zellen	238
Tabelle 49: Jüngere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Zellzyklus	239
Tabelle 50: Ältere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Comet-Assays.....	240
Tabelle 51: Ältere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Mikrokerntests.....	241

Tabelle 52: Ältere Probanden(n=3): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen der Chromosomenaberration	243
Tabelle 53: Ältere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für TUNEL positive Zellen	243
Tabelle 54: Ältere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Zellzyklus	244

Abbildungen

Abbildung 1: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße Olive-Tail-Moment,.....	162
Abbildung 2: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße Olive-Tail-Moment,.....	162
Abbildung 3: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße Olive-Tail-Moment,.....	163
Abbildung 4: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße Median Head DNA (%),.....	163
Abbildung 5: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße Median Head DNA (%),.....	164
Abbildung 6: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße Median Head DNA (%),.....	164
Abbildung 7: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment,	165
Abbildung 8: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment,	165
Abbildung 9: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment,	166
Abbildung 10: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße Log (100-Median Head DNA(%)),	166
Abbildung 11: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße Log (100-Median Head DNA(%)),.....	167
Abbildung 12: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße Log (100-Median Head DNA(%)),.....	167
Abbildung 13: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße Olive-Tail-Moment,	168
Abbildung 14: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße Olive-Tail-Moment,.....	168
Abbildung 15: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit und ohne FPG-Inkubation, Zielgröße Olive-Tail-Moment,	169
Abbildung 16: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße Median Head DNA (%),	169
Abbildung 17: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße Median Head DNA (%),	170
Abbildung 18: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit und ohne FPG-Inkubation, Zielgröße Median Head DNA (%),	170
Abbildung 19: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment,.....	171
Abbildung 20: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment,	171
Abbildung 21: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit und ohne FPG-Inkubation, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment,.....	172
Abbildung 22: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße Log (100-Median Head DNA(%)),.....	172
Abbildung 23: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße Log (100-Median Head DNA(%)),	173
Abbildung 24: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit und ohne FPG-Inkubation, Zielgröße Log (100-Median Head DNA(%)),	173

Abbildung 25: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen,	174
Abbildung 26: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen,	174
Abbildung 27: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen.....	175
Abbildung 28: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	175
Abbildung 29: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen,	176
Abbildung 30: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CREST-positive Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen ...	176
Abbildung 31: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße CBPI Proliferationsindex,	177
Abbildung 32: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße CBPI Proliferationsindex,	177
Abbildung 33: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CBPI Proliferationsindex,	178
Abbildung 34: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CBPI Proliferationsindex, , PK nicht in rot	178
Abbildung 35: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CBPI Proliferationsindex,	179
Abbildung 36: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CBPI Proliferationsindex,	179
Abbildung 37: Darstellung der Rohdaten für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße Zellen mit Chromosomenverlusten,	180
Abbildung 38: Darstellung der Rohdaten für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße Zellen mit zusätzlichen Chromosomen,	180
Abbildung 39: Darstellung der Rohdaten für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße aneuploide Zellen insgesamt,	181
Abbildung 40: Darstellung der Rohdaten für den Test auf apoptotische Ereignisse, Zielgröße TUNEL-positive Zellen in 1.000 Zellen,	182
Abbildung 41: Darstellung der Rohdaten für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße G1-Phase-Zellen,	183
Abbildung 42: Darstellung der Rohdaten für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße S-Phase-Zellen,	183
Abbildung 43: Darstellung der Rohdaten für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße G2-Phase-Zellen,	184
Abbildung 44: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment,.....	202
Abbildung 45: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment,.....	203
Abbildung 46: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment,.....	203
Abbildung 47: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße Log(100-Median-Head DNA(%)),	204

Abbildung 48: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße Log(100-Median-Head DNA(%)),	204
Abbildung 49: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße Log(100-Median-Head DNA(%)),	205
Abbildung 50: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment,.....	206
Abbildung 51: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung und FPG-Inkubation, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment,.....	206
Abbildung 52: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit und ohne FPG-Inkubation, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment,.....	207
Abbildung 53: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße Log(100-Median-Head DNA(%)),	207
Abbildung 54: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung und FPG-Inkubation, Zielgröße Log(100-Median-Head DNA(%)),	208
Abbildung 55: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit und ohne FPG-Inkubation, Zielgröße Log(100-Median-Head DNA(%)), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	208
Abbildung 56: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen,	209
Abbildung 57: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen,	209
Abbildung 58: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen,.....	210
Abbildung 59: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).....	210
Abbildung 60: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen,	211
Abbildung 61: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CREST-positive Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen (PK: 2.000 binukleäre Zellen),.....	211
Abbildung 62: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße Proliferationsindex CBPI,	212
Abbildung 63: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße Proliferationsindex CBPI,	212

Abbildung 64: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße Proliferationsindex CBPI,	213
Abbildung 65: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße Zellen mit Chromosomenverlusten,	213
Abbildung 66: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße Zellen mit zusätzlichen Chromosomen	214
Abbildung 67: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße aneuploide Zellen insgesamt,	214
Abbildung 68 Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf apoptotische Ereignisse, Zielgröße TUNEL-positive Zellen in 1.000 Zellen,	215
Abbildung 69: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße G1-Phase-Zellen,	216
Abbildung 70: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße S-Phase-Zellen,	216
Abbildung 71: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions- Werte mit 95% Konfidenzintervall für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße G2-Phase-Zellen	217

1 Die Studie

1.1 Hintergrund der Studie und Studiendesign

Niederfrequente und hochfrequente elektromagnetische Felder können nachweislich oberhalb bestimmter Schwellenwerte Gesundheitsschäden hervorrufen.

Im Hochfrequenz-Bereich (Radar, Mikrowellen, Mobilfunk, Kurz-, Mittel- und Langwellen) sind das elektrische und magnetische Feld aneinander gekoppelt und können sich als Welle frei im Raum ausbreiten. Die primäre Wirkung auf den Menschen ist die Erwärmung des Körpergewebes. Kraftwirkungen sowie die Wärmewirkung der hochfrequenten Strahlung sind eindeutig nachgewiesen und physikalisch definiert. In biologischem Gewebe treten elektrische Ladungen in Form von Ionen (geladene Atome oder Moleküle), Wassermolekülen oder anderen polaren Molekülen, sowie an Zellwänden auf. Ladungen verschieben sich unter dem Einfluss elektromagnetischer Felder. Ionen werden hin und her bewegt und polare Moleküle richten sich im ständig wechselnden Feld stets neu aus. Sie schwingen im Takt der angelegten Frequenz. Dabei entsteht Wärme (www.bfs.de/elektro/hff/wirkungen.html).

Die Fibroblasten-Studie untersucht nun mögliche DNA-, Chromosom- und Genomschädigende Wirkungen der für Mobilfunksysteme genutzten hochfrequenten elektromagnetischen Felder. Ziel ist eine qualitativ hochwertige Bestimmung möglicher gentoxischer Effekte in humanen peripheren Lymphozyten. Mit Hilfe der Studie soll eine belastbare Datenlage unter Abdeckung des möglichen gentoxischen Schadensspektrums erzielt werden, wobei die folgenden biologisch relevanten Endpunkte untersucht wurden:

- 1 strukturelle Chromosomenaberrationen,
- 2 Mikrokerne, mit und ohne Centromer (aneugen, gentoxisch)
- 3 DNA-Strangbrüche (Einzel- oder Doppelstrangbrüche der Erbsubstanz sowie alkalilabile Stellen)
- 4 TUNEL-Apoptose-Test
- 5 Zellzyklus

1.2 Studienpopulation

Insgesamt wurden in dieser Studie 20 Probanden untersucht, die alle entweder zwischen 18 und 19 Jahren oder zwischen 50 und 60 Jahren alt sein sollten.

Die folgenden Daten beziehen sich auf den Analysedatensatz mit den 20 Probanden. Die Probanden mussten neben der Einverständniserklärung noch einen Fragebogen mit insgesamt 28 Fragen zu personenbezogenen Daten wie Alter, Geschlecht, Beruf, gesundheitlicher Zustand, sowie Fragen zur Mobilfunkexposition beantworten. In der folgenden Tabelle werden einige der personenbezogenen Daten der Probanden dargestellt.

Tabelle 1: Personenbezogene Daten der älteren und der jüngeren Probanden

Variable		Ältere Probanden (n=10)	Jüngere Probanden (n=10)
Alter	Mittelwert $\pm$ STD (Min - Max)	54.80 $\pm$ 3.01 (50 - 59)	18.30 $\pm$ 0.48 (18 - 19)
Geschlecht	Weiblich Männlich	8 2	4 6
Körpergröße	Mittelwert $\pm$ STD (Min - Max)	170.6 $\pm$ 5.99 (160 - 178)	179.1 $\pm$ 9.28 (163 - 193)
Gewicht	Mittelwert $\pm$ STD (Min - Max)	82.0 $\pm$ 22.95 (59 - 118)	70.2 $\pm$ 8.40 (56 - 83)
Seit der Geburt in Hamburg	Ja (Anzahl) Nein (Anzahl)	6 4	8 2
Gesundheitszustand	Sehr gut (Anzahl) gut (Anzahl) zufrieden (Anzahl) keine Angabe (Anzahl)	2 6 1 1	2 6 2 0
Herz- und Kreislauf- erkrankungen	Ja (Anzahl) Nein (Anzahl)	2 10	0 10
Diabetes	Ja (Anzahl) Nein (Anzahl)	0 10	0 10
Allergien	Ja (Anzahl) Nein (Anzahl)	3 7	1 9
Heuschnupfen	Ja (Anzahl) Nein (Anzahl)	3 7	1 9
Krebserkrankungen	Ja (Anzahl) Nein (Anzahl)	0 10	0 10
Sport treiben	Ja (Anzahl) Nein (Anzahl)	8 2	8 2
Wie viel Stunden pro Woche Sport	Mittelwert $\pm$ STD (Min - Max)	3.88 $\pm$ 2.03 (1 - 7)	6.80 $\pm$ 2.95 (4 - 11)
Telefonieren	Täglich bis 15 Min bis 1 Std. (Anzahl) Täglich < 15 Min (Anzahl) Mehrere Male pro Woche (Anzahl) Seltener (Anzahl)	0 1 6 3	1 2 4 3
Wohnen Nähe eines Sendemasten	Ja (Anzahl) Nein (Anzahl) Weiß nicht (Anzahl)	2 5 3	1 8 1

STD = Standardabweichung

2 Statistische Methoden

2.1 Statistischer Analyseplan

Auf Grundlage des niedergelegten Analyseplans aus der Vorgängerstudie FM8823 wurde eine Inspektion der verblindeten Daten vorgenommen (blind data review), mit der Zielsetzung, die Daten auf Vollständigkeit und Plausibilität zu überprüfen sowie die Verteilungsannahmen zu spezifizieren.

Für die vorliegende Studie wurde ebenfalls ein Analyseplan auf Basis eines Blind Data Review erstellt (Siehe Anhang). Ziel des Analyseplans ist eine genaue Spezifikation der statistischen Modelle und Analysemethoden auf Basis des Blind-Data-Review. Dies schließt auch ggf. den Umgang mit fehlenden Werten und extremen Werten (statistischen Ausreißern) mit ein. Die wesentlichen Inhalte des Analyseplans werden im Folgenden wiedergegeben. Im Folgenden wird zunächst die Analysestrategie übergreifend über alle fünf Endpunkte beschrieben. Danach werden für jeden der Assays wesentliche Ergebnisse des Blind Data Review benannt, Analyse-Modell und -Methode spezifiziert, und die Wahl der Methodik begründet.

2.2 Analysestrategie

Die Hauptfragestellung ist die nach dem Bestehen eines Befeldungseffektes. Dazu sind innerhalb jedes Probanden die Messergebnisse aus vier Dosisgruppen zu berücksichtigen. Dazu wird primär ein statistischer Test auf Trend durchgeführt. Anschließend werden Effektschätzer für jede der Dosisgruppen und für paarweise Differenzen zur Negativkontrolle (Sham) mit 95%-Konfidenzintervallen präsentiert.

Daneben wird der Kontrast zwischen Negativkontrolle und Positivkontrolle – ebenfalls als Effektschätzung mit 95%-Konfidenzintervall – gestellt. In die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse sollten neben dem formalen Test auf Trend, auch die Form des Dosistrends (Monotonie), die Größe des Trendeffektes und das Verhältnis zwischen Dosistrend und Abstand zwischen Negativ- und Positiv-Kontrolle einfließen.

Für die Hauptfragestellung zum Bestehen eines Befeldungseffektes wurde aufgrund von multiplen Testens eine Korrektur des Signifikanzniveaus vorgenommen. Die Hauptfragestellung wurde anhand eines exakten Permutationstests auf einen Dosistrend überprüft. Wie mit dem multiplen Testen umgegangen wurde, wird im folgenden Abschnitt erklärt.

2.3 Umgang mit multiplen Hypothesentests

Mit insgesamt 22 Zielvariablen aus fünf Assays liegen damit auch 22 statistische Test- und Schätzprobleme vor. Dabei setzen sich die 22 Variablen zusammen aus 10 Zielvariablen des Comet-Assays, jeweils 2 für 4 Zeitpunkte und 2 für FPG, 6 Zielvariablen des Mikrokerntests, jeweils 3 für 2 Zeitpunkte, 2 Zielvariablen der Chromosomenaberration (Chromosomenverlust. und Chromosomenzugewinn), 1 Zielvariable des TUNEL-Tests (TUNEL_pos/ausgew_zellen) und 3 Zielvariablen des Zellzyklustests.

Da im günstigen Fall ein Beleg für die Abwesenheit von Befeldungseffekten angestrebt wird, ist die stärkste Aussage in diesem Sinne ein Beibehalten der Nullhypothese in 22 Tests mit Konfidenzintervallen, welche relevante Effekte ausschließen.

Primär wurden daher p-Werte nicht für multiples Testen adjustiert und zweiseitige Konfidenzintervalle zur (unadjustierten) Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95% angegeben.

Die Chance eines solchen Nachweises ist auch unter der globalen Nullhypothese (Gültigkeit aller 22 Nullhypothesen) nicht hoch. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Nullhypothese unter den 22 fälschlicherweise abgelehnt und dafür die falsche Alternativhypothese angenommen wird, liegt bei bis zu $P(H1|H0)=1-(1-0.05)^{22}=0.68 = 68\%$.

Als Hilfe zur Interpretation solcher möglicher Zufallsbefunde wird zusätzlich eine Bonferroni-Korrektur auf Assay-Ebene vorgenommen. Das bedeutet, das globale Signifikanzniveau pro Assay wird auf 5% gesetzt, die lokalen Signifikanzniveaus sind dann folgendermaßen definiert:

Comet-Assay:	0.05/10=0.005
Mikrokerntest:	0.05/6=0.0083
Chromosomenaberrationen:	0.05/2=0.025
TUNEL-Apoptose-Test:	0.05
Zellzyklusanalyse:	0.05/3=0.0167

Schließlich sind die lokalen Signifikanz-Niveaus für eine Bonferroni-Korrektur über alle Assays hinweg nochmals durch fünf zu dividieren.

Comet-Assay:	0.05/50 = 0.0010
Mikrokerntest:	0.05/30 = 0.0017
Chromosomenaberrationen:	0.05/10 = 0.0050
TUNEL-Apoptose-Test:	0.05/5 = 0.0100
Zellzyklusanalyse:	0.05/15=0.0033.

Der Begriff der *statistischen Signifikanz* wird in diesem Bericht nur bezogen auf die primäre Analyse der Hauptfragestellungen verwendet, wenn entsprechend der oben angegebenen Schranken ein p-Wert das angegebene lokale Niveau unterschreitet. Für alle anderen Ergebnisse wird keine Kontrolle des multiplen Fehlers erster Art angestrebt; sie werden als *statistisch auffällig* bezeichnet, wenn der p-Wert das lokale Niveau von 5% unterschreitet.

Zur Beurteilung eines möglichen Zusammenhangs zwischen Dosis und Wirkung sind dabei jeweils die Mittelwerte und die Differenzen zur Sham-Befeldung je Dosisstufe (mit 95% Konfidenzintervall) heranzuziehen. Die Abwesenheit eines monotonen Zusammenhangs wird dann als Hinweis gewertet, dass der Effekt ein Zufallsbefund ist.

Alle Nebenanalysen werden als explorativ betrachtet. P-Werte, die das lokale Niveau unterschreiten haben dann keinen konfirmativen sondern einen Hypothesen generierenden Charakter.

2.4 Spezifikation und Begründung der Analysemethoden

Zielvariablen

Folgende Zielvariablen werden in der statistischen Analyse berücksichtigt:

Comet-Assay:

- Olive-Tail-Moment ($\log_{10}$ Olive-Tail-Moment)
- Medianer Anteil DNA im Kopf (%) ($\log_{10}$ (100-Median Head DNA (%)))

Beide Zielvariablen werden zu drei Zeitpunkten untersucht, sowie zusätzlich jeweils einmal zum Zeitpunkt nach 72h mit dem und ohne den FPG Wert. Die zwei Zielgrößen des Comet-Assays sind stark miteinander korreliert und werden jeweils transformiert. Die Zielgröße „CoA_olive_tailm“ wird logarithmiert und die Zielgröße „mediane DNA im Kopf (%)“

(DNA_Head)“ wird folgendermaßen transformiert: $\text{DNA_Head_LN} = \log_{10} ((100 - \text{DNA_Head})/100)$.

Mikrokerntest

- Anzahl der Mikrokerne in 2000 Zellen. (Errechnet als $\text{MNI} = ((\text{mn}_1 + 2 * \text{mn}_2 + 3 * \text{mn}_3) / \text{mn_ausg_zellen}) * 2000$)
- Anzahl der Mikrokerne mit CREST in 2000 Zellen (Errechnet als $\text{MNI_crest} = ((\text{mn}_1_crest + \text{mn}_2_crest + \text{mn}_3_plus_crest) / \text{mn_ausg_zellen}) * 2000$)
- CBPI

Chromosomenaberrationen:

- Anteil unter 200 Mitosen (oberhalb): (Errechnet als $\text{chrom_46_plus} = \text{chrom_46_plus} / \text{ausgew_mitosen} * 200$)
- Anteil unter 200 Mitosen (unterhalb): (Errechnet als $\text{chrom_46_minus} = \text{chrom_46_minus} / \text{ausgew_mitosen} * 200$)
- Anteil unter 200 Mitosen (unterhalb oder oberhalb) : aneuploid cells (Errechnet als $\text{chrom_all} = (\text{chrom_46_plus} + \text{chrom_46_minus}) / \text{ausgew_mitosen} * 200$)

TUNEL-Apoptose-Test:

- Anzahl TUNEL positiver Zellen (Errechnet als $\text{TUNEL_pos} = \text{TUNEL_pos} / \text{ausgewertete Zellen} * 1000$)

Zellzyklusanalyse:

- G1
- G2
- S

2.5 Tests auf einen Dosistrend

Bei allen fünf Assays wird analog vorgegangen. Es werden zunächst Permutationstests auf einen Dosistrend über die vier SAR-Stufen „Sham“, „low“, „medium“ und „high“ als primäre Analyse durchgeführt. Als Sensitivitätsanalyse werden sekundär zusätzlich Page-Trend-Tests berechnet.

Die Analysen werden separat für alle Zielvariablen der fünf Assays durchgeführt.

Begründung: Da unter der Nullhypothese der Abwesenheit eines Befeldungseffektes die Verteilung der Zielvariablen in den 4 Expositionsbedingungen gleich ist, sind die Voraussetzungen für Permutationstests erfüllt.

Aufgrund folgender Punkte lassen sich der Permutationstest und der Page-Trend-Test bei dieser Fragestellung auf einen Dosistrend begründen:

- Beides sind Trend-Tests.
- Beide Tests untersuchen, ob mit steigender Exposition die Werte in den Zielvariablen steigen.
- Beide Tests sind also sensitiv für die Trend-Alternativhypothese von dosisabhängigen geordneten Erwartungswerten.
- Keiner der Tests setzt eine Normalverteilung voraus.

Der Permutationstest verwendet die Originalwerte der Zielvariablen, während der Page-Trend-Test eine Rangskala der Zielvariablen verwendet. Als Prüfgröße wird die Summe der Dosistrendscores über alle Probanden gebildet:

$$T = \sum_{i=1}^{20} \sum_{j=1}^4 jY_{ij} ,$$

oder äquivalent dazu:

$$T = \frac{1}{20} \sum_i T_i; \text{ mit}$$

$$T_i = \frac{1}{10} (-3Y_{i1} - Y_{i2} + Y_{i3} + 3Y_{i4}) .$$

Dabei ist Y_{ij} der Wert einer Zielvariable bei Proband i unter Befeldungsdosis j . (Die Leerdosis ist hier als $j=1$ enthalten, die Positivkontrolle ist nicht einbezogen.) Dies ist die gleiche Prüfgröße, die sich auch unter Annahme eines Poisson-Modells als Score-Test ergibt. Die zweite, skalierte Variante wird zur Quantifizierung des Dosistrends verwendet. Mittelwerte mit t-test-basierten 95%-Konfidenzintervallen ergeben dann eine Schätzung der durchschnittlichen Differenz zwischen zwei Dosisstufen.

Als Sensitivitätsanalyse ist zusätzlich noch der Page-Trend-Test vorgesehen. Der Page-Trend- oder Page-L-Test ist ein Test auf Dosistrend mit der Teststatistik $T = \sum_{ij} jR_{ij}$, wobei j der

Dosisindex (1-4) und R_{ij} der Rang der Zielvariablen der j -ten Dosis innerhalb eines Probanden ist. Für die Permutationstests wird das R-Paket „coin“ verwendet (für den Permutationstest die Funktion `independence_test`, für den Page-Test die Funktion `„friedman_test“`).

Der Permutationstest wird als primäre Analysemethode gewählt, da dieser mit den originalskalierten Werten zu den aufgeführten Schätzern und Konfidenzintervallen passt, da diese auch für die Originalskala berechnet wurden. Der Page-Trend-Test dient lediglich dazu, um zu überprüfen, ob die Ergebnisse des Permutationstests von der spezifischen Methodenauswahl abhängig sind. Aus den Erfahrungen des Vorgängerprojekts FM8823 sind keine relevanten Unterschiede in den Ergebnissen der beiden Trendtests zu erwarten.

2.6 Subgruppenanalyse

Es werden Subgruppenanalysen für die beiden Altersgruppen durchgeführt. Dazu wird wie in der primären Analyse ein statistischer Test auf Trend (exakter Permutationstest) durchgeführt. Dazu werden Effektschätzer mit 95% Konfidenzintervallen, welche rein asymptotisch berechnet wurden angegeben. Es werden ebenfalls paarweise Differenzen zur Negativkontrolle (Sham) berechnet und mit 95%-Konfidenzintervallen präsentiert.

3 Datensichtung

Für alle statistischen Analysen wurden die folgenden Zielvariablen festgelegt:

Comet-Assay

- Olive Tail-Moment (Log(Olive-Tail-Moment))
- Medianer Anteil DNA im Kopf (%) (Log (100-Median Head DNA(%))
- Beide Zielvariablen werden zu 4 Zeitpunkten untersucht, sowie jeweils einmal zum Zeitpunkt nach 72h mit dem FPG Wert

Damit gibt **10** Zielvariablen des Comet-Assays. Die zwei Zielgrößen des Comet-Assays sind stark miteinander korreliert und werden jeweils transformiert. Die Zielgröße „CoA_olive_tailm“ wird logarithmiert und die Zielgröße „mediane DNA im Kopf (%) (DNA_Head)“ wird folgendermaßen transformiert: $DNA_Head_LN = \log_{10}((100 - DNA_Head))$

Mikrokerntest

- Anzahl der Mikrokerne in 2000 Zellen. (Errechnet als $MNI = ((mn_1 + 2*mn_2 + 3*mn_3plus)/mn_ausg_zellen)*2000$)
- Anzahl der Mikrokerne mit crest in 2000 Zellen (Errechnet als $MNI_crest = ((mn_1_crest + mn_2_crest + mn_3_plus_crest)/mn_ausg_zellen)*2000$)
- CBPI

Es existieren 6 Zielvariablen des Mikrokerntests:

- Zusätzlich 3 Zielgrößen für den erweiterten Mikrokerntest

Chromosomenaberrationen

- Anteil unter 200 Mitosen (oberhalb): cell chromosome loss(Errechnet als $chrom_46_plus = chrom_46_plus / ausgew_mitosen)*200$
- Anteil unter 200 Mitosen (unterhalb) : cell chromosome increase (Errechnet als $chrom_46_minus = chrom_46_minus / ausgew_mitosen)*200$
- Anteil unter 200 Mitosen (unterhalb oder oberhalb) : aneuploid cells (Errechnet als $chrom_all = (chrom_46_plus + chrom_46_minus) / ausgew_mitosen)*200$

Damit gibt es 3 Zielvariablen bei der Chromosomenaberration

TUNEL-Apoptose-Test

- TUNEL_pos/ausgewertete Zellen: TUNEL positive cells (Errechnet als $TUNEL_pos = TUNEL_pos / ausgewertete\ Zellen)*1000$

Der TUNEL-Apoptose-Test resultiert in einer Zielvariablen

Zellzyklusanalyse

- G1
- G2
- S

Innerhalb des Zellzyklus werden somit 3 Zielvariablen untersucht.

Insgesamt kommen wir nun auf 23 Zielvariablen .Die Daten wurden in einem ersten Schritt auf fehlende Werte und Ausreißer untersucht.

3.1 *Fehlende Werte, Ausreißer und auffällige Werte*

Ein wichtiger Schritt vor der statistischen Analyse ist die Daten auf fehlende Werte zu untersuchen, da es bei der Nichtbeachtung von fehlenden Werten zu verzerrten Ergebnissen kommen kann.

Fehlende Werte in den Zielvariablen:

Bei den Zielvariablen der verschiedenen Assays kamen keine fehlenden Werte vor. Damit muss die Analyse nicht auf fehlende Werte angepasst werden.

Ausreißer und auffällige Werte:

Ein weiterer wichtiger Schritt vor der eigentlichen Hauptanalyse war die Überprüfung auf Ausreißer und andere auffällige Werte.

Bei den Zielgrößen ergaben sich keine unplausiblen Werte. Beim Comet-Assay gab es allerdings ein paar vereinzelte Ausreißer bei einigen Zeitpunkten in den Daten. Daher werden die Analysen des Comet-Assays im Folgenden immer für die log-transformierten Werte durchgeführt.

Ein Proband wies bei der Zielvariablen Olive Tail Moment in zwei Expositionsgruppen Werte über 40 aus. Solch ein Ausreißer wird im Normalfall nicht mit ausgewertet. Daher wurde eine Sensitivitätsanalyse gerechnet, wo dieser Proband aus der Analyse ausgeschlossen wurde. Der erweiterte Mikrokerntest wurde lediglich an 4 Probanden untersucht. Hier ist die Streuung in den Daten relativ groß.

Um die Zielvariablen rein deskriptiv zu beschreiben und auch graphisch darzustellen wird im Folgenden zu jeder Zielvariablen eine Graphik präsentiert.

3.2 *Rohdaten*

In den folgenden Abbildungen sind nun die verschiedenen Zielvariablen der unterschiedlichen Assays jeweils in einem Diagramm dargestellt. Dabei ist auf der x-Achse die Expositionsgruppe Sham bis High, sowie die Positivkontrolle, dargestellt. Zur besseren Veranschaulichung der Werte von der Positivkontrolle werden diese in rot dargestellt. Für die beiden Zielgrößen des Comet-Assays sind jeweils die eigentlichen Rohdaten und die logarithmierten Werte aufgeführt. Als Zielvariablen gelten im Folgenden aber immer nur die log-transformierten Werte.

Comet-Assay

Exposure time=4 h

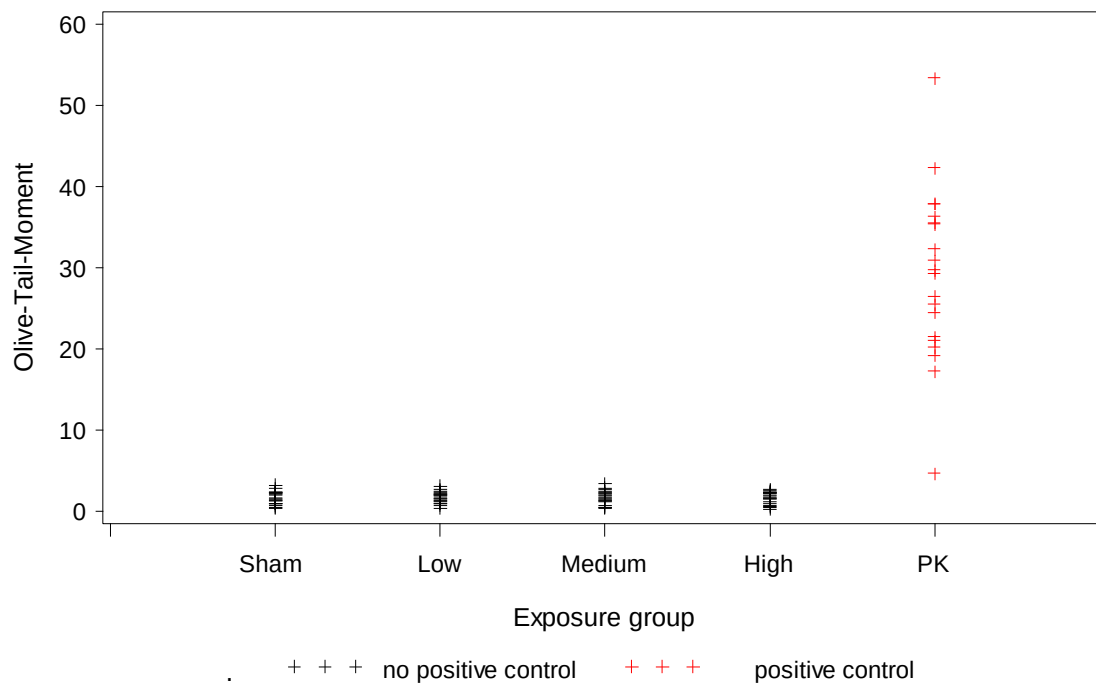


Abbildung 1: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

Exposure time=16 h

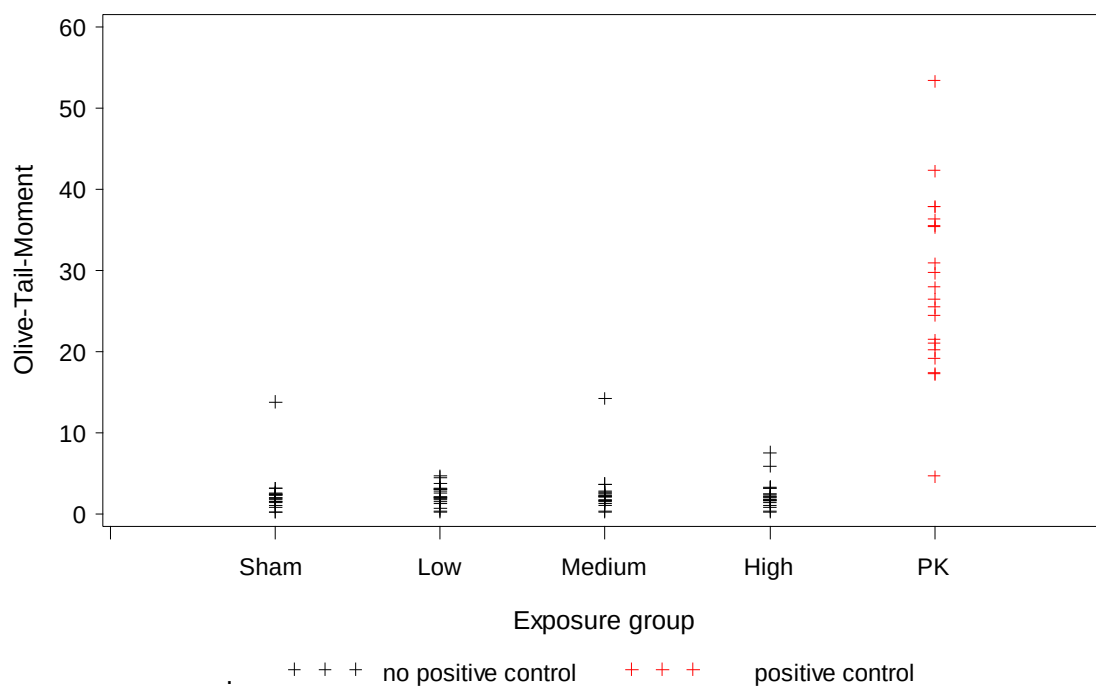


Abbildung 2: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

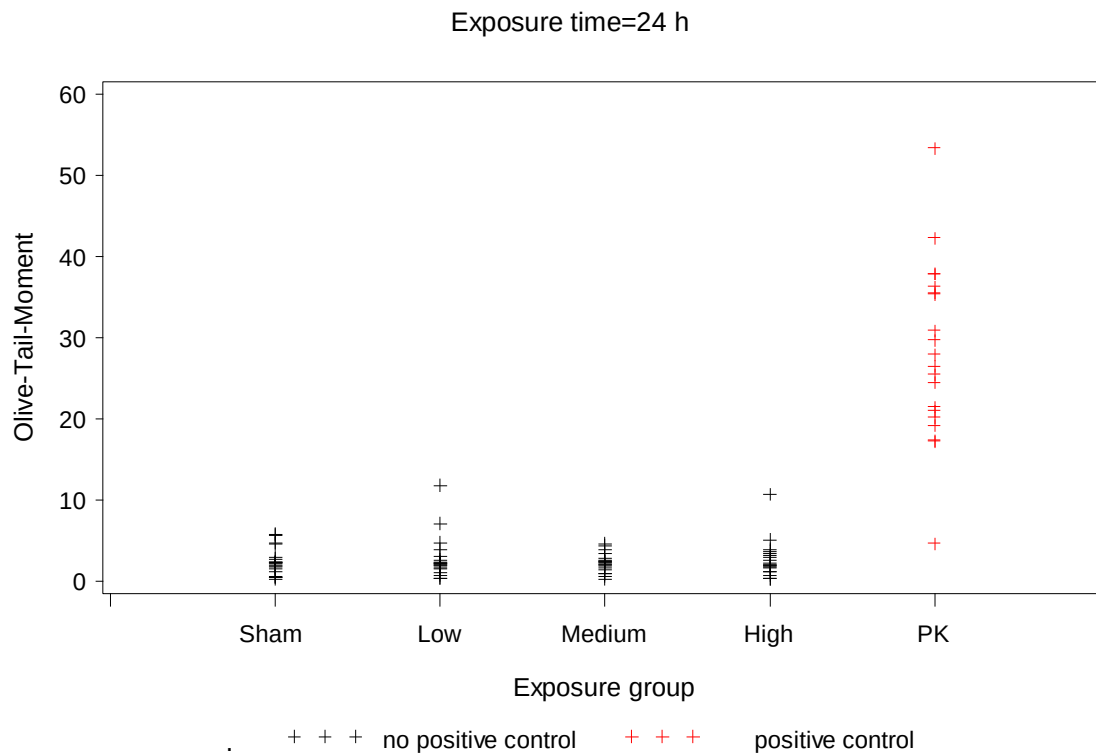


Abbildung 3: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

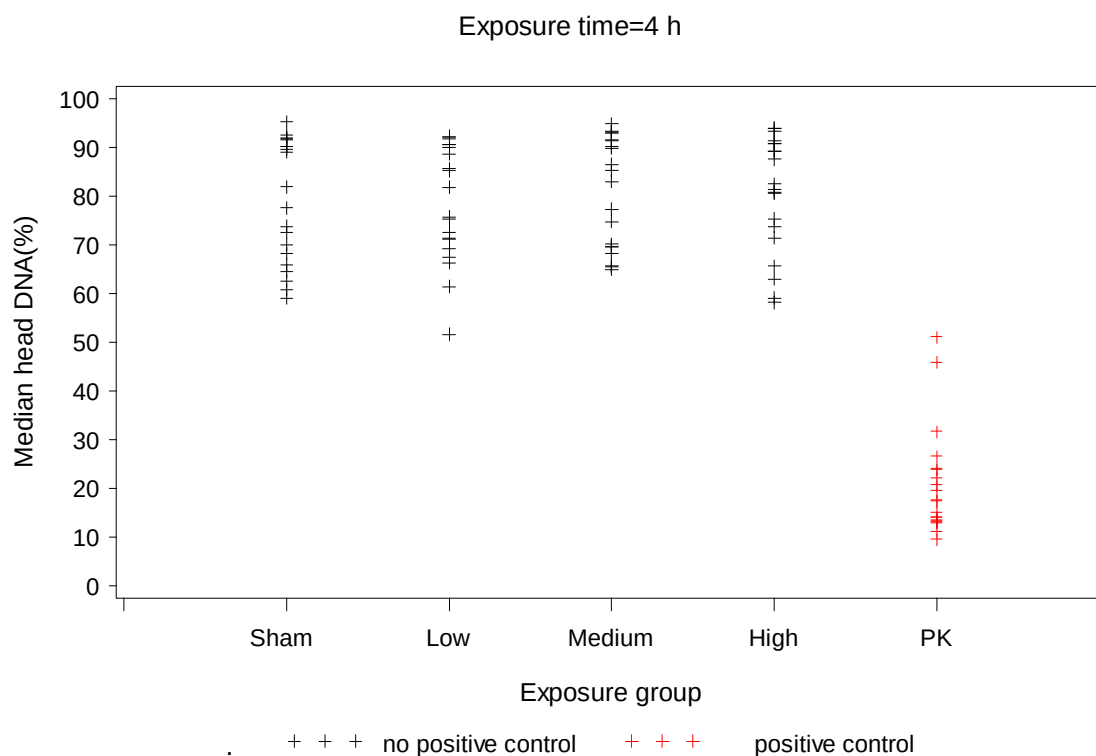


Abbildung 4: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße Median Head DNA (%), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

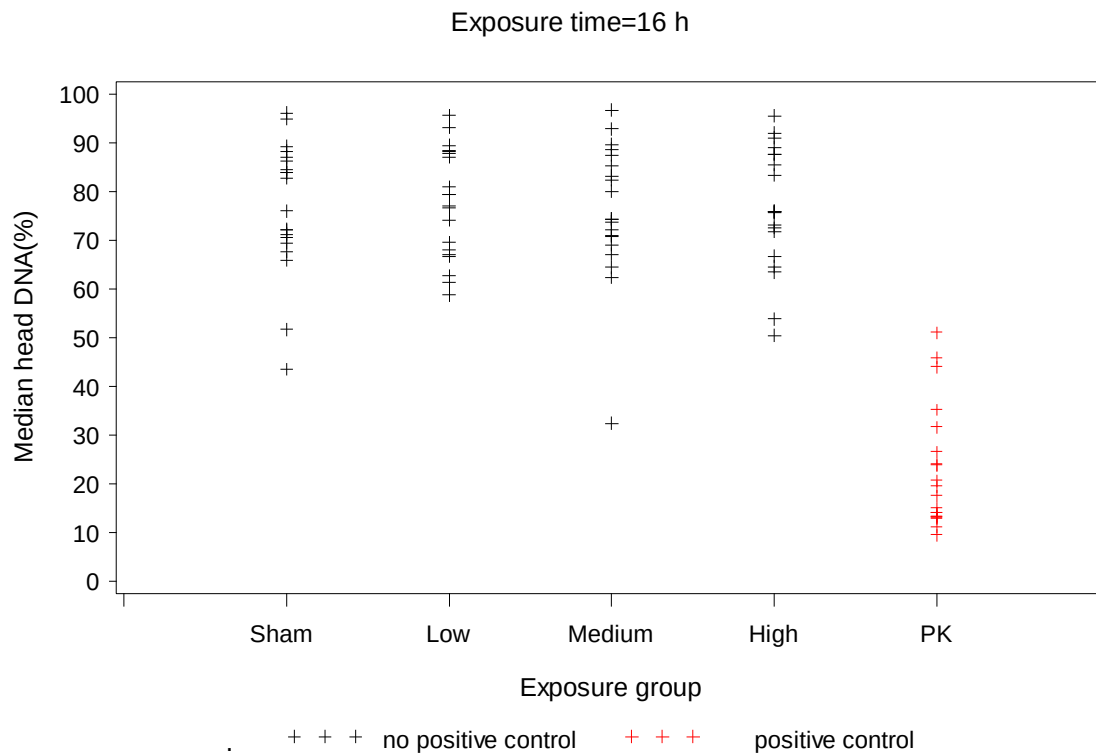


Abbildung 5: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße Median Head DNA (%), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

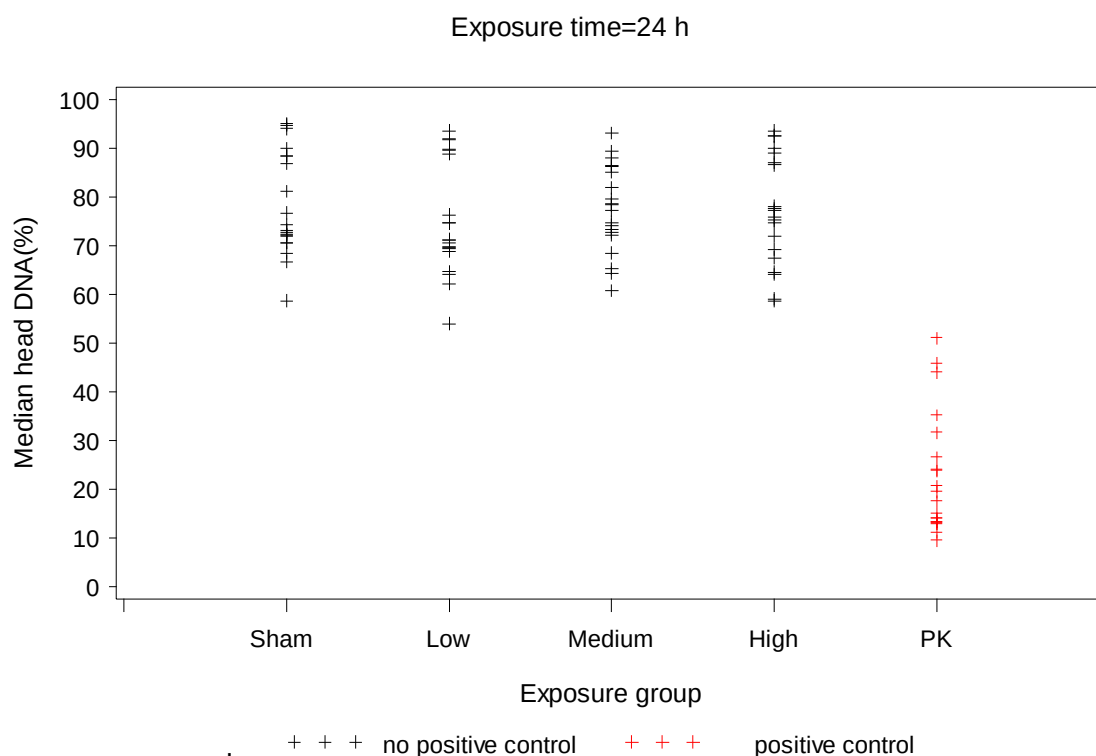


Abbildung 6: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße Median Head DNA (%), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

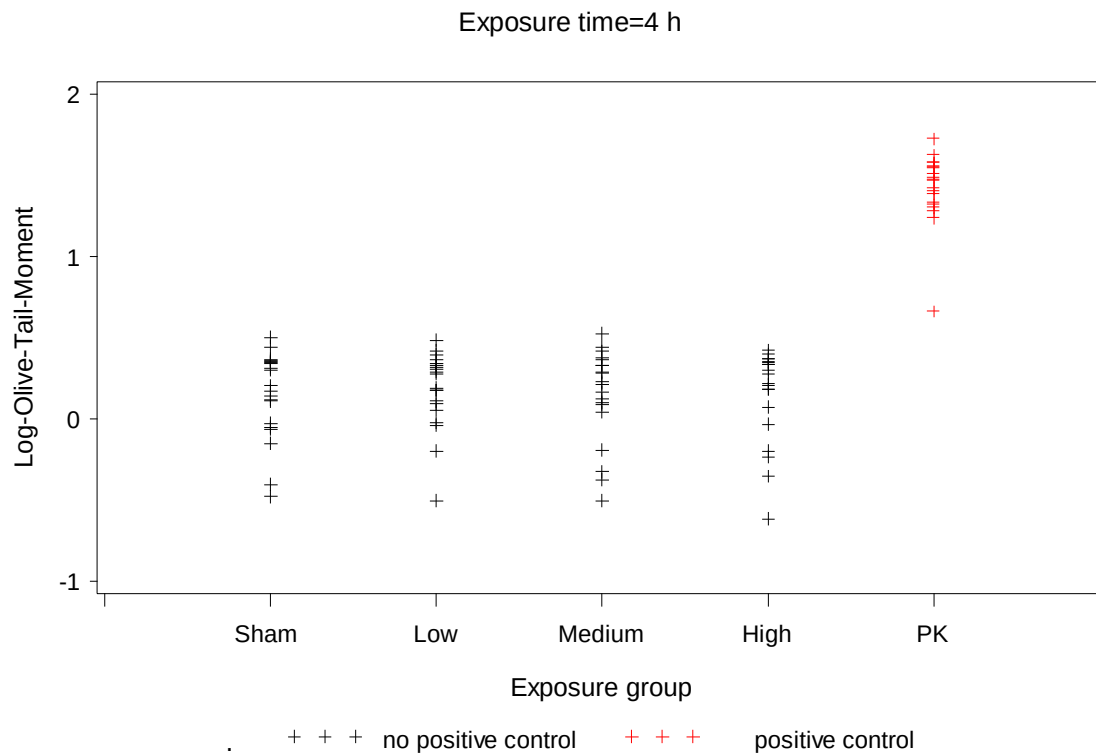


Abbildung 7: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

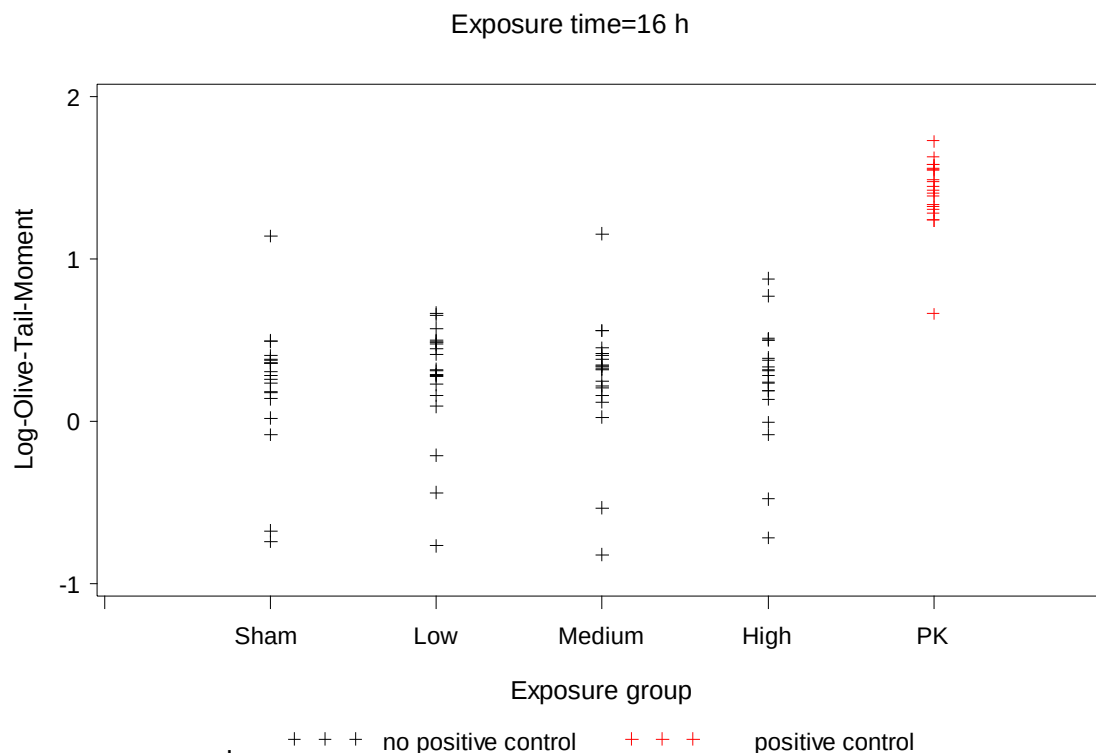


Abbildung 8: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

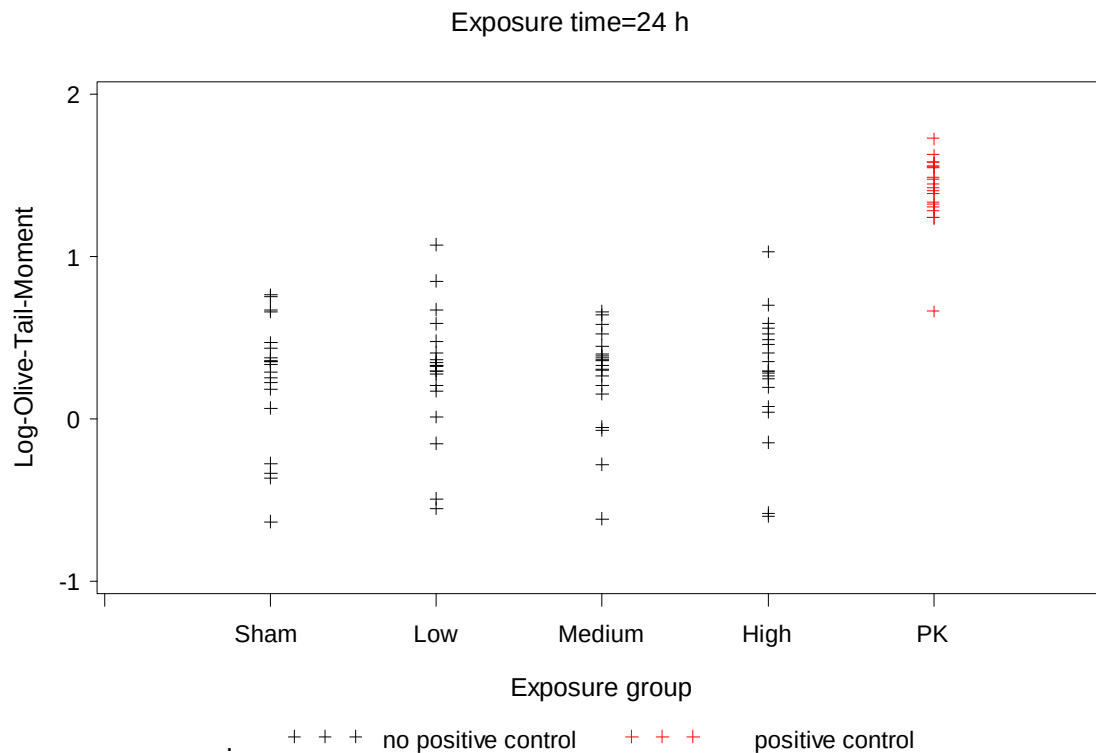


Abbildung 9: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

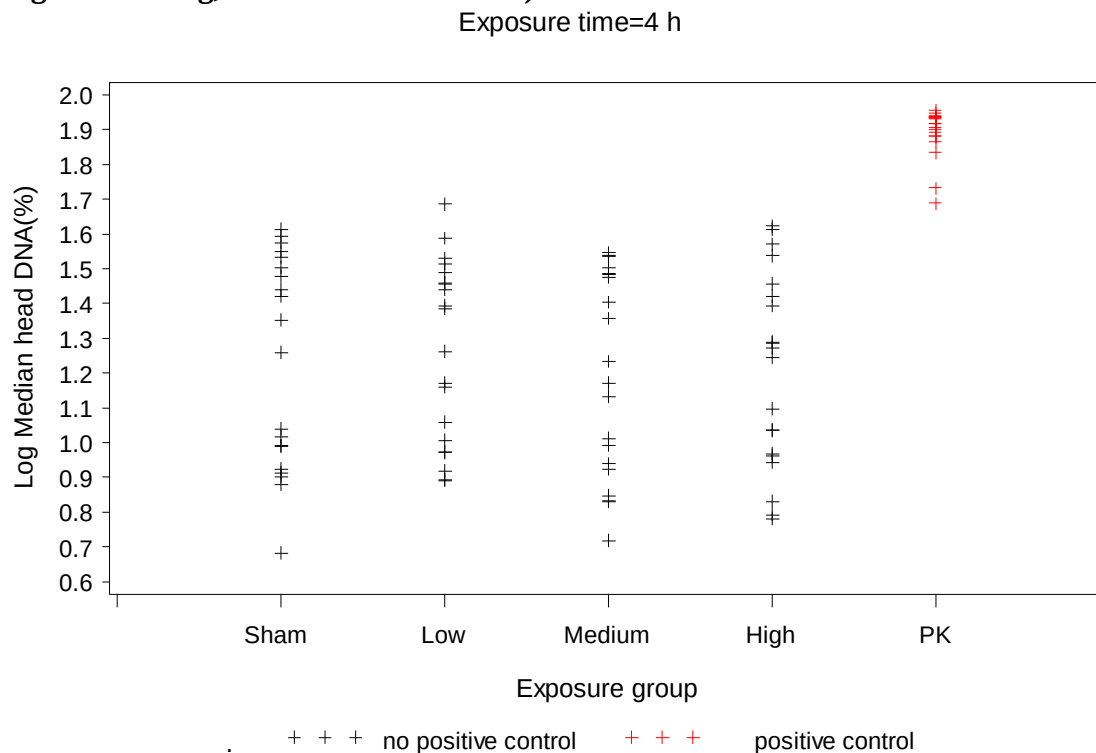


Abbildung 10: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße Log (100-Median Head DNA(%)), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

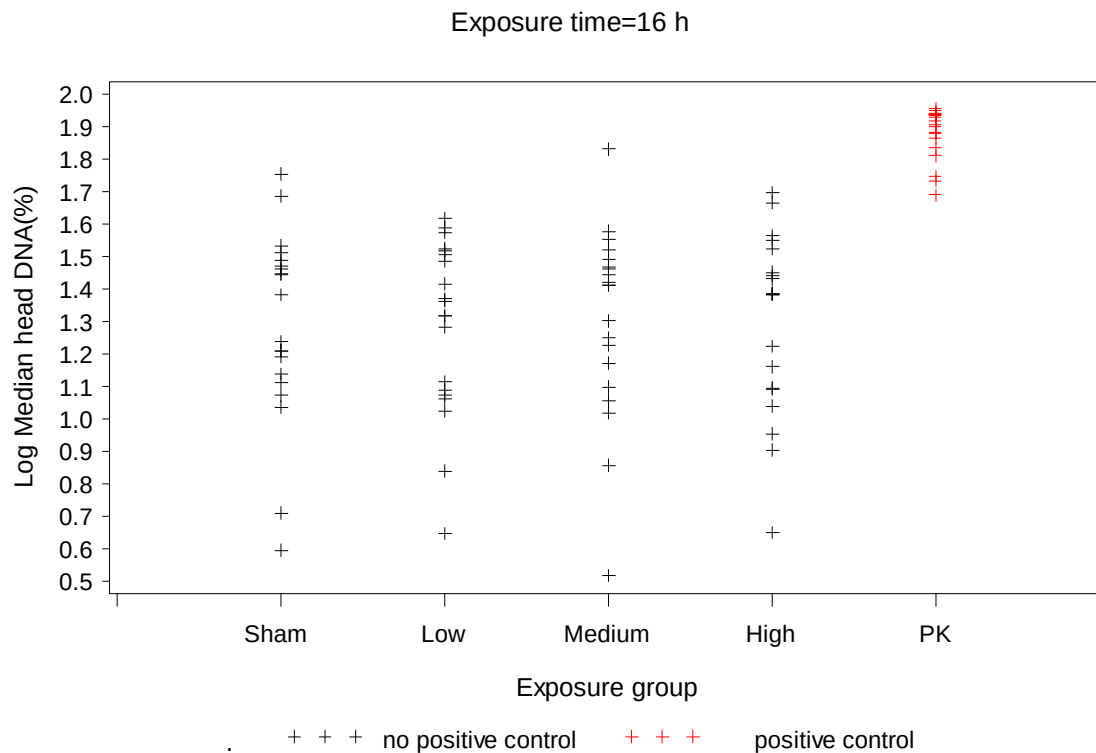


Abbildung 11: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße Log (100-Median Head DNA(%)), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)
Exposure time=24 h

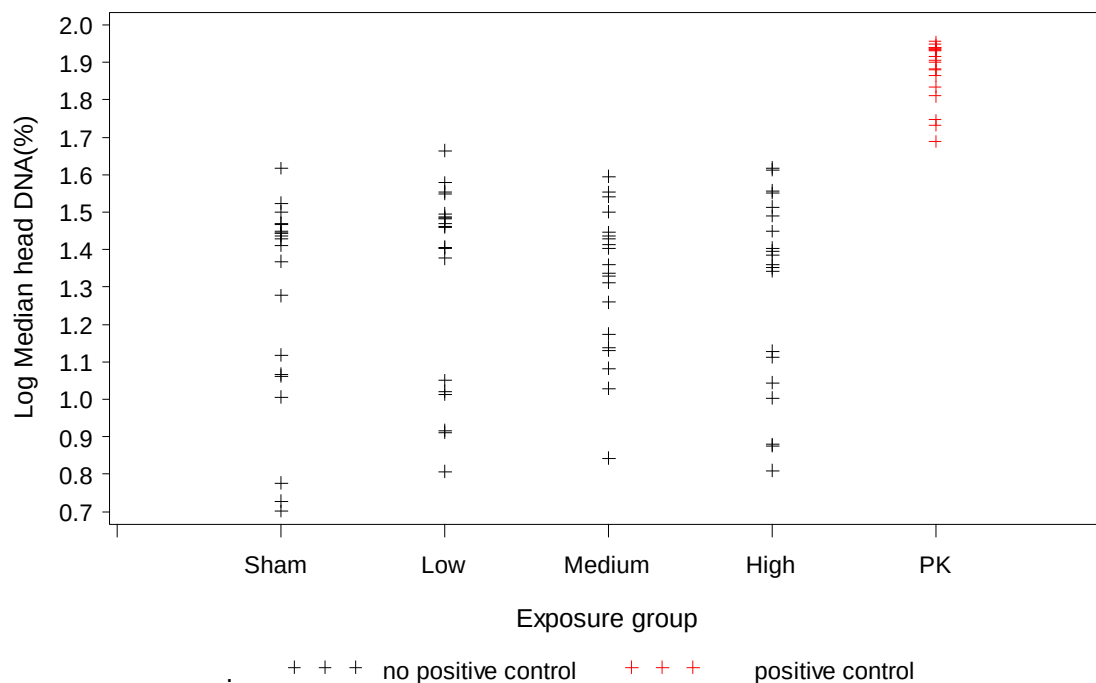


Abbildung 12: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße Log (100-Median Head DNA(%)), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

3.2.2 Comet-Assay nach 72h Bestrahlung mit und ohne FPG

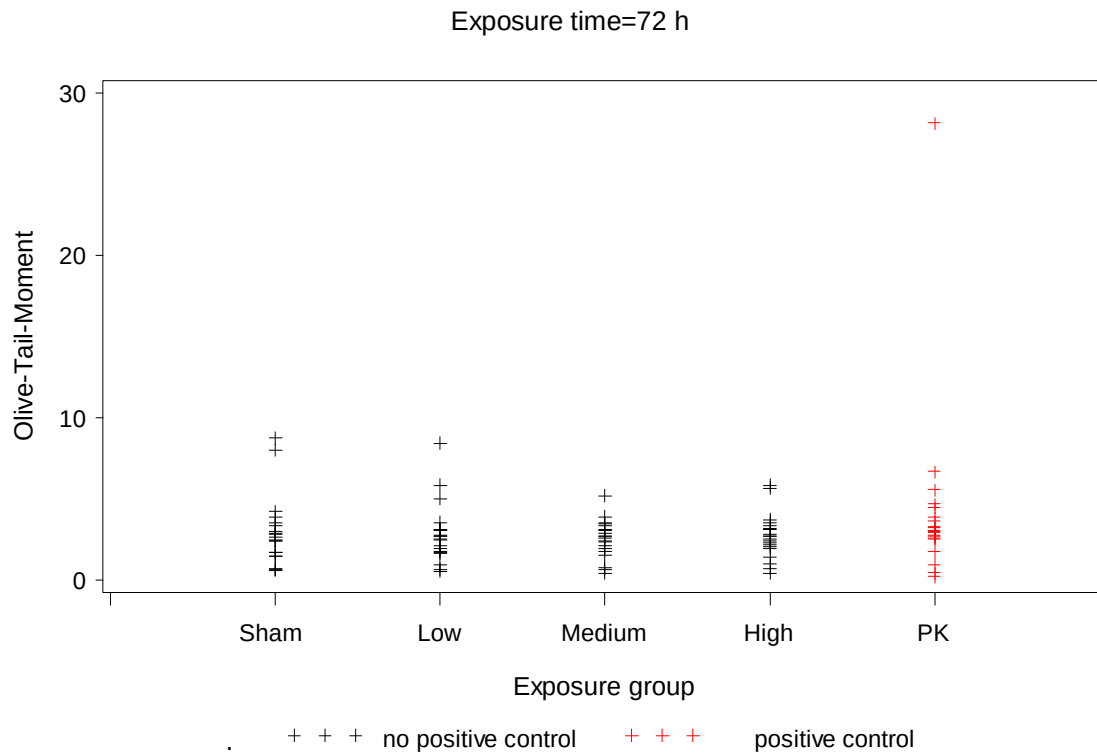


Abbildung 13: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

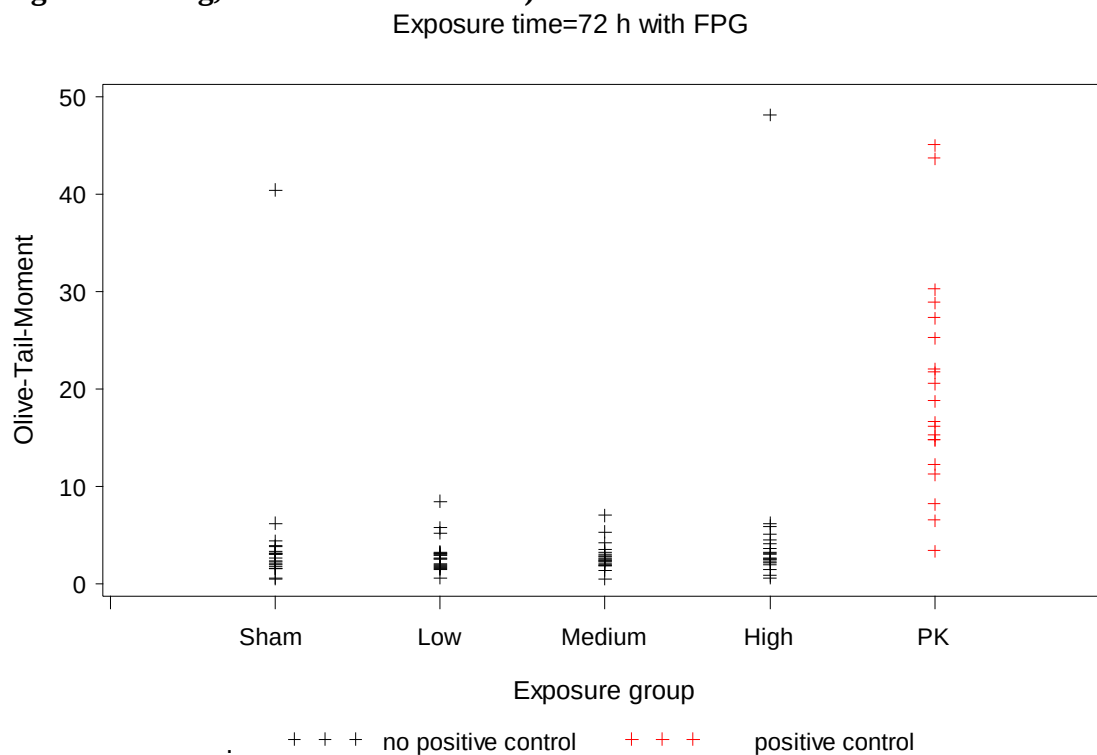


Abbildung 14: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

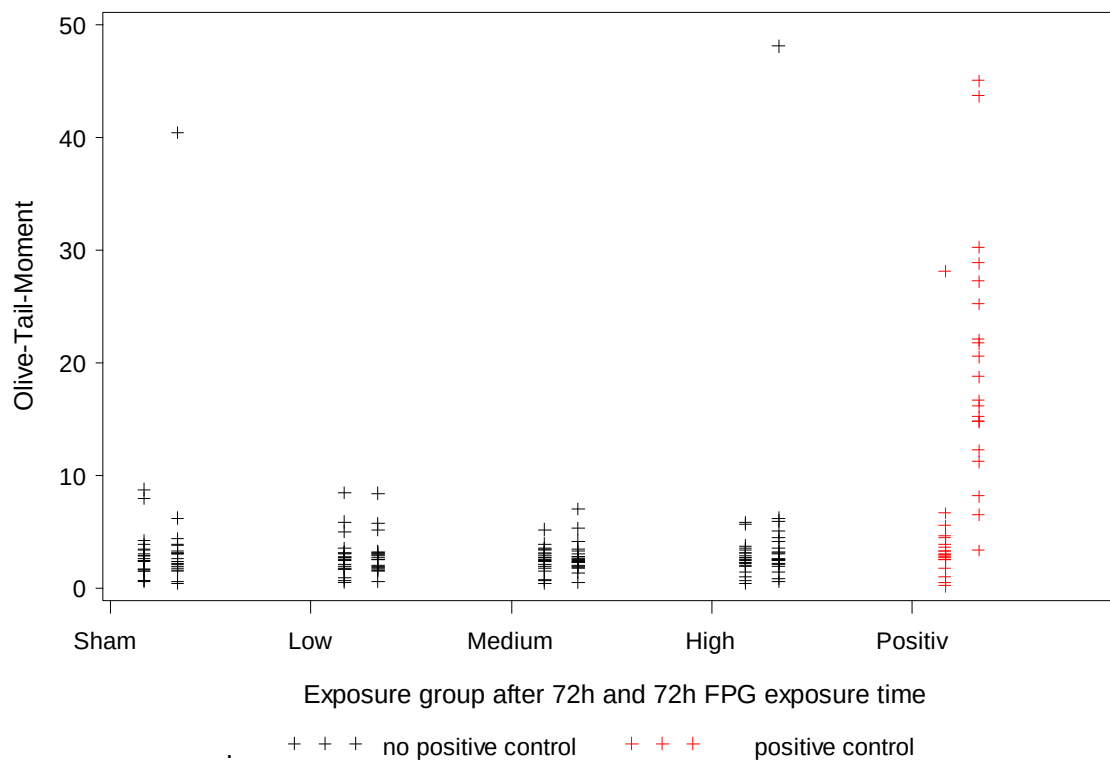


Abbildung 15: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit und ohne FPG-Inkubation, Zielgröße Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

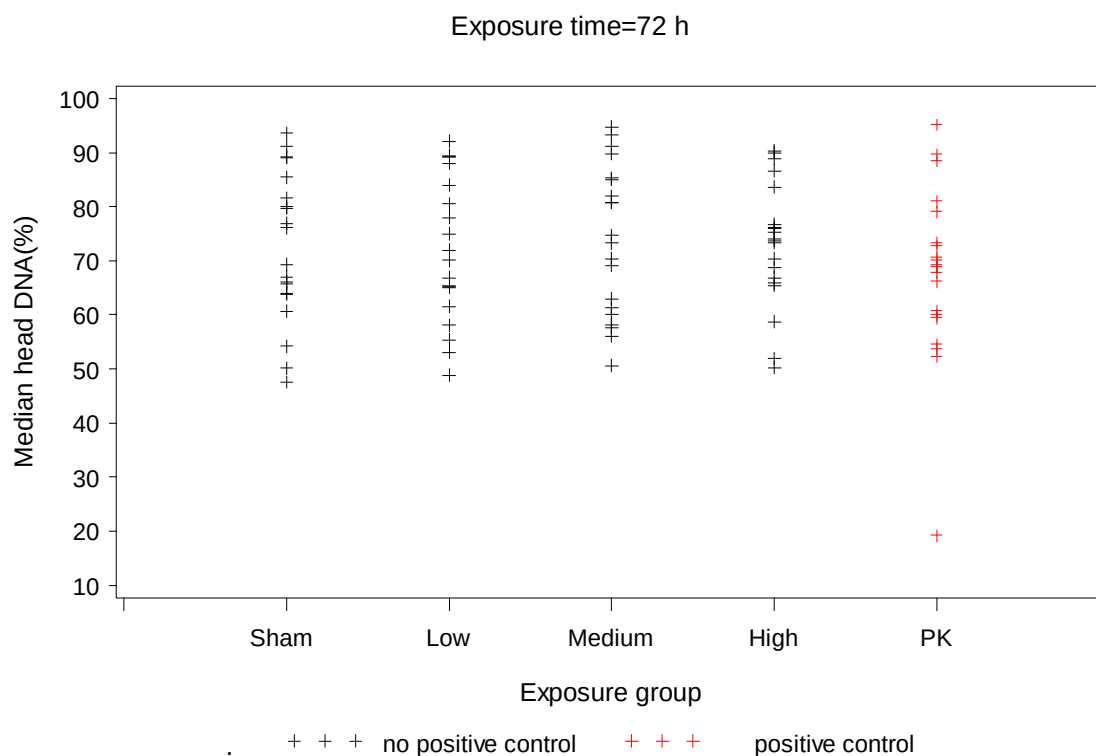


Abbildung 16: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße Median Head DNA (%), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

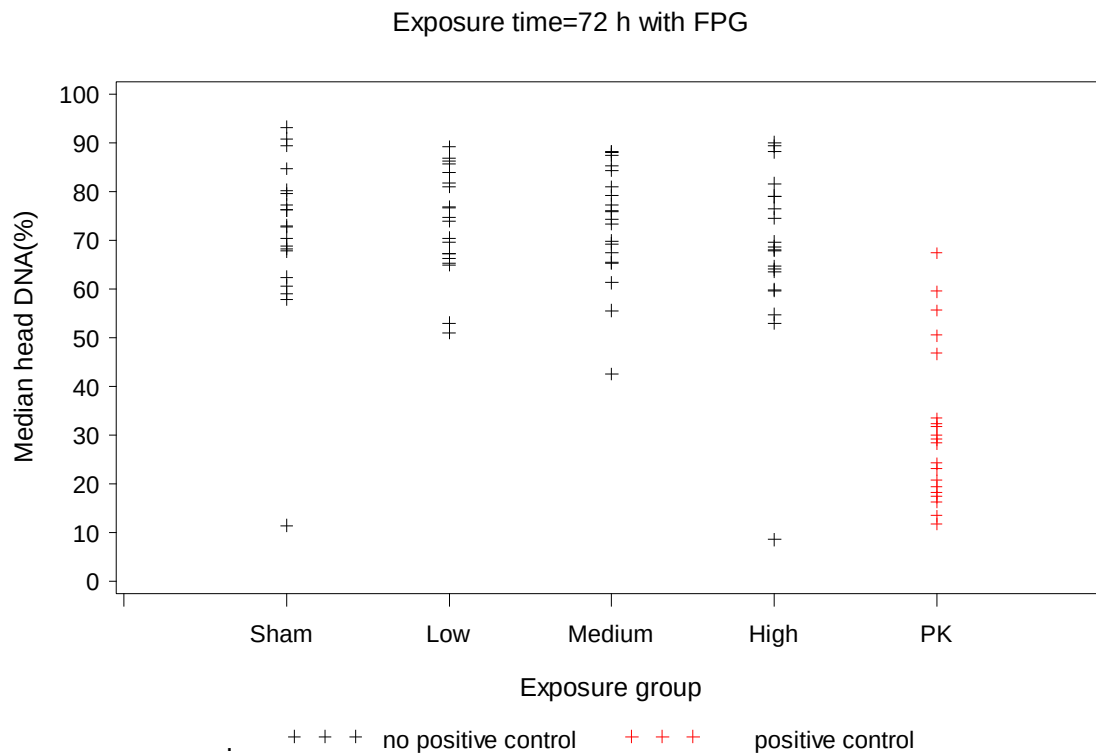


Abbildung 17: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße Median Head DNA (%), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

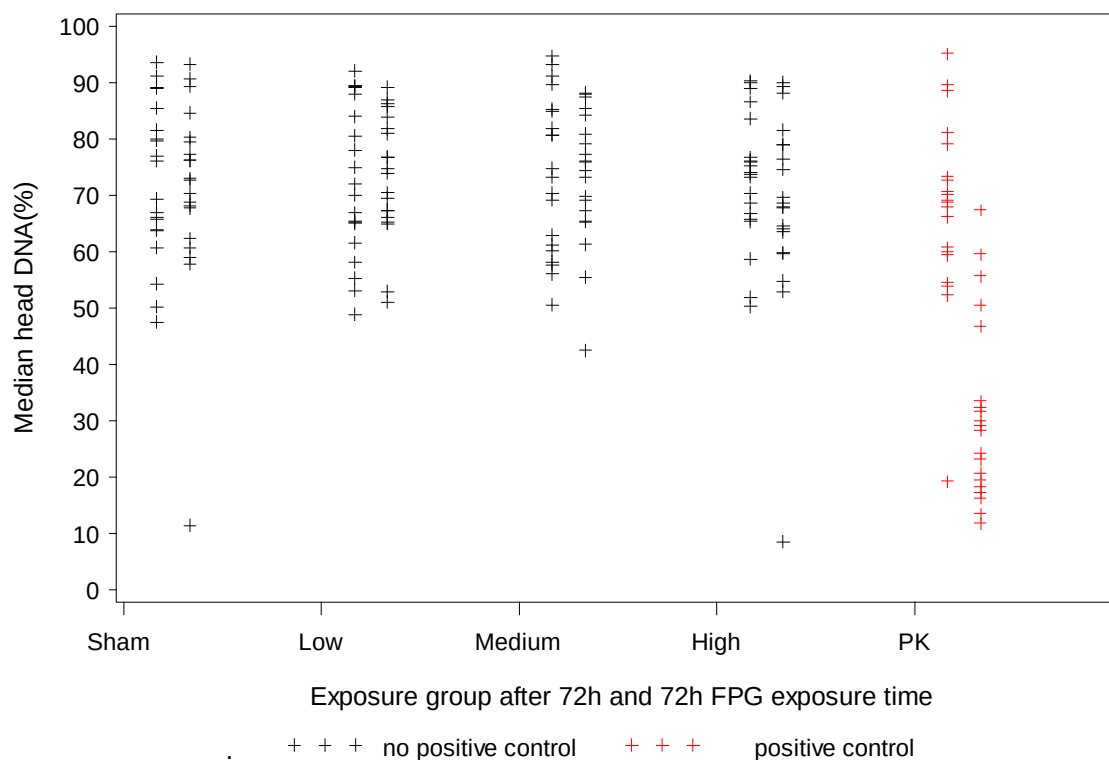


Abbildung 18: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit und ohne FPG-Inkubation, Zielgröße Median Head DNA (%), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

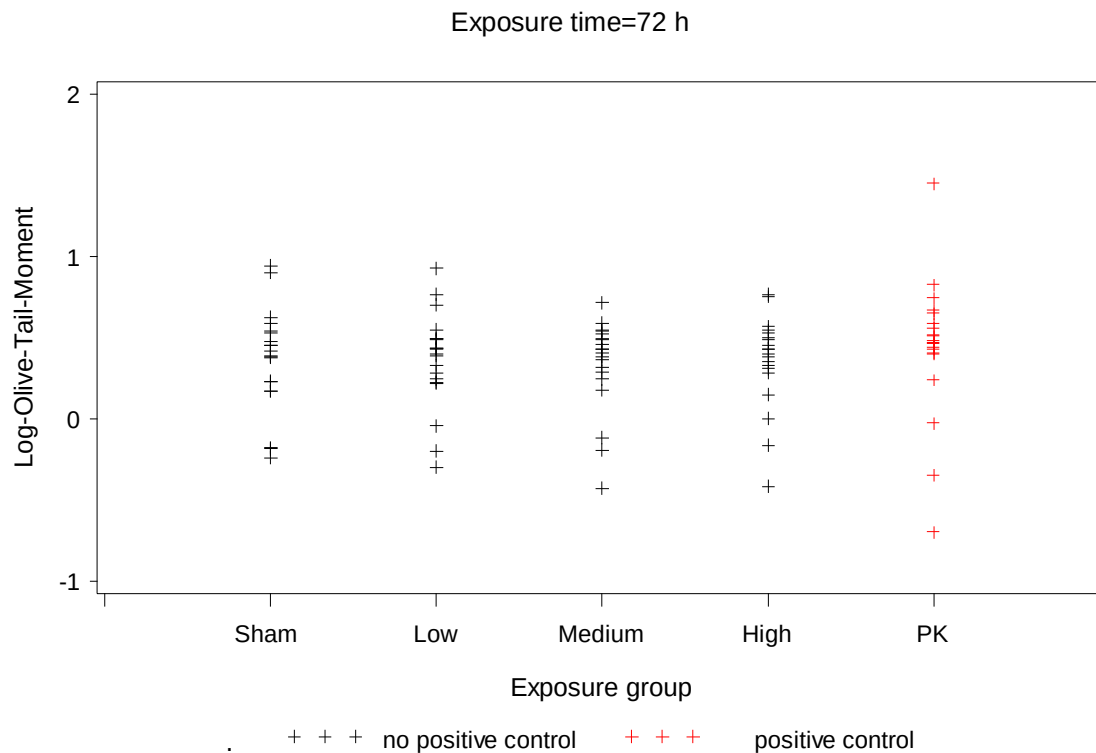


Abbildung 19: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

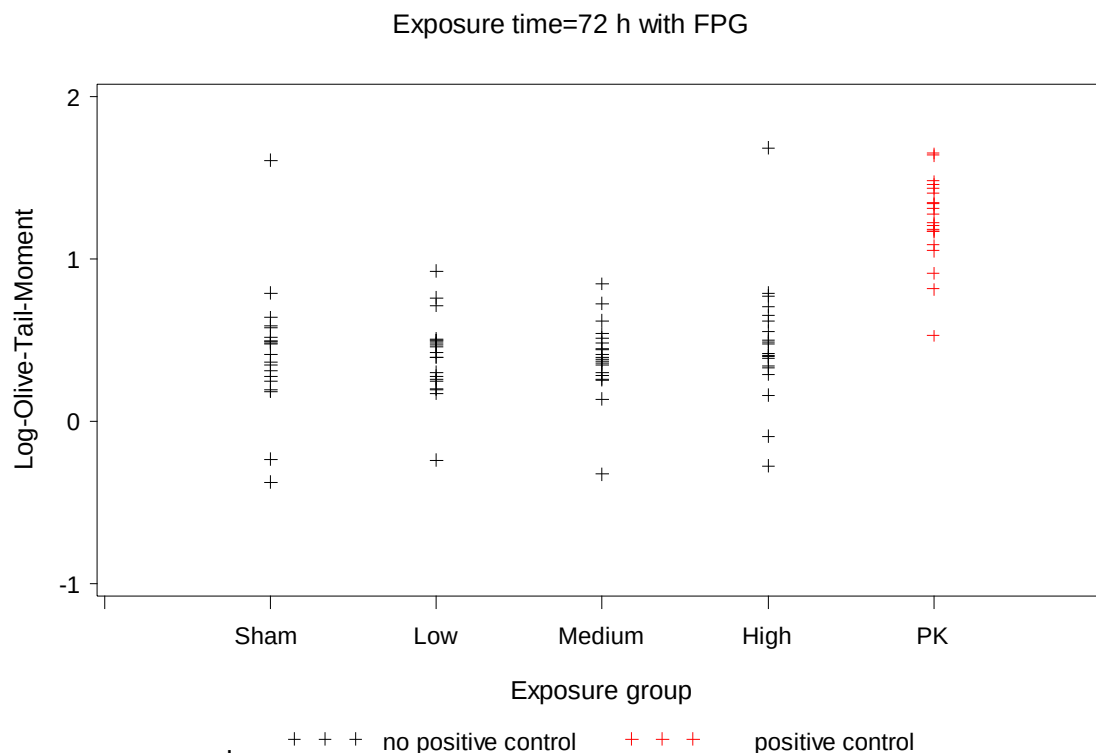


Abbildung 20: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

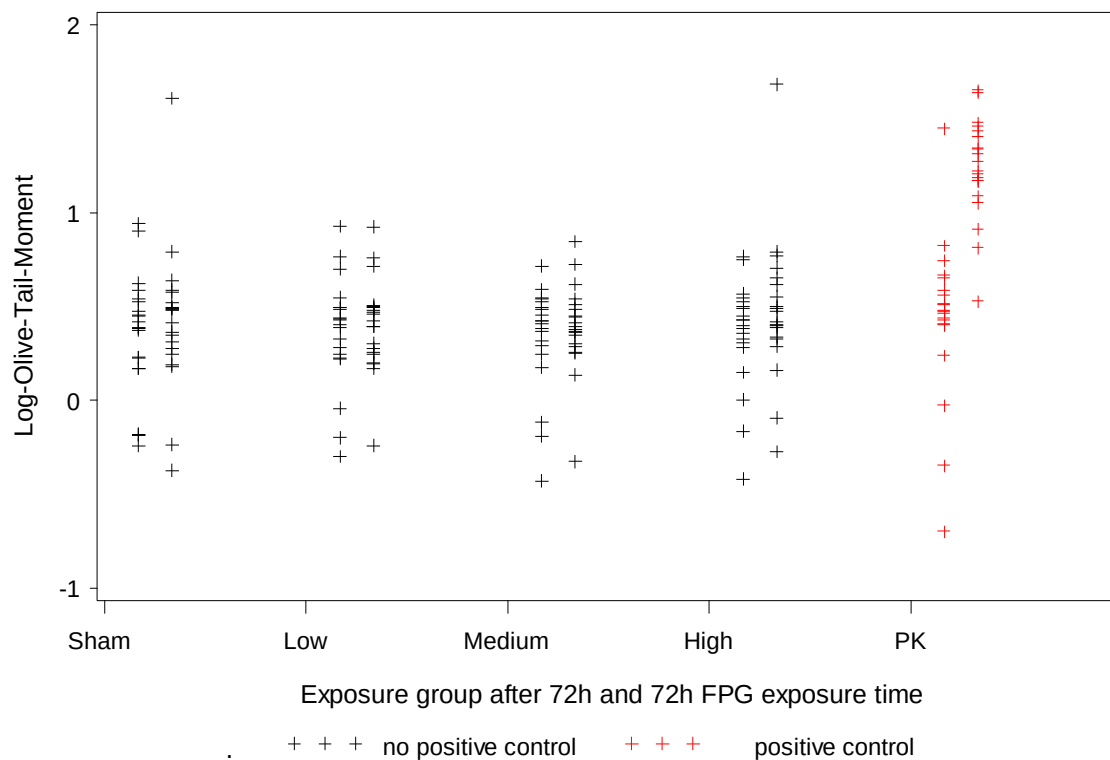


Abbildung 21: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit und ohne FPG-Inkubation, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)
Exposure time=72 h

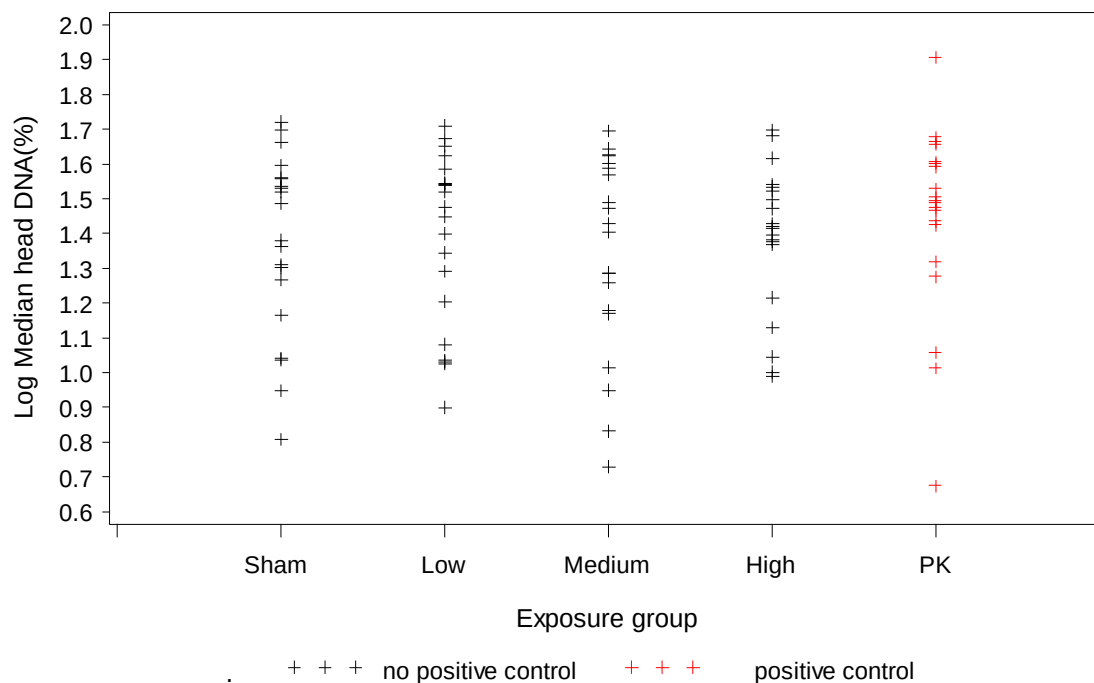


Abbildung 22: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße Log (100-Median Head DNA(%)), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

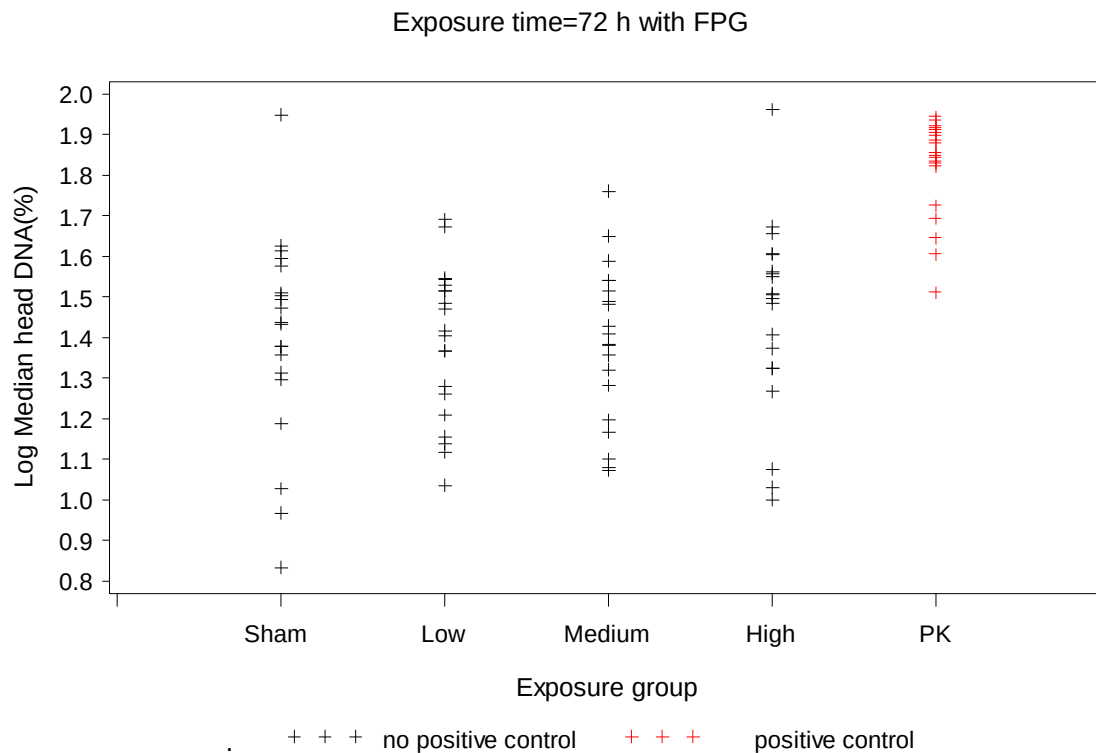


Abbildung 23: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit FPG-Inkubation, Zielgröße Log (100-Median Head DNA(%)), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

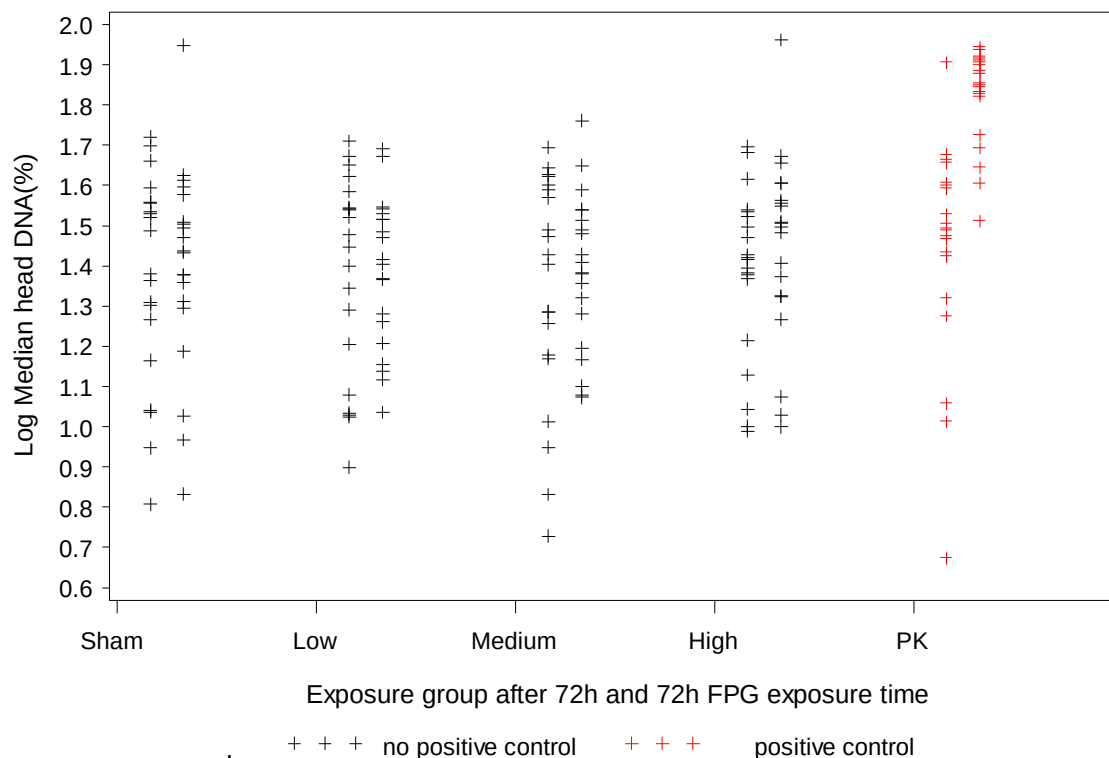


Abbildung 24: Darstellung der Rohdaten für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit und ohne FPG-Inkubation, Zielgröße Log (100-Median Head DNA(%)), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

Mikroerntest

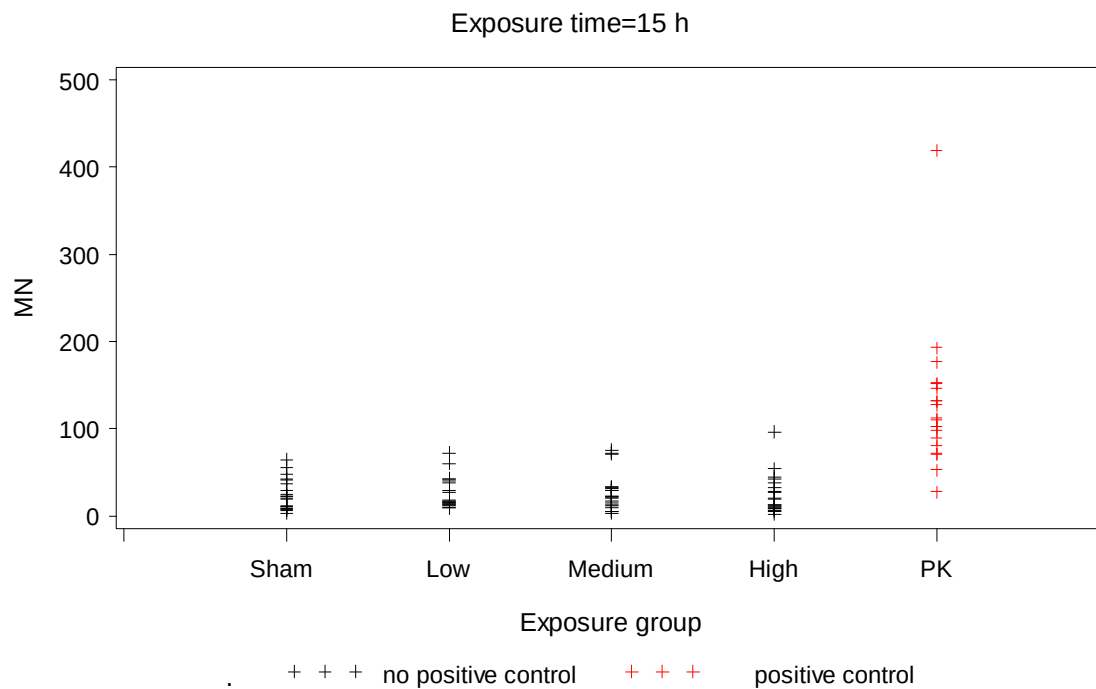


Abbildung 25: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

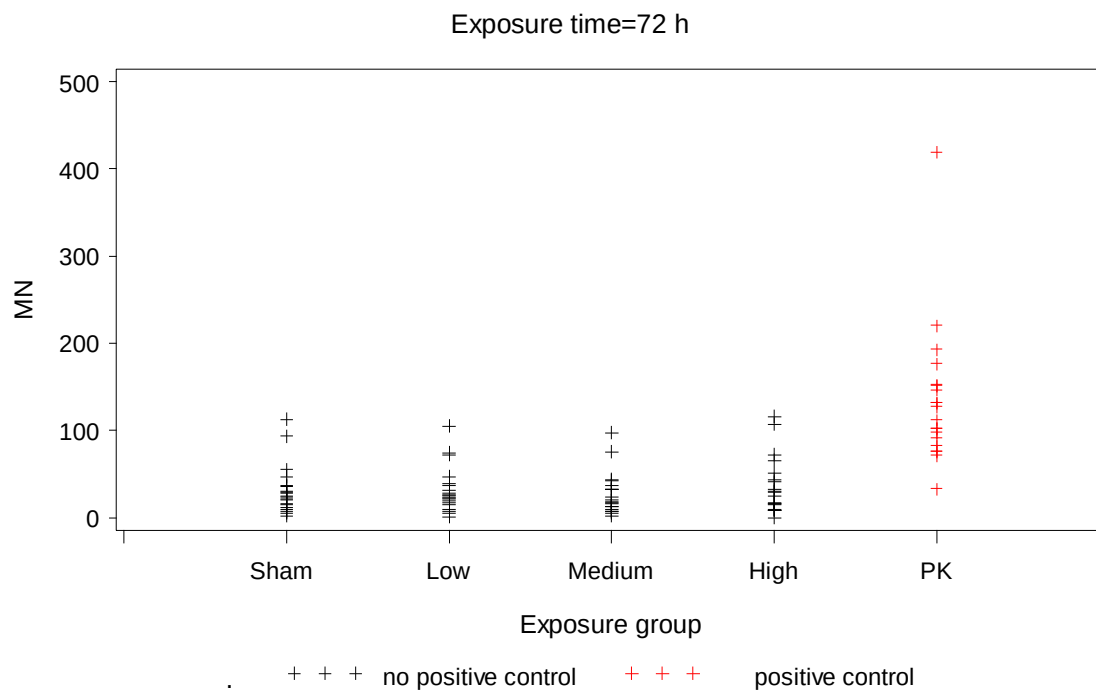


Abbildung 26: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

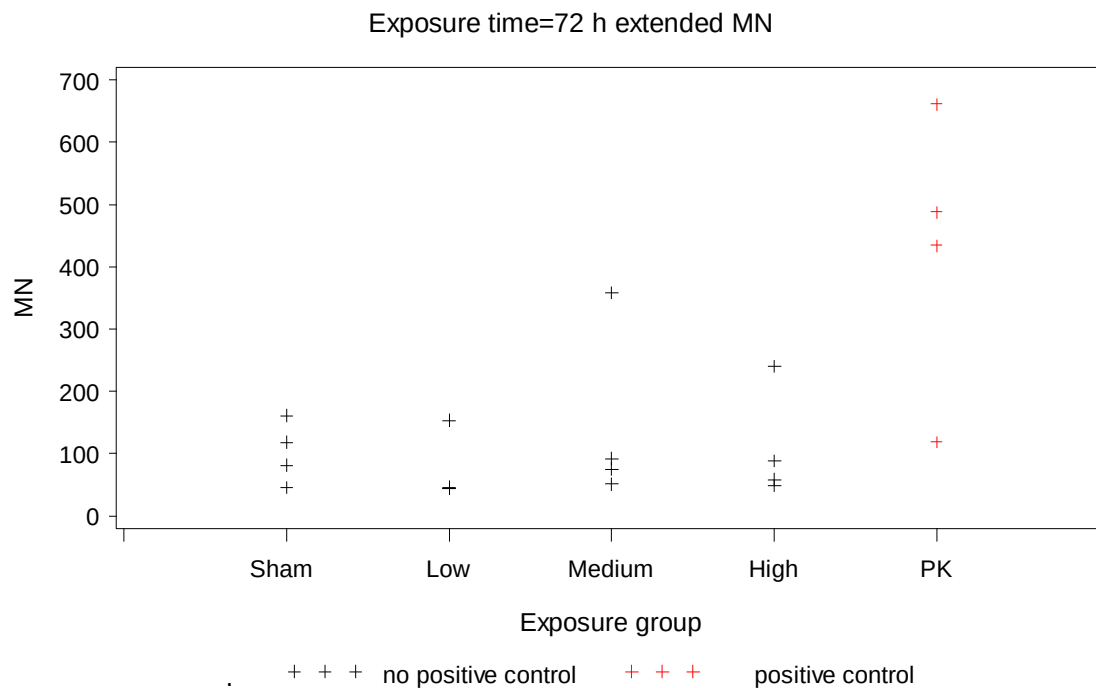


Abbildung 27: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen (PK: 2.000 binukleäre Zellen), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

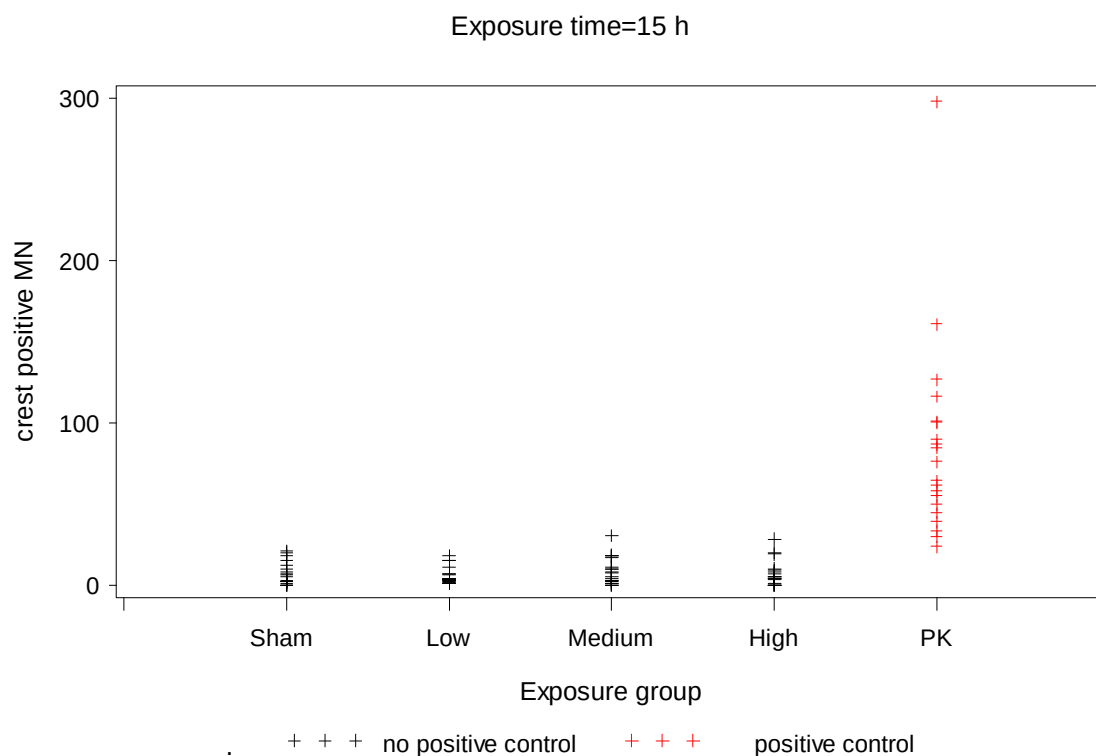


Abbildung 28: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

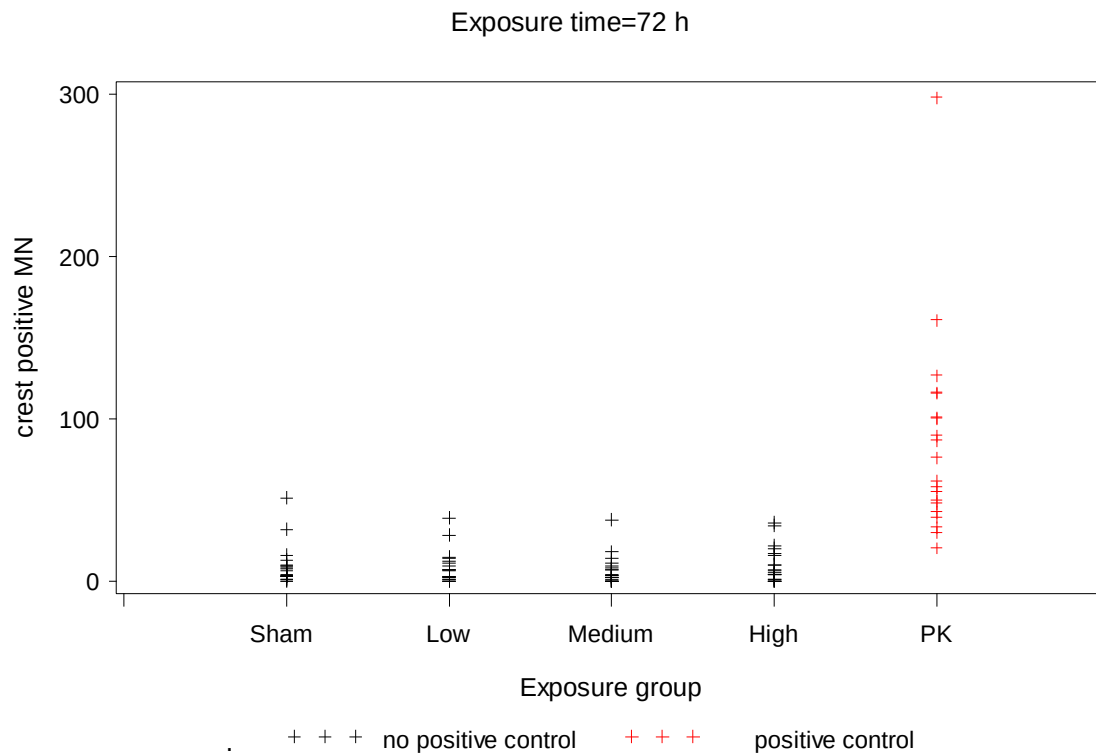


Abbildung 29: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

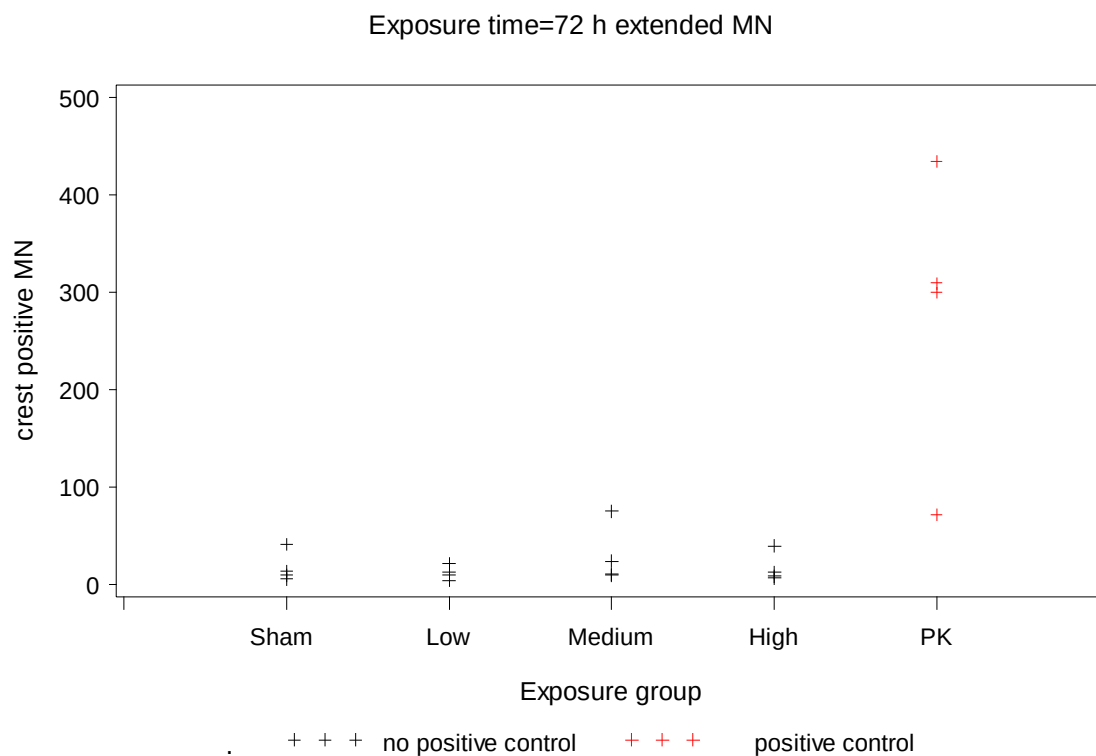


Abbildung 30: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CREST-positive Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen (PK: 2.000 binukleäre Zellen), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

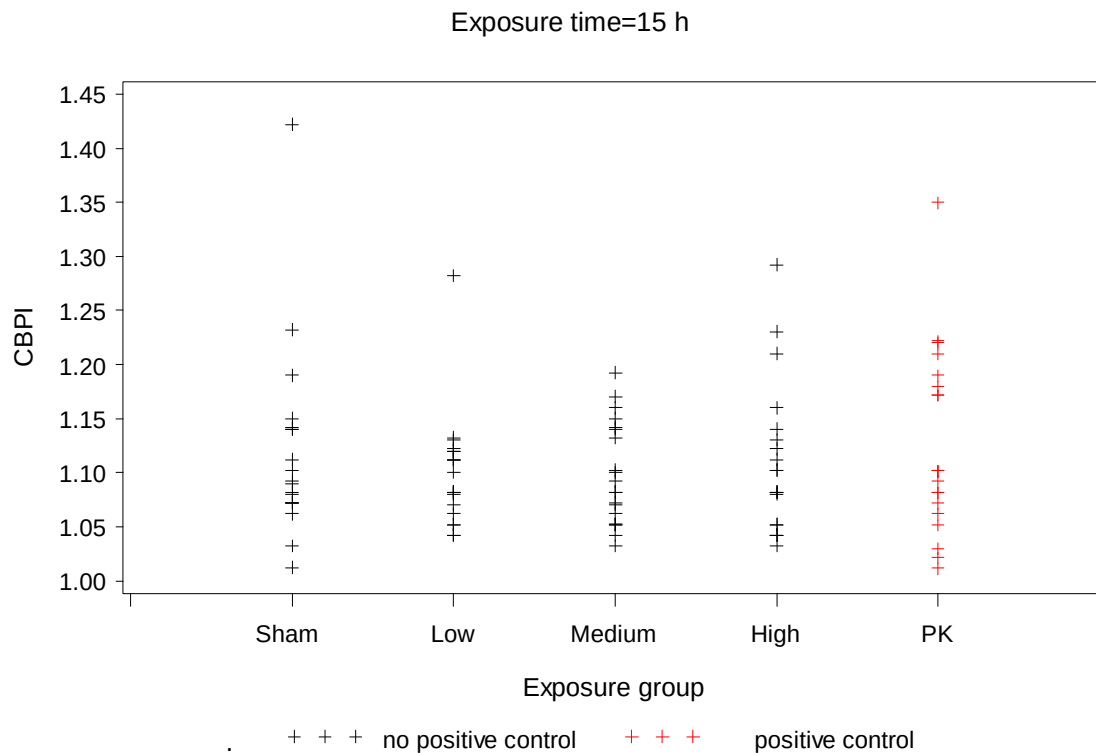


Abbildung 31: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße CBPI Proliferationsindex, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle für die Gentoxizität)

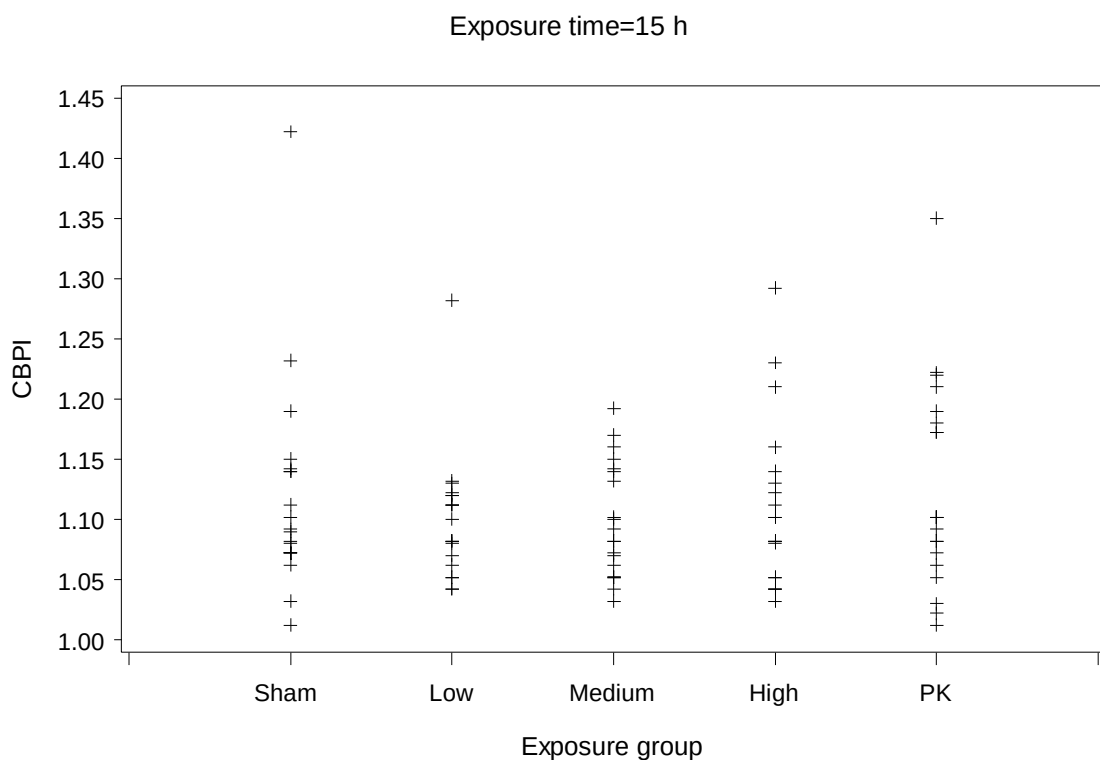


Abbildung 32: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße CBPI Proliferationsindex, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle für die Gentoxizität), PK nicht rot

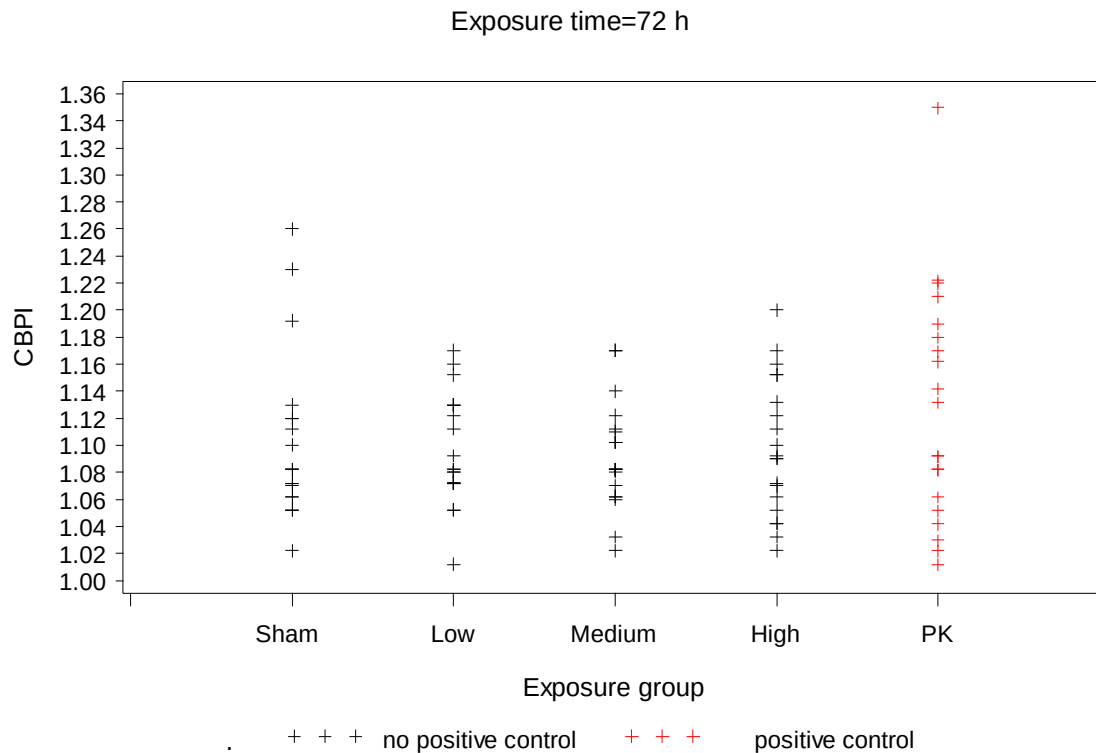


Abbildung 33: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CBPI Proliferationsindex, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle für die Gentoxizität)

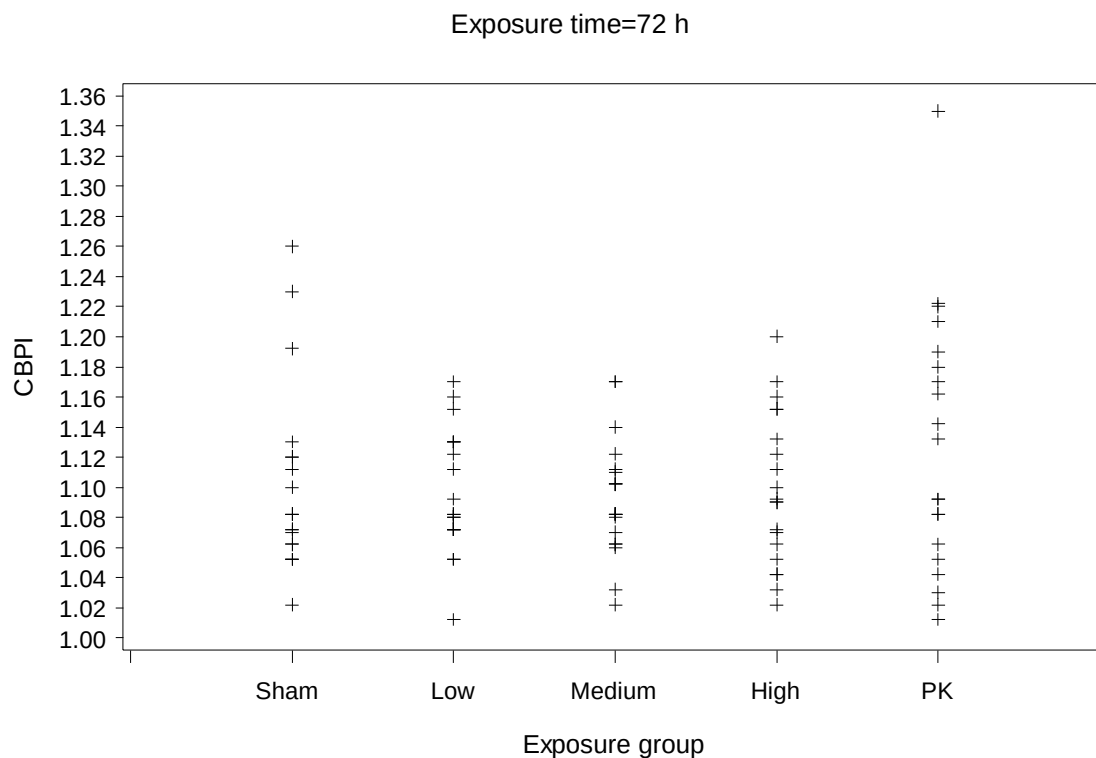


Abbildung 34: Darstellung der Rohdaten für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CBPI Proliferationsindex, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle für die Gentoxizität), PK nicht in rot

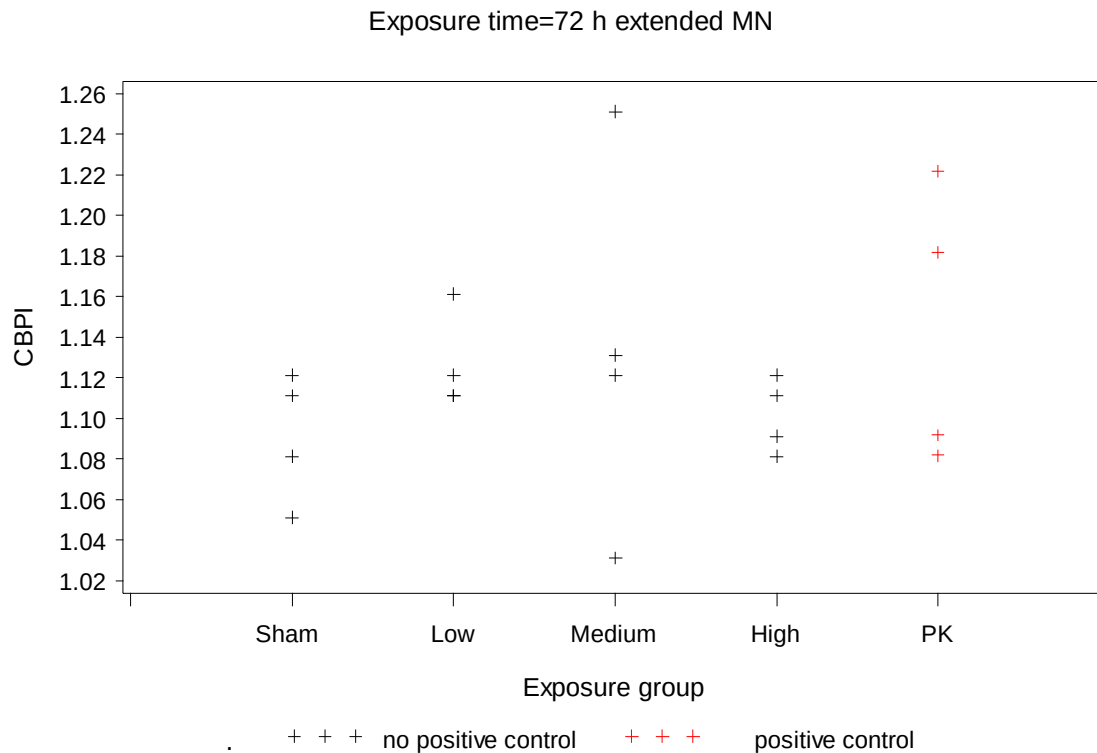


Abbildung 35: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CBPI Proliferationsindex, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle für die Gentoxizität)
Exposure time=72 h extended MN

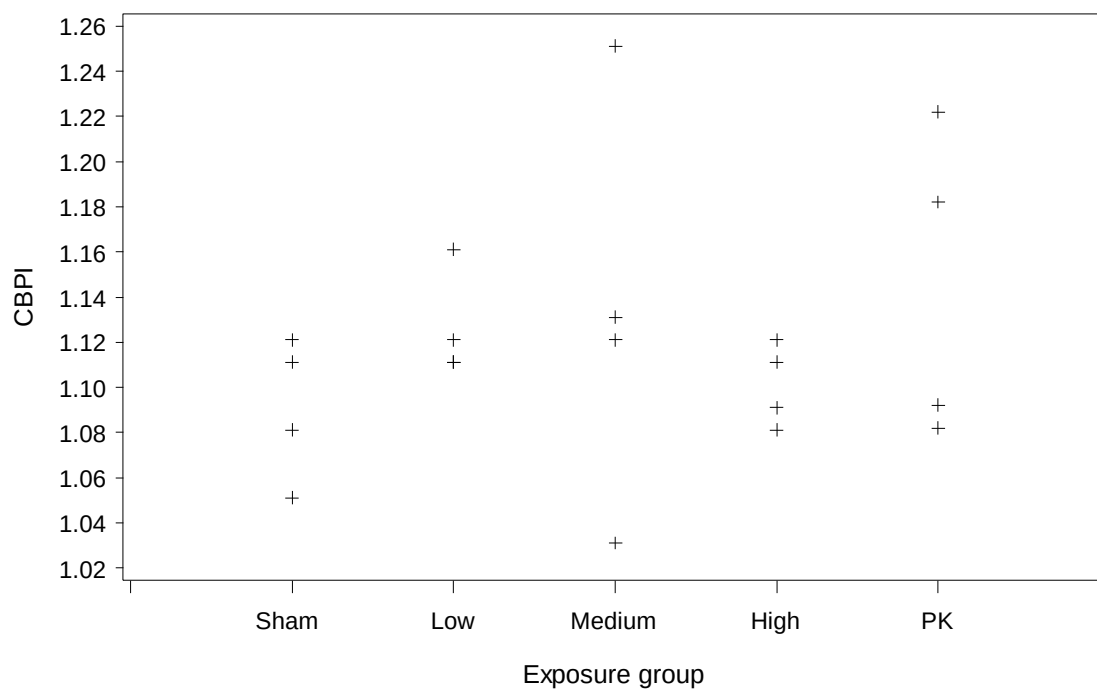


Abbildung 36: Darstellung der Rohdaten für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CBPI Proliferationsindex, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle für die Gentoxizität), PK nicht rot

3.2.4 Chromosomenaberration

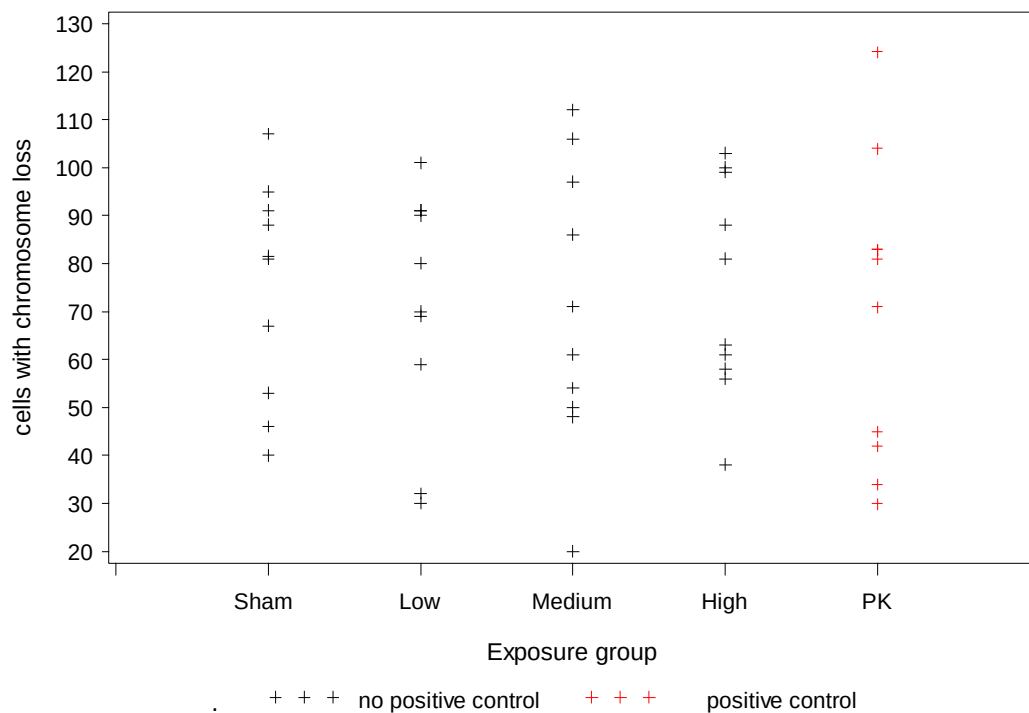


Abbildung 37: Darstellung der Rohdaten für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße Zellen mit Chromosomenverlusten, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

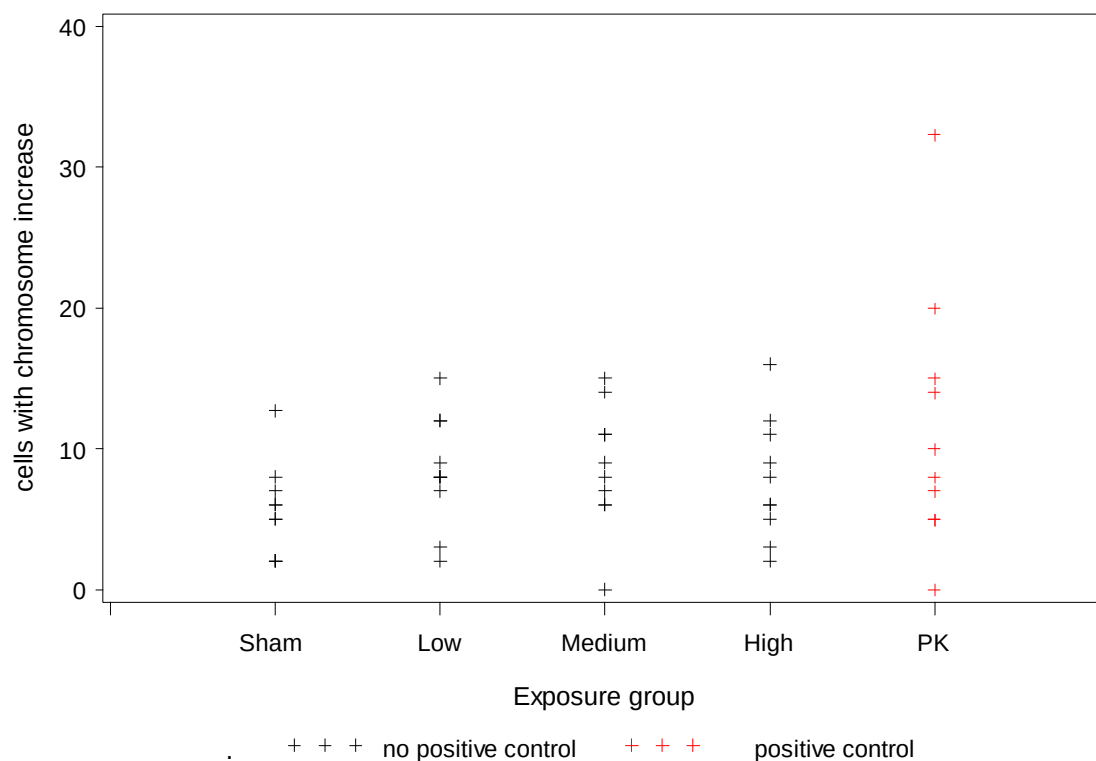


Abbildung 38: Darstellung der Rohdaten für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße Zellen mit zusätzlichen Chromosomen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

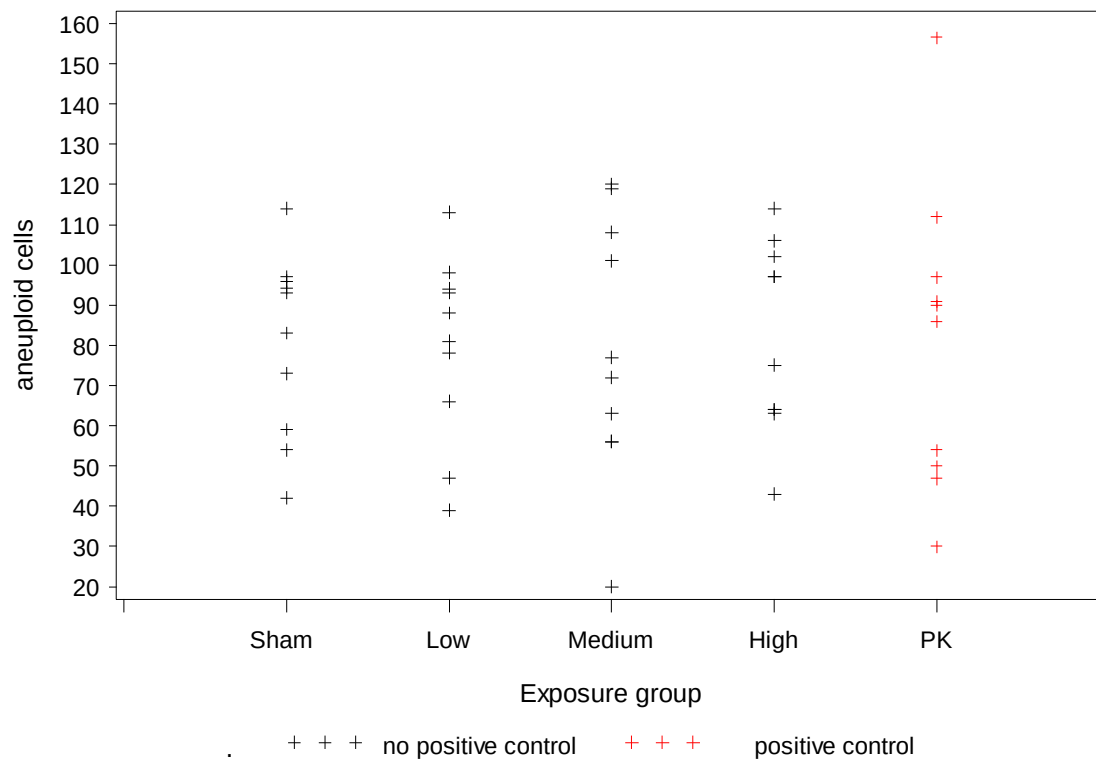


Abbildung 39: Darstellung der Rohdaten für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße aneuploide Zellen insgesamt, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

3.2.5 TUNEL-Apoptose-Test

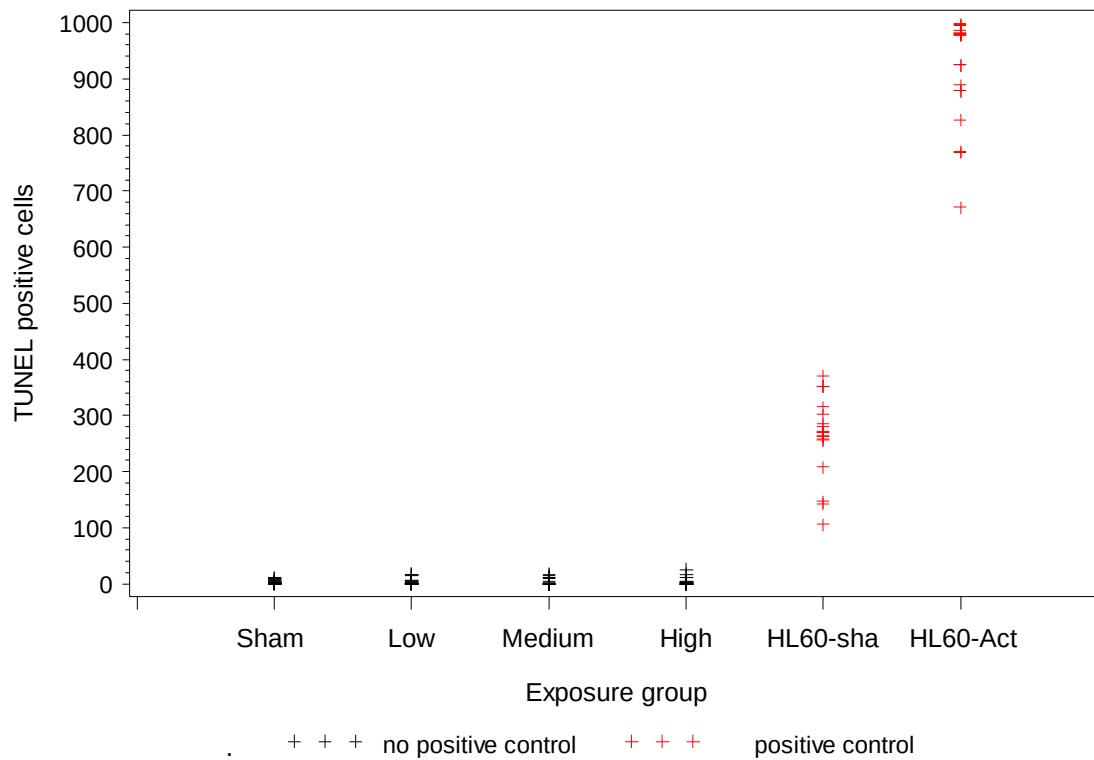


Abbildung 40: Darstellung der Rohdaten für den Test auf apoptotische Ereignisse, Zielgröße TUNEL-positive Zellen in 1.000 Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, HL-60-Sham = Kontrollzelllinie, unbehandelt, HL-60 Act = Kontrollzelllinie, Actinomycin D-behandelt).

3.2.6 Zellzyklus

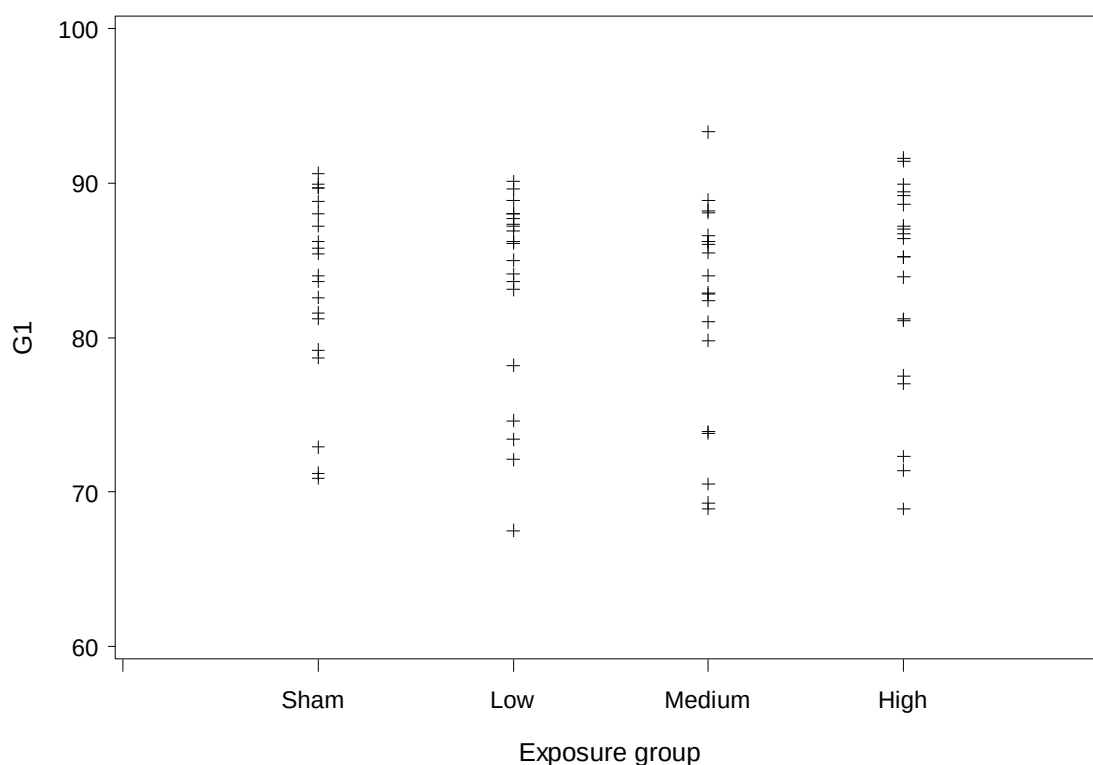


Abbildung 41: Darstellung der Rohdaten für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße G1-Phase-Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg)

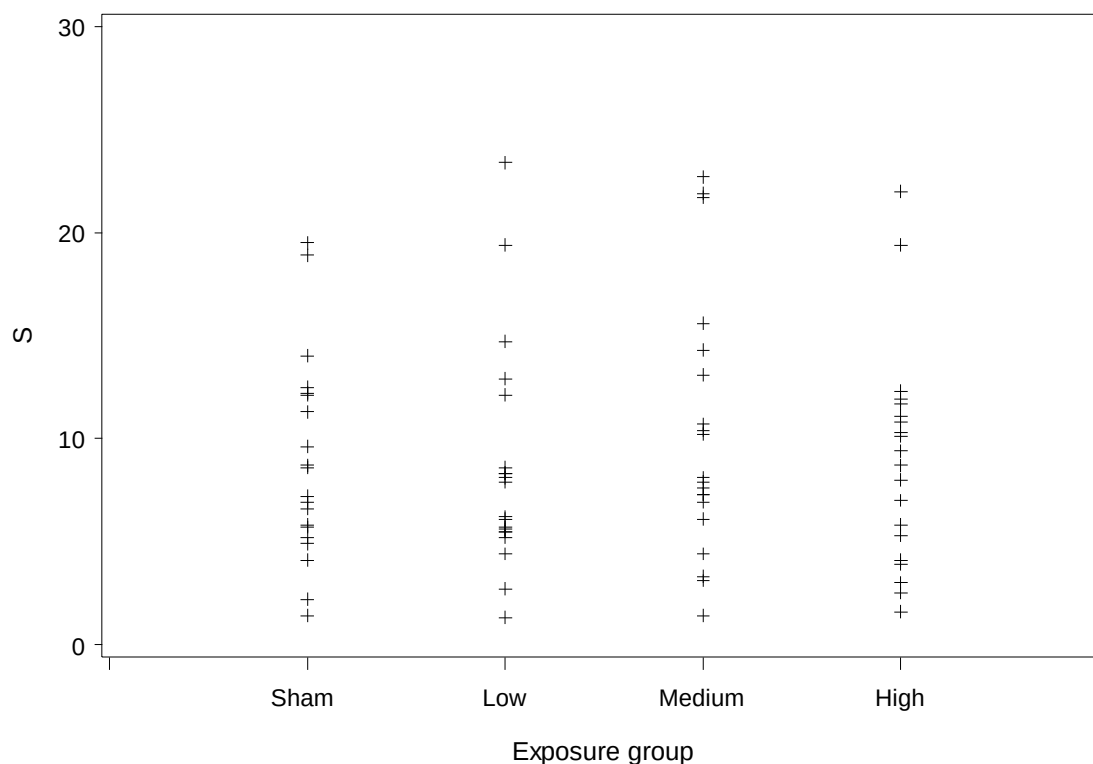


Abbildung 42: Darstellung der Rohdaten für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße S-Phase-Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg)

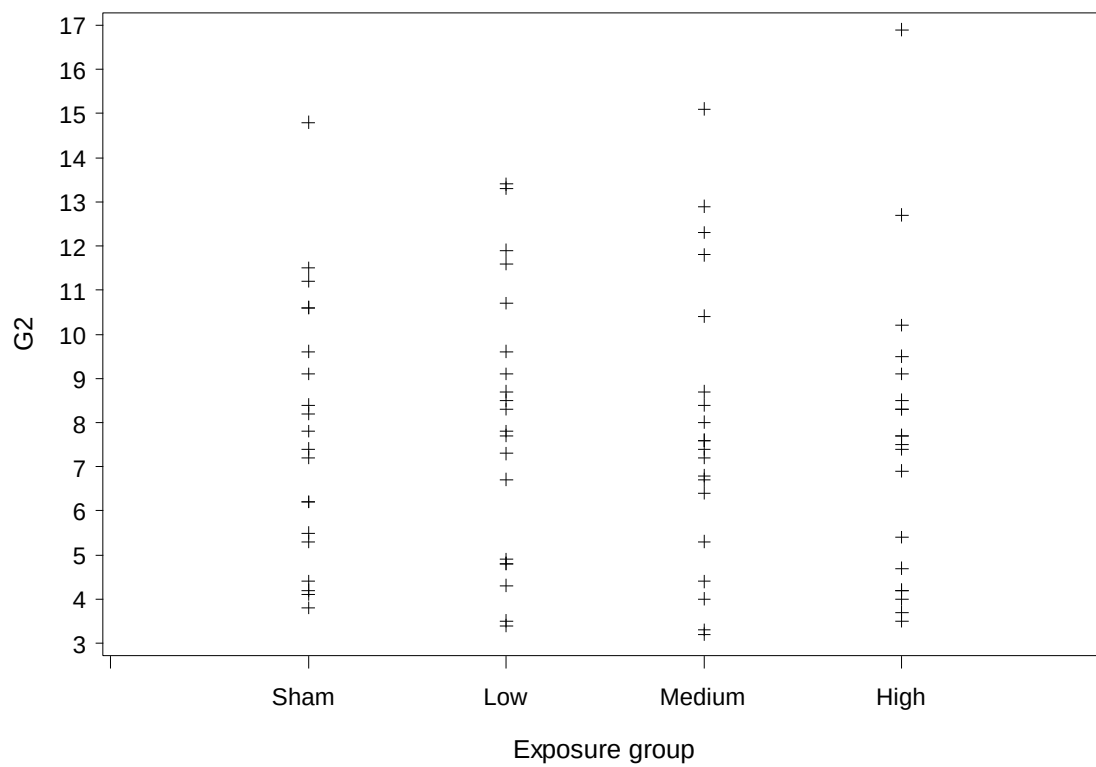


Abbildung 43: Darstellung der Rohdaten für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße G2-Phase-Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg)

3.3 Tabellarische Darstellung der Rohdaten

In den folgenden Tabellen werden die Ergebnisse der Zielvariablen (Rohdaten) der verschiedenen Assays getrennt nach den verschiedenen Expositionsgruppen und Proband aufgeführt. Dabei werden die Expositionsgruppen 1=Sham, 2=low, 3= medium, 4=high, sowie die Positivkontrolle (5) zum direkten Vergleich nebeneinander aufgeführt.

Tabelle 2: Zielvariablen des Comet-Assays (Rohdaten)

Exposure time After 4 h

	<i>Olive-Tail-Moment</i>					<i>Median Head DNA(%)</i>					<i>Log Olive-Tail-Moment</i>					<i>Log (100-Median Head DNA(%))</i>				
	<i>Exposure group</i>					<i>Exposure group</i>					<i>Exposure group</i>					<i>Exposure group</i>				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>PB</i>																				
<i>P10</i>	0.93	2.31	1.68	1.52	35.3	89.6	71.2	89.7	82.5	13.1	-0.03	0.36	0.23	0.18	1.55	1.02	1.46	1.01	1.24	1.94
<i>P11</i>	0.39	0.63	0.47	0.58	24.5	95.2	92.2	93.2	93.2	13.4	-0.41	-0.20	-0.33	-0.24	1.39	0.68	0.89	0.83	0.83	1.94
<i>P12</i>	2.22	2.48	2.76	1.61	21.0	72.5	67.4	68.3	89.2	24.1	0.35	0.39	0.44	0.21	1.32	1.44	1.51	1.50	1.03	1.88
<i>P13</i>	2.25	2.01	1.94	2.33	29.8	62.6	66.2	69.6	58.1	14.1	0.35	0.30	0.29	0.37	1.47	1.57	1.53	1.48	1.62	1.93
<i>P14</i>	2.05	1.89	2.30	2.25	25.5	68.2	72.5	64.9	65.6	19.5	0.31	0.28	0.36	0.35	1.41	1.50	1.44	1.55	1.54	1.91
<i>P15</i>	2.75	1.93	3.34	2.49	21.5	69.9	71.4	70.1	73.7	31.6	0.44	0.29	0.52	0.40	1.33	1.48	1.46	1.48	1.42	1.83
<i>P16</i>	2.31	2.12	2.60	2.15	20.2	64.6	61.4	65.7	62.8	23.8	0.36	0.33	0.41	0.33	1.30	1.55	1.59	1.54	1.57	1.88
<i>P17</i>	1.99	2.20	2.13	2.23	17.3	77.5	75.3	74.7	75.3	26.6	0.30	0.34	0.33	0.35	1.24	1.35	1.39	1.40	1.39	1.87
<i>P18</i>	0.86	0.94	0.42	0.63	4.62	90.2	88.6	94.8	91.3	51.1	-0.07	-0.03	-0.38	-0.20	0.66	0.99	1.06	0.72	0.94	1.69
<i>P19</i>	2.20	2.07	1.92	2.16	37.9	65.8	69.2	69.5	71.4	15.0	0.34	0.32	0.28	0.33	1.58	1.53	1.49	1.48	1.46	1.93
<i>P20</i>	1.48	1.12	1.26	1.64	37.9	81.9	85.2	85.2	80.6	13.3	0.17	0.05	0.10	0.21	1.58	1.26	1.17	1.17	1.29	1.94
<i>P21</i>	0.70	0.91	0.64	0.44	36.3	91.8	90.6	91.6	93.8	20.7	-0.15	-0.04	-0.19	-0.36	1.56	0.91	0.97	0.92	0.79	1.90
<i>P22</i>	0.88	1.23	1.22	0.92	53.4	89.1	85.6	86.4	90.8	14.0	-0.06	0.09	0.09	-0.04	1.73	1.04	1.16	1.13	0.96	1.93
<i>P23</i>	0.33	0.31	0.31	0.24	30.9	91.6	92.2	93.0	94.0	9.47	-0.48	-0.51	-0.51	-0.62	1.49	0.92	0.89	0.85	0.78	1.96
<i>P3</i>	1.28	1.28	1.45	2.00	32.3	92.4	91.7	90.2	87.5	17.4	0.11	0.11	0.16	0.30	1.51	0.88	0.92	0.99	1.10	1.92
<i>P4</i>	1.30	1.49	1.09	1.88	29.3	92.0	89.9	93.3	89.2	22.1	0.11	0.17	0.04	0.27	1.47	0.90	1.01	0.83	1.04	1.89
<i>P5</i>	1.38	1.54	1.32	1.52	19.2	90.3	90.6	91.3	90.7	45.9	0.14	0.19	0.12	0.18	1.28	0.99	0.97	0.94	0.97	1.73
<i>P6</i>	1.59	1.49	1.63	1.17	26.5	73.7	75.7	77.3	80.7	17.6	0.20	0.17	0.21	0.07	1.42	1.42	1.39	1.36	1.29	1.92
<i>P7</i>	3.15	2.61	2.38	2.63	42.3	60.7	81.7	82.9	81.3	11.2	0.50	0.42	0.38	0.42	1.63	1.59	1.26	1.23	1.27	1.95
<i>P8</i>	2.29	3.02	2.13	2.33	35.6	59.0	51.5	65.4	59.0	13.0	0.36	0.48	0.33	0.37	1.55	1.61	1.69	1.54	1.61	1.94
<i>All</i>	1.62	1.68	1.65	1.64	29.1	78.9	78.5	80.8	80.5	20.8	0.14	0.18	0.14	0.14	1.42	1.23	1.26	1.20	1.21	1.89

Exposure time After 16 h

	Olive-Tail-Moment					Median Head DNA(%)					Log Olive-Tail-Moment					Log Median Head DNA(%)				
	Exposure group					Exposure group					Exposure group					Exposure group				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>PB</i>																				
<i>P10</i>	1.37	1.68	1.64	1.36	35.3	84.5	88.2	82.3	85.6	13.1	0.14	0.23	0.21	0.13	1.55	1.19	1.07	1.25	1.16	1.94
<i>P11</i>	0.18	0.17	0.29	0.19	24.5	96.1	95.6	92.8	95.6	13.3	-.74	-.77	-.54	-.72	1.39	0.59	0.65	0.86	0.65	1.94
<i>P12</i>	2.53	2.97	2.53	2.15	21.0	72.0	62.6	67.0	75.7	24.1	0.40	0.47	0.40	0.33	1.32	1.45	1.57	1.52	1.39	1.88
<i>P13</i>	1.92	2.56	1.59	1.54	29.8	67.6	58.7	73.7	71.8	14.1	0.28	0.41	0.20	0.19	1.47	1.51	1.62	1.42	1.45	1.93
<i>P14</i>	1.72	2.08	2.23	3.23	25.5	71.2	67.9	64.4	53.8	19.5	0.24	0.32	0.35	0.51	1.41	1.46	1.51	1.55	1.66	1.91
<i>P15</i>	3.09	3.71	2.61	2.45	21.5	69.3	66.6	70.7	75.8	31.6	0.49	0.57	0.42	0.39	1.33	1.49	1.52	1.47	1.38	1.83
<i>P16</i>	2.41	1.93	2.41	2.08	20.2	65.9	67.0	69.0	66.6	23.8	0.38	0.29	0.38	0.32	1.30	1.53	1.52	1.49	1.52	1.88
<i>P17</i>	2.27	2.03	2.15	2.37	17.3	72.2	77.0	72.2	72.5	26.6	0.36	0.31	0.33	0.37	1.24	1.44	1.36	1.44	1.44	1.87
<i>P18</i>	1.04	1.43	1.30	0.98	4.62	87.1	80.9	80.0	87.6	51.1	0.02	0.16	0.11	-.01	0.66	1.11	1.28	1.30	1.09	1.69
<i>P19</i>	1.52	1.88	2.20	2.05	37.9	76.0	76.6	62.3	64.5	15.0	0.18	0.27	0.34	0.31	1.58	1.38	1.37	1.58	1.55	1.93
<i>P20</i>	2.01	2.78	2.08	1.90	37.9	70.5	69.5	71.0	73.1	13.3	0.30	0.44	0.32	0.28	1.58	1.47	1.48	1.46	1.43	1.94
<i>P21</i>	0.82	0.61	1.05	0.82	36.3	86.3	93.1	85.2	87.7	20.7	-.09	-.21	0.02	-.09	1.56	1.14	0.84	1.17	1.09	1.90
<i>P22</i>	1.50	1.23	1.43	1.54	53.4	82.8	87.0	87.5	83.3	14.0	0.18	0.09	0.16	0.19	1.73	1.24	1.11	1.10	1.22	1.93
<i>P23</i>	0.21	0.36	0.15	0.33	30.9	94.9	89.5	96.7	92.0	9.47	-.68	-.44	-.82	-.48	1.49	0.71	1.02	0.52	0.90	1.96
<i>P3</i>	13.8	4.62	2.81	7.51	27.9	51.6	74.0	83.2	63.4	35.3	1.14	0.66	0.45	0.88	1.45	1.68	1.41	1.23	1.56	1.81
<i>P4</i>	2.37	3.13	2.09	1.72	17.4	88.2	88.5	89.6	91.0	44.0	0.37	0.50	0.32	0.24	1.24	1.07	1.06	1.02	0.95	1.75
<i>P5</i>	1.81	1.91	1.77	1.74	19.2	89.2	87.8	88.6	89.1	45.9	0.26	0.28	0.25	0.24	1.28	1.03	1.09	1.06	1.04	1.73
<i>P6</i>	2.28	3.06	3.60	3.15	26.5	83.8	79.3	74.3	75.9	17.6	0.36	0.49	0.56	0.50	1.42	1.21	1.32	1.41	1.38	1.92
<i>P7</i>	2.28	3.06	3.60	3.15	42.3	83.8	79.3	74.3	75.9	11.2	0.36	0.49	0.56	0.50	1.63	1.21	1.32	1.41	1.38	1.95
<i>P8</i>	3.11	4.48	14.2	5.89	35.6	43.4	61.2	32.3	50.4	13.0	0.49	0.65	1.15	0.77	1.55	1.75	1.59	1.83	1.70	1.94
<i>All</i>	2.41	2.28	2.58	2.31	28.2	76.8	77.5	75.9	76.6	22.8	0.22	0.26	0.26	0.24	1.41	1.28	1.29	1.30	1.30	1.88

Exposure time After 24 h

	Olive-Tail-Moment					Median Head DNA(%)					Log Olive-Tail-Moment					Log (100-Median Head DNA(%))				
	Exposure group					Exposure group					Exposure group					Exposure group				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>PB</i>																				
<i>P10</i>	1.16	1.97	1.41	1.95	35.3	86.9	74.6	81.9	88.9	13.1	0.06	0.29	0.15	0.29	1.55	1.12	1.41	1.26	1.04	1.94
<i>P11</i>	0.43	0.32	0.52	0.25	24.5	88.3	91.8	85.1	93.6	13.3	-.37	-.49	-.28	-.60	1.39	1.07	0.92	1.17	0.81	1.94
<i>P12</i>	2.27	2.22	2.43	2.24	21.0	72.3	64.6	68.4	71.9	24.1	0.36	0.35	0.39	0.35	1.32	1.44	1.55	1.50	1.45	1.88
<i>P13</i>	2.36	2.13	2.37	2.54	29.8	66.6	64.1	60.7	58.6	14.1	0.37	0.33	0.37	0.40	1.47	1.52	1.55	1.59	1.62	1.93
<i>P14</i>	2.15	2.14	2.29	1.77	25.5	71.9	69.7	64.3	77.6	19.5	0.33	0.33	0.36	0.25	1.41	1.45	1.48	1.55	1.35	1.91
<i>P15</i>	1.66	2.54	2.51	3.61	21.5	81.1	69.5	74.1	67.5	31.6	0.22	0.40	0.40	0.56	1.33	1.28	1.48	1.41	1.51	1.83

Exposure time After 24 h

	Olive-Tail-Moment					Median Head DNA(%)					Log Olive-Tail-Moment					Log (100-Median Head DNA(%))				
	Exposure group					Exposure group					Exposure group					Exposure group				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
P16	2.24	2.11	2.02	1.91	20.2	68.4	62.2	65.2	64.0	23.8	0.35	0.32	0.31	0.28	1.30	1.50	1.58	1.54	1.56	1.88
P17	2.25	2.31	2.30	2.86	17.3	73.2	71.2	73.3	64.5	26.6	0.35	0.36	0.36	0.46	1.24	1.43	1.46	1.43	1.55	1.87
P18	0.46	0.70	0.88	0.71	4.62	95.0	91.8	89.3	89.9	51.1	-0.34	-0.15	-0.06	-0.15	0.66	0.70	0.91	1.03	1.00	1.69
P19	2.70	1.89	1.61	1.56	37.9	58.6	69.3	72.1	75.8	15.0	0.43	0.28	0.21	0.19	1.58	1.62	1.49	1.45	1.38	1.93
P20	1.79	1.97	1.98	1.97	37.9	70.6	71.1	74.7	75.2	13.3	0.25	0.29	0.30	0.29	1.58	1.47	1.46	1.40	1.39	1.94
P21	0.53	1.02	0.85	1.09	36.3	94.7	88.8	87.9	87.1	20.7	-0.28	0.01	-0.07	0.04	1.56	0.73	1.05	1.08	1.11	1.90
P22	2.93	3.00	2.79	3.07	53.4	88.5	89.7	86.3	86.6	14.0	0.47	0.48	0.45	0.49	1.73	1.06	1.01	1.14	1.13	1.93
P23	0.23	0.28	0.24	0.26	30.9	94.0	93.6	93.1	92.5	9.47	-0.64	-0.55	-0.62	-0.59	1.49	0.78	0.81	0.84	0.88	1.96
P3	5.77	11.8	4.35	5.00	27.9	72.2	53.9	78.3	78.1	35.3	0.76	1.07	0.64	0.70	1.45	1.44	1.66	1.34	1.34	1.81
P4	5.61	7.05	3.79	10.6	17.4	74.2	68.7	78.6	59.0	44.0	0.75	0.85	0.58	1.03	1.24	1.41	1.50	1.33	1.61	1.75
P5	1.51	1.48	2.12	1.18	19.2	89.9	89.5	86.5	92.4	45.9	0.18	0.17	0.33	0.07	1.28	1.01	1.02	1.13	0.88	1.73
P6	4.57	4.66	3.32	3.84	26.5	72.7	70.5	77.2	74.7	17.6	0.66	0.67	0.52	0.58	1.42	1.44	1.47	1.36	1.40	1.92
P7	4.66	3.84	4.57	3.32	42.3	70.5	74.7	72.7	77.2	11.2	0.67	0.58	0.66	0.52	1.63	1.47	1.40	1.44	1.36	1.95
P8	1.94	1.61	1.83	1.84	35.6	76.7	76.2	79.5	69.2	13.0	0.29	0.21	0.26	0.26	1.55	1.37	1.38	1.31	1.49	1.94
All	2.36	2.75	2.21	2.58	28.2	78.3	75.3	77.5	77.2	22.8	0.24	0.29	0.26	0.27	1.41	1.26	1.33	1.32	1.29	1.88

Exposure time After 72 h

	Olive-Tail-Moment					Median Head DNA(%)					Log Olive-Tail-Moment					Log (100-Median Head DNA(%))				
	Exposure group					Exposure group					Exposure group					Exposure group				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
PB																				
P10	3.35	3.10	2.66	3.08	2.69	54.2	53.0	57.6	50.2	69.2	0.53	0.49	0.42	0.49	0.43	1.66	1.67	1.63	1.70	1.49
P11	0.66	0.90	0.64	1.00	0.20	93.6	89.2	93.2	86.6	95.3	-0.18	-0.05	-0.19	0.00	-0.70	0.81	1.03	0.83	1.13	0.67
P12	2.99	3.51	3.47	3.69	3.26	69.3	65.2	70.3	74.0	66.2	0.48	0.55	0.54	0.57	0.51	1.49	1.54	1.47	1.42	1.53
P13	3.48	2.73	3.49	3.14	6.69	63.8	65.4	61.2	65.3	52.3	0.54	0.44	0.54	0.50	0.83	1.56	1.54	1.59	1.54	1.68
P14	1.47	1.91	1.94	2.13	4.66	76.1	72.0	69.2	65.8	54.6	0.17	0.28	0.29	0.33	0.67	1.38	1.45	1.49	1.53	1.66
P15	1.68	2.12	2.07	2.03	2.75	79.6	78.0	81.9	75.2	68.9	0.23	0.33	0.32	0.31	0.44	1.31	1.34	1.26	1.39	1.49
P16	1.69	2.43	1.75	2.69	2.51	85.4	74.9	80.7	70.4	72.8	0.23	0.39	0.24	0.43	0.40	1.16	1.40	1.29	1.47	1.44
P17	2.62	5.00	2.32	2.26	2.96	65.7	58.1	74.7	73.7	70.2	0.42	0.70	0.37	0.35	0.47	1.53	1.62	1.40	1.42	1.47
P18	2.83	5.81	5.17	5.63	3.63	66.1	48.8	50.6	51.9	60.8	0.45	0.76	0.71	0.75	0.56	1.53	1.71	1.69	1.68	1.59
P19	2.40	1.75	2.85	3.50	4.46	81.6	89.3	85.3	73.3	67.9	0.38	0.24	0.45	0.54	0.65	1.27	1.03	1.17	1.43	1.51
P20	7.97	2.67	2.41	1.90	0.94	50.1	65.0	73.3	76.7	88.6	0.90	0.43	0.38	0.28	-0.03	1.70	1.54	1.43	1.37	1.06
P21	0.57	0.50	0.37	0.38	0.45	89.1	89.4	94.7	90.3	89.7	-0.24	-0.30	-0.43	-0.42	-0.35	1.04	1.02	0.73	0.99	1.01
P22	3.85	8.42	3.33	5.80	2.90	76.9	70.1	80.7	76.2	73.4	0.59	0.93	0.52	0.76	0.46	1.36	1.48	1.28	1.38	1.43

Exposure time After 72 h

	Olive-Tail-Moment					Median Head DNA(%)					Log Olive-Tail-Moment					Log (100-Median Head DNA(%))				
	Exposure group					Exposure group					Exposure group					Exposure group				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
P23	0.65	0.63	0.76	0.68	28.2	91.2	92.1	91.1	88.9	19.2	-0.19	-0.20	-0.12	-0.17	1.45	0.95	0.90	0.95	1.04	1.91
P3	2.44	2.51	3.10	2.40	3.02	64.0	66.9	58.1	68.7	60.0	0.39	0.40	0.49	0.38	0.48	1.56	1.52	1.62	1.50	1.60
P4	8.72	3.11	2.55	2.82	1.74	66.9	80.5	85.0	83.6	79.1	0.94	0.49	0.41	0.45	0.24	1.52	1.29	1.18	1.21	1.32
P5	1.47	1.65	1.49	1.40	2.55	89.0	88.0	89.7	90.0	81.1	0.17	0.22	0.17	0.15	0.41	1.04	1.08	1.01	1.00	1.28
P6	4.19	3.05	3.05	3.35	3.87	47.5	55.3	56.0	58.7	59.5	0.62	0.48	0.48	0.53	0.59	1.72	1.65	1.64	1.62	1.61
P7	2.36	1.67	2.66	2.69	5.56	79.9	84.0	62.9	75.9	53.8	0.37	0.22	0.42	0.43	0.75	1.30	1.20	1.57	1.38	1.66
P8	2.81	2.70	3.88	2.50	3.23	60.7	61.5	60.2	66.8	70.6	0.45	0.43	0.59	0.40	0.51	1.59	1.59	1.60	1.52	1.47
All	2.91	2.81	2.50	2.65	4.31	72.5	72.3	73.8	73.1	67.7	0.36	0.36	0.33	0.35	0.44	1.37	1.38	1.34	1.39	1.44

Exposure time After 72 h with FPG

	Olive-Tail-Moment					Median Head DNA(%)					Log Olive-Tail-Moment					Log (100-Median Head DNA(%))				
	Exposure group					Exposure group					Exposure group					Exposure group				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
PB																				
P10	1.76	1.80	2.79	4.11	11.3	84.6	76.8	67.3	52.9	28.3	0.25	0.26	0.45	0.61	1.05	1.19	1.37	1.51	1.67	1.86
P11	2.57	2.47	1.80	2.44	3.38	77.2	76.7	87.4	81.5	67.5	0.41	0.39	0.26	0.39	0.53	1.36	1.37	1.10	1.27	1.51
P12	3.12	3.11	2.57	3.16	20.5	68.9	67.2	75.9	69.6	30.0	0.49	0.49	0.41	0.50	1.31	1.49	1.52	1.38	1.48	1.85
P13	3.04	3.14	4.14	3.56	16.7	62.3	66.1	55.4	59.8	29.2	0.48	0.50	0.62	0.55	1.22	1.58	1.53	1.65	1.60	1.85
P14	1.55	1.56	1.92	1.93	18.8	76.2	74.7	69.8	68.7	23.1	0.19	0.19	0.28	0.29	1.27	1.38	1.40	1.48	1.50	1.89
P15	1.89	1.76	2.22	4.46	6.53	79.5	81.8	79.1	67.7	59.6	0.28	0.25	0.35	0.65	0.81	1.31	1.26	1.32	1.51	1.61
P16	2.05	1.89	1.78	2.18	22.1	67.7	74.0	76.0	64.6	16.3	0.31	0.28	0.25	0.34	1.34	1.51	1.42	1.38	1.55	1.92
P17	2.31	2.87	2.29	2.12	43.7	73.0	69.5	74.4	76.4	13.5	0.36	0.46	0.36	0.33	1.64	1.43	1.48	1.41	1.37	1.94
P18	2.21	5.15	2.77	2.50	16.1	72.7	52.9	69.2	68.0	31.7	0.34	0.71	0.44	0.40	1.21	1.44	1.67	1.49	1.51	1.83
P19	3.00	2.47	2.47	2.52	12.3	80.3	83.9	84.3	78.9	50.6	0.48	0.39	0.39	0.40	1.09	1.30	1.21	1.20	1.32	1.69
P20	4.35	3.21	2.33	5.89	8.19	68.2	65.2	77.3	63.5	55.7	0.64	0.51	0.37	0.77	0.91	1.50	1.54	1.36	1.56	1.65
P21	0.42	0.57	0.47	0.53	25.3	90.7	86.9	88.0	88.1	11.8	-0.38	-0.24	-0.33	-0.28	1.40	0.97	1.12	1.08	1.07	1.95
P22	3.86	8.38	5.27	6.16	27.3	76.2	70.4	73.2	74.5	33.5	0.59	0.92	0.72	0.79	1.44	1.38	1.47	1.43	1.41	1.82
P23	0.58	2.00	1.36	0.80	45.1	93.2	85.7	88.2	89.3	17.3	-0.24	0.30	0.13	-0.10	1.65	0.83	1.15	1.07	1.03	1.92
P3	3.09	2.95	3.24	2.98	21.8	57.8	64.9	61.3	59.6	19.4	0.49	0.47	0.51	0.47	1.34	1.63	1.55	1.59	1.61	1.91
P4	6.16	3.01	3.45	3.08	15.3	70.4	80.9	80.9	79.0	24.3	0.79	0.48	0.54	0.49	1.18	1.47	1.28	1.28	1.32	1.88
P5	1.51	1.47	1.99	1.44	14.8	89.4	89.2	85.4	90.0	46.8	0.18	0.17	0.30	0.16	1.17	1.03	1.04	1.17	1.00	1.73
P6	3.75	5.71	6.98	5.06	30.3	59.0	51.0	42.4	54.7	20.7	0.57	0.76	0.84	0.70	1.48	1.61	1.69	1.76	1.66	1.90
P7	40.4	1.58	3.04	48.1	28.9	11.3	86.2	65.4	8.47	18.2	1.61	0.20	0.48	1.68	1.46	1.95	1.14	1.54	1.96	1.91
P8	3.29	2.65	2.39	2.60	14.8	60.6	67.3	65.3	64.0	32.4	0.52	0.42	0.38	0.41	1.17	1.60	1.51	1.54	1.56	1.83
All	4.55	2.89	2.76	5.28	20.1	70.9	73.6	73.3	68.0	31.5	0.42	0.39	0.39	0.48	1.23	1.40	1.39	1.39	1.45	1.82

Tabelle 3: Zielvariablen des Mikrokerntests (Rohdaten)*Exposure time After 15 h*

	<i>MN</i>					<i>crest positive MN</i>					<i>CBPI</i>				
	<i>Exposure group</i>					<i>Exposure group</i>					<i>Exposure group</i>				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>PB</i>															
<i>P10</i>	42.6	42.7	11.8	26.8	132	9.91	14.9	0.00	4.97	100	1.19	1.10	1.15	1.16	1.19
<i>P11</i>	64.6	71.9	71.9	96.5	80.8	6.95	3.00	18.0	19.9	33.5	1.42	1.28	1.19	1.29	1.17
<i>P12</i>	28.9	37.5	30.9	32.0	52.9	5.98	3.95	11.0	5.00	39.0	1.08	1.05	1.13	1.04	1.07
<i>P13</i>	24.8	13.8	16.6	27.5	194	1.98	1.62	2.92	3.93	76.3	1.09	1.07	1.07	1.08	1.03
<i>P14</i>	8.44	14.8	12.6	7.86	113	1.88	2.96	0.97	3.93	89.8	1.15	1.08	1.14	1.14	1.21
<i>P15</i>	11.0	29.0	75.6	7.78	103	0.00	7.00	7.85	0.00	30.0	1.06	1.11	1.04	1.05	1.01
<i>P16</i>	3.00	12.0	4.99	10.9	111	0.00	3.00	1.99	0.00	84.7	1.07	1.13	1.08	1.11	1.10
<i>P17</i>	22.6	26.8	20.7	11.9	71.6	20.7	14.9	17.8	9.94	49.7	1.01	1.04	1.03	1.03	1.06
<i>P18</i>	20.9	8.93	4.96	4.90	27.7	7.96	1.98	0.00	0.00	23.7	1.23	1.11	1.07	1.10	1.10
<i>P19</i>	47.9	59.7	71.2	44.9	102	12.0	11.0	30.2	19.0	55.0	1.10	1.08	1.05	1.05	1.02
<i>P20</i>	36.5	15.8	32.8	37.8	147	17.8	0.99	17.9	6.97	127	1.09	1.06	1.06	1.10	1.08
<i>P21</i>	6.82	16.9	15.0	12.9	177	1.95	5.98	1.00	7.94	161	1.07	1.08	1.09	1.08	1.05
<i>P22</i>	10.8	14.9	22.0	18.9	89.3	2.95	2.99	5.00	0.99	44.6	1.11	1.11	1.10	1.08	1.10
<i>P23</i>	41.0	42.7	29.6	54.0	152	15.0	17.9	9.88	28.0	101	1.07	1.05	1.05	1.04	1.09
<i>P3</i>	22.6	16.2	21.9	12.6	127	1.88	3.80	10.0	3.89	57.8	1.14	1.13	1.17	1.13	1.35
<i>P4</i>	19.7	39.7	22.4	5.90	153	4.93	6.95	3.73	0.00	116	1.14	1.12	1.16	1.21	1.22
<i>P5</i>	5.99	13.0	9.89	20.6	419	0.00	1.00	2.97	4.91	298	1.07	1.08	1.08	1.08	1.17
<i>P6</i>	55.9	18.4	28.6	42.5	132	20.0	3.88	7.63	8.89	86.9	1.14	1.12	1.14	1.12	1.22
<i>P7</i>	11.9	13.0	33.0	8.99	71.1	0.00	2.99	17.0	3.00	64.2	1.03	1.04	1.05	1.04	1.08
<i>P8</i>	8.17	9.82	2.99	1.94	97.8	0.91	0.98	0.00	0.00	61.8	1.08	1.12	1.10	1.23	1.18
<i>All</i>	24.7	25.9	27.0	24.4	128	6.63	5.58	8.29	6.56	85.0	1.12	1.10	1.10	1.11	1.13

Exposure time After 72 h

	<i>MN</i>					<i>crest positive MN</i>					<i>CBPI</i>				
	<i>Exposure group</i>					<i>Exposure group</i>					<i>Exposure group</i>				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>PB</i>															
<i>P10</i>	46.7	46.9	32.9	50.6	132	12.9	5.99	1.99	9.92	100	1.10	1.08	1.06	1.09	1.19
<i>P11</i>	23.9	21.9	32.0	25.0	76.4	2.98	2.98	8.99	4.99	42.6	1.11	1.12	1.12	1.11	1.08
<i>P12</i>	36.1	19.6	32.9	29.9	33.2	3.90	2.94	3.98	3.99	20.5	1.08	1.07	1.03	1.06	1.04
<i>P13</i>	20.4	39.0	16.5	15.3	194	7.41	14.6	1.95	3.61	76.3	1.23	1.13	1.17	1.16	1.03
<i>P14</i>	9.00	4.73	9.34	15.8	113	3.00	0.00	0.00	3.95	89.8	1.13	1.16	1.14	1.17	1.21
<i>P15</i>	55.0	71.9	42.1	65.7	103	15.7	12.0	7.84	21.6	30.0	1.02	1.01	1.02	1.02	1.01

Exposure time After 72 h

	<i>MN</i>					<i>crest positive MN</i>					<i>CBPI</i>				
	<i>Exposure group</i>					<i>Exposure group</i>					<i>Exposure group</i>				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>P16</i>	14.7	9.67	6.90	9.82	82.6	2.95	0.97	0.00	0.00	39.4	1.05	1.05	1.08	1.04	1.16
<i>P17</i>	21.9	22.9	15.9	16.9	71.6	8.95	13.9	6.95	5.98	49.7	1.08	1.08	1.11	1.07	1.06
<i>P18</i>	11.9	23.7	13.0	7.97	91.5	2.99	8.90	3.00	1.00	33.1	1.06	1.09	1.10	1.15	1.13
<i>P19</i>	113	74.0	75.4	107	102	50.9	28.0	17.9	33.9	55.0	1.05	1.05	1.06	1.03	1.02
<i>P20</i>	16.0	26.0	18.0	72.0	147	3.00	7.00	3.00	20.0	127	1.06	1.07	1.08	1.04	1.08
<i>P21</i>	30.0	28.0	19.9	40.8	177	9.99	6.99	10.9	16.9	161	1.07	1.15	1.08	1.12	1.05
<i>P22</i>	24.9	15.0	13.0	43.8	76.6	5.98	2.00	2.00	15.9	47.7	1.08	1.07	1.10	1.09	1.14
<i>P23</i>	28.7	36.8	36.9	31.9	152	8.90	10.9	6.98	6.97	101	1.05	1.07	1.06	1.05	1.09
<i>P3</i>	36.7	31.5	43.2	28.8	127	7.94	6.88	13.8	9.92	57.8	1.26	1.17	1.17	1.20	1.35
<i>P4</i>	6.81	16.9	4.80	8.22	153	0.00	1.99	0.00	0.00	116	1.12	1.13	1.11	1.10	1.22
<i>P5</i>	4.98	6.83	6.81	7.96	419	0.00	0.00	0.00	1.00	298	1.07	1.13	1.07	1.07	1.17
<i>P6</i>	93.3	105	97.0	116	132	31.8	38.8	37.6	35.8	86.9	1.19	1.11	1.08	1.13	1.22
<i>P7</i>	27.8	25.9	23.6	15.9	221	0.99	1.00	0.98	0.00	116	1.07	1.08	1.10	1.15	1.09
<i>P8</i>	2.00	0.98	1.98	0.00	97.8	1.00	0.00	0.00	0.00	61.8	1.12	1.08	1.08	1.09	1.18
<i>All</i>	31.2	31.3	27.1	35.5	135	9.06	8.30	6.39	9.77	85.5	1.10	1.10	1.09	1.10	1.13

Exposure time After 72 h extended MN

	<i>MN</i>					<i>crest positive MN</i>					<i>CBPI</i>				
	<i>Exposure group</i>					<i>Exposure group</i>					<i>Exposure group</i>				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>PB</i>															
<i>P20</i>	118	153	92.0	88.0	435	13.0	21.0	23.0	12.0	300	1.05	1.11	1.03	1.09	1.09
<i>P22</i>	45.0	46.0	51.0	47.9	119	5.00	12.0	8.99	5.99	71.6	1.11	1.16	1.12	1.11	1.08
<i>P6</i>	161	43.8	358	240	662	40.5	8.96	74.7	39.0	435	1.12	1.12	1.25	1.12	1.22
<i>P8</i>	80.5	43.6	74.7	57.6	489	8.94	3.96	9.96	7.95	309	1.08	1.11	1.13	1.08	1.18
<i>All</i>	101	71.6	144	108	426	16.9	11.5	29.2	16.2	279	1.09	1.13	1.13	1.10	1.14

Tabelle 4: Zielvariablen der Chromosomenaberration (Rohdaten)

	<i>cell chromosome loss</i>					<i>cell chromosome increase</i>					<i>aneuploid cells</i>				
	<i>Exposure group</i>					<i>Exposure group</i>					<i>Exposure group</i>				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<i>PB</i>															
<i>P10</i>	67.0	59.0	61.0	100	81.0	6.00	7.00	11.0	6.00	10.0	73.0	66.0	72.0	106	91.0
<i>P13</i>	88.0	70.0	54.0	61.0	30.0	5.00	8.00	9.00	2.00	0.00	93.0	78.0	63.0	63.0	30.0

	cell chromosome loss					cell chromosome increase					aneuploid cells				
	Exposure group					Exposure group					Exposure group				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
P14	53.0	69.0	50.0	63.0	45.0	6.00	12.0	6.00	12.0	5.00	59.0	81.0	56.0	75.0	50.0
P16	91.0	90.0	71.0	58.0	71.0	5.00	8.00	6.00	6.00	15.0	96.0	98.0	77.0	64.0	86.0
P18	81.0	101	97.0	81.0	83.0	2.00	12.0	11.0	16.0	14.0	83.0	113	108	97.0	97.0
P20	81.5	80.0	106	88.0	124	12.7	8.00	14.0	9.00	32.3	94.2	88.0	120	97.0	157
P3	95.0	91.0	86.0	103	104	2.00	3.00	15.0	11.0	8.00	97.0	94.0	101	114	112
P4	107	91.0	112	99.0	83.0	7.00	2.00	7.00	3.00	7.00	114	93.0	119	102	90.0
P6	40.0	30.0	20.0	38.0	34.0	2.00	9.00	0.00	5.00	20.0	42.0	39.0	20.0	43.0	54.0
P8	46.0	32.0	48.0	56.0	42.0	8.00	15.0	8.00	8.00	5.00	54.0	47.0	56.0	64.0	47.0
All	74.9	71.3	70.5	74.7	69.7	5.57	8.40	8.70	7.80	11.6	80.5	79.7	79.2	82.5	81.4

Tabelle 5: Zielvariablen TUNEL-Apoptose-Test (Rohdaten)

	TUNEL positive cells					
	Exposure group					
	1	2	3	4	5	6
PB						
P10	0.98	0.96	0.96	0.00	264	925
P11	0.99	0.99	0.00	0.00	269	981
P12	10.9	17.0	11.8	24.7	286	986
P13	0.92	1.96	0.00	0.00	269	981
P14	1.86	0.98	0.00	0.00	256	982
P15	5.94	5.28	8.84	2.98	315	997
P16	2.95	0.00	0.99	1.00	258	979
P17	0.00	0.96	0.95	0.98	352	978
P18	0.00	0.00	1.00	0.00	352	978
P19	3.98	5.72	11.0	4.97	371	998
P20	0.98	0.98	0.00	0.00	352	978
P21	0.99	4.96	3.97	2.98	280	995
P22	8.79	16.8	16.9	16.7	262	879
P23	7.97	13.9	14.9	11.8	302	879
P3	0.00	0.00	0.00	0.00	209	889
P4	0.90	1.37	0.00	0.78	143	827
P5	2.79	0.00	0.00	1.86	271	769
P6	0.77	0.00	0.00	0.00	107	771
P7	0.00	0.00	0.00	0.00	146	672
P8	0.99	0.99	0.00	1.96	264	925
All	2.63	3.64	3.57	3.54	266	919

Tabelle 6: Zielvariablen des Zellzyklus Tests (Rohdaten)

	G1				S				G2			
	<i>Exposure group</i>				<i>Exposure group</i>				<i>Exposure group</i>			
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
<i>PB</i>												
<i>P10</i>	70.9	67.5	68.9	68.9	19.5	23.4	22.7	22.0	9.60	9.10	8.40	9.10
<i>P11</i>	79.2	78.2	79.8	77.0	9.60	8.30	7.90	10.3	11.2	13.4	12.3	12.7
<i>P12</i>	81.6	83.1	81.0	81.1	6.90	5.20	6.10	9.40	11.5	11.6	12.9	9.50
<i>P13</i>	87.2	90.1	86.0	87.2	8.70	5.70	7.60	8.70	4.10	4.30	6.40	4.20
<i>P14</i>	89.7	89.6	86.2	91.4	4.90	5.60	10.7	3.90	5.50	4.80	3.20	4.70
<i>P15</i>	88.8	87.7	88.9	89.2	2.20	2.70	3.10	2.50	9.10	9.60	8.00	8.30
<i>P16</i>	86.2	85.0	82.8	85.2	6.60	8.30	10.4	8.00	7.20	6.70	6.70	6.90
<i>P17</i>	89.7	86.9	88.1	88.6	4.10	4.40	4.40	4.10	6.20	8.70	7.60	7.40
<i>P18</i>	85.8	87.2	85.5	87.0	5.80	5.50	7.30	5.30	8.40	7.30	7.20	7.70
<i>P19</i>	88.0	88.0	88.2	89.9	1.40	1.30	1.40	1.60	10.6	10.7	10.4	8.50
<i>P20</i>	78.7	73.4	73.9	77.5	11.3	14.7	14.3	12.3	10.6	11.9	11.8	10.2
<i>P21</i>	81.2	86.1	84.0	85.2	12.5	5.50	7.30	10.8	6.20	8.30	8.70	4.00
<i>P22</i>	83.6	84.1	82.4	81.2	8.60	8.10	10.2	11.1	7.80	7.80	7.40	7.70
<i>P23</i>	90.6	88.0	93.3	91.6	5.20	8.60	3.30	3.00	4.20	3.40	3.30	5.40
<i>P3</i>	85.4	86.2	86.2	86.7	7.20	6.10	6.90	5.80	7.40	7.70	6.80	7.50
<i>P4</i>	72.9	72.1	70.5	72.3	18.9	19.4	21.9	19.4	8.20	8.50	7.60	8.30
<i>P5</i>	84.0	83.6	82.9	86.4	12.2	12.9	13.1	10.1	3.80	3.50	4.00	3.50
<i>P6</i>	71.2	74.6	69.3	71.4	14.0	12.1	15.6	11.7	14.8	13.3	15.1	16.9
<i>P7</i>	89.9	88.9	86.6	89.4	5.70	6.20	8.10	7.00	4.40	4.90	5.30	3.70
<i>P8</i>	82.6	87.3	73.8	83.9	12.1	7.90	21.7	11.9	5.30	4.80	4.40	4.20
<i>All</i>	83.4	83.4	81.9	83.6	8.87	8.60	10.2	8.94	7.81	8.02	7.88	7.52

4 Dosistrendanalyse

4.1 Hauptauswertung

Für die Hauptauswertung zum Testen eines Dosiseffekts, wurden 26 Variablen verwendet: Die 23 Zielvariablen, die bereits festgelegt waren und die drei Variablen MN, crest positive MN und CBPI für den erweiterten Mikrokerntest, der allerdings für nur vier Probanden vorlag.

Für alle Zielvariablen der unterschiedlichen Assays wurde als primärer Test ein Permutationstest auf linearen Trend durchgeführt. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse des Permutationstests für alle Zielvariablen aufgeführt. Der Permutationstest wurde anhand der entblindeten Daten mit dem R-Paket „coin“ und der zugehörigen Funktion „independence_test“ mit B= 1000000 Wiederholungen durchgeführt. Die Positiv-Kontrolle wurde nicht mit in die Analyse aufgenommen. Positive Werte der Z-Statistik deuten auf einen steigenden Trend, d.h. höhere Dosen waren mit höheren Werten der Zielgröße assoziiert.

Tabelle 7: Ergebnisse des Permutationstests (zur primären Analyse) für die Zielvariablen für alle Probanden (n=20, jedoch beim erweiterten Mikrokerntest n=4 und bei der Chromosomenaberration n=10).

Variable	Z-Teststatistik	p-Wert
Log (100-Median Head DNA(%))after 4 h	-0.5025	0.6173
Log (100-Median Head DNA(%)) after 16 h	0.2041	0.8395
Log (100-Median Head DNA(%))after 24 h	0.2912	0.7724
Log (100-Median Head DNA(%))after 72 h	-0.0126	0.99
Log (100-Median Head DNA(%)) after 72 h FPG	0.7144	0.478
Log Olive-Tail-Moment after 4 h	-0.0892	0.9298
Log Olive-Tail-Moment after 16 h	-0.0072	0.9943
Log Olive-Tail-Moment after 24 h	0.1491	0.8826
Log Olive-Tail-Moment after 72 h	-0.1958	0.8461
Log Olive-Tail-Moment after 72 h FPG	0.5383	0.597
MN after 15 h	0.004	0.9968
MN after 72 h	0.314	0.7561
MN extended after 72 h	0.4846	0.6652
crest positive MN after 15 h	0.3564	0.7248
crest positive MN after 72 h	0.0218	0.9827
crest positive MN extended after 72 h	0.3784	0.7458
CBPI after 15 h	-0.4198	0.6824
CBPI after 72 h	-0.2712	0.7888
CBPI extended after 72 h	0.347	0.7753
NCA cell chromosome loss	-0.0455	0.9655
NCA cell chromosome increase	1.22	0.2289
NCA aneuploid cells	0.1551	0.8795
TUNEL positive cells	0.4937	0.6271
Zellzyklus G1	-0.134	0.8947
Zellzyklus S	0.3361	0.7404
Zellzyklus G2	-0.3198	0.752

MN = Mikrokerne, NCA = Chromosomenaberrationen

Die Permutationstests zeigen keine Auffälligkeiten. Es gibt keine p-Werte, die nach der Korrektur des Fehlers erster Art als signifikant gelten. Die p-Werte liegen über 0.05, somit ist nicht einmal eine statistische Auffälligkeit zu erkennen. Die Werte vom erweiterten Mikrokerntest sind mit Vorsicht zu bewerten, da die Fallzahl mit vier Probanden sehr klein ist.

In der folgenden Tabelle 8 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Zielvariablen und Dosisgruppen aufgeführt.

Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Comet-Assays und alle Expositionsbedingungen

		Exposure time									
		After 4 h		After 16 h		After 24 h		After 72 h		After 72 h with FPG	
		Mean	StdDev	Mean	StdDev	Mean	StdDev	Mean	StdDev	Mean	StdDev
Olive-Tail-Moment	Exposure group										
	Sham	1.62	0.79	2.41	2.79	2.36	1.64	2.91	2.13	4.55	8.54
	Low	1.68	0.70	2.28	1.23	2.75	2.62	2.81	1.85	2.89	1.76
	Medium	1.65	0.83	2.58	2.87	2.21	1.17	2.50	1.16	2.76	1.42
	High	1.64	0.74	2.31	1.74	2.58	2.25	2.65	1.38	5.28	10.19
	PK	29.06	10.63	28.24	10.91	28.24	10.91	4.31	5.83	20.14	11.00
Median Head DNA(%)	Exposure group										
	Sham	78.93	12.71	76.82	13.56	78.31	10.63	72.53	13.78	70.94	17.40
	Low	78.50	11.97	77.52	11.24	75.27	11.57	72.32	13.51	73.56	10.81
	Medium	80.85	11.24	75.86	14.19	77.45	8.92	73.81	13.85	73.31	11.78
	High	80.53	11.94	76.56	12.59	77.20	11.32	73.11	11.52	67.96	17.80
	PK	20.84	11.06	22.82	12.52	22.82	12.52	67.65	16.53	31.48	16.22
Log Olive-Tail-Moment	Exposure group										
	Sham	0.14	0.27	0.22	0.40	0.24	0.39	0.36	0.32	0.42	0.39
	Low	0.18	0.24	0.26	0.36	0.29	0.39	0.36	0.30	0.39	0.25
	Medium	0.14	0.29	0.26	0.40	0.26	0.31	0.33	0.28	0.39	0.24
	High	0.14	0.29	0.24	0.37	0.27	0.39	0.35	0.29	0.48	0.39
	PK	1.42	0.22	1.41	0.22	1.41	0.22	0.44	0.43	1.23	0.27
Log (100-Median Head DNA(%))	Exposure group										
	Sham	1.23	0.30	1.28	0.29	1.26	0.28	1.37	0.26	1.40	0.25
	Low	1.26	0.26	1.29	0.27	1.33	0.26	1.38	0.25	1.39	0.19
	Medium	1.20	0.29	1.30	0.29	1.32	0.20	1.34	0.29	1.39	0.19
	High	1.21	0.28	1.30	0.28	1.29	0.26	1.39	0.21	1.45	0.23
	PK	1.89	0.07	1.88	0.08	1.88	0.08	1.44	0.27	1.82	0.12

**Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Mikrokern-
tests und alle Expositionsbedingungen Die Zielvariablen MN und crest positive MN sind
jeweils auf 2000 ausgewertete Zellen, bzw. beim erweiterten Mikrokern-
test auf 10000 ausgewertete Zellen hochgerechnet**

		<i>Exposure time</i>					
		<i>After 15 h</i>		<i>After 72 h</i>		<i>After 72 h extended MN</i>	
		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>
<i>MN</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	24.70	17.93	31.18	28.27	101.1	49.88
	<i>Low</i>	25.88	17.71	31.33	25.91	71.59	54.29
	<i>Medium</i>	26.97	21.85	27.11	24.00	143.8	143.6
	<i>High</i>	24.37	22.64	35.46	32.49	108.4	89.30
	<i>PK</i>	127.7	80.07	135.1	80.84	426.2	226.3
<i>crest positive MN</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	6.63	6.97	9.06	12.23	16.87	16.11
	<i>Low</i>	5.58	5.09	8.30	9.93	11.48	7.16
	<i>Medium</i>	8.29	8.23	6.39	8.92	29.16	31.02
	<i>High</i>	6.56	7.60	9.77	10.96	16.23	15.37
	<i>PK</i>	85.04	61.38	85.51	62.44	278.8	151.2
<i>CBPI</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	1.12	0.09	1.10	0.06	1.09	0.03
	<i>Low</i>	1.10	0.05	1.10	0.04	1.13	0.02
	<i>Medium</i>	1.10	0.05	1.09	0.04	1.13	0.09
	<i>High</i>	1.11	0.07	1.10	0.05	1.10	0.02
	<i>PK</i>	1.13	0.09	1.13	0.09	1.14	0.07

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen der Chromosomenaberration und alle Expositionsbedingungen. Die Zielvariablen sind auf 200 ausgewertete Mitosen hochgerechnet.

		Mean	StdDev
<i>cells with chromosome loss</i>	<i>Exposure group</i>		
	<i>Sham</i>	74.95	22.46
	<i>Low</i>	71.30	24.70
	<i>Medium</i>	70.50	29.37
	<i>High</i>	74.70	22.48
	<i>PK</i>	69.72	31.38
<i>cells with chromosome increase</i>	<i>Exposure group</i>		
	<i>Sham</i>	5.570	3.300
	<i>Low</i>	8.400	3.978
	<i>Medium</i>	8.700	4.373
	<i>High</i>	7.800	4.315
	<i>PK</i>	11.63	9.284
<i>aneuploid cells</i>	<i>Exposure group</i>		
	<i>Sham</i>	80.52	22.82
	<i>Low</i>	79.70	23.12
	<i>Medium</i>	79.20	32.41
	<i>High</i>	82.50	23.63
	<i>PK</i>	81.36	37.39

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichung für TUNEL positive Zellen und alle Expositionsbedingungen. TUNEL positive cells werden unter 1000 ausgewerteten Zellen angegeben.

		Mean	StdDev
<i>TUNEL positive cells</i>	<i>Exposure group</i>		
	<i>Sham</i>	2.633	3.231
	<i>Low</i>	3.639	5.593
	<i>Medium</i>	3.565	5.672
	<i>High</i>	3.536	6.617
	<i>HL60-Sham</i>	266.4	71.09
	<i>HL60-Actinomycin</i>	918.5	93.65

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Zellzyklustests und alle Expositionsbedingungen

	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>
<i>G1 Exposure group</i>		
<i>Sham</i>	83.36	6.156
<i>Low</i>	83.38	6.568
<i>Medium</i>	81.92	7.052
<i>High</i>	83.56	6.833
<i>S Exposure group</i>		
<i>Sham</i>	8.870	4.946
<i>Low</i>	8.595	5.480
<i>Medium</i>	10.20	6.283
<i>High</i>	8.945	5.264
<i>G2 Exposure group</i>		
<i>Sham</i>	7.805	2.963
<i>Low</i>	8.015	3.119
<i>Medium</i>	7.875	3.259
<i>High</i>	7.520	3.314

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

In den folgenden Tabellen sind nun die Ergebnisse der Hauptanalyse anhand von Trendscores zum Testen auf einen Dosistrend bei den 20 Probanden aufgeführt.

Es wird jeweils der Mittelwert, die 95 %-Konfidenzintervallgrenzen, sowie der exakte p-Wert (vom Permutationstest) für die Zielvariablen der verschiedenen Assays berichtet. Da der exakte Permutationstest keine Schätzer und Konfidenzintervalle berechnet wurden diese anhand von Trendscores rein asymptotisch berechnet. Die Positivkontrolle wurde bei dieser Analyse nicht mit berücksichtigt.

Tabelle 13: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Comet-Assays. N=20 Probanden

	<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>	<i>P-Wert</i>
<i>Log Olive-Tail-Moment</i>				
<i>Exposure time</i>				
<i>After 4 h</i>	-0.00	-0.02	0.02	0.9298
<i>After 16 h</i>	0.01	-0.02	0.03	0.9943
<i>After 24 h</i>	0.01	-0.02	0.03	0.8826
<i>After 72 h</i>	-0.01	-0.04	0.03	0.8461
<i>After 72 h with FPG</i>	0.02	-0.01	0.04	0.597

		Mean	95_LCLM	95_UCLM	P-Wert
Log (100-Median Head DNA(%))	Exposure time				
	After 4 h	-0.01	-0.04	0.01	0.6173
	After 16 h	0.01	-0.01	0.02	0.8399
	After 24 h	0.01	-0.02	0.03	0.7724
	After 72 h	-0.00	-0.03	0.03	0.99
	After 72 h with FPG	0.02	-0.01	0.04	0.478

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Tabelle 14: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Mikrokerntests. N=20 Probanden außer beim erweiterten Mikrokerntest, dort N=4

		Mean	95_LCLM	95_UCLM	P-Wert
MN	Exposure time				
	After 15 h	0.01	-1.88	1.90	0.9968
	After 72 h	0.86	-1.21	2.93	0.7561
	After 72 h extended MN	9.39	-40.2	59.01	0.6652
crest positive MN	Exposure time				
	After 15 h	0.25	-0.85	1.35	0.7248
	After 72 h	0.02	-1.02	1.06	0.9827
	After 72 h extended MN	1.58	-3.24	6.39	0.7458
CBPI	Exposure time				
	After 15 h	-0.00	-0.01	0.01	0.6824
	After 72 h	-0.00	-0.01	0.00	0.7888
	After 72 h extended MN	0.00	-0.01	0.01	0.7753

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze;
MN = Mikrokerne

Tabelle 15: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen der Chromosomenaberration. N=10 Probanden

	Mean	95_LCLM	95_UCLM	P-Wert
cells with chromosome loss	-0.15	-4.83	4.52	0.9655
cells chromosome increase	0.70	-0.62	2.02	0.2289
aneuploid cells	0.54	-4.47	5.56	0.8795

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Tabelle 16: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für TUNEL positive Zellen. N=20 Probanden

	<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>	<i>P-Wert</i>
<i>TUNEL positive cells</i>	0.26	-0.24	0.77	0.6271

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Tabelle 17: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Zellzyklus. N=20 Probanden

	<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>	<i>P-Wert</i>
<i>G1</i>	-0.09	-0.35	0.17	0.8947
<i>S</i>	0.18	-0.09	0.45	0.7404
<i>G2</i>	-0.10	-0.27	0.07	0.752

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Die p-Werte und Konfidenzintervalle zeigen keine Auffälligkeiten in Richtung eines Dosistrends.

4.2 Sensitivitätsanalysen

In Tabelle 18 sind die Ergebnisse der Sensitivitätsanalyse anhand des Page-Trend-Tests auf Dosistrend aufgeführt. Die Ergebnisse sind für alle Zielvariablen und die Variablen des erweiterten Mikrokerntests dargestellt. Der Page-Trend-Test wurde mit dem R-Paket „coin“ und der zugehörigen Funktion „Friedman_test“ mit B= 100000 Wiederholungen durchgeführt. Die Positiv-Kontrolle wurde wie auch bei den Permutationstests zur primären Analyse nicht mit aufgenommen.

Kein p-Wert dieser Sensitivitätsanalyse deutet auf einen Trend über die 4 Dosisgruppen hin. Die Ergebnisse der primären Analyse werden somit durch die Sensitivitätsanalyse bestätigt.

Tabelle 18: Ergebnisse des Page-Trend-Tests (Sensitivitätsanalyse) für die Zielvariablen für alle Probanden (n=20, jedoch beim erweiterten Mikrokerntest n=4 und bei der Chromosomenaberration n=10)

Variable	Chi-Quadrat-Teststatistik	p-Wert
Log (100-Median Head DNA(%))after 4 h	1.944	0.1768
Log (100-Median Head DNA(%)) after 16 h	0.60	0.4643
Log (100-Median Head DNA(%))after 24 h	0.486	0.5131
Log (100-Median Head DNA(%))after 72 h	0.216	0.673
Log (100-Median Head DNA(%)) after 72 h FPG	1.536	0.2318
Log Olive-Tail-Moment after 4 h	0.0242	0.8934
Log Olive-Tail-Moment after 16 h	0.1234	0.742
Log Olive-Tail-Moment after 24 h	0.0965	0.7678
Log Olive-Tail-Moment after 72 h	0.0136	0.9276
Log Olive-Tail-Moment after 72 h FPG	1.099	0.3082
MN after 15 h	0.096	0.7881
MN after 72 h	0	1
MN extended after 72 h	0.03	0.9323
crest positive MN after 15 h	0.4959	0.4974
crest positive MN after 72 h	0.1038	0.764
crest positive MN extended after 72h	0	1
CBPI after 15 h	0.6486	0.4349
CBPI after 72 h	0.1043	0.763
CBPI extended after 72 h	0.0353	0.8984
NCA cell chromosome loss	0.0273	0.899
NCA cell chromosome increase	1.0681	0.3190
NCA aneuploid cells	0.5121	0.5019
TUNEL positive cells	1.2217	0.2807
Zellzyklus G1	0	1
Zellzyklus S	0.4446	0.5209
Zellzyklus G2	2.9633	0.08887

MN = Mikrokerne, NCA = Chromosomenaberrationen

4.3 Sensitivitätsanalyse für den Comet-Assay

Beim Comet-Assay gab es bei der Zielvariablen Olive Tail Moment einen Ausreißer, der einen Wert über 40 hatte. Der Proband (Proband7) mit dem entsprechend hohen Wert wurde in einer Sensitivitätsanalyse herausgenommen. Aufgeführt ist das Ergebnis der Trendscores mit Mittelwert 95% Konfidenzintervall und dem zugehörigen p-Wert. Wie auch bei der primären Analyse zeigt sich kein signifikanter Trend; wenn man den Probanden, mit Ausreißern aus der Analyse ausschließt.

Tabelle 19: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielgröße Olive Tail Moment. Ohne Proband 7. N=19 Probanden

		Mean	95_LCLM	95_UCLM	P-Wert
<i>Olive-Tail-Moment</i>	<i>time</i>				
	<i>After 4 h</i>	0.01	-0.04	0.06	0.5898
	<i>After 16 h</i>	-0.02	-0.34	0.31	0.9109
	<i>After 24 h</i>	0.03	-0.17	0.23	0.7582
	<i>After 72 h</i>	-0.12	-0.44	0.19	0.4172
	<i>After 72 h with FPG</i>	0.09	-0.10	0.28	0.3250
<i>Log Olive-Tail-Moment</i>	<i>time</i>				
	<i>After 4 h</i>	-0.00	-0.02	0.02	0.9055
	<i>After 16 h</i>	0.00	-0.02	0.03	0.7621
	<i>After 24 h</i>	0.01	-0.02	0.03	0.5070
	<i>After 72 h</i>	-0.01	-0.04	0.03	0.6260
	<i>After 72 h with FPG</i>	0.02	-0.01	0.04	0.1964

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

4.4 Differenzen zu Sham

Interessant zu untersuchen ist wie sich die Werte der unterschiedlichen Expositionen zu der Sham-Exposition verhalten. In den folgenden Abbildungen werden für alle Zielgrößen die Differenzen zur Sham-Gruppe graphisch dargestellt. Damit die Differenzen der Expositionen Low bis High zur Sham Exposition besser sichtbar werden, wurden teilweise die y-Achsen etwas angeglichen.

Hinweis: Für die folgenden Abbildungen gilt: An erster Stelle steht jeweils die Differenz von Sham zu Sham (was definitionsgemäß 0 ist), an zweiter Stelle die Differenz von Low zu Sham, an dritter Stelle die Differenz von Medium zu Sham, an vierter Stelle die Differenz von High zu Sham und an letzter Stelle von der Positivkontrolle zu Sham.

4.4.1 Comet-Assay

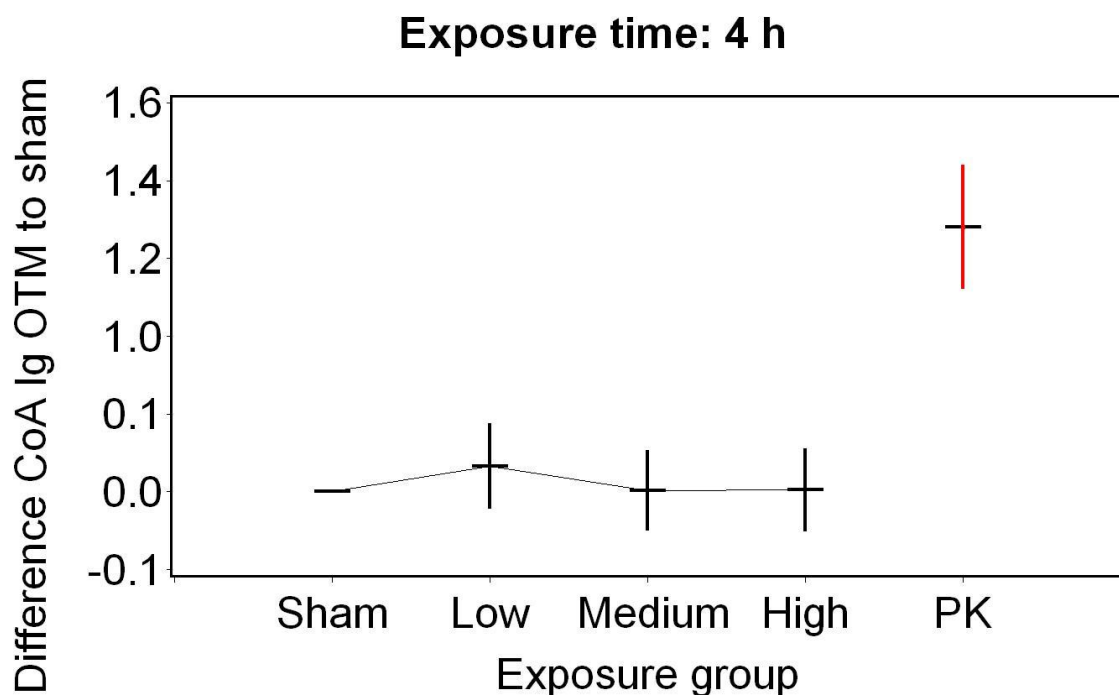


Abbildung 44: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

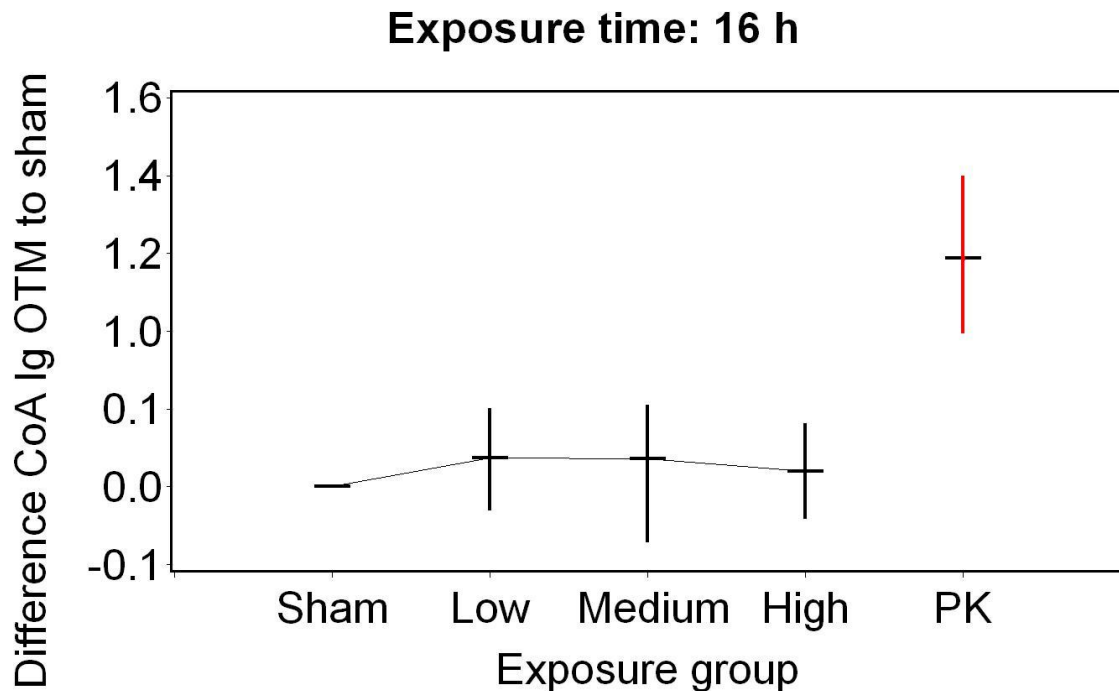


Abbildung 45: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

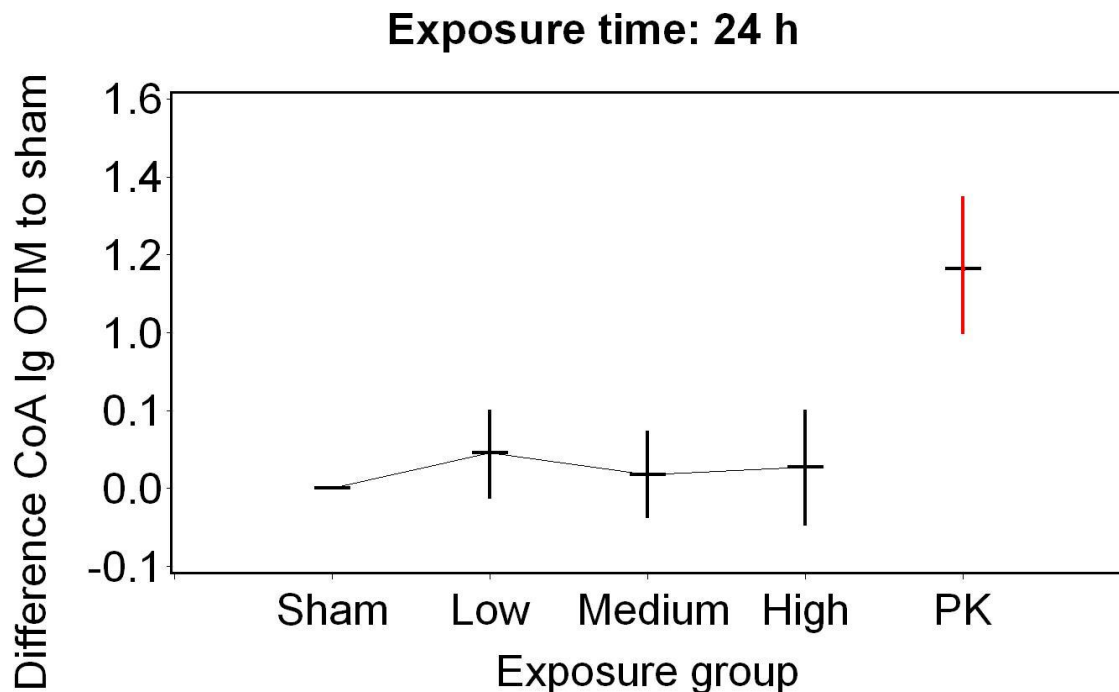


Abbildung 46: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

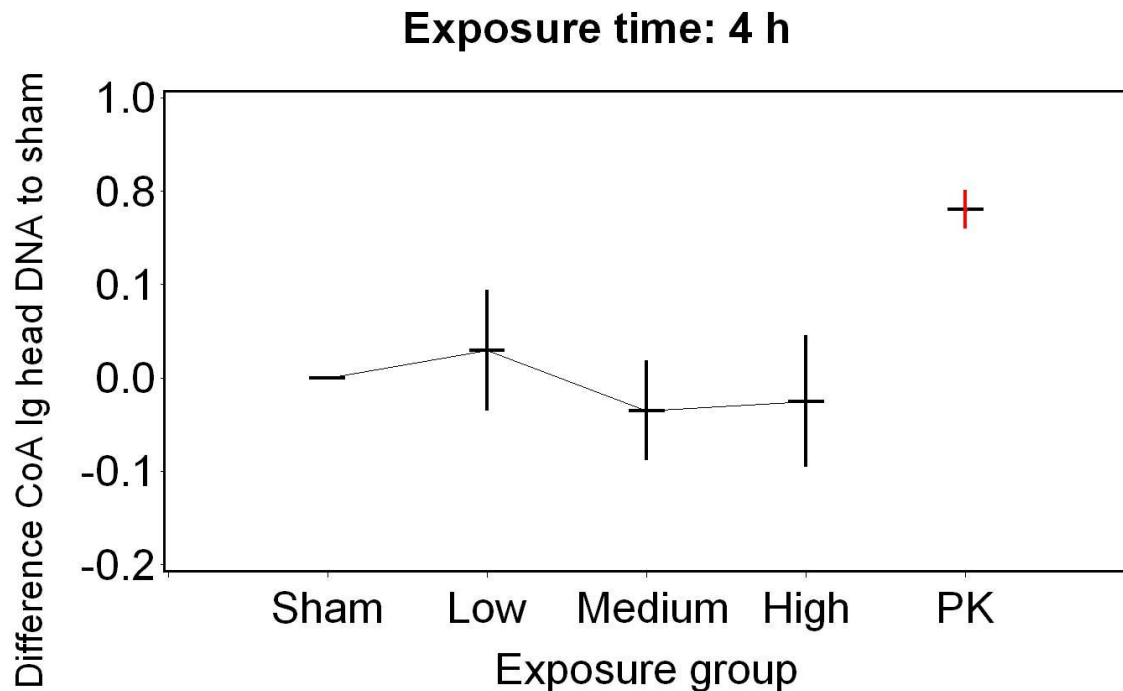


Abbildung 47: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 4 h Befeldung, Zielgröße $\text{Log}(100\text{-Median-Head DNA}(\%))$, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

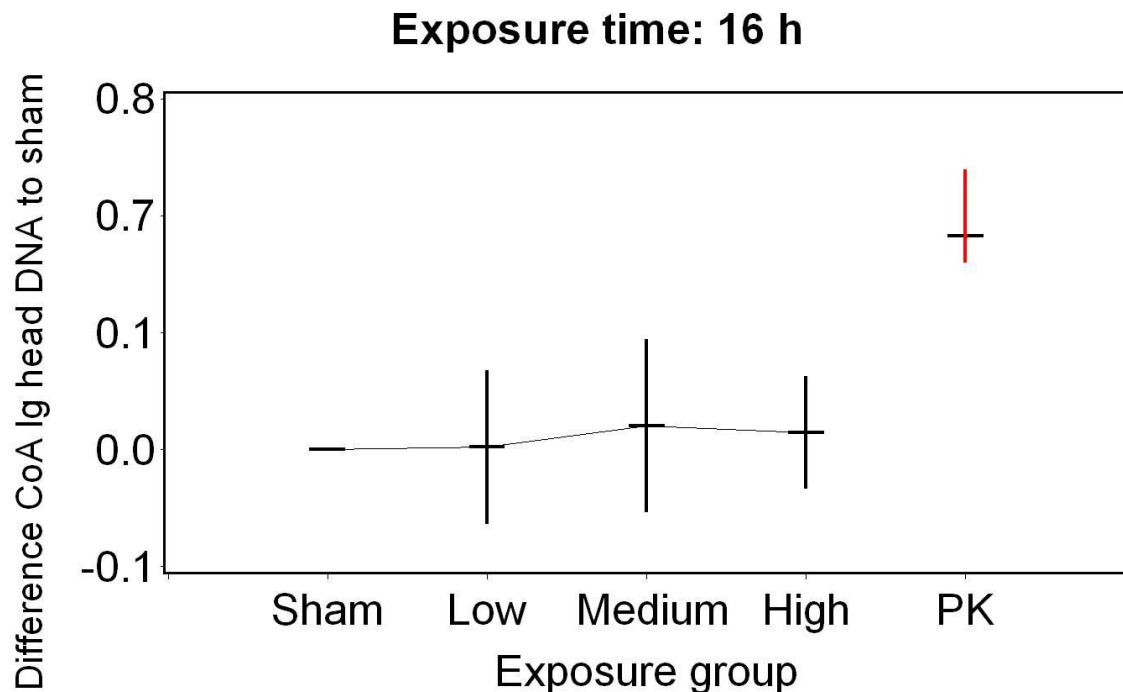


Abbildung 48: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 16 h Befeldung, Zielgröße $\text{Log}(100\text{-Median-Head DNA}(\%))$, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

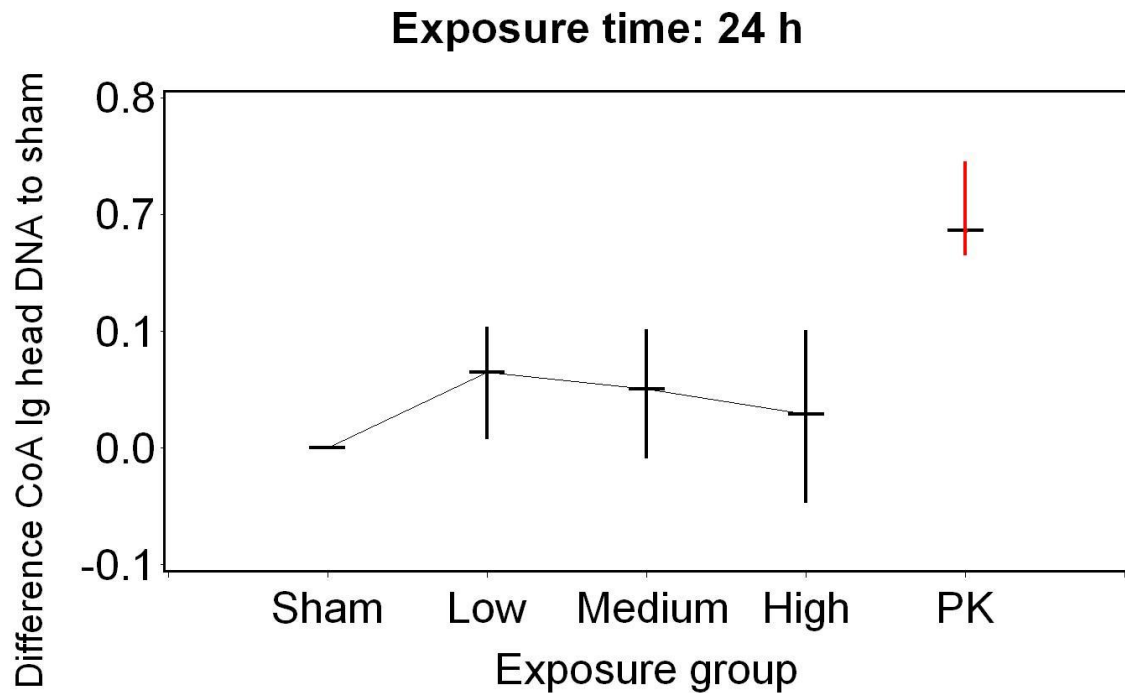


Abbildung 49: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 24 h Befeldung, Zielgröße $\text{Log}(100\text{-Median-Head DNA}(\%))$, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

4.4.2

Comet-Assay nach 72h Bestrahlung mit und ohne FPG

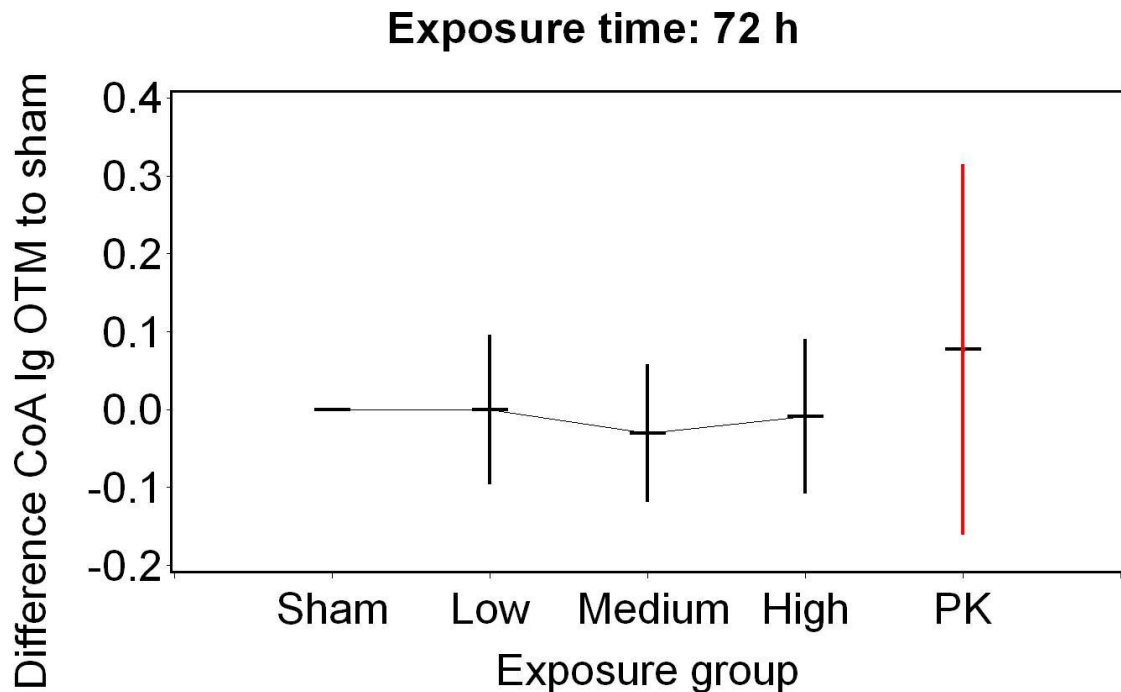


Abbildung 50: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

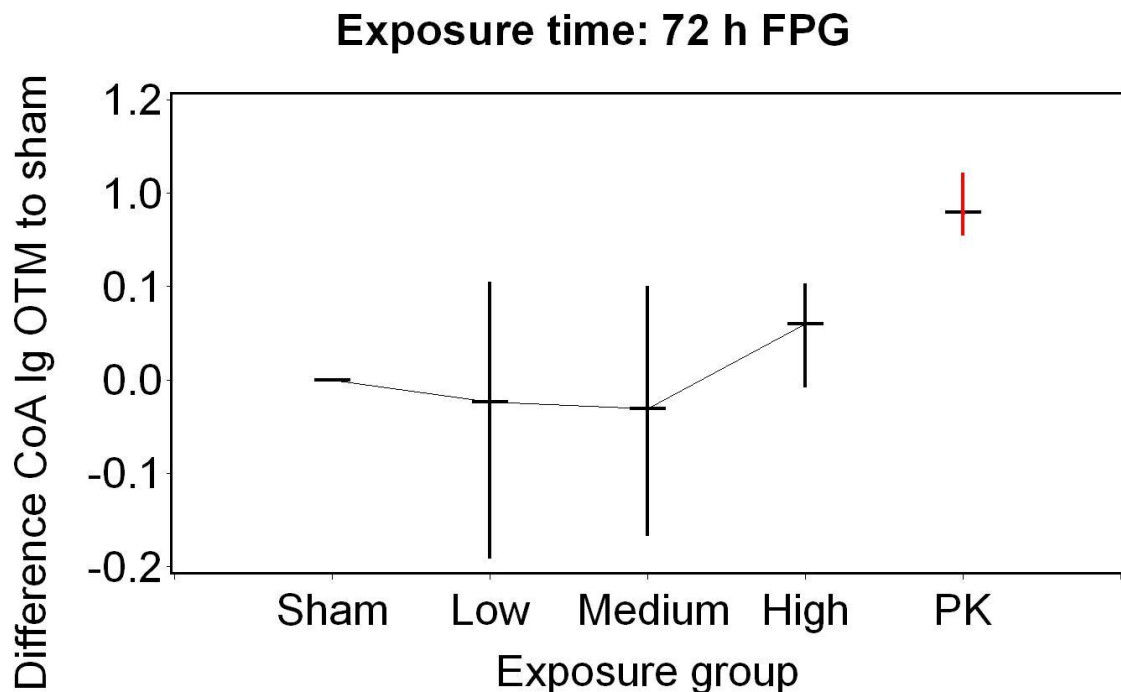


Abbildung 51: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung und FPG-Inkubation, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

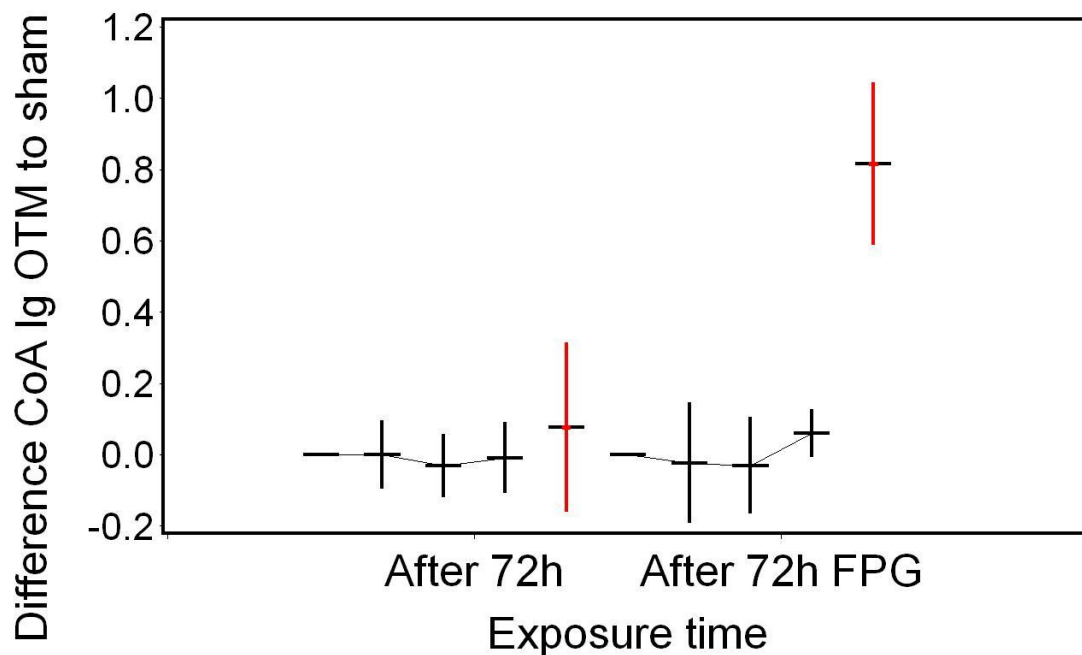


Abbildung 52: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit und ohne FPG-Inkubation, Zielgröße Log Olive-Tail-Moment, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

Exposure time: 72 h

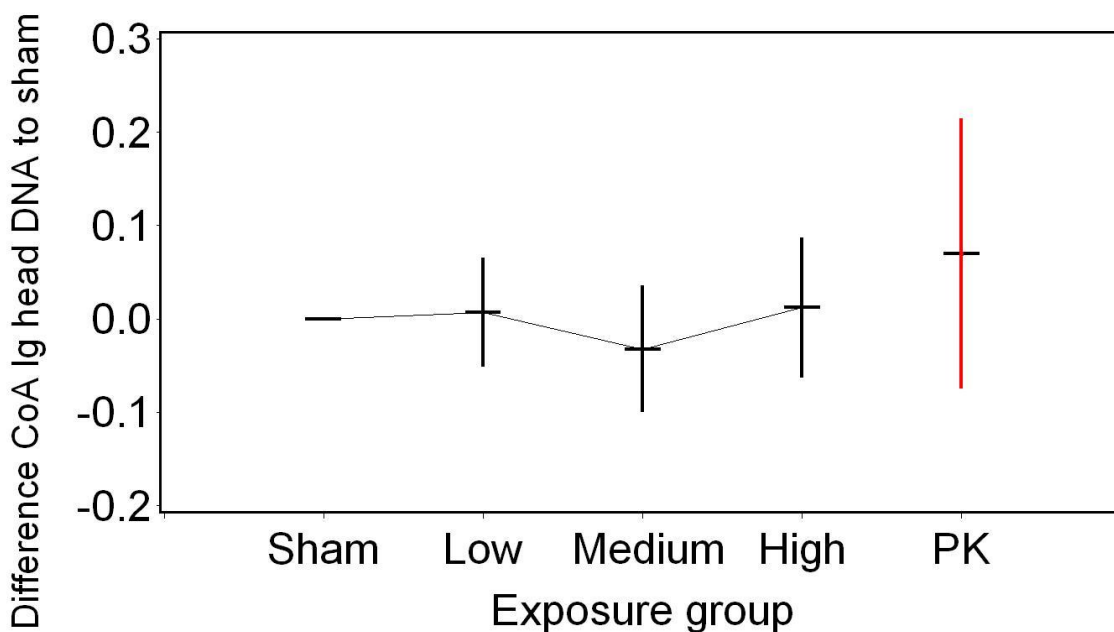


Abbildung 53: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung, Zielgröße Log(100-Median-Head DNA(%)), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

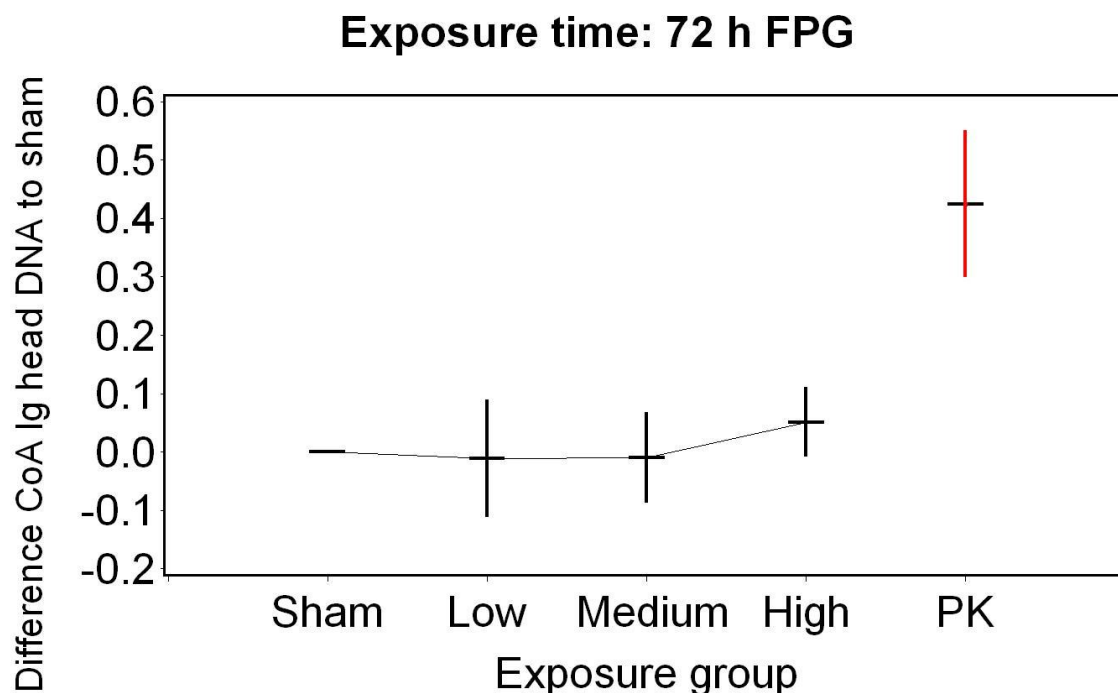


Abbildung 54: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung und FPG-Inkubation, Zielgröße $\text{Log}(100\text{-Median-Head DNA}(\%))$, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

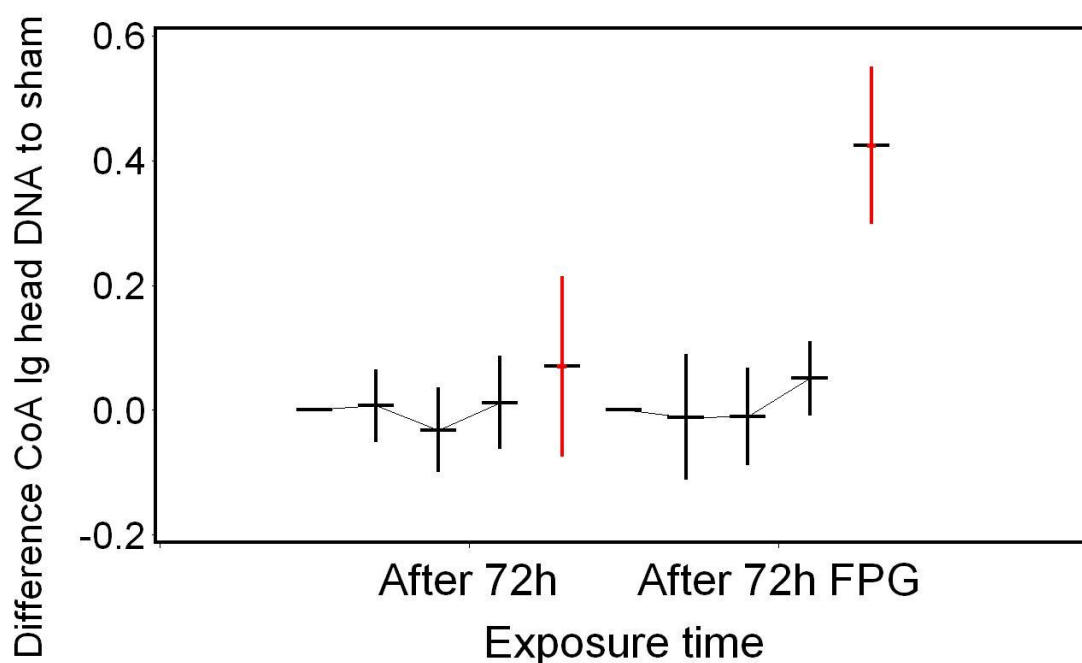


Abbildung 55: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Comet-Assay nach 72 h Befeldung mit und ohne FPG-Inkubation, Zielgröße $\text{Log}(100\text{-Median-Head DNA}(\%))$, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

4.4.3

Mikrokerntest

Exposure time: 15 h

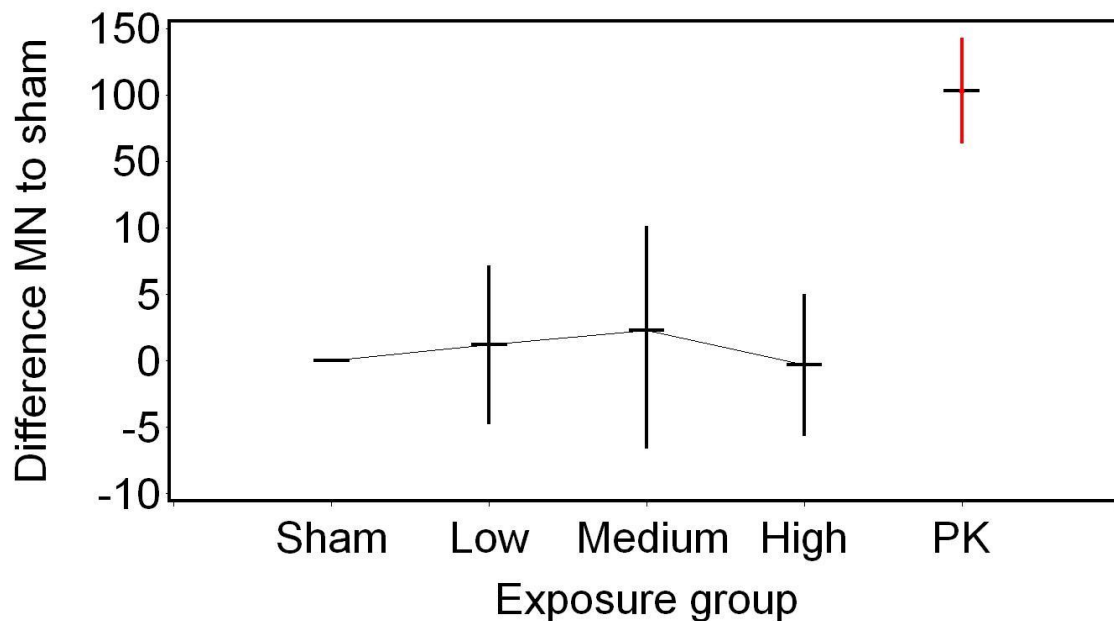


Abbildung 56: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

Exposure time: 72 h

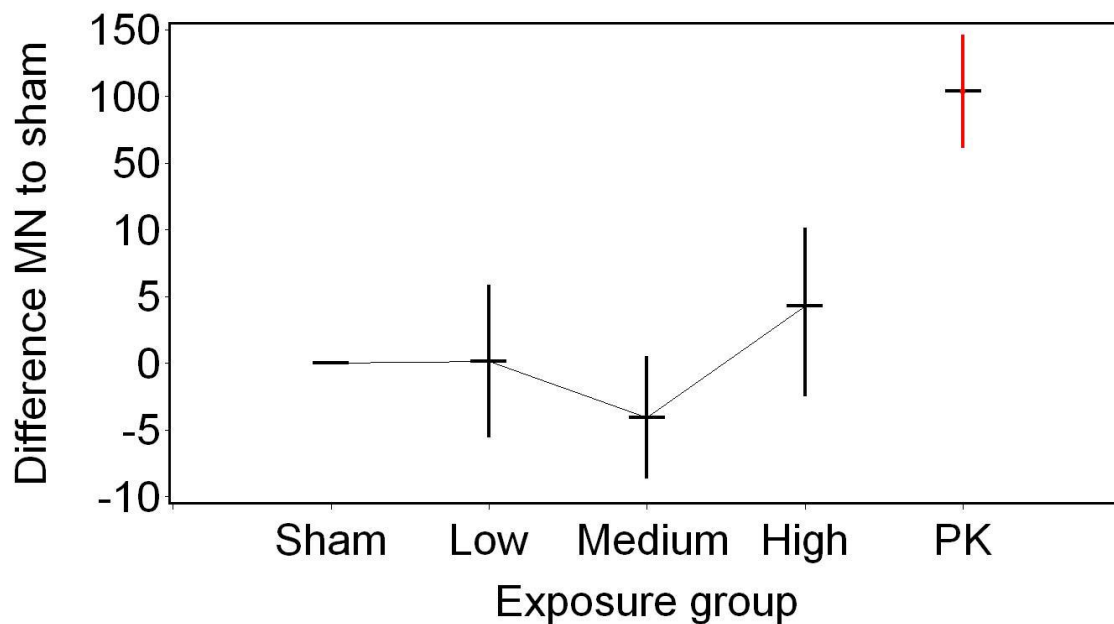


Abbildung 57: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

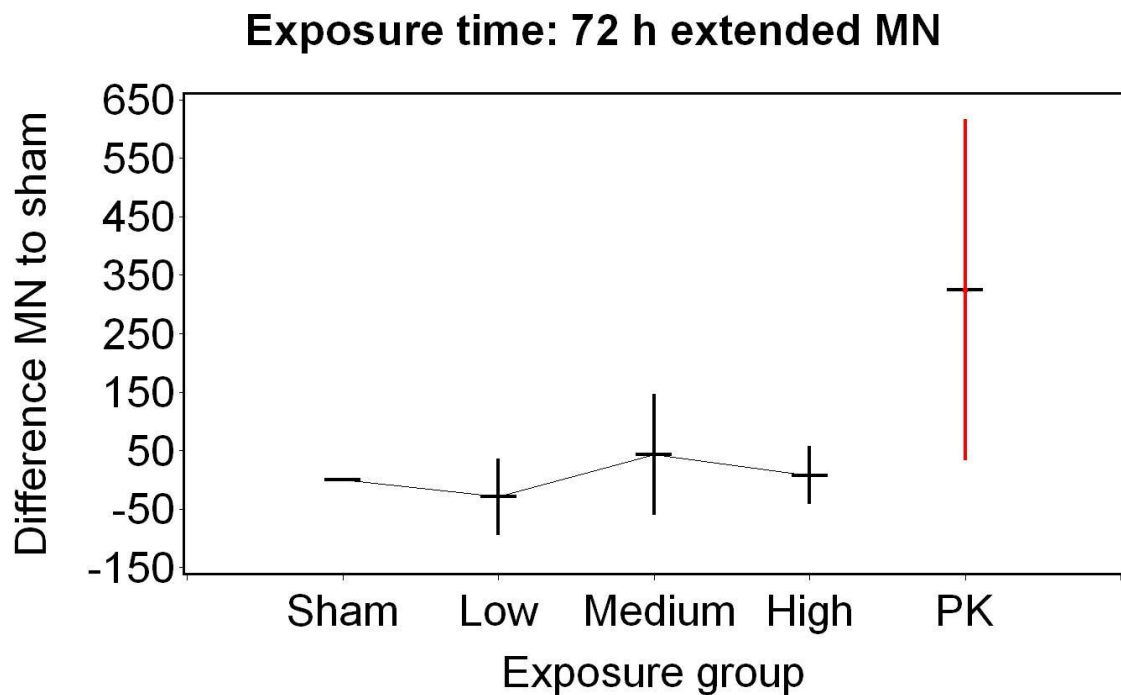


Abbildung 58: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen (PK: 2.000 binukleäre Zellen), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

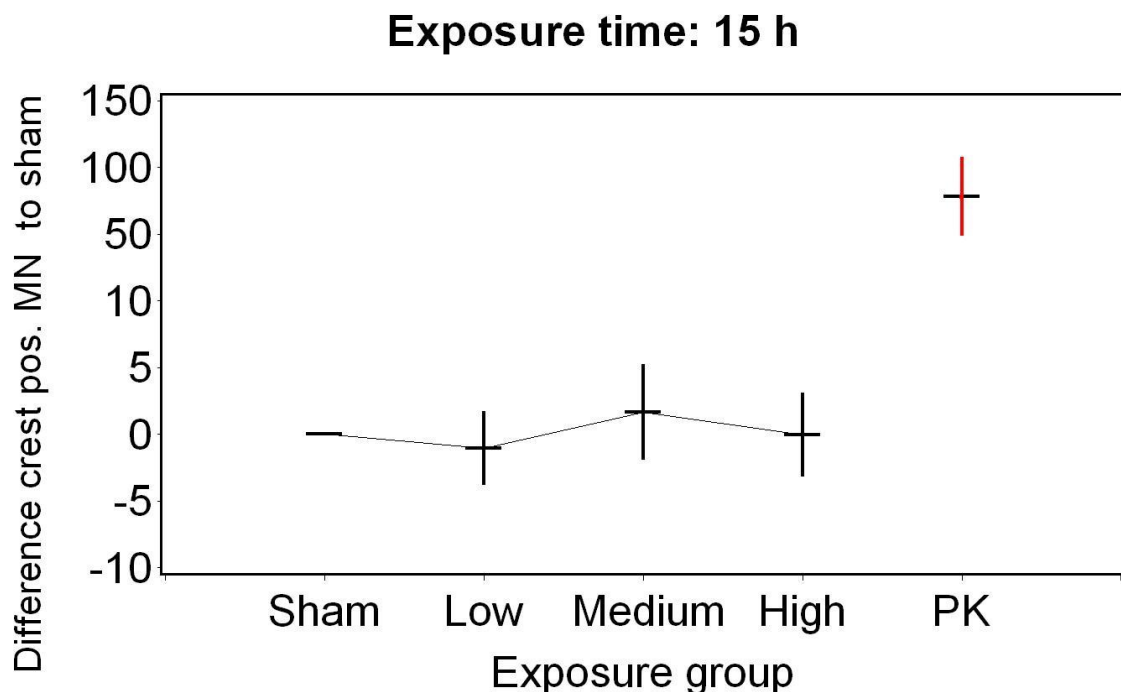


Abbildung 59: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

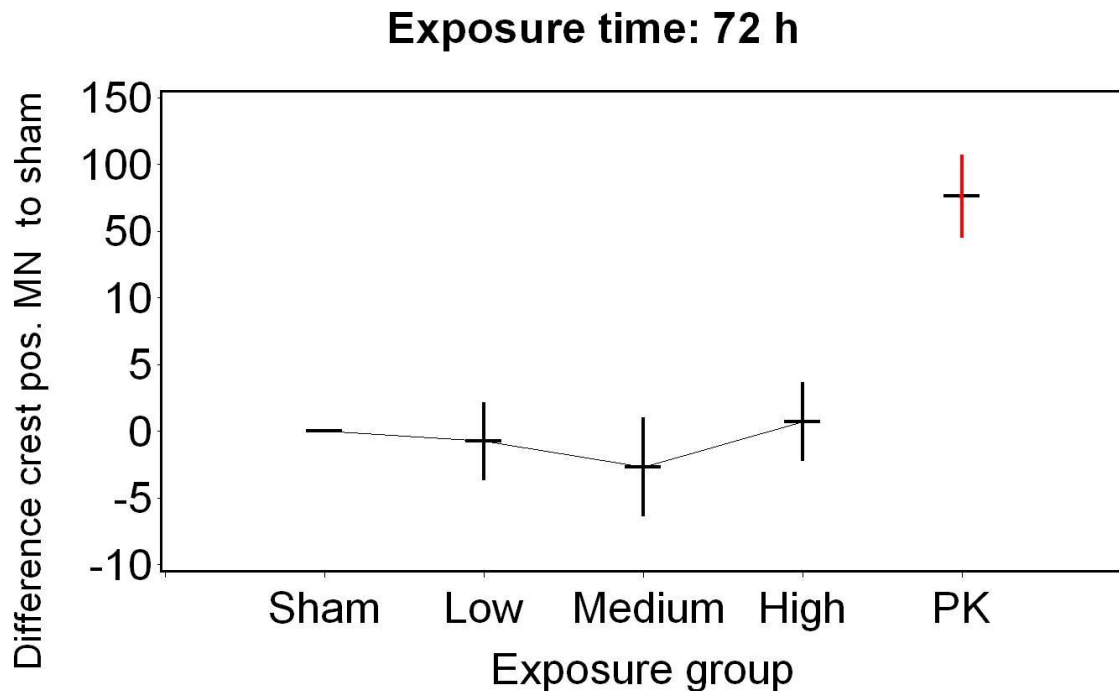


Abbildung 60: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CREST-positive Mikrokerne in 2.000 binukleären Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

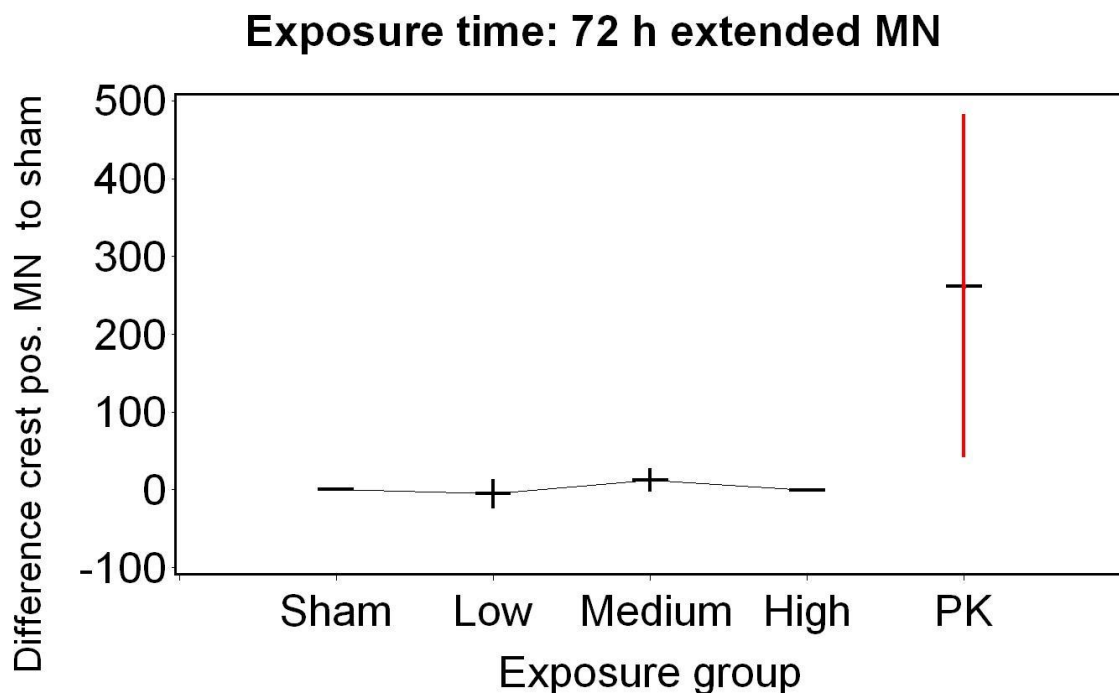


Abbildung 61: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße CREST-positive Mikrokerne in 10.000 binukleären Zellen (PK: 2.000 binukleäre Zellen), (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

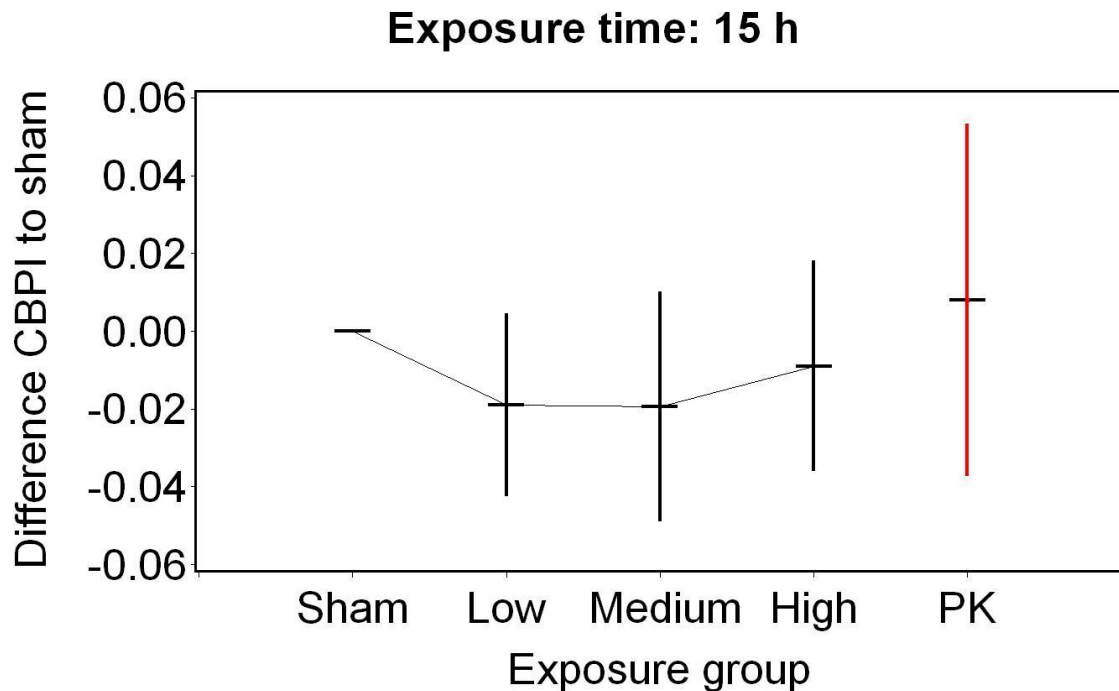


Abbildung 62: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 15 h Befeldung, Zielgröße Proliferationsindex CBPI, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

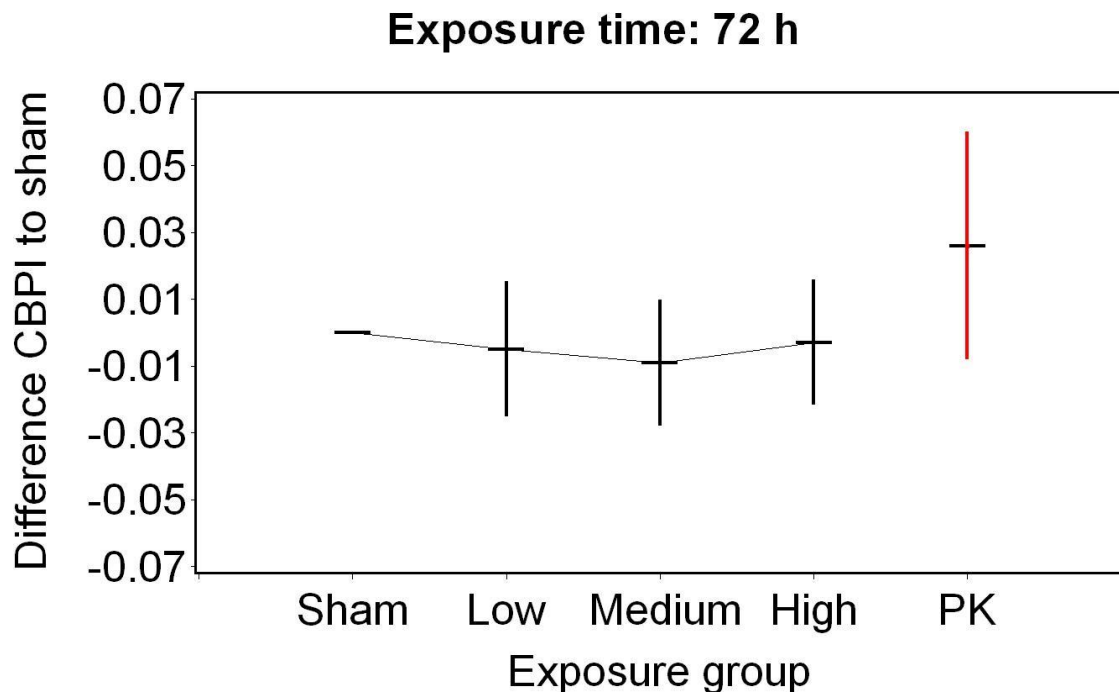


Abbildung 63: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße Proliferationsindex CBPI, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

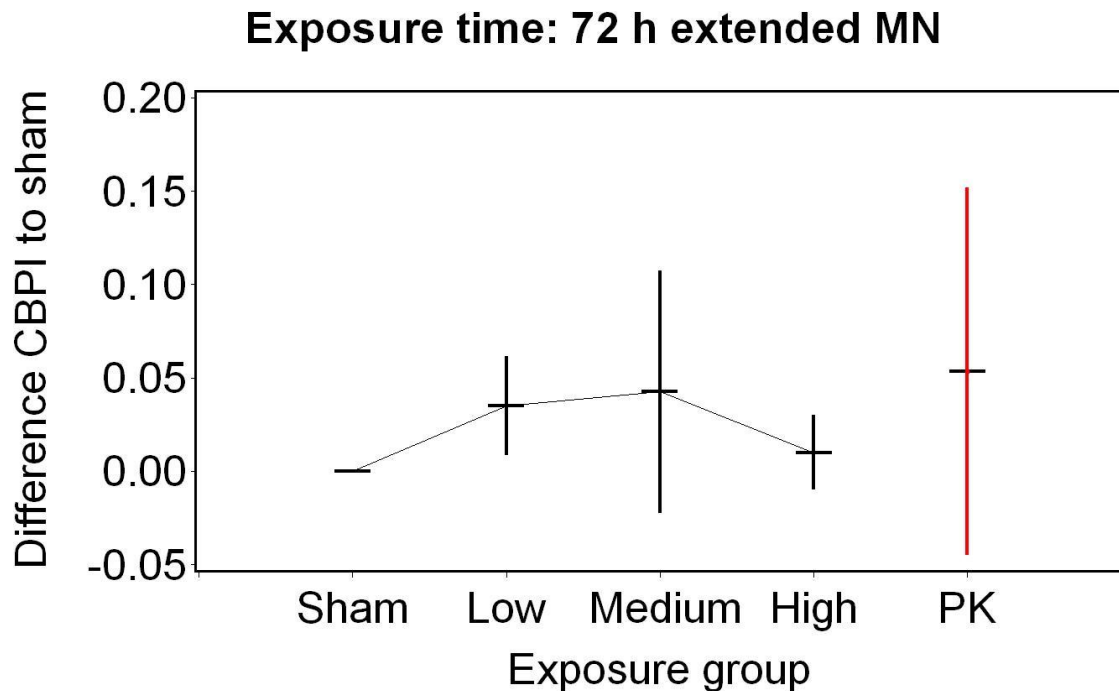


Abbildung 64: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den erweiterten Mikrokerntest nach 72 h Befeldung, Zielgröße Proliferationsindex CBPI, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle).

4.4.4 Chromosomenaberration

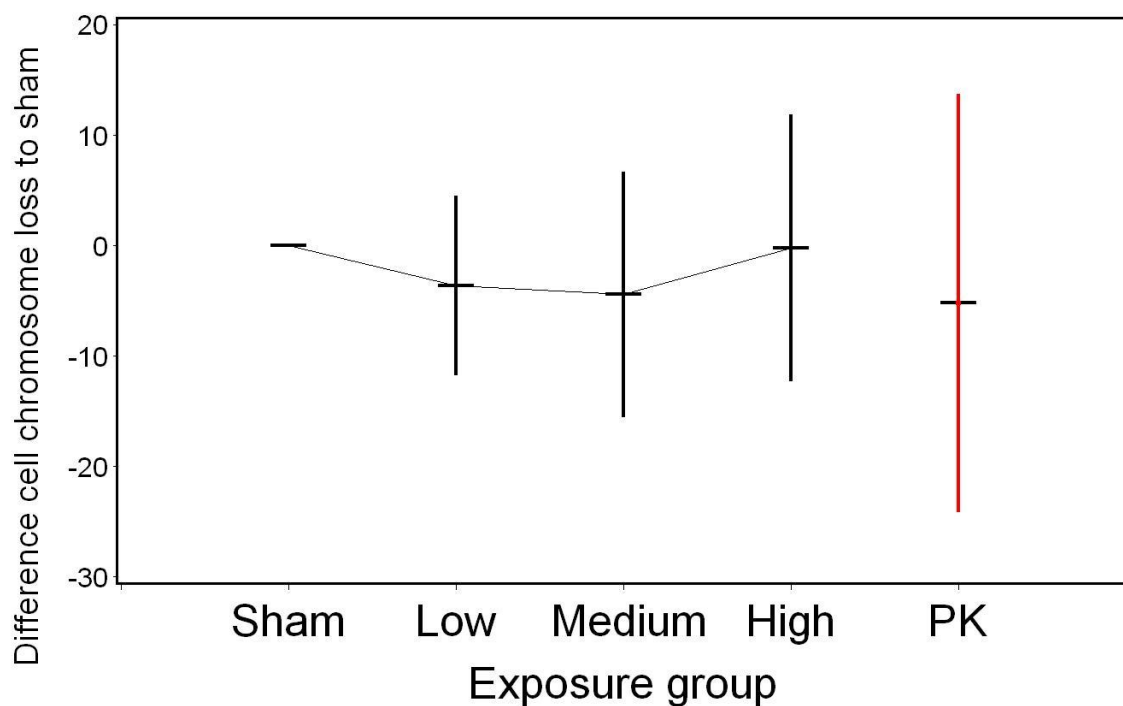


Abbildung 65: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße Zellen mit Chromosomenverlusten, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

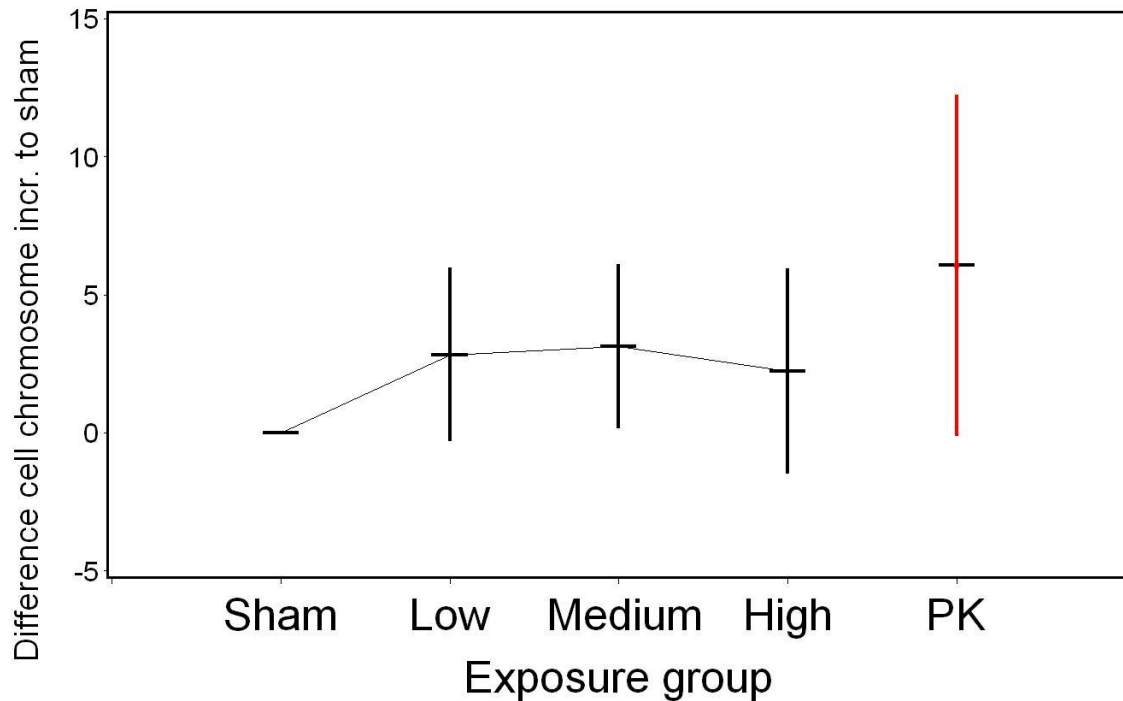


Abbildung 66: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße Zellen mit zusätzlichen Chromosomen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

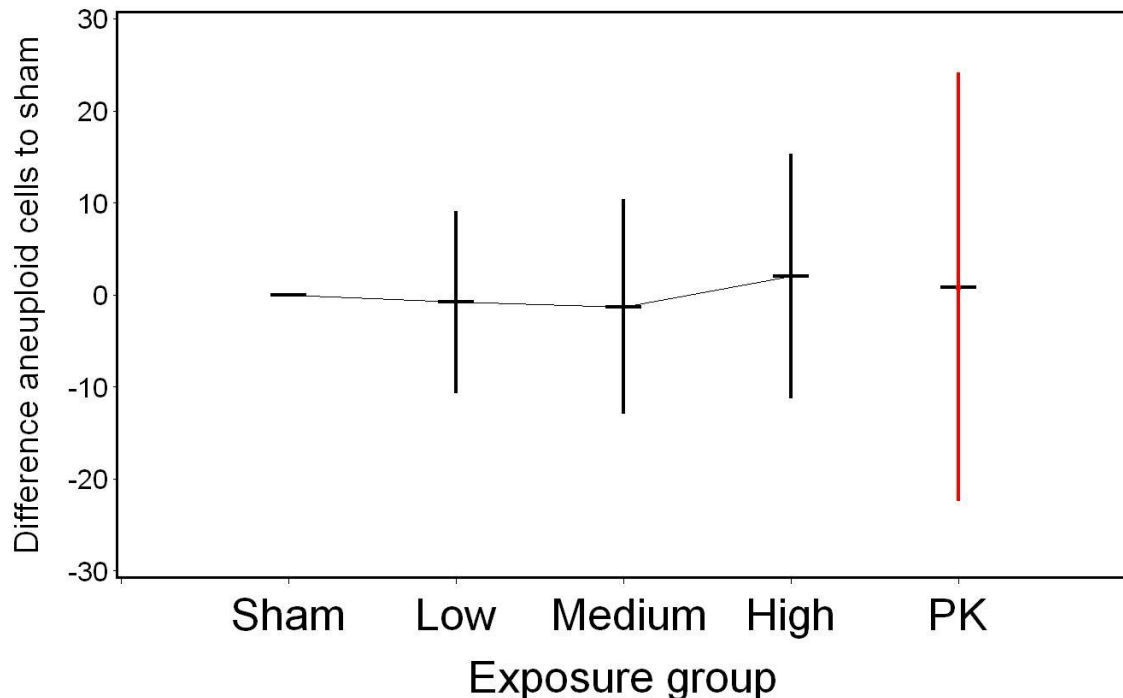


Abbildung 67: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf numerische Chromosomenaberrationen, Zielgröße aneuploide Zellen insgesamt, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK = Positivkontrolle)

4.4.5 TUNEL-Apoptose-Test

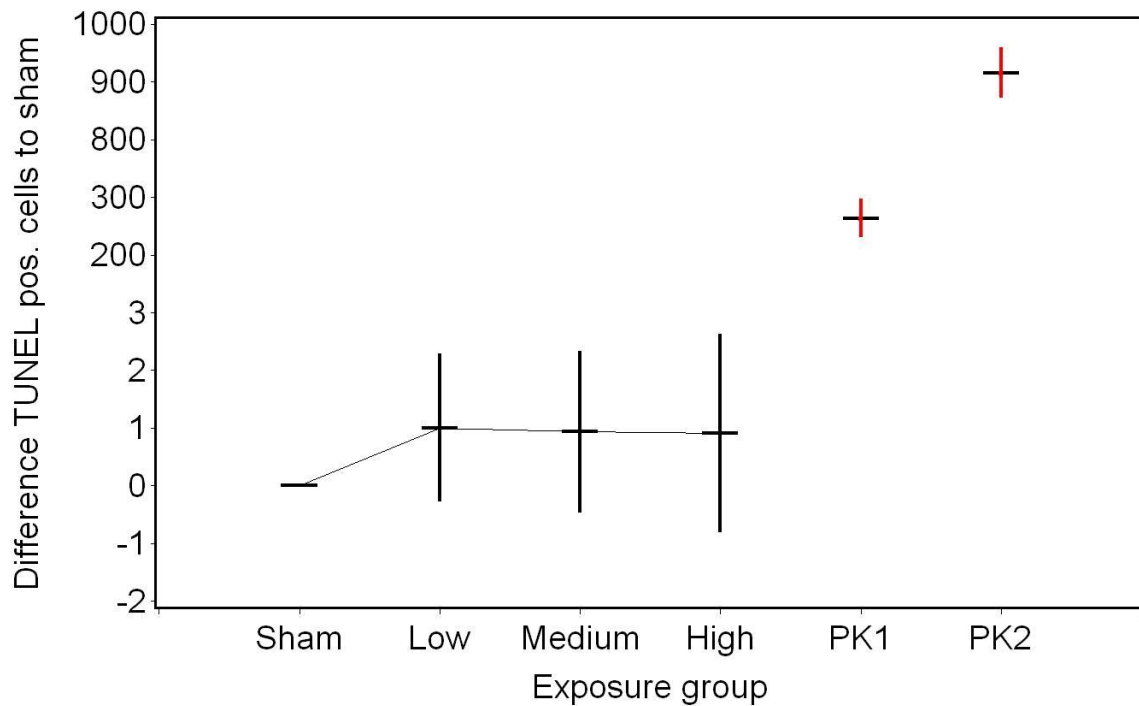


Abbildung 68: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für den Test auf apoptotische Ereignisse, Zielgröße TUNEL-positive Zellen in 1.000 Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg, PK1: HL-60-Sham = Kontrollzelllinie, unbehandelt, PK2: HL-60 Act = Kontrollzelllinie, Actinomycin D-behandelt)

4.4.6 Zellzyklus

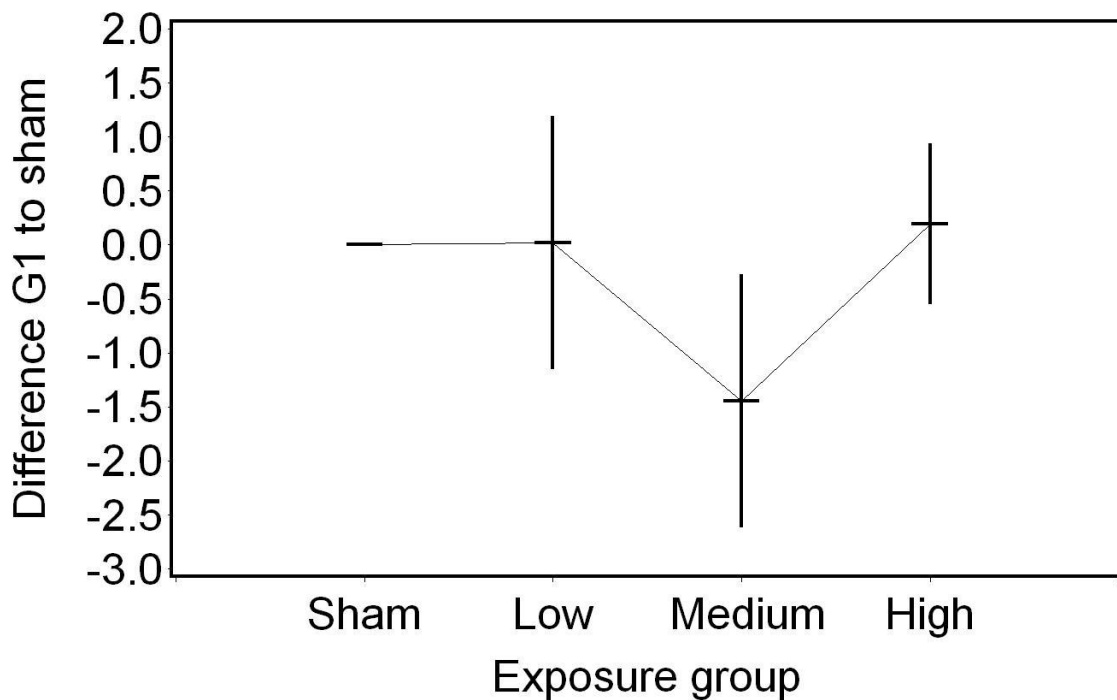


Abbildung 69: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße G1-Phase-Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg)

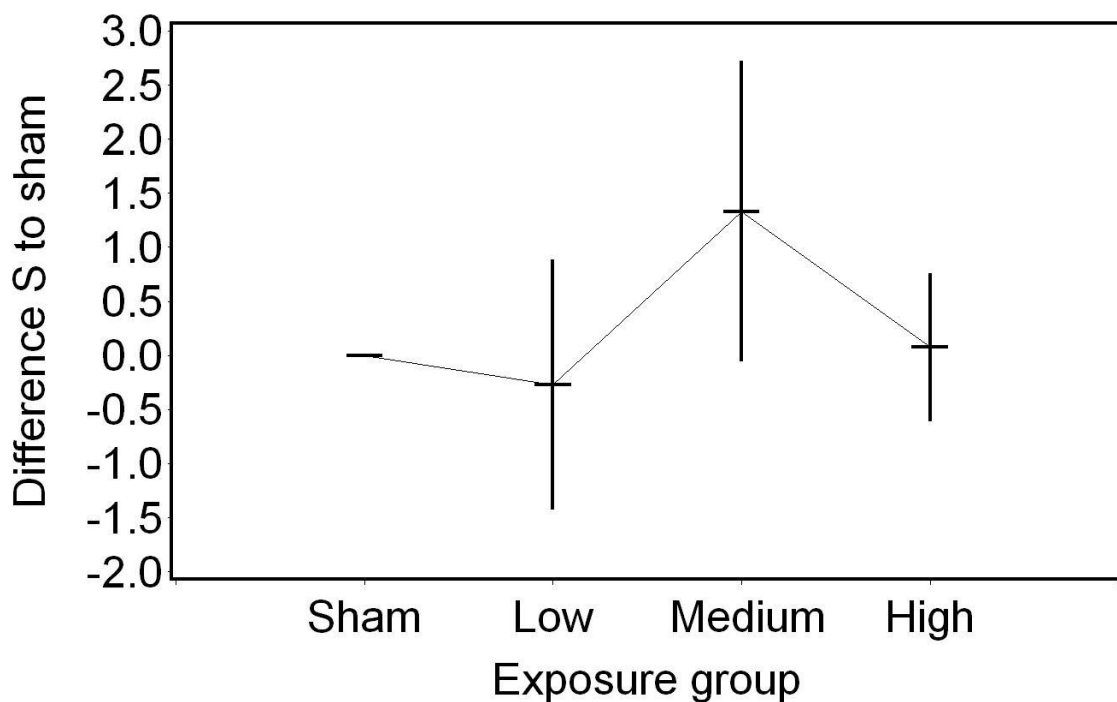


Abbildung 70: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße S-Phase-Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg)

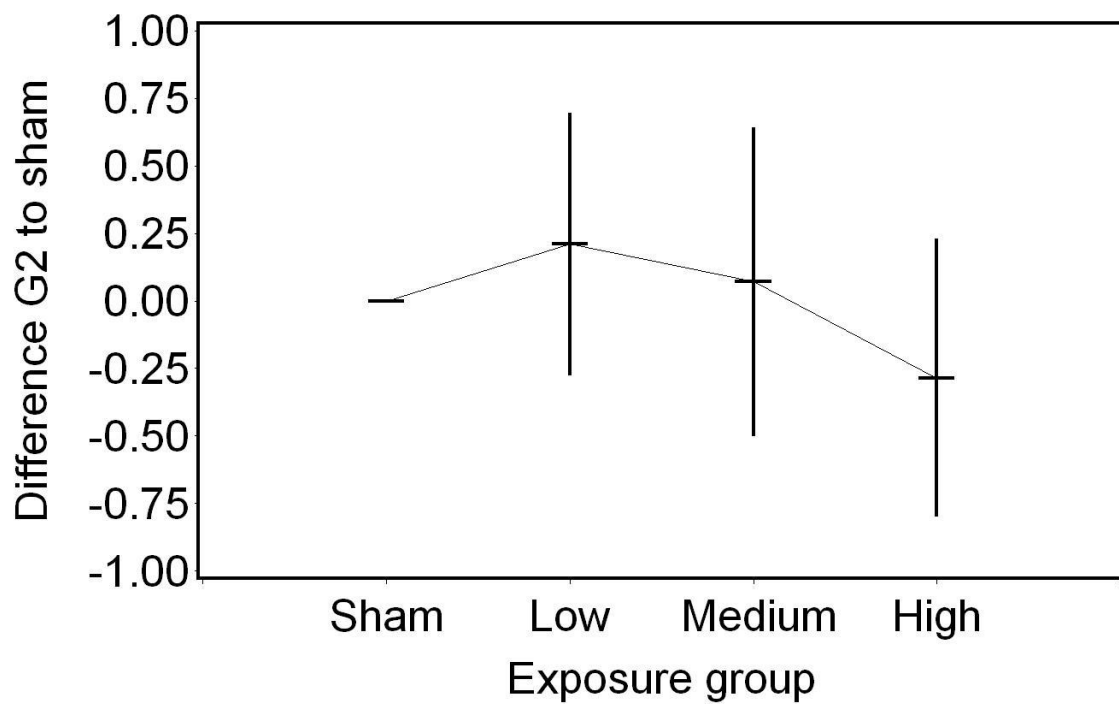


Abbildung 71: Darstellung der Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95% Konfidenzintervall für die Zellzyklusverteilung der Primärzellen, Zielgröße G2-Phase-Zellen, (Sham = 0 W/kg, Low = 0,2 W/kg, Medium = 2 W/kg, High = 10 W/kg)

In den folgenden Tabellen werden nun noch die Mittelwertsdifferenzen und deren Konfidenzintervalle für alle Zielvariablen getrennt nach der Expositionsgruppe aufgeführt. Es werden die Mittelwertsdifferenzen und die entsprechenden Konfidenzintervalle berichtet. Liegt die 0 im Konfidenzintervall so gehen wir davon aus, dass ein statistisch auffälliger Unterschied zwischen den Sham Werten und der jeweiligen Exposition besteht. Wichtig ist darauf zu achten welches Vorzeichen die Mittelwertsdifferenz hat. Ein negatives Vorzeichen bedeutet hier, dass die Werte nach Sham Befeldung höher waren als die nach der entsprechenden anderen Befeldung. Ein positives Vorzeichen bedeutet somit, dass die Werte der entsprechend höheren Exposition größer waren als die der Sham Befeldung.

Tabelle 20: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Comet-Assays

		Exposure time					
		After 4 h			After 16 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Mean	95_LCLM	95_UCLM
Difference CoA Ig OTM to Sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	.0330	-.025	.0908	.0375	-.034	.1095
	Medium	.0017	-.052	.0556	.0366	-.076	.1496
	High	.0025	-.053	.0584	.0204	-.044	.0846
	PK	1.281	1.122	1.441	1.187	.9755	1.399
Difference CoA Ig(100-Head DNA) to Sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	.0296	-.038	.0975	.0020	-.067	.0710
	Medium	-.035	-.091	.0214	.0199	-.058	.0974
	High	-.025	-.099	.0484	.0145	-.036	.0651
	PK	.6612	.5208	.8017	.5978	.4563	.7393

OTM = Olive-Tail-Moment, Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Tabelle 20 fortgesetzt

		Exposure time					
		After 24 h			After 72 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Mean	95_LCLM	95_UCLM
Difference CoA Ig OTM to Sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	.0454	-.016	.1073	-.000	-.100	.0999
	Medium	.0178	-.041	.0770	-.030	-.123	.0623
	High	.0273	-.052	.1065	-.009	-.113	.0954
	PK	1.165	.9797	1.350	.0769	-.161	.3150

		Exposure time					
		After 24 h			After 72 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Mean	95_LCLM	95_UCLM
Difference CoA Ig(100-Head DNA) to Sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	.0648	.0046	.1249	.0069	-.054	.0676
	Medium	.0506	-.012	.1132	-.032	-.103	.0389
	High	.0290	-.051	.1089	.0120	-.067	.0906
	PK	.6167	.4881	.7453	.0699	-.075	.2143

OTM = Olive-Tail-Moment, CoA = Comet-Assay, Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Tabelle 20 fortgesetzt

		Exposure time		
		After 72 h with FPG		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM
Difference CoA Ig OTM to Sham	Exposure group			
	Sham	.0000	.	.
	Low	-.023	-.200	.1531
	Medium	-.031	-.173	.1121
	High	.0598	-.011	.1311
	PK	.8163	.5888	1.044
Difference CoA Ig(100-Head DNA) to Sham	Exposure group			
	Sham	.0000	.	.
	Low	-.011	-.116	.0939
	Medium	-.010	-.092	.0709
	High	.0512	-.011	.1137
	PK	.4247	.2987	.5507

OTM = Olive-Tail-Moment, CoA = Comet-Assay, Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Tabelle 21: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Mikrokerntests

		<i>Exposure time</i>					
		<i>After 15 h</i>			<i>After 72 h</i>		
		<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>	<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>
<i>Difference MN to Sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	1.178	-5.10	7.452	.1575	-5.85	6.161
	<i>Medium</i>	2.269	-7.06	11.59	-4.07	-8.88	.7372
	<i>High</i>	-.337	-5.95	5.280	4.285	-2.79	11.36
	<i>PK</i>	103.0	63.02	142.9	103.9	61.41	146.4
<i>Difference crest positive MN to Sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-1.05	-3.96	1.862	-.764	-3.80	2.273
	<i>Medium</i>	1.660	-2.08	5.396	-2.67	-6.55	1.210
	<i>High</i>	-.070	-3.36	3.218	.7114	-2.37	3.795
	<i>PK</i>	78.41	49.13	107.7	76.45	45.66	107.2
<i>Difference CBPI to Sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.019	-.044	.0056	-.005	-.026	.0162
	<i>Medium</i>	-.019	-.050	.0114	-.009	-.029	.0107
	<i>High</i>	-.009	-.037	.0193	-.003	-.023	.0166
	<i>PK</i>	.0080	-.037	.0533	.0260	-.008	.0601

MN = Mikrokerne, Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Tabelle 21 fortgesetzt

		<i>Exposure time</i>		
		<i>After 72 h extended MN</i>		
		<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>
<i>Difference MN to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-29.5	-134	74.63
	<i>Medium</i>	42.71	-122	207.3
	<i>High</i>	7.213	-71.9	86.34
	<i>PK</i>	325.1	33.52	616.6

		<i>Exposure time</i>		
		<i>After 72 h extended MN</i>		
		<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>
<i>Difference crest positive MN to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-5.39	-34.7	23.93
	<i>Medium</i>	12.30	-11.7	36.25
	<i>High</i>	-.637	-2.42	1.143
	<i>PK</i>	262.0	41.26	482.7
<i>Difference CBPI to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0350	-.007	.0771
	<i>Medium</i>	.0425	-.061	.1459
	<i>High</i>	.0100	-.022	.0418
	<i>PK</i>	.0535	-.045	.1519

MN = Mikrokerne, Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Tabelle 22: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen der Chromosomenaberration

		<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>
<i>Difference cell chromosome loss to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-3.65	-12.8	5.532
	<i>Medium</i>	-4.45	-17.0	8.102
	<i>High</i>	-.248	-13.9	13.41
	<i>PK</i>	-5.22	-24.1	13.69
<i>Difference cell chromosome incr. to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	2.830	-.715	6.375
	<i>Medium</i>	3.130	-.240	6.500
	<i>High</i>	2.230	-1.98	6.442
	<i>PK</i>	6.062	-.122	12.25
<i>Difference aneuploid cells to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.818	-12.0	10.37
	<i>Medium</i>	-1.32	-14.5	11.90
	<i>High</i>	1.982	-13.0	17.00
	<i>PK</i>	.8386	-22.5	24.14

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Tabelle 23: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für TUNEL positive Zellen

		Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference TUNEL pos. cells to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	1.006	-.331	2.343
	<i>Medium</i>	.9321	-.531	2.395
	<i>High</i>	.9028	-.898	2.703
	<i>HL60-Sham</i>	263.8	230.8	296.7
	<i>HL60-Actinomycin</i>	915.9	872.2	959.5

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Tabelle 24: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Zellzyklus

		Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference G1 to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0200	-1.21	1.248
	<i>Medium</i>	-1.45	-2.67	-.220
	<i>High</i>	.1950	-.584	.9739
<i>Difference S to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.275	-1.48	.9346
	<i>Medium</i>	1.330	-.124	2.784
	<i>High</i>	.0750	-.644	.7940
<i>Difference G2 to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.2100	-.299	.7191
	<i>Medium</i>	.0700	-.529	.6690
	<i>High</i>	-.285	-.825	.2547

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Alle Mittelwertsdifferenzen, ausgenommen von solchen im Vergleich von Sham und der Positivkontrolle erweisen sich als statistisch nicht auffällig. Eine Ausnahme, die niedrige Dosis nach 24h Befeldung zeigt im Anteil Head DNA eine Erhöhung, die bei höheren Dosen nicht wiedergefunden wird.

5 Subgruppenanalyse

Da innerhalb dieser Studie zwei Probandengruppen von unterschiedlichem Alter, jüngere und ältere Probanden, untersucht wurden stellt sich die Frage nach Subgruppeneffekten. Es könnte vorkommen, dass zwar kein positiver Dosistrend über das gesamte Probandenkollektiv besteht, aber eine der beiden Probandengruppen, wenn man diese separat betrachtet, einen auffälligen Dosistrend aufweist.

Zunächst werden hier die Mittelwerte und Standardabweichungen der unterschiedlichen Zielvariablen separat für die jüngeren und älteren Probanden dargestellt. Es werden immer erst die Ergebnisse für die jüngeren Probanden anschließend dann die Ergebnisse für die älteren Probanden präsentiert.

5.1 Mittelwerte und Standardabweichungen für jüngere und ältere Probanden

Tabelle 25: Jüngere Probanden (n=10): Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Comet-Assays und alle Expositionsbedingungen

		Exposure time									
		4 h		16 h		24 h		72 h		72 h with FPG	
		Mean	StdDev	Mean	StdDev	Mean	StdDev	Mean	StdDev	Mean	StdDev
Olive-Tail-Moment	Exposure group										
	Sham	1.71	0.64	3.18	3.77	2.52	1.77	2.98	2.15	2.56	1.38
	Low	1.77	0.44	2.51	1.01	3.42	3.39	3.04	1.35	2.56	1.12
	Medium	1.83	0.83	2.06	0.48	2.40	1.02	2.65	1.07	2.66	0.77
	High	1.90	0.55	2.50	1.87	3.22	2.88	2.76	1.14	2.84	0.98
	PK	23.50	8.97	21.86	8.45	21.86	8.45	3.32	1.41	18.69	9.93
Median Head DNA(%)	Exposure group										
	Sham	79.73	12.43	74.68	12.23	77.93	9.71	71.08	10.98	73.34	9.63
	Low	77.87	11.27	75.66	10.56	71.52	11.62	68.55	12.55	73.07	10.26
	Medium	80.42	12.42	77.38	8.59	75.21	9.58	70.86	13.47	71.87	9.16
	High	77.66	12.37	75.71	12.43	74.05	13.09	69.49	12.39	68.66	10.80
	PK	26.51	12.92	30.50	13.43	30.50	13.43	66.90	9.74	29.21	14.18
Log Olive-Tail-Moment	Exposure group										
	Sham	0.20	0.17	0.37	0.30	0.30	0.32	0.41	0.24	0.37	0.18
	Low	0.23	0.12	0.37	0.16	0.40	0.34	0.45	0.17	0.38	0.17
	Medium	0.21	0.25	0.30	0.11	0.34	0.20	0.40	0.16	0.41	0.12
	High	0.25	0.18	0.33	0.24	0.39	0.33	0.41	0.16	0.43	0.16
	PK	1.32	0.25	1.29	0.24	1.29	0.24	0.49	0.16	1.22	0.21

		<i>Exposure time</i>									
		<i>4 h</i>		<i>16 h</i>		<i>24 h</i>		<i>72 h</i>		<i>72 h with FPG</i>	
		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>
<i>Log Median Head DNA(%)</i>	<i>Exposure group</i>										
	<i>Sham</i>	1.22	0.29	1.35	0.23	1.29	0.27	1.43	0.20	1.40	0.18
	<i>Low</i>	1.28	0.26	1.34	0.21	1.41	0.24	1.46	0.19	1.40	0.18
	<i>Medium</i>	1.19	0.32	1.32	0.18	1.36	0.18	1.42	0.23	1.43	0.15
	<i>High</i>	1.28	0.26	1.33	0.25	1.35	0.28	1.44	0.21	1.46	0.19
	<i>PK</i>	1.86	0.08	1.83	0.09	1.83	0.09	1.50	0.13	1.84	0.10

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

Tabelle 26: Jüngere Probanden (n=10):Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Mikrokerntests und alle Expositionsbedingungen Die Zielvariablen MN und crest positive MN sind jeweils auf 2000 ausgewertete Zellen, bzw. beim erweiterten Mikrokerntest auf 10000 ausgewertete Zellen hochgerechnet

		<i>Exposure time</i>			
		<i>15 h</i>		<i>72 h</i>	
		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>
<i>MN</i>	<i>Exposure group</i>				
	<i>Sham</i>	18.16	11.62	22.82	17.50
	<i>Low</i>	21.68	12.10	27.40	20.84
	<i>Medium</i>	20.14	20.52	19.15	14.74
	<i>High</i>	13.70	8.38	22.71	20.03
	<i>PK</i>	145.1	106.1	148.7	101.7
<i>crest positive MN</i>	<i>Exposure group</i>				
	<i>Sham</i>	4.92	6.51	6.19	5.33
	<i>Low</i>	5.81	5.19	6.53	5.71
	<i>Medium</i>	4.82	5.60	3.55	4.59
	<i>High</i>	3.16	3.23	5.69	6.70
	<i>PK</i>	92.71	78.14	89.10	79.16
<i>CBPI</i>	<i>Exposure group</i>				
	<i>Sham</i>	1.12	0.07	1.11	0.08
	<i>Low</i>	1.10	0.03	1.10	0.05
	<i>Medium</i>	1.10	0.05	1.10	0.05
	<i>High</i>	1.11	0.05	1.11	0.06
	<i>PK</i>	1.15	0.10	1.15	0.10

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

Tabelle 27: Jüngere Probanden (n=7): Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen der Chromosomenaberration und alle Expositionsbedingungen. Die Zielvariablen sind auf 200 ausgewertete Mitosen hochgerechnet

		Mean	StdDev
cells with chromosome loss	Exposure group		
	Sham	83.14	18.11
	Low	81.57	15.43
	Medium	75.86	23.26
	High	80.71	20.09
	PK	71.00	25.28
cells with chromosome increase	Exposure group		
	Sham	4.714	1.976
	Low	7.429	3.910
	Medium	9.286	3.302
	High	8.000	5.132
	PK	8.429	5.192
aneuploid cells	Exposure group		
	Sham	87.86	17.97
	Low	89.00	15.34
	Medium	85.14	24.15
	High	88.71	20.99
	PK	79.43	28.77

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

Tabelle 28: Jüngere Probanden (n=10): Mittelwerte und Standardabweichung für TUNEL positive Zellen und alle Expositionsbedingungen. TUNEL positive cells werden unter 1000 ausgewerteten Zellen angegeben.

		Mean	StdDev
TUNEL positive cells	Exposure group		
	Sham	1.635	1.859
	Low	1.151	1.603
	Medium	1.273	2.703
	High	.7597	1.007
	HL60-Sham	268.9	63.14
	HL60-Actinomycin	930.6	78.26

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

Tabelle 29: Jüngere Probanden (n=10): Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Zellzyklustests und alle Expositionsbedingungen

		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>
<i>G1</i>	<i>Exposure group</i>		
	<i>Sham</i>	84.06	6.692
	<i>Low</i>	83.59	7.595
	<i>Medium</i>	82.60	7.072
	<i>High</i>	84.29	7.459
<i>S</i>	<i>Exposure group</i>		
	<i>Sham</i>	9.010	6.008
	<i>Low</i>	9.400	6.941
	<i>Medium</i>	10.81	6.735
	<i>High</i>	8.980	6.630
<i>G2</i>	<i>Exposure group</i>		
	<i>Sham</i>	6.950	2.008
	<i>Low</i>	7.020	2.144
	<i>Medium</i>	6.590	1.699
	<i>High</i>	6.760	1.929

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

Tabelle 30: Ältere Probanden (n=10): Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Comet-Assays und alle Expositionsbedingungen

		<i>Exposure time</i>									
		<i>4 h</i>		<i>16 h</i>		<i>24 h</i>		<i>72 h</i>		<i>72 h with FPG</i>	
		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>
<i>Olive-Tail-Moment</i>	<i>Exposure group</i>										
	<i>Sham</i>	1.52	0.94	1.64	0.99	2.21	1.58	2.85	2.22	6.53	11.97
	<i>Low</i>	1.59	0.91	2.06	1.43	2.08	1.43	2.58	2.30	3.22	2.25
	<i>Medium</i>	1.47	0.84	3.11	4.06	2.01	1.33	2.34	1.28	2.87	1.90
	<i>High</i>	1.37	0.83	2.12	1.68	1.94	1.22	2.55	1.65	7.73	14.32
	<i>PK</i>	34.62	9.45	34.62	9.45	34.62	9.45	5.30	8.22	21.59	12.34
<i>Median Head DNA(%)</i>	<i>Exposure group</i>										
	<i>Sham</i>	78.12	13.61	78.96	15.11	78.69	11.99	73.99	16.60	68.55	23.11
	<i>Low</i>	79.13	13.21	79.38	12.14	79.03	10.79	76.10	14.01	74.05	11.88
	<i>Medium</i>	81.28	10.58	74.34	18.60	79.69	8.06	76.76	14.28	74.74	14.30
	<i>High</i>	83.39	11.39	77.40	13.37	80.36	8.77	76.72	9.86	67.25	23.47
	<i>PK</i>	15.16	4.43	15.15	4.43	15.15	4.43	68.41	21.93	33.75	18.51
<i>Log Olive-Tail-Moment</i>	<i>Exposure group</i>										
	<i>Sham</i>	0.08	0.34	0.08	0.44	0.18	0.45	0.32	0.39	0.47	0.53
	<i>Low</i>	0.12	0.31	0.15	0.47	0.18	0.42	0.27	0.37	0.41	0.31
	<i>Medium</i>	0.08	0.32	0.21	0.56	0.18	0.39	0.27	0.37	0.37	0.32
	<i>High</i>	0.04	0.35	0.16	0.46	0.15	0.43	0.29	0.37	0.53	0.53
	<i>PK</i>	1.52	0.12	1.52	0.12	1.52	0.12	0.38	0.60	1.24	0.33
<i>Log Median Head DNA(%)</i>	<i>Exposure group</i>										
	<i>Sham</i>	1.24	0.33	1.21	0.35	1.24	0.31	1.32	0.32	1.40	0.32
	<i>Low</i>	1.24	0.28	1.23	0.32	1.25	0.28	1.30	0.29	1.37	0.20
	<i>Medium</i>	1.20	0.27	1.28	0.38	1.27	0.21	1.27	0.33	1.35	0.23
	<i>High</i>	1.13	0.29	1.27	0.31	1.24	0.24	1.33	0.21	1.43	0.28
	<i>PK</i>	1.93	0.02	1.93	0.02	1.93	0.02	1.39	0.36	1.80	0.14

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

Tabelle 31: Ältere Probanden (n=10): Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Mikrokerntests und alle Expositionsbedingungen Die Zielvariablen MN und crest positive MN sind jeweils auf 2000 ausgewertete Zellen, bzw. beim erweiterten Mikrokerntest auf 10000 ausgewertete Zellen hochgerechnet

		<i>Exposure time</i>					
		<i>15 h</i>		<i>72 h</i>		<i>72 h extended MN</i>	
		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>	<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>
<i>MN</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	31.25	21.19	39.54	35.00	101.1	49.88
	<i>Low</i>	30.08	21.82	35.26	30.80	71.59	54.29
	<i>Medium</i>	33.80	21.98	35.06	29.29	143.8	143.6
	<i>High</i>	35.03	27.54	48.21	38.29	108.4	89.30
	<i>PK</i>	110.2	39.92	121.5	55.18	426.2	226.3
<i>crest positive MN</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	8.34	7.33	11.94	16.40	16.87	16.11
	<i>Low</i>	5.36	5.25	10.07	12.99	11.48	7.16
	<i>Medium</i>	11.76	9.22	9.24	11.36	29.16	31.02
	<i>High</i>	9.96	9.26	13.85	13.10	16.23	15.37
	<i>PK</i>	77.38	41.45	81.92	43.99	278.8	151.2
<i>CBPI</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	1.12	0.11	1.09	0.04	1.09	0.03
	<i>Low</i>	1.10	0.07	1.09	0.03	1.13	0.02
	<i>Medium</i>	1.10	0.05	1.08	0.03	1.13	0.09
	<i>High</i>	1.11	0.09	1.09	0.04	1.10	0.02
	<i>PK</i>	1.11	0.06	1.10	0.06	1.14	0.07

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

Tabelle 32: Ältere Probanden (n=3): Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen der Chromosomenaberration und alle Expositionsbedingungen. Die Zielvariablen sind auf 200 ausgewertete Mitosen hochgerechnet.

		<i>Mean</i>	<i>StdDev</i>
<i>cells with chromosome loss</i>	<i>Exposure group</i>		
	<i>Sham</i>	55.83	22.42
	<i>Low</i>	47.33	28.31
	<i>Medium</i>	58.00	43.86
	<i>High</i>	60.67	25.32
	<i>PK</i>	66.75	49.95

		Mean	StdDev
cells with chromosome increase	Exposure group		
	Sham	7.566	5.362
	Low	10.67	3.786
	Medium	7.333	7.024
	High	7.333	2.082
	PK	19.11	13.68
aneuploid cells	Exposure group		
	Sham	63.39	27.33
	Low	58.00	26.29
	Medium	65.33	50.65
	High	68.00	27.22
	PK	85.86	61.34

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

Tabelle 33: Ältere Probanden (n=10): Mittelwerte und Standardabweichung für TUNEL positive Zellen und alle Expositionsbedingungen. TUNEL positive cells werden unter 1000 ausgewerteten Zellen angegeben.

		Mean	StdDev
TUNEL positive cells	Exposure group		
	Sham	3.632	4.045
	Low	6.128	7.050
	Medium	5.857	6.995
	High	6.312	8.618
	HL60-Sham	263.9	81.66
	HL60-Actinomycin	906.5	109.9

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

Tabelle 34: Ältere Probanden (n=10): Mittelwerte und Standardabweichung für die Zielvariablen des Zellzyklustests und alle Expositionsbedingungen

	Mean	StdDev
G1 Exposure group		
Sham	82.66	5.841
Low	83.17	5.770
Medium	81.23	7.345
High	82.82	6.459
S Exposure group		
Sham	8.730	3.936
Low	7.790	3.711
Medium	9.590	6.096
High	8.910	3.812

	Mean	StdDev
G2 Exposure group		
Sham	8.660	3.588
Low	9.010	3.707
Medium	9.160	3.984
High	8.280	4.264

Mean = Mittelwert, StdDev = Standardabweichung

Im Folgenden werden die Subgruppenanalysen auf einen Dosistrend für die Zielvariablen dargestellt. Da diese Analysen rein explorativer Natur sind darf bei p-Werten von kleiner als 0.05 von einem statistisch auffälligen Trend gesprochen werden, nicht aber von einem signifikanten. Ist das Vorzeichen des Mittleren Trendscores negativ so spricht man, bei einem auffälligen p-Wert von einem negativen Trend.

5.2 Dosistrendanalysen für jüngere und ältere Probanden

Hinweis: Die p-Werte sind die exakten p-Werte, berechnet anhand des Permutationstests. Der exakte Permutationstest gibt keine Schätzer und Konfidenzintervalle aus. Die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden rein asymptotisch anhand eines Trendscores berechnet.

Tabelle 35: Jüngere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Comet-Assays. Der p-Wert wurde exakt bestimmt(Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

Young

		Mean	95_LCLM	95_UCLM	P-Wert
Log Olive-Tail-Moment	Exposure time				
	After 4 h	0.01	-0.01	0.04	0.631
	After 16 h	-0.02	-0.05	0.02	0.5299
	After 24 h	0.02	-0.02	0.06	0.6366
	After 72 h	-0.00	-0.05	0.04	0.9106
	After 72 h FPG	0.02	-0.02	0.07	0.3294
Log (100-Median Head DNA(%))	Exposure time				
	After 4 h	0.01	-0.01	0.03	0.8203
	After 16 h	-0.01	-0.03	0.02	0.7415
	After 24 h	0.01	-0.02	0.05	0.6872
	After 72 h	0.00	-0.04	0.04	0.9672
	After 72 h FPG	0.02	-0.02	0.06	0.3423

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Tabelle 36: Jüngere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Mikrokerntests. Der p-Wert wurde exakt bestimmt(Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

Young		Mea	95_LCL	95_UCL	
		n	M	M	P-Wert
MN	Exposure time	-			
	After 15 h	1.49	-4.47	1.48	0.4629
	After 72 h	-			
		0.86	-2.14	0.43	0.741
crest positive MN	Exposure time	-			
	After 15 h	0.63	-1.90	0.64	0.4000
	After 72 h	-			
		0.45	-1.34	0.45	0.5772
CBPI	Exposure time	-			
	After 15 h	0.00	-0.01	0.01	0.8241
	After 72 h	-			
		0.00	-0.01	0.01	0.8575

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Tabelle 37: Jüngere Probanden (n=7): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen der Chromosomen-aberration. Der p-Wert wurde exakt bestimmt(Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

Young		Mean	95_LCLM	95_UCLM	P-Wert
cells with chromosome loss		-1.30	-8.14	5.54	0.6872
cells chromosome increase		1.17	-0.72	3.07	0.0808
aneuploid cells		-0.13	-7.78	7.52	0.9717

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Tabelle 38: Jüngere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für TUNEL positive Zellen. Der p-Wert wurde exakt bestimmt(Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

Young		Mean	95_LCLM	95_UCLM	P-Wert
TUNEL-positive cells		-0.25	-0.47	-0.03	0.3585*

* Der asymptotische p-Wert lag hier bei 0.0291. Wichtig zu beachten ist, dass der Mittelwert im negativen Wertebereich liegt. Wenn ein Trend vorliegt wäre dies ein negativer Trend.

Tabelle 39: Jüngere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Zellzyklus. Der p-Wert wurde exakt bestimmt(Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

Young

	Mean	95_LCLM	95_UCLM	P-Wert
G1	-0.03	-0.32	0.26	0.9768
S	0.13	-0.15	0.42	0.886
G2	-0.10	-0.26	0.06	0.7136

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

Die exakten p-Werte, berechnet anhand des Permutationstests zum Testen auf einen Dosistrend, zeigen keine Auffälligkeiten bei den jüngeren Probanden.

Tabelle 40: Ältere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Comet-Assays. Der p-Wert wurde exakt bestimmt(Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

Old

		Mean	95_LCLM	95_UCLM	P-Wert
<i>Log Olive-Tail-Moment</i>	<i>Exposure time</i>				
	<i>After 4 h</i>	-0.02	-0.04	0.01	0.7043
	<i>After 16 h</i>	0.03	-0.00	0.06	0.6438
	<i>After 24 h</i>	-0.01	-0.04	0.02	0.8775
	<i>After 72 h</i>	-0.01	-0.06	0.04	0.8706
	<i>After 72 h FPG</i>	0.01	-0.01	0.04	0.8374
<i>Log (100-Median Head DNA(%))</i>	<i>Exposure time</i>				
	<i>After 4 h</i>	-0.04	-0.07	-0.00	0.3640*
	<i>After 16 h</i>	0.02	-0.00	0.05	0.6387
	<i>After 24 h</i>	0.00	-0.04	0.04	0.9853
	<i>After 72 h</i>	-0.00	-0.04	0.04	0.964
	<i>After 72 h FPG</i>	0.01	-0.01	0.03	0.8371

Mean = Mittelwert, 95_LCLM/ 95_UCLM = 95% Konfidenzintervall untere/ obere Grenze

*Der asymptotische p-Wert lag hier bei 0.0348. Wichtig zu beachten ist, dass der Mittelwert im negativen Wertebereich liegt. Wenn ein Trend vorliegt wäre dies ein negativer Trend.

Tabelle 41: Ältere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Mikrokerntests. Der p-Wert wurde exakt bestimmt(Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

Old

		Mean	95_LCLM	95_UCLM	P-Wert
<i>MN</i>	<i>Exposure time</i>				
	<i>After 15 h</i>	1.51	-0.98	4.00	0.6409
	<i>After 72 h</i>	2.58	-1.43	6.59	0.5824
	<i>After 72 h with FPG</i>	9.39	-40.2	59.01	0.6653
<i>Crest positive MN</i>	<i>Exposure time</i>				
	<i>After 15 h</i>	1.13	-0.73	2.98	0.3263
	<i>After 72 h</i>	0.49	-1.58	2.57	0.7973
	<i>After 72 h with FPG</i>	1.58	-3.24	6.39	0.746
<i>CBPI</i>	<i>Exposure time</i>				
	<i>After 15 h</i>	-0.00	-0.02	0.01	0.7402
	<i>After 72 h</i>	-0.00	-0.01	0.01	0.8247
	<i>After 72 h with FPG</i>	0.00	-0.01	0.01	0.7748

Tabelle 42: Ältere Probanden (n=3): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen der Chromosomenaberration. Der p-Wert wurde exakt bestimmt(Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

Old

	Mean	95_LCLM	95_UCLM	P-Wert
cells with chromosome loss	2.52	-6.34	11.38	0.733
cells chromosome increase	-0.40	-1.30	0.50	0.7448
aneuploid cells	2.12	-5.88	10.11	0.795

Tabelle 43: Ältere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für TUNEL positive Zellen. Der p-Wert wurde exakt bestimmt(Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

Old

	Mean	95_LCLM	95_UCLM	P-Wert
TUNEL-positive cells	0.78	-0.17	1.72	0.4201

Tabelle 44: Ältere Probanden (n=10): Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die Zielvariablen des Zellzyklus. Der p-Wert wurde exakt bestimmt(Permutationstest), die Schätzer und Konfidenzintervalle wurden asymptotisch berechnet.

Old

	Mean	95_LCLM	95_UCLM	P-Wert
G1	-0.15	-0.64	0.35	0.8708
S	0.23	-0.29	0.76	0.7125
G2	-0.10	-0.44	0.24	0.8567

Die exakten p-Werte, berechnet anhand des Permutationstests zum Testen auf einen Dosistrend, zeigen keine Auffälligkeiten bei den älteren Probanden.

5.3 Differenzen zu Sham für jüngere und ältere Probanden

Wie auch für das Gesamtkollektiv wurden separat für die jüngeren und älteren Probanden Differenzen zu Sham Exposition berechnet. Die Ergebnisse werden in den folgenden Tabellen mit der Mittelwertsdifferenz und dem 95% Konfidenzintervall dargestellt.

Da diese Analysen rein explorativ zu bewerten sind werden keine p-Werte angegeben. Man kann von einer statistisch auffälligen Differenz zur Sham Exposition sprechen, wenn das Konfidenzintervall die 0 nicht enthält. Wichtig ist das Vorzeichen der Mittelwertsdifferenz zu berücksichtigen.

Wie bei den Analysen des Gesamtkollektivs wurden auch hier die Differenzen Expositionsgruppe minus Negativ-Befeldung berechnet. Somit deuten negative Mittelwertsdifferenzen darauf hin, dass die Sham Exposition im Schnitt die höheren Werte aufwies.

Tabelle 45: Jüngere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Comet-Assays

		Exposure time					
		After 4 h			After 16 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Mean	95_LCLM	95_UCLM
Difference CoA Ig OTM to Sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	.0309	-.072	.1333	.0039	-.128	.1361
	Medium	.0055	-.098	.1091	-.065	-.230	.1004
	High	.0505	-.029	.1297	-.042	-.140	.0569
	PK	1.120	.9327	1.307	.9264	.7067	1.146
Difference CoA Ig Head DNA to Sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	.0587	-.045	.1622	-.008	-.097	.0810
	Medium	-.030	-.105	.0451	-.031	-.153	.0915
	High	.0595	-.013	.1323	-.026	-.093	.0417
	PK	.6361	.4366	.8356	.4817	.3437	.6198

Tabelle 45 fortgesetzt

		Exposure time					
		After 24 h			After 72 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Mean	95_LCLM	95_UCLM
Difference CoA Ig OTM to Sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	.0936	.0040	.1833	.0441	-.110	.1987
	Medium	.0394	-.059	.1383	-.009	-.159	.1419
	High	.0843	-.034	.2024	.0080	-.145	.1607
	PK	.9892	.7975	1.181	.0868	-.141	.3144

		<i>Exposure time</i>					
		<i>After 24 h</i>			<i>After 72 h</i>		
		<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>	<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>
<i>Difference CoA Ig Head DNA to Sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.1198	.0478	.1918	.0369	-.053	.1271
	<i>Medium</i>	.0756	-.014	.1650	-.010	-.115	.0961
	<i>High</i>	.0610	-.051	.1724	.0195	-.102	.1405
	<i>PK</i>	.5486	.3893	.7079	.0763	-.049	.2016

Beim Comet-Assay wiesen die beiden Zielvariablen für die jüngeren Probanden jeweils zum Zeitpunkt nach 24 Stunden Exposition bei der Low Befeldung eine statistische auffällige Differenz zur Negativ-Befeldung auf. Der Trend ist aber nicht monoton. Bei mittlerer und höherer Dosis wird ein schwächerer und statistisch unauffälliger Effekt beobachtet. Der Test auf Trend ist statistisch unauffällig.

Tabelle 45 fortgesetzt

		<i>Exposure time</i>		
		<i>After 72 h with FPG</i>		
		<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>
<i>Difference CoA Ig OTM to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0079	-.110	.1255
	<i>Medium</i>	.0419	-.049	.1329
	<i>High</i>	.0611	-.079	.2016
	<i>PK</i>	.8569	.6709	1.043
<i>Difference CoA Ig Head DNA to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0039	-.088	.0955
	<i>Medium</i>	.0321	-.072	.1360
	<i>High</i>	.0684	-.057	.1938
	<i>PK</i>	.4450	.3369	.5531

Tabelle 46: Jüngere Probanden (n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Mikrokerntests

		Exposure time					
		After 15 h			After 72 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference MN to Sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	3.525	-4.36	11.41	4.589	-1.90	11.08
	<i>Medium</i>	1.982	-15.6	19.60	-3.67	-8.35	1.012
	<i>High</i>	-4.46	-12.0	3.099	-.103	-4.50	4.299
	<i>PK</i>	127.0	48.46	205.5	125.9	48.00	203.8
<i>Difference crest positive MN to Sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.8886	-2.07	3.850	.3421	-2.95	3.638
	<i>Medium</i>	-.095	-4.32	4.128	-2.64	-5.99	.7092
	<i>High</i>	-1.76	-5.39	1.871	-.491	-2.66	1.678
	<i>PK</i>	87.79	30.35	145.2	82.92	24.39	141.4
<i>Difference CBPI to Sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.018	-.061	.0248	-.009	-.045	.0274
	<i>Medium</i>	-.016	-.055	.0235	-.009	-.039	.0212
	<i>High</i>	-.006	-.044	.0316	-.005	-.038	.0276
	<i>PK</i>	.0290	-.039	.0973	.0410	-.028	.1098

Tabelle 47: Jüngere Probanden(n=7): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen der Chromosomenaberration

		Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference cell chromosome loss to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	2.429	-15.9	20.71
	<i>Medium</i>	-8.71	-21.9	4.427
	<i>High</i>	-8.00	-27.4	11.43
	<i>PK</i>	-12.1	-35.0	10.68

		Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference cell chromosome incr. to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	2.143	-1.50	5.781
	<i>Medium</i>	4.143	-.110	8.395
	<i>High</i>	4.167	-1.48	9.815
	<i>PK</i>	3.714	-1.95	9.383
<i>Difference aneuploid cells to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	4.571	-15.7	24.80
	<i>Medium</i>	-4.57	-18.2	9.093
	<i>High</i>	-3.83	-26.9	19.19
	<i>PK</i>	-8.43	-35.1	18.20

Tabelle 48: Jüngere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition nach Expositionsgruppe (EG) für TUNEL positive Zellen

		Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference TUNEL pos. cells to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.100	-1.56	1.357
	<i>Medium</i>	-1.07	-4.61	2.471
	<i>High</i>	-1.53	-4.40	1.329
	<i>HL60-Sham</i>	267.3	222.2	312.4
	<i>HL60-Actinomycin</i>	928.9	873.1	984.8

Tabelle 49: Jüngere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Zellzyklus

		Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference G1 to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-1.17	-5.15	2.813
	<i>Medium</i>	-2.80	-5.98	.3814
	<i>High</i>	-1.08	-4.85	2.689
<i>Difference S to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	1.800	-1.42	5.017
	<i>Medium</i>	2.700	-.749	6.149
	<i>High</i>	1.310	-2.13	4.754
<i>Difference G2 to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.640	-2.54	1.258
	<i>Medium</i>	.0800	-1.05	1.206
	<i>High</i>	-.220	-2.35	1.910

Bei den Zielvariablen des Mikrokerntests, der Chromosomenaberration, wie auch des TUNEL-Apoptose-Tests und Zellzyklus war keine der Differenzen zur Negativ-Befeldung statistisch auffällig.

Tabelle 50: Ältere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Comet-Assays

		Exposure time					
		After 4 h			After 16 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Mean	95_LCLM	95_UCLM
Difference CoA Ig OTM to Sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	.0351	-.042	.1126	.0711	-.011	.1537
	Medium	-.002	-.061	.0574	.1378	-.018	.2931
	High	-.046	-.126	.0352	.0824	.0033	.1615
	PK	1.443	1.196	1.689	1.448	1.139	1.757
Difference CoA Ig Head DNA to Sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	.0004	-.105	.1056	.0122	-.112	.1363
	Medium	-.040	-.140	.0602	.0705	-.038	.1790
	High	-.110	-.226	.0053	.0546	-.025	.1338
	PK	.6863	.4480	.9246	.7138	.4601	.9675

Tabelle 50 fortgesetzt

		Exposure time					
		After 24 h			After 72 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Mean	95_LCLM	95_UCLM
Difference CoA Ig OTM to Sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	-.003	-.093	.0877	-.044	-.197	.1080
	Medium	-.004	-.087	.0797	-.052	-.191	.0863
	High	-.030	-.145	.0857	-.026	-.199	.1475
	PK	1.340	1.029	1.652	.0669	-.410	.5443
Difference CoA Ig Head DNA to Sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	.0097	-.086	.1058	-.023	-.118	.0718
	Medium	.0255	-.078	.1286	-.055	-.170	.0602
	High	-.003	-.137	.1308	.0045	-.121	.1302
	PK	.6847	.4591	.9103	.0634	-.232	.3586

		Exposure time		
		After 72 h with FPG		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM
Difference CoA Ig OTM to Sham	Exposure group			
	Sham	.0000	.	.
	Low	-.055	-.427	.3177
	Medium	-.103	-.397	.1904
	High	.0586	-.014	.1314
	PK	.7757	.3079	1.243
Difference CoA Ig Head DNA to Sham	Exposure group			
	Sham	.0000	.	.
	Low	-.026	-.240	.1877
	Medium	-.053	-.193	.0876
	High	.0340	-.023	.0906
	PK	.4044	.1471	.6617

Es zeigt sich beim Comet-Assay bei den älteren Probanden in der Zielgröße: CoA Ig OTM eine auffällige Differenz zur Negativ-Befeldung in der High Befeldung nach 16 Stunden Exposition. Bei niedriger und mittlerer Dosis wird ein statistisch unauffälliger Effekt beobachtet. Der Test auf Trend ist nicht statistisch auffällig.

Tabelle 51: Ältere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Mikrokerntests

		Exposure time					
		After 15 h			After 72 h		
		Mean	95_LCLM	95_UCLM	Mean	95_LCLM	95_UCLM
Difference MN to Sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	-1.17	-12.4	10.04	-4.27	-14.9	6.371
	Medium	2.556	-8.32	13.43	-4.47	-14.1	5.114
	High	3.787	-5.11	12.68	8.672	-5.66	23.01
	PK	78.94	46.61	111.3	81.92	34.09	129.7
Difference crest positive MN to Sham	Exposure group						
	Sham	.0000	.	.	.0000	.	.
	Low	-2.98	-8.34	2.376	-1.87	-7.64	3.896
	Medium	3.414	-3.48	10.31	-2.70	-10.6	5.238
	High	1.621	-4.45	7.694	1.914	-4.45	8.282
	PK	69.03	40.22	97.85	69.98	35.29	104.7

		<i>Exposure time</i>					
		<i>After 15 h</i>			<i>After 72 h</i>		
		<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>	<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>
<i>Difference CBPI to Sham</i>	<i>Exposure group</i>						
	<i>Sham</i>	.0000	.	.	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-.020	-.054	.0141	-.001	-.030	.0285
	<i>Medium</i>	-.023	-.079	.0330	-.009	-.041	.0225
	<i>High</i>	-.012	-.062	.0383	-.001	-.030	.0279
	<i>PK</i>	-.013	-.083	.0574	.0110	-.016	.0383

Tabelle 51 fortgesetzt

		<i>Exposure time</i>		
		<i>After 72 h extended MN</i>		
		<i>Mean</i>	<i>95_LCLM</i>	<i>95_UCLM</i>
<i>Difference MN to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-29.5	-134	74.63
	<i>Medium</i>	42.71	-122	207.3
	<i>High</i>	7.213	-71.9	86.34
	<i>PK</i>	325.1	33.52	616.6
<i>Difference crest positive MN to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-5.39	-34.7	23.93
	<i>Medium</i>	12.30	-11.7	36.25
	<i>High</i>	-.637	-2.42	1.143
	<i>PK</i>	262.0	41.26	482.7
<i>Difference CBPI to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.0350	-.007	.0771
	<i>Medium</i>	.0425	-.061	.1459
	<i>High</i>	.0100	-.022	.0418
	<i>PK</i>	.0535	-.045	.1519

Tabelle 52: Ältere Probanden(n=3): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen der Chromosomenaberration

		Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference cell chromosome loss to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-6.33	-18.1	5.406
	<i>Medium</i>	2.173	-53.1	57.47
	<i>High</i>	6.840	-15.5	29.21
	<i>PK</i>	10.92	-57.6	79.46
<i>Difference cell chromosome incr. to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	8.667	-.738	18.07
	<i>Medium</i>	-.233	-4.36	3.898
	<i>High</i>	1.767	-10.6	14.10
	<i>PK</i>	11.54	-19.8	42.89
<i>Difference aneuploid cells to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	2.333	-9.14	13.81
	<i>Medium</i>	1.940	-57.5	61.34
	<i>High</i>	8.607	-20.3	37.51
	<i>PK</i>	22.46	-66.6	111.5

Tabelle 53: Ältere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für TUNEL positive Zellen

		Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference TUNEL pos. cells to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	3.583	-.440	7.607
	<i>Medium</i>	4.093	-.666	8.853
	<i>High</i>	3.380	-1.03	7.793
	<i>HL60-Sham</i>	260.3	202.7	317.8
	<i>HL60-Actinomycin</i>	902.8	824.9	980.8

Tabelle 54: Ältere Probanden(n=10): Differenzen zur Sham Exposition getrennt nach Expositionsgruppe (EG) für die Zielvariablen des Zellzyklus

		Mean	95_LCLM	95_UCLM
<i>Difference G1 to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.8800	-5.46	7.221
	<i>Medium</i>	-.830	-5.53	3.871
	<i>High</i>	1.720	-.150	3.590
<i>Difference S to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	-1.31	-5.63	3.006
	<i>Medium</i>	-.240	-5.40	4.921
	<i>High</i>	-1.35	-3.50	.8035
<i>Difference G2 to Sham</i>	<i>Exposure group</i>			
	<i>Sham</i>	.0000	.	.
	<i>Low</i>	.3500	-3.09	3.786
	<i>Medium</i>	1.070	.1657	1.974
	<i>High</i>	-.470	-2.44	1.500

Es zeigt sich beim Zellzyklus bei den älteren Probanden in der Zielgröße G2 eine auffällige Differenz zur Negativ-Befeldung in der Medium Befeldung. Die Differenz zur niedrigen Dosis erweist sich als schwächer und nicht statistisch auffällig. Die Dosis zur hohen Befeldung zeigt ein negatives Vorzeichen womit die Werte der hohen Dosis sogar kleiner sind als die der Negativ-Befeldung. Es liegt also kein monotoner Trend vor, was auch der Test auf einen Dosistrend bestätigt.

Anhang: Statistischer Analyseplan Fibroblasten-Studie

Projekts StSch 4504 der BfS

**„Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder des Mobilfunks
auf menschliche Fibroblasten (Gentoxizität)“**

31.07.2012

Jochem König und Veronika Weyer

Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI),
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Inhalt

1	Zielsetzung des statistischen Analyseplans	246
2.1	Umgang mit multiplen Hypothesentests	246
2.2	Umgang mit Ausreißern, unplausiblen Werten und fehlenden Werten	247
3	Spezifikation und Begründung der Analysemethoden	247
3.1	Zielvariablen	247
3.2	Tests auf einen Dosisrend	248

1 Zielsetzung des statistischen Analyseplans

Auf Grundlage des niedergelegten Analyseplans aus der Vorgängerstudie: FM8823 wurde eine Inspektion der verblindeten Daten vorgenommen (blind data review), mit der Zielsetzung die Daten auf Vollständigkeit und Plausibilität zu überprüfen sowie die Verteilungsannahmen zu spezifizieren.

Ziel des hiermit vorgelegten Analyseplans ist eine genaue Spezifikation der statistischen Modelle und Analysemethoden auf Basis des Blind-Data-Review. Dies schließt auch ggf. den Umgang mit fehlenden Werten und extremen Werten (statistischen Ausreißern) ein.

Im Folgenden wird zunächst die Analysestrategie übergreifend über alle vier Gentoxizitätsassays beschrieben. Danach werden für jeden der Assays wesentliche Ergebnisse des Blind Data Review benannt, Analyse-Modell und -Methode spezifiziert, und die Wahl der Methodik begründet.

2 Analysestrategie

Die Hauptfragestellung ist die nach dem Bestehen eines Befeldungseffektes. Dazu sind innerhalb jeden Probanden die Messergebnisse aus vier Dosisgruppen zu berücksichtigen. Dazu wird primär ein statistischer Test auf Trend durchgeführt. Anschließend werden Effektschätzer für jede der Dosisgruppen und für paarweise Differenzen zur Negativkontrolle mit 95%-Konfidenzintervallen präsentiert.

Daneben wird der Kontrast zwischen Negativkontrolle und Positivkontrolle – ebenfalls als Effektschätzung mit 95%-Konfidenzintervall – gestellt.

In die Interpretation und Diskussion der Ergebnisse sollten neben dem formalen Test auf Trend, auch die Form des Dosistrends (Monotonie) die Größe des Trendeffektes und das Verhältnis zwischen Dosistrend und Abstand zwischen Negativ- und Positiv-Kontrolle einfließen.

2.1 Umgang mit multiplen Hypothesentestens

Mit insgesamt 22 Zielvariablen aus fünf Assays liegen damit auch 22 statistische Test- und Schätzprobleme vor.

Dabei setzen sich die 22 Variablen zusammen aus 10 Zielvariablen des Comet-Assays, jeweils 2 für 4 Zeitpunkte und 2 für FPG, 6 Zielvariablen des Mikrokerntests, jeweils 3 für 2 Zeitpunkte, 2 Zielvariablen der Chromosomenaberration (pos. und neg. und pos. oder neg.), 1 Zielvariable des TUNEL Tests (TUNEL_pos/ausgew_zellen) und 3 Zielvariablen Zellzyklustests.

Da im günstigen Fall ein Beleg für die Abwesenheit von Befeldungseffekten angestrebt wird, ist die stärkste Aussage in diesem Sinne ein Beibehalten der Nullhypothese in 23 Tests mit Konfidenzintervallen, welche relevante Effekte ausschließen.

Primär werden daher p-Werte nicht für multiples Testen adjustiert und zweiseitige Konfidenzintervalle zur (unadjustierten) Vertrauenswahrscheinlichkeit von 95% angegeben.

Die Chance eines solchen Nachweises ist auch unter der globalen Nullhypothese (Gültigkeit aller 23 Nullhypothesen) nicht hoch. Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Nullhypothese unter den 23 fälschlicherweise abgelehnt und dafür die falsche Alternativhypothese angenommen wird, liegt bei bis zu $P(H1|H0)=1-(1-0.05)^{23}=0.69=69\%$.

Als Hilfe zur Interpretation solcher möglicher Zufallsbefunde wird zusätzlich eine Bonferroni-Korrektur aus Assay-Ebene vorgenommen.

Das bedeutet, das globale Signifikanzniveau pro Assay wird auf 5 % gesetzt, die lokalen Signifikanzniveaus sind folgendermaßen definiert:

- Comet-Assay: $0.05/10=0.005$
- Mikrokerntest: $0.05/6=0.0083$
- Chromosomenaberrationen: $0.05/2=0.025$
- TUNEL-Apoptose-Test: 0.05
- Zellzyklusanalyse: $0.05/3=0.0167$

Schließlich sind lokale Signifikanz-Niveaus für eine Bonferroni-Korrektur über alle Assays hinweg nochmals durch fünf zu dividieren.

- Comet-Assay: $0.05/50 = 0.0010$
- Mikrokerntest: $0.05/30 = 0.0017$
- Chromosomenaberrationen: $0.05/10 = 0.0050$
- TUNEL-Apoptose-Test: $0.05/5 = 0.0100$
- Zellzyklusanalyse: $0.05/15=0.0033$.

Einzelne zum lokalen Niveau von 5% signifikante Ergebnisse werden als explorative Resultate betrachtet, solange sie nicht auch nach Bonferroni-Korrektur, und Inspektion des Trendprofils auf Monotonie Bestand haben.

2.2 *Umgang mit Ausreißern, unplausiblen Werten und fehlenden Werten*

Die Blinddateninspektion ergab keinen Hinweis auf unplausible Werte, und Ausreißer (extreme Werte). Die Daten sind mit Ausnahme von den Daten von 9 Probanden beim Chromosomenaberrationstest vollzählig. Der Chromosomenaberrationstest wurde nur anhand von 11 Probanden durchgeführt, deren Daten vollständig sind. Verfahren für Umgang mit Ausreißern und fehlenden Werten müssen daher nicht spezifiziert werden.

3 Spezifikation und Begründung der Analysemethoden

3.1 *Zielvariablen*

Folgende Zielvariablen werden in der statistischen Analyse berücksichtigt:

Comet-Assay

- Olive-Tail-Moment
- Medianer Anteil DNA im Kopf (%)
- Beide Zielvariablen werden zu 4 Zeitpunkten untersucht, sowie jeweils einmal zum Zeitpunkt nach 72h mit dem FPG Wert

- Die zwei Zielgrößen des Comet-Assays sind stark miteinander korreliert und werden jeweils transformiert. Die Zielgröße „CoA_olive_tailm“ wird logarithmiert und die Zielgröße „mediane DNA im Kopf (%) (DNA_Head)“ wird folgendermaßen transformiert: $\text{DNA_Head_LN} = \log_{10}((100 - \text{DNA_Head})/100)$

Mikrokerntest

- Anzahl der Mikrokerne in 2000 Zellen. (Errechnet als $\text{MNI} = ((\text{mn}_1 + 2 * \text{mn}_2 + 3 * \text{mn}_3) / \text{mn_ausg_zellen}) * 2000$)
- Anzahl der Mikrokerne mit crest in 2000 Zellen (Errechnet als $\text{MNI_crest} = ((\text{mn}_1_crest + \text{mn}_2_crest + \text{mn}_3_plus_crest) / \text{mn_ausg_zellen}) * 2000$)
- CBPI

Chromosomenaberrationen

- Anteil unter 200 Mitosen (oberhalb) : (Errechnet als $\text{chrom_46_plus} = (\text{chrom_46_plus} / \text{ausgew_mitosen}) * 200$)
- Anteil unter 200 Mitosen (unterhalb) :(Errechnet als $\text{chrom_46_minus} = (\text{chrom_46_minus} / \text{ausgew_mitosen}) * 200$)

TUNEL-Apoptose-Test

- Anzahl TUNEL positiver Zellen (Errechnet als $\text{TUNEL_pos} = (\text{TUNEL_pos} / \text{ausgewertete Zellen}) * 1000$)

Zellzyklusanalyse

- G1
- G2
- S

3.2 Tests auf einen Dosistrend

Bei allen 5 Assays wird analog vorgegangen.

Es werden zunächst Permutationstests auf einen Dosistrend über die 4 Dosisstufen „Sham“, „low“, „medium“ und „high“ als primäre Analyse durchgeführt. Als Sensitivitätsanalyse werden sekundär zusätzlich Page-Trend-Tests berechnet. Die Analysen werden separat für alle Zielvariablen der 5 Assays durchgeführt.

Begründung: Da unter der Nullhypothese der Abwesenheit eines Befeldungseffektes die Verteilung der Zielvariablen in den 4 Dosisbedingungen gleich ist, sind die Voraussetzungen für Permutationstests erfüllt.

Aufgrund folgender Punkte lassen sich der Permutationstest und der Page-Trend-Test bei dieser Fragestellung auf einen Dosistrend begründen:

- Beides sind Trend-Tests.
- Beide Tests untersuchen, ob mit steigender Exposition die Werte in den Zielvariablen steigen. Beide Tests sind also sensitiv für die Trend Alternativhypothese von dosisabhängigen geordneten Erwartungswerten.
- Keiner der Tests setzt eine Normalverteilung voraus.

Der Permutationstest verwendet die Originalwerte der Zielvariablen, während der Page-Trend-Test eine Rangskala der Zielvariablen verwendet.

Als Prüfgröße wird die Summe der Dosistrendscore über alle Probanden gebildet:

$$T = \sum_{i=1}^{20} \sum_{j=1}^4 jY_{ij},$$

oder äquivalent dazu:

$$T = \frac{1}{20} \sum_i T_i; \text{ mit}$$

$$T_i = \frac{1}{10} (-3Y_{i1} - Y_{i2} + Y_{i3} + 3Y_{i4}).$$

Dabei ist Y_{ij} der Wert einer Zielvariable bei Proband i unter Befeldungsdosis j . (Die Leerdosis ist hier als $j=1$ enthalten, die Positivkontrolle ist nicht einbezogen.)

Dies ist die gleiche Prüfgröße, die sich auch unter Annahme eines Poisson-Modells als Score-Test ergibt. Die zweite, skalierte, Variante wird zur Quantifizierung des Dosistrends verwendet. Mittelwerte mit t-test-basierten 95%-Konfidenzintervallen ergeben dann eine Schätzung der durchschnittlichen Differenz zwischen zwei Dosisstufen.

Als Sensitivitätsanalyse ist zusätzlich noch der Page-Trend-Test vorgesehen. Der Page-Trend- oder Page-L-Test ist ein Test auf Dosistrend mit der Teststatistik $T = \sum_{ij} jR_{ij}$, wobei j der

Dosisindex (1-4) und R_{ij} der Rang der Zielvariablen der j -ten Dosis innerhalb eines Probanden ist. Für die Permutationstests wird das R-Paket „coin“ verwendet (für den Permutationstest die Funktion `independence_test`, für den Page-Test die Funktion `„friedman_test“`).

Der Permutationstest wird als primäre Analyseverfahren gewählt, da dieser mit den originalskalierten Werten zu den aufgeführten Schätzern und Konfidenzintervallen passt, da diese auch für die Originalskala berechnet wurden.

Der Page-Trend-Test dient lediglich dazu, um zu überprüfen, ob die Ergebnisse des Permutationstests von der spezifischen Methodenwahl abhängig sind.

Aus den Erfahrungen des Vorgängerprojekts: FM8823 sind keine relevanten Unterschiede in den Ergebnissen der beiden Trendtests zu erwarten.

Datum, Unterschrift

Mainz,

8 Bericht zur Expositionsanlage (ITIS)

Dosimetry Report for sXc1800XL

Jose Fayos and Niels Kuster

Zurich, June 2007

Executive Summary

An eight waveguide system enabling to simultaneously expose three power levels and shape with eighteen 35-mm Petri dishes each had been developed and fully characterized. Despite the capacity increase per waveguide the dosimetric performance did not degenerate significantly compared to the two-wave guide system sXc1800 with six Petri dishes each.

The dosimetric performance parameters are summarized in Table 1.

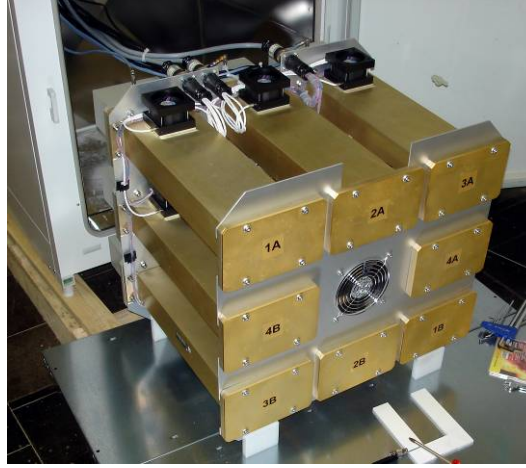


Figure 1: Eight waveguide setup sXc1800XL.

efficiency	$1.84 \text{ W/kg}/(\text{A/m})^2$
uniformity (SD)	32 %
max temperature load	$<0.05 \text{ }^\circ\text{C}/(\text{W/kg})$

Table 1: Summary of the dosimetric performance of sXc1800XL.

All values are better than the specified performance parameter in the original proposal.

Contents

1	Abbreviations & Definition	4
2	Objective	5
3	Methods	5
4	Results	8
5	Conclusions	14

1 Abbreviations & Definition

E_{RMS} , H_{RMS} : Root-mean-square of field values

EMF: Electromagnetic Field

FDTD: Finite Difference Time Domain

RF: Radio Frequency

SAR: Specific Absorption Rate

PEC: Perfect electric conductor

SEMCAD X: EM & thermal simulation platform (SPEAG, Switzerland)

DASY4: Near-field scanner version 4 (SPEAG, Switzerland)

EASY4: stand-alone field and temperature measurement system (SPEAG, Switzerland)

The following normalization has been applied if not stated otherwise:

- All values in this report are all normalized to $1 \text{ A}^2/\text{m}^2$, i.e., square field strength of the incident field at the center of the waveguide.

2 Objective

The objective of this report is to provide the dosimetric data of the sXc1800XL exposure setup as well as the maximum temperature load.

3 Methods

The numerical dosimetry was conducted with SEMCAD X (SPEAG, Switzerland). The results were validated with DASY4 (SPEAG, Switzerland), equipped with calibrated magnetic field probe (H3DV6:SN6212) and the world's smallest dosimetric probe (ET1DV4:SN9023). The temperature evaluation was performed with EASY4 using calibrated temperature probes (T1V3Lab:SN5102&5104).

The NUNC 35-mm petri dishes (model 153066) have dimensions as shown in Figure 2. Nine of these petri dishes are placed in a well-defined layout inside the standard R18 waveguides (cross section: 129.4×64.2 mm, total length: 450 mm) using dish holders as shown in figure 3.

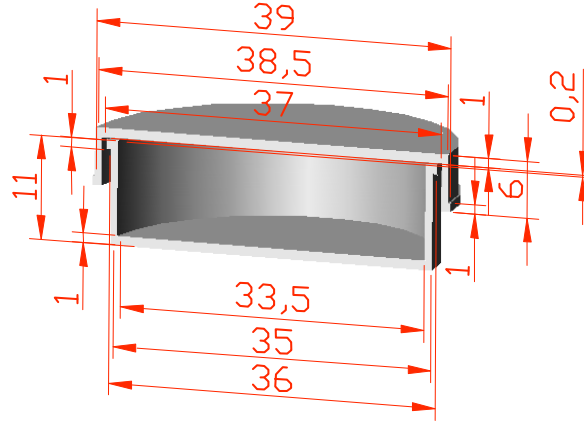


Figure 2: Measured geometry of a NUNC petri dish (model 153066) in mm.

In this study, the cells are cultivated with 3.0 ml of medium, the dielectric properties of which have been measured at 37°C (see Table 2).

The waveguides are fed with a standard broadband coupler and determined by a shortplate at the end of the waveguide. The shortcut plates were gold-plated to ensure good RF contacts and can easily be correctly mounted and removed with quick-mounting screws. Airflow is enforced by ventilators (see figure 3). The fan current and the air temperature coming from inside the waveguide through the fan is monitored in 10 s intervals to ensure proper functioning. The incident field per waveguide is controlled by an E-field sensor, the location of which was on the first E-field maxima from the shortplate (see figure 3). All sensors were calibrated using transfer calibration. The calibration was verified using a shortcut plate with calibrated H-field sensor.

Eight of these assembled waveguides were mounted inside a HERAcell 240 incubator (figure 4). The fan available in the incubator plus the eight fans mounted on the waveguides

	Material	ϵ_1	$\sigma(S/m)$
Waveguide	Brass	1	PEC
Shortplate	Gold	1	PEC
Petri dish	Polystyrene	2.54	$4.7E - 4$
Trays	Polystyrene	2.54	$4.7E - 4$
Media	RPMI	71.6	2.36
Experimental Media	0.9 % NaCl	71.6	2.41

Table 2: Dielectric properties of materials used in the simulation (1747 MHz, 37 °C).

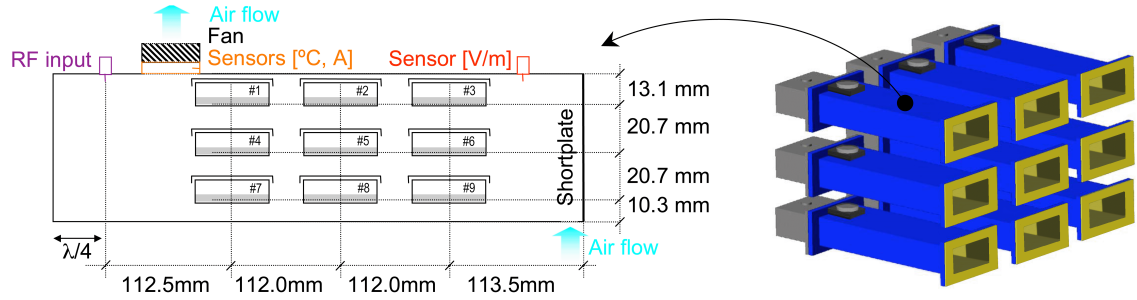


Figure 3: Allocation of petri dishes inside the waveguide (side view).

and one extra fan ensured a uniform air temperature.

The positions of the nine petri dishes inside the waveguide were optimized in a previous study using the optimizer function of SEMCAD X for uniform exposure of all cells, i.e., minimal standard deviation of the induced fields at the bottom of the petri dishes.

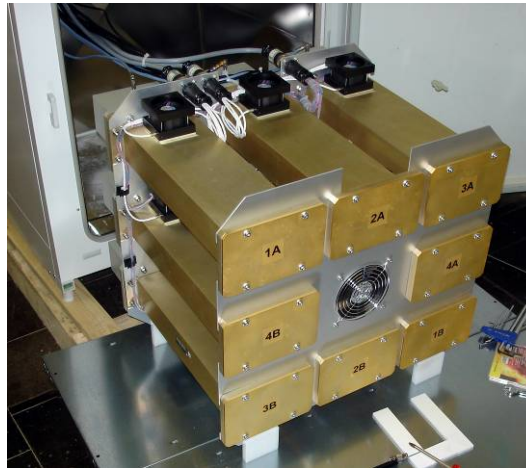


Figure 4: Mounting of the eight waveguides inside the incubator.

The meniscus was simulated using the model determined by Schuderer et al. (2004) [16]. The grid step in the $X - Y$ plane for the media was set to be within $[0.09, 0.18]$ mm. The

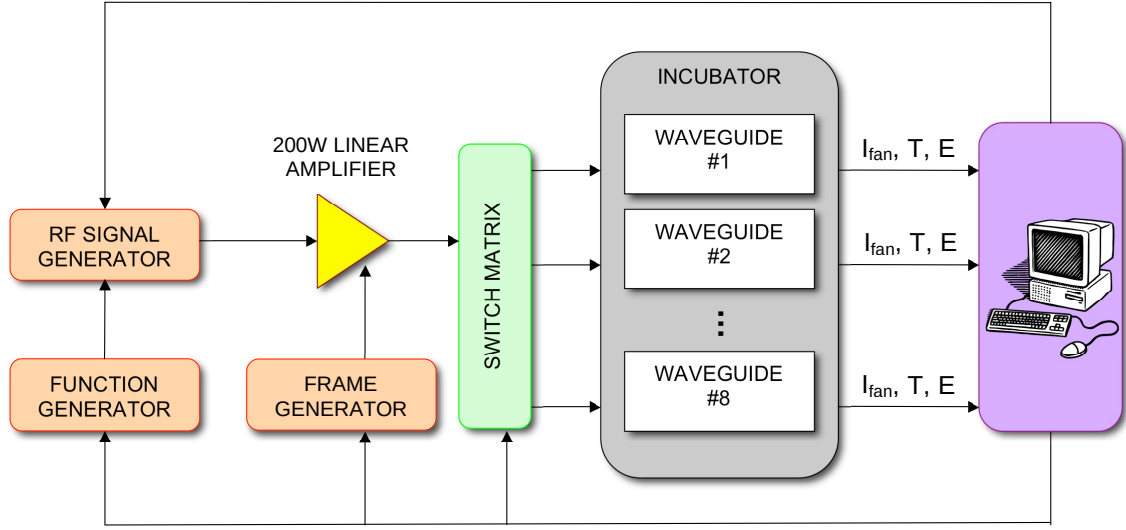


Figure 5: Simplified block diagram of the RF exposure system.

grid step in the Z direction ranged from 0.09 to 0.3 mm, ensuring 1 voxel height (Z axis) for the bottom section and at least 14 voxels height in the core section and another 14 voxels in the meniscus section. The simulation was performed using conformal voxeling which has shown better results than the regular FDTD voxeling because of its better adaptation to the model as presented in Figure 6. Conformal grids were used throughout the study.

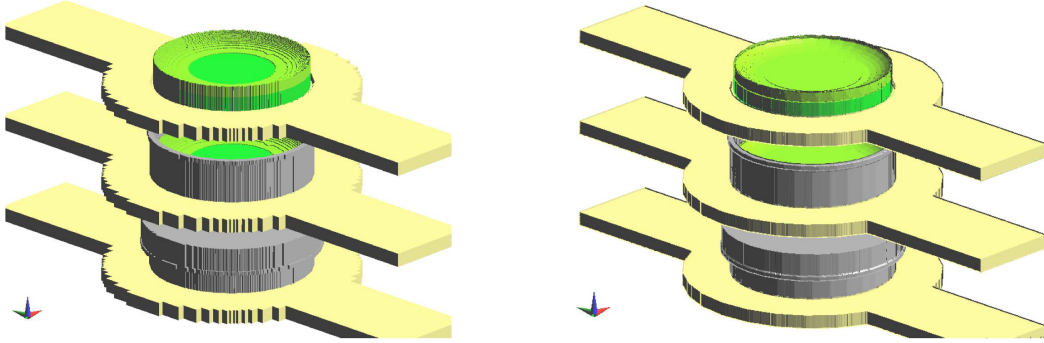


Figure 6: Some SEMCAD solids voxelized in FDTD mode (left) and Conformal FDTD mode (right).

The computed H-field maxima were verified using DASY4 (see Figure 7) and good agreements with deviations of less than 2 mm were found. The slight asymmetry was not considered in the tray design, i.e., it was constructed symmetrically in order to keep handling as simple as possible.

The thermal load depends on the SAR distribution inside the media and the heat transfer to the environment. The temperature measurements were done for one waveguide set inside the incubator (37 °C, > 95 % relative humidity, 5 % CO₂). The temperature probes

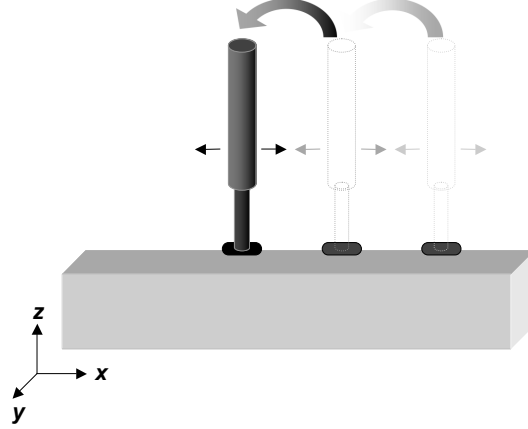


Figure 7: Probe movements for H-field maxima detection.

(T1V3Lab:SN5102&5104) were fixed to the bottom center of the petri dish. All the petri dishes were filled with 3.0 ml of the experimental media that provides the same physical parameters as the media used in the experiments. The setup is depicted in Figure 8. The limitations for the measurement were set by the length of the temperature sensors which allowed measurement of the values inside the petri dishes closest to the source (numbers 1, 4 and 7) and those closest to the shortplate (numbers 3, 6 and 9). The methodology was the same as developed and applied by Schuderer et al. (2004) [16], i.e., the heat transfer constants were determined from the measured temperature rise and cooling and normalized to the averaged SAR levels for the monolayer.

The data were recorded by the EASY4 system and processed in MATLAB to obtain the fitting curve parameters.

4 Results

The SAR distribution in the liquid obtained from simulations is in a good agreement with the results published in Schuderer et al. (2003) [15]. Figure 9 shows $Z - X$ and $Z - Y$ plane cuts of the $|E_{RMS}|$ and $|H_{RMS}|$ distribution centered on the petri dish #1. Both cuts are not exactly equal because of the E-field and H-Field variation from the center along the X and Y axis respectively, which induces a variation in the coupling, as was expected. The E-field recorded in the petri dishes are residual values as their positions are located on E-field minima and H-field maxima.

The evaluation of the monolayer cell cultures is summarized in Table 3. The setup provides an efficiency of $1.84 \text{ (W/kg)/(A/m)}^2$ with a standard deviation of only 31.4%. The SAR averaged over all medium gives a value of $0.81 \text{ (W/kg)/(A/m)}^2$.

For validation purposes, the SAR values of the media contained in the petri dish # 2 was measured along the Z axis in a centered position of the petri dish using the DASY4 system. The measured values compared with the simulation results are presented in Figure 13.

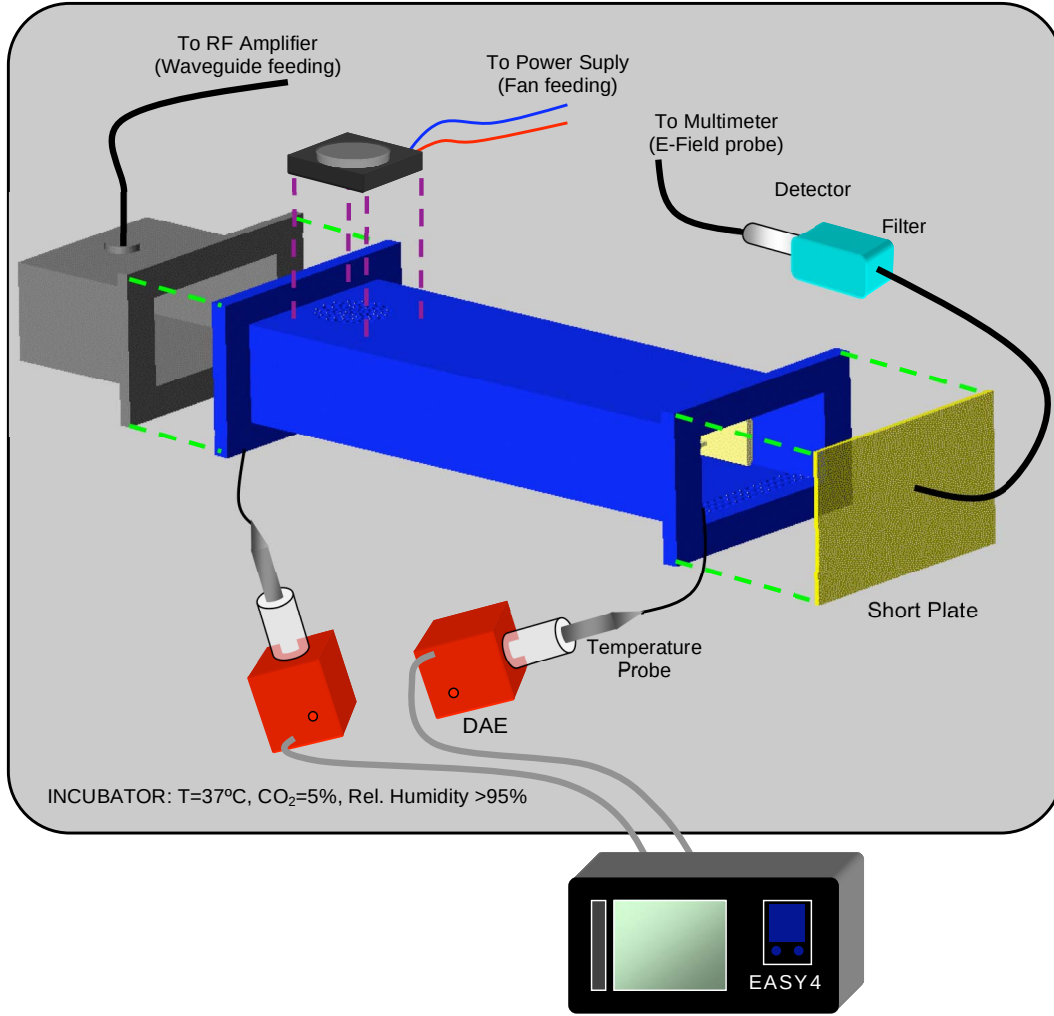


Figure 8: Temperature measurement setup.

Petri dish #	Mean [W/kg]/[A/m] ²	%	SD [W/kg]/[A/m] ²	Minimum [W/kg]/[A/m] ²	Maximum [W/kg]/[A/m] ²
1	1.83	-0.89 %	0.56	0.23	2.56
2	1.83	-0.86 %	0.56	0.22	2.56
3	1.85	0.35 %	0.57	0.22	2.60
4	1.82	-1.39 %	0.58	0.22	2.62
5	1.82	-1.40 %	0.58	0.21	2.61
6	1.85	0.04 %	0.59	0.22	2.66
7	1.86	0.75 %	0.58	0.19	2.63
8	1.86	1.01 %	0.59	0.19	2.64
9	1.88	2.39 %	0.59	0.19	2.69
Average		Δ_{MAX}	Average	Average	Average
1.84		2.39 %	0.58	0.21	2.62

Table 3: SAR statistics extracted from the simulation results at the bottom core.



Figure 9: $|E_{RMS}|$ and $|H_{RMS}|$ distribution centered in the petri dish #1. 0 dB are set to the maxima value found on the bottom core (monolayer cells).

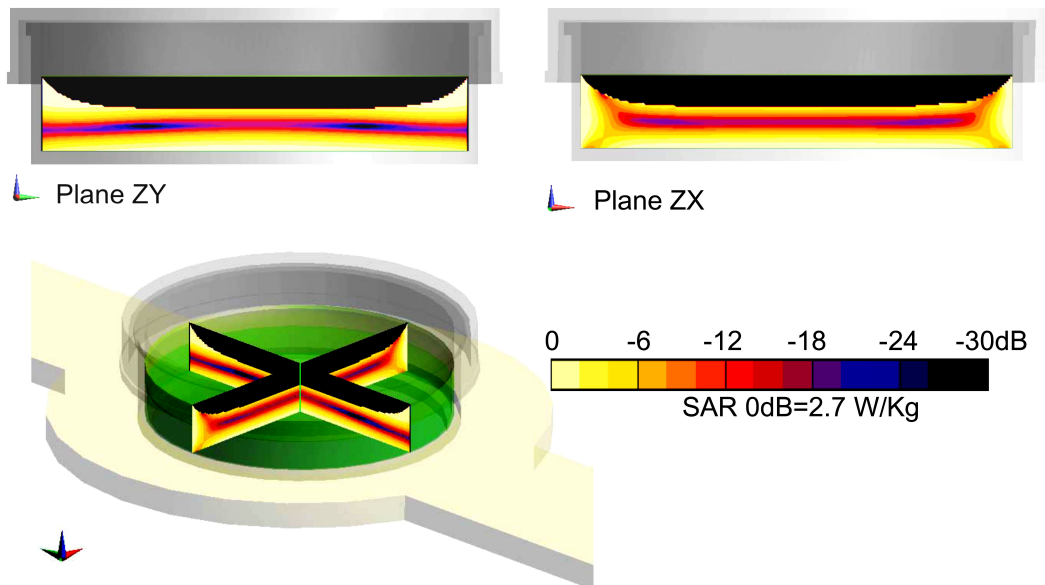


Figure 10: SAR distribution in the petri dish #1. 0 dB corresponds to the maxima SAR value found on the bottom layer (monolayer cells).

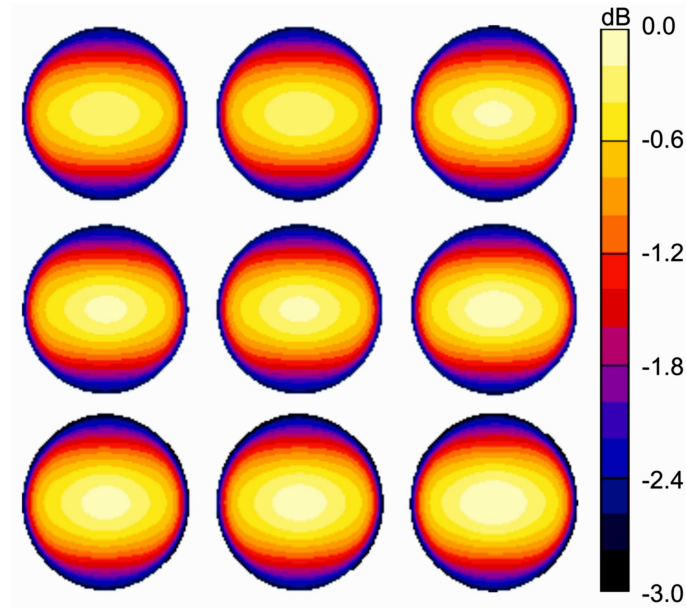


Figure 11: SAR pattern of monolayer cell cultures. Rows matches height position in the waveguide (upper, middle and lower) and columns the distance from the shortplate (right is closest to the short). $0 \text{ dB} = 2.7 \text{ (W/kg)/(A/m)}^2$.

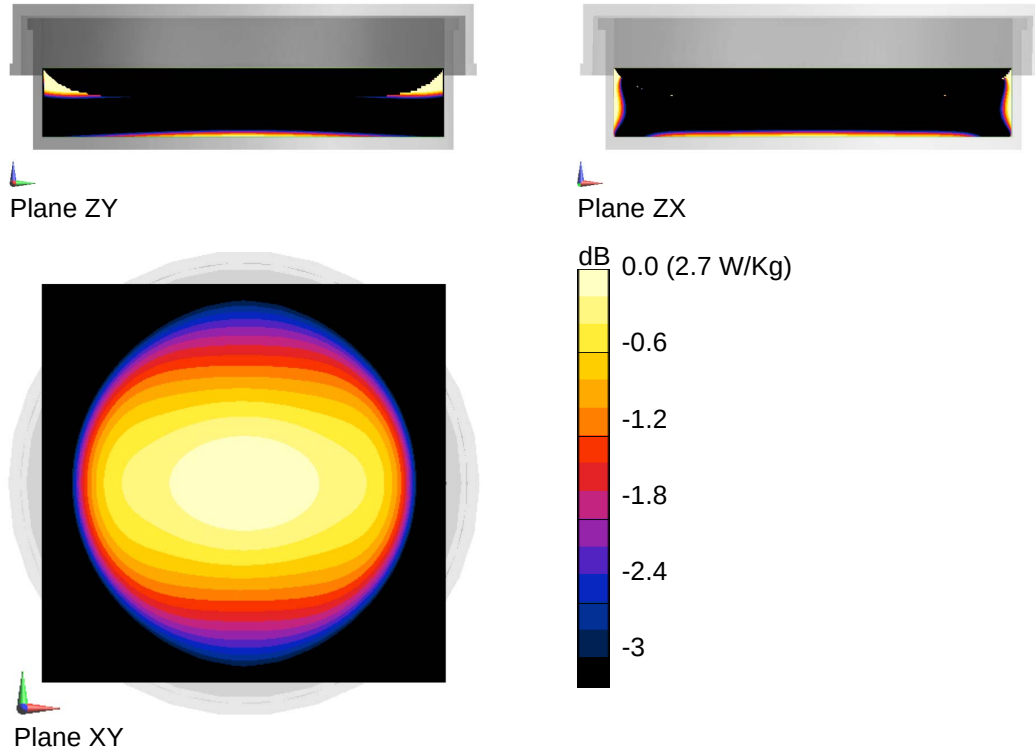


Figure 12: SAR distribution in the petri dish #1. 0 dB corresponds to the maxima SAR value found on the bottom layer (monolayer cells).

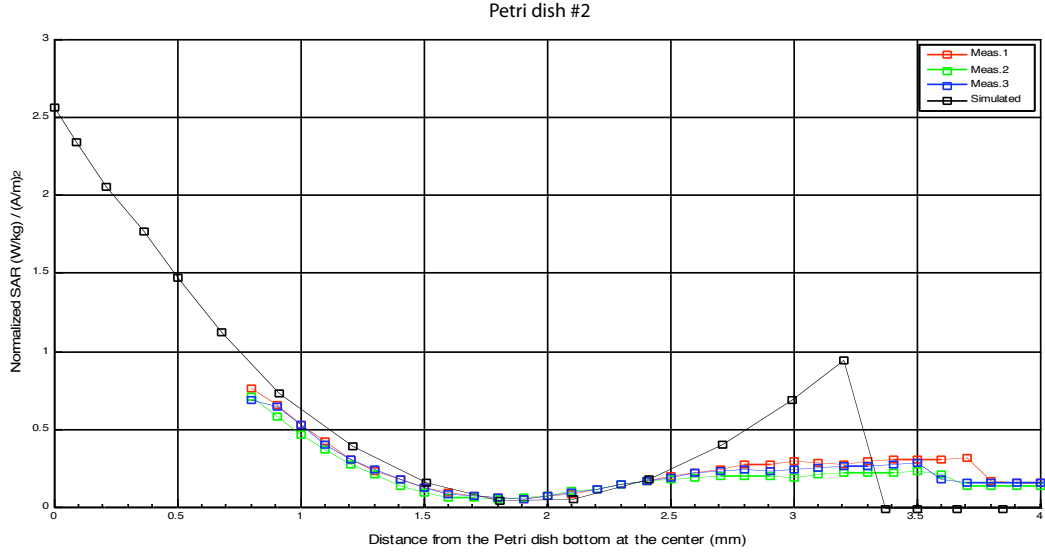


Figure 13: SAR simulated vs. measured in the center of the petri dish #2 along the Z -axis. Due to boundary effects of the low liquid depth, only a small fraction could be measured reliably (see Pokovic et al. (2000) [11]).

Petri dish #	ΔT [$^{\circ}\text{C}/(\text{W/kg})$]
1	0.034
3	0.019
4	0.040
6	0.027
7	0.047
9	0.035

Table 4: Preliminary temperature increase per W/kg .

$$T_{RISE} = T_0 + \frac{SAR_{MUT}}{C_{MUT}} \cdot \tau_{RISE} (1 - e^{-\frac{t}{\tau_{RISE}}})$$

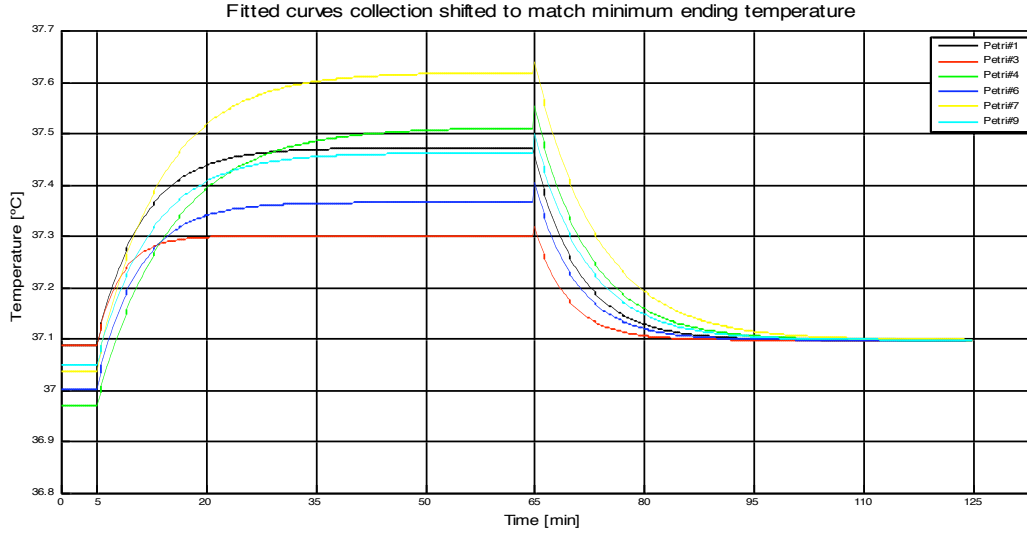


Figure 14: Fitting curves of the temperature measurements.

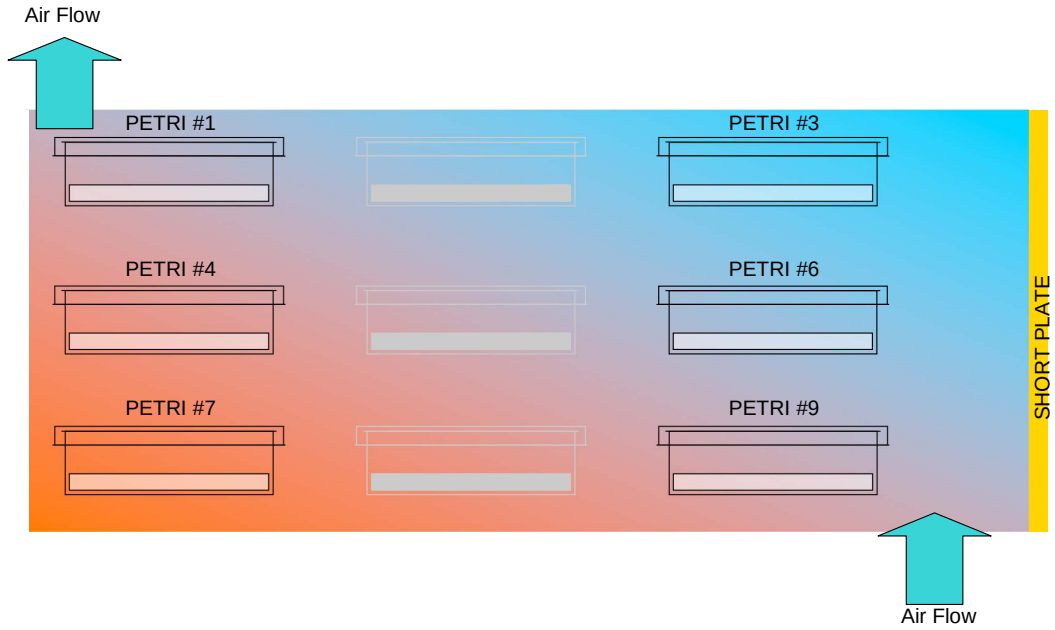


Figure 15: Qualitative thermal load distribution.

The temperature measurements were processed to obtain the thermal load of the exposure setup. The empirical data recorded was processed and fitted to the curves shown in MATLAB. The results for the temperature increase are shown in Table 4. The largest

temperature increase evaluated is less than 0.5°C for an averaged SAR level of 1 W/kg at the bottom layer of the petri dish. Nevertheless, careful ΔT considerations are required for interpreting the results at 10 W/kg since the temperature increase will be considerable larger than 0.1°C even for the proposed on/off cycles. This result is comparable with the findings of Schuderer et al. (2004) [16] This assessment is valid for the entire setup as the ventilators ensure that there are no temperature gradients within the incubator. Worst-case estimates are necessary based on thorough uncertainty analyses prior to the publication.

5 Conclusions

Despite the capacity per waveguide having been increased from six to nine petri dishes, a standard deviation of less than 35 % was achieved. The efficiency of $1.84\text{ W/kg}/(\text{A/m})^2$ is similar to that given by Schuderer et al. (2004) [16].

The measured temperature load of $<0.05^{\circ}\text{C}/(\text{W/kg})$ also meets the requirement. However it should be noted that at 10 W/kg , the temperature difference between sham and exposure will be considerable larger than 0.1°C .

References

- [1] Gajda GB, McNamee JP, Thansandote A, Boonpanyarak S, Lemay E, Bellier PV. 2002. Cylindrical Waveguide Applicator for In Vitro Exposure of Cell Culture Samples to 1.9-GHz Radiofrequency Fields. *Bioelectromagnetics* 23:592-598.
- [2] Ivaschuk OI, Jones RA, Ishida-Jones T, Haggren W, Addey WR, Phillips JL. 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.
- [3] Kuster N, Schönborn F. 2000. Recommended Minimal Requirements and Development Guidelines for Exposure Setups of Bio-Experiments Addressing the Health Risk Concern of Wireless Communications. *Bioelectromagnetics* 21:508-514.
- [4] Laval L, Leveque PH, Jecko B. 2000. A New In Vitro Exposure Device for the Mobile Frequency of 900 MHz. *Bioelectromagnetics* 21: 255-263.
- [5] Meltz ML, Eagan P, Harris CR, Erwin DN. 1988. Dosimetry considerations in far field microwave exposure of mammalian cells. *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR* 20:23-30.
- [6] Monk P, Sli E. 1994. Error Estimates for Yees Method on Non-uniform Grids. *IEEE Transactions on Magnetics* 30(5):3200-3203.
- [7] Moros EG, Straube WL, Pickard WF. 1999. The Radial Transmission Line as a Broad-Band Shielded Exposure System for Microwave Irradiation of Large Numbers of Culture Flasks. *Bioelectromagnetics* 20:65-80.

- [8] Navarro EA, Sangary NT, Litva J. 1996. Some Considerations on the Accuracy of the Nonuniform FDTD Method and Its Application to Waveguide Analysis When Combined with the Perfectly Matched Layer Technique. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques* 44(7):1115-1124.
- [9] Penafiel LM, 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.
- [10] Pokovic K. 1999. Advanced Electromagnetic probes for near-field evaluations. Dissertation ETH No. 13334 for the degree of Doctor of Technical Sciences. Swiss Federal Institute of Technology Zurich.
- [11] Pokovic K, Schmid T, Kuster N. 2000. Milimeter-Resolution E-Field Probe for Isotropic Measurement in Lossy Media Between 100 MHz and 20 GHz. *IEEE Transactions on Instrumentation and Measurements* 49(4):873-878.
- [12] Schönborn F, Pokovic K, Burkhardt M, Kuster N. 2001. Basis for Optimization of In Vitro Exposure Apparatus for Health Hazard Evaluations of Mobile Communications. *Bioelectromagnetics* 22:547-559.
- [13] Schönborn F, Pokovic K, Wobus AM, Kuster N. 2000. Design, Optimization, Realization, and Analysis of an In Vitro System for the Exposure of Embryonic Stem Cells at 1.71 GHz. *Bioelectromagnetics* 21:372-384.
- [14] Schuderer J, Samaras T, Oesch W, Spt 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):2057-2066.
- [15] Schuderer J, Kuster N. 2003. Effect of the Meniscus at the Solid/Liquid Interface on the SAR Distribution on Petri Dishes and Flasks. *Bioelectromagnetics* 24:103-108.
- [16] Schuderer J, Schmid T, Urban G, Samaras T, Kuster N. 2004. Novel high-resolution temperature probe for radiofrequency dosimetry. *Physics in Medicine and Biology* 49:N83-N92.
- [17] Tuschl H, Novak W, Molla-Djafari H. 2006. In vitro Effects of GSM Modulated Radiofrequency Fields on Human Immune Cells. *Bioelectromagnetics* 27:188-196.

Abstract

In a previous REFLEX-study, funded by the European Community, a number of different endpoints in several model cell lines and organisms were analyzed for possible effects of high frequency electromagnetic fields (EMF), as used for mobile communication systems. Most of the studies showed no indications of changes or damages induced by EMF. However, regarding DNA strand break induction and micronuclei formation one study had indicated some minor significant effects of EMF in human dermal fibroblasts.

The purpose of our study, funded by the German Federal Office for Radiation Protection (Bundesamt für Strahlenschutz, BfS), was to clarify these conflicting findings in a separate study, supplemented with further endpoints which were missing in the previous REFLEX study. Therefore, we applied conditions mainly based upon the above described REFLEX-study: we used cells from various donors, 10 juvenile (age 18-19) and 10 adult (age 50-59), in order to assess inter-individual variability. Primary human dermal fibroblasts from these donors were exposed to 1800 Hz high frequency EMF-fields (GSM-1800, intermittent) with SAR-values of 0 (sham control), 0.2, 2 and 10 W/kg. In parallel, we performed corresponding positive controls with assay-based chemical toxins. As analytical endpoints, we analyzed Comet assays for DNA strand break induction after 4, 16 and 24 hrs of exposure. After 72 hrs of exposure, we performed Comet assays with FPG-endonuclease incubation for ROS-induced DNA damage. Further, we tested micronuclei formation (MNT) with CREST analysis for genotoxic damage and distinction between clastogenic and aneugenic effects after 15 and 72 hrs of EMF exposure. The latter were also analyzed by numeric chromosomal aberration assay (nCA) and a five-fold extended CREST-based MNT. We also performed flow-cytometric analysis of the cell cycle and analyzed TUNEL assays for apoptotic events, both after 24 hrs of exposure. The whole study was performed as a double blind study with no access to exposure values until after completing all analyses as well as statistical pre-analysis of the blind data.

Statistical Analysis of the unblinded results from all donors, as well as separated for juvenile and adult donors, showed no statistically significant evidences for genotoxic effects induced by high frequency EMF-exposure. Further no dose-dependent effects could be observed for any of the analyzed SAR-values. In conclusion we found no evidence for EMF-induced genotoxic damage in primary human dermal fibroblasts *in vitro* for any of the analyzed endpoints.

| Verantwortung für Mensch und Umwelt |

Kontakt:

Bundesamt für Strahlenschutz

Postfach 10 01 49

38201 Salzgitter

Telefon: + 49 30 18333 - 0

Telefax: + 49 30 18333 - 1885

Internet: www.bfs.de

E-Mail: ePost@bfs.de

Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.



Bundesamt für Strahlenschutz