

## Spotlight on EMF Research

# Spotlight on “Evaluation of mitochondrial stress following ultraviolet radiation and 5G radiofrequency field exposure in human skin cells” by Patrignoni et al. in Bioelectromagnetics (2023)

Kategorie [Hochfrequente Felder, In-vitro-Studie]

Spotlight - Mai/2024 no.3 (Deu)

Kompetenzzentrum Elektromagnetische Felder (KEMF)

## 1 Einordnung des Artikels in den Kontext durch das BfS

Hochfrequente elektromagnetische Felder (HF-EMF) sind technologiebedingt seit dem letzten Jahrhundert in der Umwelt präsent. Die jüngste Einführung der Mobilfunk-Technologie der fünften Generation (5G) beinhaltet die Nutzung des Frequenzbandes um 3,5 GHz, um die Geschwindigkeit der Datenübertragung zu erhöhen. HF-EMF dieser Frequenz weisen eine geringe Eindringtiefe in biologisches Gewebe auf. Die Energie des Feldes wird dabei hauptsächlich von der menschlichen Haut absorbiert. Während die Auswirkungen von HF-EMF anderer Frequenzen eingehend untersucht wurden, fehlt es an Forschung über mögliche gesundheitliche Auswirkungen auf die menschliche Haut von HF-EMF in diesem Frequenzband. Ein bisher vermuteter, bei noch nicht abschließend bewertbarer Evidenzlage möglicher Vermittler von gesundheitlichen Auswirkungen der HF-EMF-Exposition ist der oxidative Stress [2]. Er tritt auf, wenn reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie das Superoxid-Radikalanion  $O_2^{\cdot-}$  (molekularer Sauerstoff mit einem zusätzlichen ungepaarten Elektron), im Überschuss vorhanden sind, was zu einer Schädigung von Makromolekülen und Organellen führt [3]. ROS entstehen auf natürliche Weise bei biochemischen Prozessen und werden durch antioxidative Enzymsysteme reguliert. Im Gegensatz zu ionisierender Strahlung und ultraviolettem Licht (UV) [4] wurde bisher kein plausibler physikalisch-chemischer Mechanismus für die mutmaßliche ROS-Bildung durch HF-EMF-Exposition vorgeschlagen.

## 2 Resultate und Schlussfolgerungen aus der Perspektive der Autoren

Patrignoni et al. [1] nutzten ein In-vitro-Zellexpositionssystem, um experimentell zu bestimmen, ob HF-EMF alleine oder nach Exposition mit UV-B-Strahlung die Gesundheitsparameter von zwei Zelltypen der menschlichen Haut beeinflusst. Dazu verwendeten sie humane immortalisierte KHAT-Keratinocyten und Xp6be-Hautfibroblasten. Erstere vertreten den Zelltyp, der die Epidermis, d. h. die äußerste Schicht der

Haut, bildet, während letztere einen Zelltyp repräsentieren, der in der Dermis, der Bindegewebsschicht direkt unter der Epidermis, zu finden ist.

Die Exposition mit HF-EMF erfolgte in einer selbst entwickelten Modenverwirbelungskammer, die ein homogenes und isotropes Feld innerhalb der Zellkulturplatten gewährleistet und sich für die Verwendung in Kombination mit einem Zellkultur-Inkubator eignet [5]. Der Aufbau wurde so abgestimmt, dass in den exponierten Zellkulturen spezifische Absorptionsraten (SAR) von 0,25, 1,0 oder 4,0 W/kg bei 3,5 GHz erzeugt wurden. Diese Expositionsniveaus wurden durch Temperaturmessungen des Mediums in den Zellkulturgefäßen und durch numerische Simulationen auf der Grundlage der Finite-Differenzen-Methode im Zeitbereich (FDTD) validiert. Zusätzlich wurden die Zellkulturen zuerst mit UV-B-Strahlung bei einer Wellenlänge von 312 nm für nicht länger als eine Minute bestrahlt, und danach HF-EMF ausgesetzt oder scheinexponiert.

Nach 24 Stunden HF-EMF-Exposition oder Scheinexposition wurden drei verschiedene fluoreszenzbasierte Testverfahren durchgeführt, um die biologischen Wirkungen von HF-EMF auf Hautzellen zu bestimmen: a) Nachweis mitochondrialer ROS und insbesondere von Superoxid mit der MitoSox™ Red-Sonde; b) Depolarisierung der mitochondrialen Membran mit dem Mitostatus®TMRE-Farbstoff; c) Messung der zellulären Lebensfähigkeit und Apoptose mit Annexin V und Sytox Blue Dead Cell Stain. Die Messungen wurden nach der Kodierung der Proben unter verblindeten Bedingungen durchgeführt.

Unter Verwendung geeigneter Positivkontrollen wurden für jedes Analyseverfahren und jeden Zelltyp eine solche UV-B-Dosis ausgewählt, die zu statistisch signifikanten Effekten führte und etwa 50 % des maximalen Effekts erzielte. Dadurch konnten die Tests innerhalb eines dynamischen Bereichs durchgeführt werden, in dem zusätzliche Effekte von HF-EMF nachweisbar wären. Die Autoren geben an, dass die UV-B-Dosen im Bereich der Standard-Erythemdosis von 30 mJ/cm<sup>2</sup> lagen, einem umweltrelevanten Expositionsniveau.

Beim Vergleich von HF-EMF-exponierten mit scheinexponierten Zellen bestand eine statistisch signifikante Abnahme der mitochondrialen ROS-Produktion in Fibroblasten um etwa 15 % bei 1,0 W/kg SAR. Es wurden weder bei den beiden anderen SAR-Werten noch bei einem anderen Analyseverfahren noch in Keratinozyten Veränderungen festgestellt. Für die auf eine UV-B-Bestrahlung folgende HF-EMF-Exposition wurde eine statistisch signifikant erhöhte mitochondriale ROS-Produktion in Keratinozyten um 28 % bei 0,25 W/kg und um 20 % bei 1,0 W/kg festgestellt. Bei 4,0 W/kg war das Signal der Sonde ohne statistische Signifikanz um 16 % erhöht. In Fibroblasten wurde die UV-B-induzierte ROS-Produktion nicht durch die HF-EMF-Exposition beeinflusst. HF-EMF-Exposition für sich alleine oder auf UV-B-Bestrahlung folgend hatte in beiden Zelltypen weder Einfluss auf das mitochondriale Membranpotenzial noch die zelluläre Apoptose.

Die vorliegende Arbeit ist dem Fazit der Autoren nach die erste Studie, die eine Steigerung der ROS-Produktion durch HF-EMF nach UV-B-Exposition in Keratinozyten, aber nicht in Fibroblasten, zeigt. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass HF-EMF-Exposition bei 3,5 GHz nicht ausreicht, um zusätzlich das mitochondriale Membranpotenzial zu beeinträchtigen oder Apoptose oder Nekrose von Zellen zu verursachen. Sie schlagen weitere Studien an Hautorganoiden und experimentelle In-vivo-Studien vor, um auf den Ergebnissen aufbauend die Komplexität des gesamten Hautgewebes zu berücksichtigen.

### 3 Kommentare des BfS

Die zusätzliche Exposition eines zuvor gestressten biologischen Systems mit HF-EMF stellt ein realistisches Szenario dar. Einfallende UV-Strahlung aus Sonnenlicht oder Solarien könnte körpereigene Schutzmechanismen erschöpfen und das betroffene Gewebe für Schäden durch ansonsten harmlose Stressfaktoren sensibilisieren. Patrignoni et al. untersuchten die Auswirkung einer HF-EMF-Exposition bei 3,5 GHz mit und ohne vorausgehende UV-B-Bestrahlung auf Mitochondrien, die bekanntermaßen eine Zielorganelle für UV-induzierte Schäden sind [6]. Sie fanden, dass mit UV-B bestrahlte Keratinozyten eine weitere Erhöhung mitochondrialer ROS aufwiesen, wenn sie zusätzlich HF-EMF mit geringer oder mittlerer Intensität ausgesetzt wurden. Die angewandten SAR-Werte lagen im Rahmen der aktuellen Grenzwerte für

die Exposition von Gliedmaßen in der Allgemeinbevölkerung, die von der Internationalen Strahlenschutzkommission für nichtionisierende Strahlung (ICNIRP) empfohlen werden [7].

Die Auswahl der zellulären Modelle hat einige Schwachpunkte, die eine weitere Verallgemeinerung der Ergebnisse erschweren. Die Hp6be-Fibroblasten stammen von einem Patienten mit der monogenen Krankheit Xeroderma pigmentosum und sind dadurch grundsätzlich empfindlich gegenüber UV-induzierten DNA-Schäden [8]. Außerdem wird weder erwähnt, ob die KHAT-Zellen von unterschiedlichen individuellen Spendern oder von einem einzigen Donor stammten, noch wie alt die Spender waren, noch ob biologisch verschiedene oder ein und derselbe Pool an KHAT-Zellen für unabhängige Experimente verwendet wurde. Es bleibt unklar, ob sowohl für die alleinige HF-EMF-Exposition als auch für die sequentielle UV- und HF-EMF-Exposition die scheinexponierten Zellen innerhalb einer zweiten, aber ausgeschalteten Modenverwirbelungskammer kultiviert wurden.

Die dargestellte Verteilung der lokalen SAR-Werte zeugt von Heterogenität sowohl innerhalb der Wells der Zellkulturplatten als auch zwischen den Positionen der Wells und den Positionen der Platten. Die Unterschiede erscheinen viel größer als die in dem Artikel angegebene "maximale Abweichung zwischen verschiedenen Positionen der Wells <30 %". Der maximale Temperaturanstieg, der im Medium am Boden der Zellkultur-Wells gemessen wurde, betrug  $2,03 \pm 0,08$  °C bei einem lokalen SAR-Wert von 4 W/kg. Die Autoren haben nicht erwähnt, welche genauen Inkubator-Temperatureinstellungen sie verwendet haben, um die HF-EMF-induzierte Erwärmung bei jedem einzelnen SAR-Wert auszugleichen. Dies beeinträchtigt die Reproduzierbarkeit der Studie und lässt die Möglichkeit offen, dass lokal begrenzte Erwärmungseffekte zu den beobachteten Unterschieden beigetragen haben könnten.

Um die Auswirkungen von HF-EMF zu bestimmen, wurden sechs unabhängige Experimente in Duplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse wurden zusammengefasst, um Whisker-Box-Plots zu erstellen. Es ist unklar, ob die Duplikate dabei gemittelt wurden, um korrekterweise sechs unabhängige Werte zu erhalten, oder ob technische und biologische Replikate fälschlicherweise zusammengelegt wurden. Außerdem wurden die Versuchskulturen ausdrücklich aus derselben Zellcharge hergestellt. Dies ermöglicht die Verwendung des gepaarten Wilcoxon-Signed-Rank-Tests. Stattdessen wurde ohne Erklärung der ungepaarte Wilcoxon-Rangsummentest für unabhängige Proben verwendet, der eine geringere Sensitivität aufweist.

Die Autoren zeigen, dass die MitoSox-Sonde empfindlich auf starke Auslöser von ROS reagiert. Da UV-B-Strahlung viel geringere Mengen an ROS induzierte und die Dihydroethidium-basierte MitoSox-Sonde anfällig für Artefakte ist [9], hätte die Spezifität des SONDENSIGNALS für mitochondriales Superoxid bei der gewählten Konzentration zumindest durch Fluoreszenzmikroskopie bestätigt werden können. Die erhöhte mitochondriale ROS-Produktion durch HF-EMF-Exposition nach UV-B-Bestrahlung bei kleinen und moderaten SAR-Werten ist ein interessanter Befund. Um diesen Prozess besser zu verstehen, hätte eine Verhinderung des zusätzlichen Anstiegs an ROS experimentell versucht werden können, indem man während verschiedener Phasen des Protokolls Superoxid-Fänger hinzugibt oder das mitochondriale Superoxid-Dismutase-Enzym (SOD2) überexprimiert. Damit könnte z. B. geklärt werden, ob eine HF-EMF-Exposition ROS dadurch erhöht, indem sie eine Erschöpfung der Schutzmechanismen nach UV-B-Bestrahlung ausnutzt.

Das Fehlen einer typischen stufenweisen Dosis-Wirkungs-Beziehung diskutieren die Autoren im Kontext einer U-förmigen hormetischen Reaktion, d. h. einer Fähigkeit des Organismus, sich an niedrige oder moderate Dosen eines Stressors in positiver Weise anzupassen. Hormesis erscheint als kein plausibles Modell zur Erklärung der Ergebnisse, da bei ausschließlicher HF-EMF-Exposition die ROS-Produktion verringert war, aber in mit UV-B-Bestrahlung vorbehandelten Proben das Gegenteil eintrat. Die Umkehrung der Expositionsreihenfolge, d. h. UV-B-Bestrahlung nach RF-EMF-Exposition, wäre ein hilfreicher Ansatz zur Aufklärung dieses Aspekts gewesen.

Zu beachten ist, dass keine der beobachteten statistisch signifikanten Veränderungen der mitochondrialen ROS sich auf das mitochondriale Membranpotenzial und die Lebensfähigkeit der Zellen auswirkten, selbst



bei den viel höheren UV-B-Dosen, als sie für den mitochondrialen ROS-Test verwendet wurden. Ebenso wurde kein Anstieg der mitochondrialen ROS durch alleinige Exposition mit HF-EMF festgestellt.

Aufgrund der erwähnten Einschränkungen und Unstimmigkeiten tragen die Ergebnisse dieser Studie bedingt zum Wissensstand darüber bei, ob eine HF-EMF-Exposition von vorbelasteter menschlicher Haut potenziell schädlich wirkt. Für abschließende Aussagen sind weitere Untersuchungen erforderlich. Um dazu einen Beitrag zu leisten, hat das BfS Studien an menschlichen Hautzellen initiiert, in denen die Auswirkung einer Exposition auf die Genexpression und DNA-Methylierung bei Frequenzen, die typischerweise in 5G-Netzen verwendet werden, untersucht wird. Weitere Studien zur Bewertung der gesundheitlichen Auswirkungen von HF-EMF auf das Auge sind geplant.

## Referenzen

- [1] Patrignoni L, Hurtier A, Orlacchio R, et al. Evaluation of mitochondrial stress following ultraviolet radiation and 5G radiofrequency field exposure in human skin cells. *Bioelectromagnetics*. Apr 2024;45(3):110-129 doi:10.1002/bem.22495 [published Online First: 20231219].
- [2] Henschenmacher B, Bitsch A, de Las Heras Gala T, et al. The effect of radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) on biomarkers of oxidative stress in vivo and in vitro: A protocol for a systematic review. *Environ Int* 2022;158:106932 doi: 10.1016/j.envint.2021.106932 [published Online First: 20211015].
- [3] Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863(12):2977-92 doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.09.012 [published Online First: 20160917].
- [4] Dunaway S, Odin R, Zhou L, Ji L, Zhang Y, Kadekaro AL. Natural Antioxidants: Multiple Mechanisms to Protect Skin From Solar Radiation. *Front Pharmacol* 2018;9:392 doi: 10.3389/fphar.2018.00392 [published Online First: 20180424].
- [5] Orlacchio R, Andrieu G, Joushomme A, et al. A Novel Reverberation Chamber for In Vitro Bioelectromagnetic Experiments at 3.5 GHz. *Ieee T Electromagn C* 2023;65(1):39-50 doi: 10.1109/Temc.2022.3216045.
- [6] He H, Xiong L, Jian L, Li L, Wu Y, Qiao S. Role of mitochondria on UV-induced skin damage and molecular mechanisms of active chemical compounds targeting mitochondria. *J Photochem Photobiol B* 2022;232:112464 doi: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112464 [published Online First: 20220513].
- [7] International Commission on Non-Ionizing Radiation P. Guidelines for Limiting Exposure to Electromagnetic Fields (100 kHz to 300 GHz). *Health Phys* 2020;118(5):483-524 doi: 10.1097/HP.0000000000001210.
- [8] Takayama K, Salazar EP, Lehmann A, Stefanini M, Thompson LH, Weber CA. Defects in the DNA repair and transcription gene ERCC2 in the cancer-prone disorder xeroderma pigmentosum group D. *Cancer Res* 1995;55(23):5656-63.
- [9] Murphy MP, Bayir H, Belousov V, et al. Guidelines for measuring reactive oxygen species and oxidative damage in cells and in vivo. *Nat Metab* 2022;4(6):651-62 doi: 10.1038/s42255-022-00591-z [published Online First: 20220627].



## **Impressum**

Bundesamt für Strahlenschutz  
Postfach 10 01 49  
38201 Salzgitter

Tel.: +49 30 18333-0

Fax: +49 30 18333-1885

E-Mail: [spotlight@bfs.de](mailto:spotlight@bfs.de)

De-Mail: [epost@bfs.de-mail.de](mailto:epost@bfs.de-mail.de)

[www.bfs.de](http://www.bfs.de)

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:  
[urn:nbn:de:0221-2024053044055](https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:0221-2024053044055)

Spotlight - Mai/2024 no.3 (Deu)