

## Projekt:

„Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut:  
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:	Dr. Petra Waldmann und Mitarbeiter Fa. Incos Boté Am Hahnenbusch 14 b 55268 Nieder-Olm	INCOS
Projektpartner:	Dr. Beate Volkmer Dr. Rüdiger Greinert und Mitarbeiter Elbekliniken Dermatologisches Zentrum Am Krankenhaus 1 21614 Buxtehude	DZB Labor 2
	Prof. Dr. Dieter Pollet u. Mitarbeiter Hochschule Darmstadt Fachbereich Chemie - Biotechnologie Schnittspahnstr. 12 64287 Darmstadt	HDA Labor 1
	Harlan Cytotest Cell Research In den Leppsteinwiesen 19 64380 Rossdorf	Harlan, CCR Labor 3
	Prof. Dr. Maria Blettner, Dr. Jochem König und Mitarbeiter Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz Obere Zahlbacher Straße 69 55131 Mainz	IMBEI
	Prof. Dr. N. Kuster und Mitarbeiter, Zürich Zeughausstrasse 43 CH-8004 Zürich	ITIS

## Inhaltsverzeichnis:

	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>78</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>5</b>
1.1	Elektromagnetische Felder .....	5
1.2	Gentoxizität und Krebsentstehung.....	9
1.3	Literatur zu hochfrequenten EMF und Gentoxizität (2003-2010) .....	12
1.4	Studiendesign .....	19
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>21</b>
2.1	Probandenrekrutierung und Blutentnahme .....	21
2.2	Studienpopulation .....	22
2.3	Exposition .....	25
2.4	Methoden.....	25
2.4.1	Chromosomenaberrationstest.....	25
2.4.2	Mikrokerntest .....	26
2.4.3	Cometassay .....	27
2.4.4	Schwesterchromatidaustausche (SCE-Test) .....	28
2.4.5	Pretests .....	28
2.5	Statistische Analyse, Strategie .....	34
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>35</b>
3.1	Datensichtung.....	35
3.1.1	Fehlende Werte .....	35
3.1.2	Ausreißer und auffällige Werte .....	35
3.1.3	Laboreffekte.....	42
3.1.4	Korrelation zum Alter .....	44
3.1.5	Präzisionsunterschiede innerhalb der Labors und Expositionsgruppen.....	45
3.2	Auswertung der entblindeten Daten.....	45
3.2.1	Dosistrendanalyse .....	46
3.2.1.1	SAS Prozedur Mixed – Cometassay.....	46
3.2.1.2	Permutationstest – Chromosomenaberration, Mikrokerntest, SCE-Test ..	47
3.2.1.3	Trendscores – Hauptanalyse .....	51
3.2.2	Sensitivitätsanalysen - Page-Trend-Test.....	52
3.2.3	Dosistrendanalyse getrennt nach Altersgruppe .....	54
3.2.4	Differenzen zur Sham-Exposition .....	59
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>68</b>
4.1	Bewertung der Daten aus biometrischer Sicht (IMBEI).....	68
4.2	Bewertung der Daten aus biologischer Sicht .....	70
4.2.1	Laborunterschiede .....	70
4.2.2	Altersunterschiede .....	71
4.2.3	Analysen zum Dosistrend .....	73
<b>5.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>75</b>
<b>6.</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>79</b>

## Tabellenverzeichnis:

Tabelle 1:	Grenzwerte für niederfrequente Felder.....	8
Tabelle 2:	Grenzwerte für hochfrequente Felder.....	8
Tabelle 3:	Publikationen: HF-EMF und DNA-Schäden in somatischen Zellen in vitro (2003-2010) ..	13
Tabelle 4:	Personenbezogene Daten der jüngeren Probanden (n=10).....	23
Tabelle 5:	Personenbezogene Daten der älteren Probanden (n=10).....	23
Tabelle 6:	Ergebnisse der Summe der Aberrationen der 3 auswertenden Labors im Vergleich .....	29
Tabelle 7:	Chromosomenaberrationen - Mittelwerte und Standardabweichungen .....	29
Tabelle 8:	Die Ergebnisse des CA-Tests im Detail.....	30
Tabelle 9:	Die Ergebnisse des Mikrokerntests der 3 auswertenden Labore .....	30
Tabelle 10:	Ergebnisse der auswertenden Labore mit dem SCE-Test. ....	31
Tabelle 11:	Cometassay - Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Zahlen .....	32
Tabelle 12:	Mittelwerte und Standardabweichung getrennt nach Laboren .....	44
Tabelle 13:	Spearmanischer Korrelationskoeffizient für die Zielvariablen zum Alter .....	44
Tabelle 14:	Intraindividuelle Standardabweichung im Laborvergleich .....	45
Tabelle 15:	Primäre Analyse für Log-Olive-Tail-Moment.....	46
Tabelle 16:	Primäre Analyse für Log(100 - mediane DNA im Kopf (%) ) .....	47
Tabelle 17:	Ergebnisse des Permutationstests für die Zielvariablen für alle Probanden (n=20) .....	47
Tabelle 18:	Mittelwerte und Standardabweichung für alle Zielvariablen und Expositionsbed. ....	48
Tabelle 19:	Ergebnisse der primären Analyse.....	50
Tabelle 20:	Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores .....	51
Tabelle 21:	Ergebnisse des Page-Trend-Tests (Sensitivitätsanalyse).....	53
Tabelle 22:	Sensitivitätsanalyse für Schwesterchromatidaustausche .....	53
Tabelle 23:	t-Test zum Vergleich der beiden Altersgruppen .....	54
Tabelle 24:	Primäre Analyseergebnisse nur für die jüngeren Probanden (n=10) .....	55
Tabelle 25:	Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores .....	56
Tabelle 26:	Analyseergebnisse nur für die älteren Probanden (n=10).....	57
Tabelle 27:	Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores – ältere Probanden .....	58
Tabelle 28:	Differenzen zur Sham-Exposition .....	68
Tabelle 29:	Liste der erfassten Variablen und der Zielvariablen .....	83
Tabelle 30:	Zielvariablen der Chromosomenaberration und des Mikrokerntests für Labor 1 .....	84
Tabelle 31:	Zielvariablen der Chromosomenaberration und des Mikrokerntests für Labor 2 .....	85
Tabelle 32:	Zielvariablen der Chromosomenaberration und des Mikrokerntests für Labor 3 .....	88
Tabelle 33:	Zielvariablen des Cometassays und des Schwesterchromatidaustausches für Labor 1 ..	89
Tabelle 34:	Zielvariablen des Cometassays und des Schwesterchromatidaustausches für Labor 2 ..	90
Tabelle 35:	Zielvariablen des Cometassays und des Schwesterchromatidaustausches für Labor 3 ..	91
Tabelle 36:	Korrelationskoeffizienten (nach Spearman) der Zielvariablen von SCE-Test, Mikrokerntest und Cometassay getrennt nach drei Laboren.....	92
Tabelle 37:	Korrelationskoeffizienten (nach Spearman) der Zielvariablen von der Chromosomenaberration getrennt nach den drei Laboren.....	94
Tabelle 38:	CBPI – Test auf Trend.....	96
Tabelle 39:	CBPI - Sensitivitätsanalyse.....	97

## Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1:	Elektromagnetisches Spektrum .....	6
Abb. 2:	Mechanismen der Krebsentstehung .....	10
Abb. 3:	Schema des Studiendesigns .....	21
Abb. 4:	Metaphaseplatte mit 3 dizentrischen Chromosomen (Dic) .....	29
Abb. 5:	Binukleare Zelle mit Mikrokern.....	31
Abb. 6:	Metaphase mit Schwesterchromatidaustauschen .....	32
Abb. 7:	Zellkerne mit zunehmendem Schädigungsgrad im Cometassay .....	32
Abb. 8:	Schweiflänge – Dosis-Wirkungsbeziehungen der 3 Labore .....	33
Abb. 9:	Zellkerne mit zunehmendem Schädigungsgrad im Cometassay .....	33
Abb. 10	Summe geschädigter Chromosomen .....	36
Abb. 11:	Dizentrische Chromosomen.....	37
Abb. 12:	Extra azentrische Chromosomen.....	37
Abb. 13:	Ringe.....	38
Abb. 14:	Chromatidtyp Aberration .....	38
Abb. 15:	Mikrokerne .....	39
Abb. 16:	Schwesterchromatidaustausche .....	40
Abb. 17:	Mediane DNA im Kopf (%).....	40
Abb. 18:	Log(100-Mediane DNA im Kopf (%)) .....	41
Abb. 19:	Olive-Tail-Moment (Median.....	41
Abb. 20:	Log-Olive-Tail-Moment (Median) .....	42
Abb. 21:	Schwesterchromatidaustausche: Mittelwertsdifferenz.....	60
Abb. 22:	Dizentrische Chromosomen: Mittelwertsdifferenz .....	60
Abb. 23:	Summe CA: Mittelwertsdifferenz.....	61
Abb. 24:	Extra azentrische Chromosomen: Mittelwertsdifferenz .....	62
Abb. 25:	Ringe: Mittelwertsdifferenz.....	62
Abb. 26:	Chromatidtyp Aberration: Mittelwertsdifferenz .....	63
Abb. 27:	Mikrokerne: Mittelwertsdifferenz .....	64
Abb. 28:	(100- mediane DNA im Kopf: Mittelwertsdifferenz.....	64
Abb. 29:	Log-Olive-Tail-Moment: Mittelwertsdifferenz .....	65
Abb. 30:	CBPI: Mittelwertsdifferenz.....	96

# 1. Einleitung

Elektrische-, magnetische und **elektromagnetische Felder (EMF)** entstehen in der Umwelt durch die Nutzung und Erzeugung von Strom sowie durch Mobilfunk-, Rundfunk- und Fernsehtechnik. Charakterisiert werden solche Felder durch die Wellenlänge (Schwingung), die Frequenz (Schwingungen pro Zeiteinheit, 1 Hz = 1 Schwingung/s) und die Amplitude (Stärke der Schwingung). Man unterscheidet zwischen nieder- (0 - 100 KHz) und hochfrequenten Feldern (100 KHz - 300 GHz). Die Hochfrequenztechnik wird vor allem im Bereich Mobilfunk und Nahbereichs- und Telekommunikation eingesetzt aber auch bei Sicherungssystemen und Verkehrsradar. Nieder- und hochfrequente elektromagnetische Felder bilden zusammen mit der optischen Strahlung den Bereich der nichtionisierenden Strahlung. Ionisierende Strahlung ist wesentlich energiereicher als nichtionisierende Strahlung und besitzt genügend Energie, um Atome und Moleküle zu ionisieren, das heißt aus elektrisch neutralen Atomen und Molekülen positiv und negativ geladene Teilchen zu erzeugen. Durchdringt ionisierende Strahlung Zellen, Gewebe oder einen Organismus gibt sie Energie ab und kann - je nach Höhe dieser Energie - schwere Strahlenschäden bewirken.

Die Frage nach möglichen Auswirkungen von nieder- und hochfrequenten, elektromagnetischen Feldern (HF-EMF) auf die Gesundheit des Menschen ist mit der steigenden Verwendung von elektrischen Geräten im beruflichen und persönlichen Bereich seit Anfang der 90iger Jahre mit der rasant steigenden Nutzung der Hochfrequenztechnologie im Alltag immer stärker in den Blickpunkt der Öffentlichkeit und der Wissenschaft gerückt.

## 1.1 Elektromagnetische Felder

Mit niederfrequenten elektrischen und magnetischen Feldern ist der Mensch schon seit über 100 Jahren konfrontiert. Die meisten elektrisch betriebenen Maschinen und Geräte nutzen Spannungen von 220 (400) V und Frequenzen von 50 Hz und 60 Hz. Sowohl im Haushalt als auch im beruflichen Umfeld ist die Elektrizität nicht mehr wegzudenken. Elektrische Felder (EF) existieren immer dort wo elektrische Ladungen vorhanden sind, unabhängig davon ob Strom fließt. Die Einheit des elektrischen Feldes ist Volt pro Meter (V/m). Magnetische Felder (MF) werden immer dann erzeugt, wenn ein Strom durch eine Leitung fließt. Die magnetische Feldstärke wird in Ampere pro Meter (A/m) gemessen. Je höher die Stromstärke, desto größer ist die magnetische Feldstärke. Es wird aber auch oft die magnetische Flußstärke in Tesla (T) angegeben. Beide Größen lassen sich leicht ineinander umrechnen. In Luft oder in biologischem Gewebe entsprechen 80A/m rund 100 Mikrottesla ( $\mu\text{T}$ ) ([www.bfs.de/elektro/nff/grundlagen.html](http://www.bfs.de/elektro/nff/grundlagen.html)).

# Elektromagnetisches Spektrum

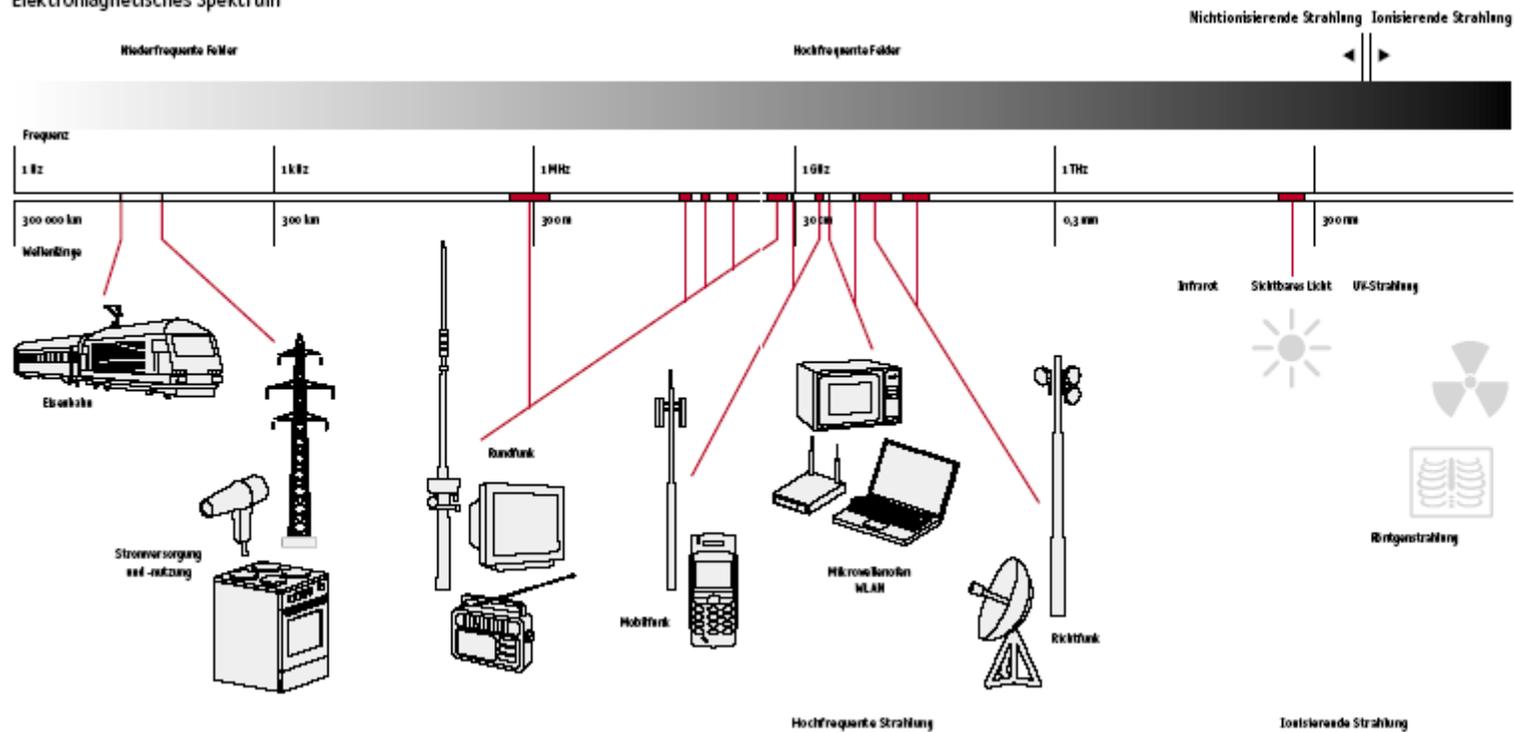


Abbildung 1: Elektromagnetisches Spektrum

Im Unterschied zu elektrischen Feldern, die kaum in Gebäude oder den menschlichen Körper eindringen, werden elektromagnetische Felder (EMF) von biologischen Systemen absorbiert und können nur schwer abgeschirmt werden (Valberg, 1997; Vijayalaxmi and Obe, 2005). Aus diesem Grund wird allgemein davon ausgegangen, dass mögliche biologische Effekte durch Expositionen mit EMF auf die magnetische Komponente oder die elektrischen Felder und Ströme, die durch magnetische Felder im Organismus induziert werden, zurückzuführen sind (Jammet et al., 1990; Tenforde, 1992; Vijayalaxmi and Obe, 2005).

Die Energieabsorption hängt vor allem von der Intensität und der Frequenz der elektromagnetischen Felder ab, aber auch von den Eigenschaften und Strukturen des biologischen Gewebes.

Die hochfrequente Abstrahlung von Mobilfunktürmen oder Handys lässt sich nicht unmittelbar mit niederfrequenten Feldern in der Umgebung von Hochspannungsleitungen oder Haushaltsgeräten vergleichen; hoch- und niederfrequente Felder wirken unterschiedlich auf den menschlichen Körper und sind deshalb getrennt zu betrachten. Die grundlegenden Eigenschaften und Wirkungen der unterschiedlichen Felder begründen deshalb auch unterschiedliche Grenzwertfestlegungen.

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.

Im Niederfrequenz-Bereich (Stromversorgung, Eisenbahn) sind das elektrische und magnetische Feld unabhängig voneinander. Die primäre Wirkung auf den Menschen sind elektrische Ströme, die im menschlichen Körper induziert werden.

Niederfrequente und hochfrequente elektromagnetische Felder können nachweislich oberhalb bestimmter Schwellenwerte Gesundheitsschäden hervorrufen. Eindeutig nachgewiesen und physikalisch definiert sind Kraftwirkungen sowie die Wärmewirkung der hochfrequenten Strahlung. In biologischem Gewebe treten elektrische Ladungen auf in Form von Ionen (geladene Atome oder Moleküle), an Zellwänden und in Wassermolekülen und anderen polaren Molekülen. Ladungen verschieben sich unter dem Einfluss elektromagnetischer Felder. Ionen werden hin und her bewegt, 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](http://www.bfs.de/elektro/hff/wirkungen.html)).

Niederfrequente EMF können zusätzliche Ströme im Körper induzieren, so dass es über einem bestimmten Schwellenwert zunächst zu biologischen Effekten und bei höheren Strömen auch zu gesundheitlichen Gefahren kommen kann. Der zugrundeliegende Mechanismus ist die Stimulation von Nerven ( $> 10$  mT), die bis zu Herzkammerflimmern und zusätzlichen Herzkontraktionen reichen kann ( $> 100$  mT).

Mit der 26. Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (26. BImSchV) im Jahre 1996 wurden entsprechende Grenzwerte rechtlich festgelegt.

Diese Grenzwerte basieren auf einer wissenschaftlichen Risikobewertung 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). Diese Gremien sind zu dem Schluss gelangt, dass gesundheitsrelevante Wirkungen bei schwacher Exposition (unterhalb bestimmter Schwellenwerte) bisher wissenschaftlich nicht nachgewiesen werden konnten. Die tatsächlich festgelegten Grenzwerte liegen noch deutlich unterhalb dieser Schwellenwerte.

Die 26. BImSchV gilt nur für ortsfeste, gewerblich genutzte Anlagen. Ihre Grenzwerte können aber auch für andere Anwendungen niederfrequenter und hochfrequenter elektromagnetischer Felder als Richtwerte herangezogen werden. In der 26. BImSchV sind Grenzwerte für die elektrischen und magnetischen Felder in der Umgebung von Stromversorgungsanlagen und Bahnstromanlagen festgelegt, sowie Grenzwerte für hochfrequente Felder, die auch den Bereich der Mobilfunkfrequenzen umfassen. Ziel der Verordnung ist es, den Schutz der Bevölkerung vor wissenschaftlich nachgewiesenen gesundheitlichen Risiken durch hoch- und niederfrequente elektromagnetische Felder sicherzustellen.

Im niederfrequenten Bereich bezieht sich die Verordnung auf die wichtigsten Anlagentypen: Hochspannungsleitungen, Erdkabel, Transformatoren sowie Bahn- und Stromversorgungsanlagen. Folgende Grenzwerte sind festgelegt (Tabelle 1):

<b>Frequenz [MHz]</b>	<b>Elektrische Feldstärke<sup>*)</sup> [kV/m]</b>	<b>Magnetische Flussdichte<sup>*)</sup> Mikrotesla [µT]</b>
50	5	100
16 2/3	10	300

<sup>\*)</sup>Effektivwerte

Folgende Grenzwerte für hochfrequente Felder sind festgelegt (Tabelle 2):

<b>Frequenz [MHz]</b>	<b>Elektrische Feldstärke<sup>*)</sup> [V/m]</b>	<b>Magnetische Feldstärke<sup>*)</sup> [A/m]</b>
10 - 400	27,5	0,073
400 - 2.000	$1,375 \times f^{1/2}$	$0,037 \times f^{1/2}$
2.000 - 300.000	61	0,16

<sup>\*)</sup>Effektivwert gemittelt über 6-Minuten-Intervalle

Der Energie, die biologischen Systemen über hochfrequente elektromagnetische Felder (HF-Felder) zugeführt wird, kann als SAR-Wert (specific absorption rate, W/Kg) bezogen auf die absorbierende Masse angegeben werden. Zur Festlegung des Grenzwertes wird in Deutschland eine Empfehlung der Strahlenschutzkommission zugrundegelegt, die als Obergrenze einen Wert von 2 W/kg, gemittelt über jeweils 10 g, nennt (Teilkörpergrenzwert). Diese Empfehlung basiert auf einer Leitlinie der Internationalen Kommission zum Schutz vor Nichtionisierender Strahlung (ICNIRP), die sich auch der Rat der Europäischen Gemeinschaft zu eigen gemacht hat. HF-Felder, die auf den gesamten Körper einwirken und dabei zu SAR-Werten von im Mittel 4 W/kg führen, bewirken beim Menschen Temperaturerhöhungen von etwa 1 °C. Im Vergleich dazu: Durch normale Muskelaktivitäten werden Leistungen von 3 bis 5 W/kg freigesetzt. ([www.bfs.de/elektro/nff/recht.html](http://www.bfs.de/elektro/nff/recht.html))

Zum Schutz des Menschen wurde bei beruflicher Exposition ein Ganzkörpergrenzwert von 0,4 W/Kg festgelegt, für die Allgemeinbevölkerung existiert ein Grenzwert von 0,08 W/Kg.

Wie viel Energie tatsächlich vom Menschen absorbiert wird, hängt von vielen Faktoren ab: z. B. von der Körpergröße, der Orientierung des Körpers im EMF und der Frequenz der Strahlung.

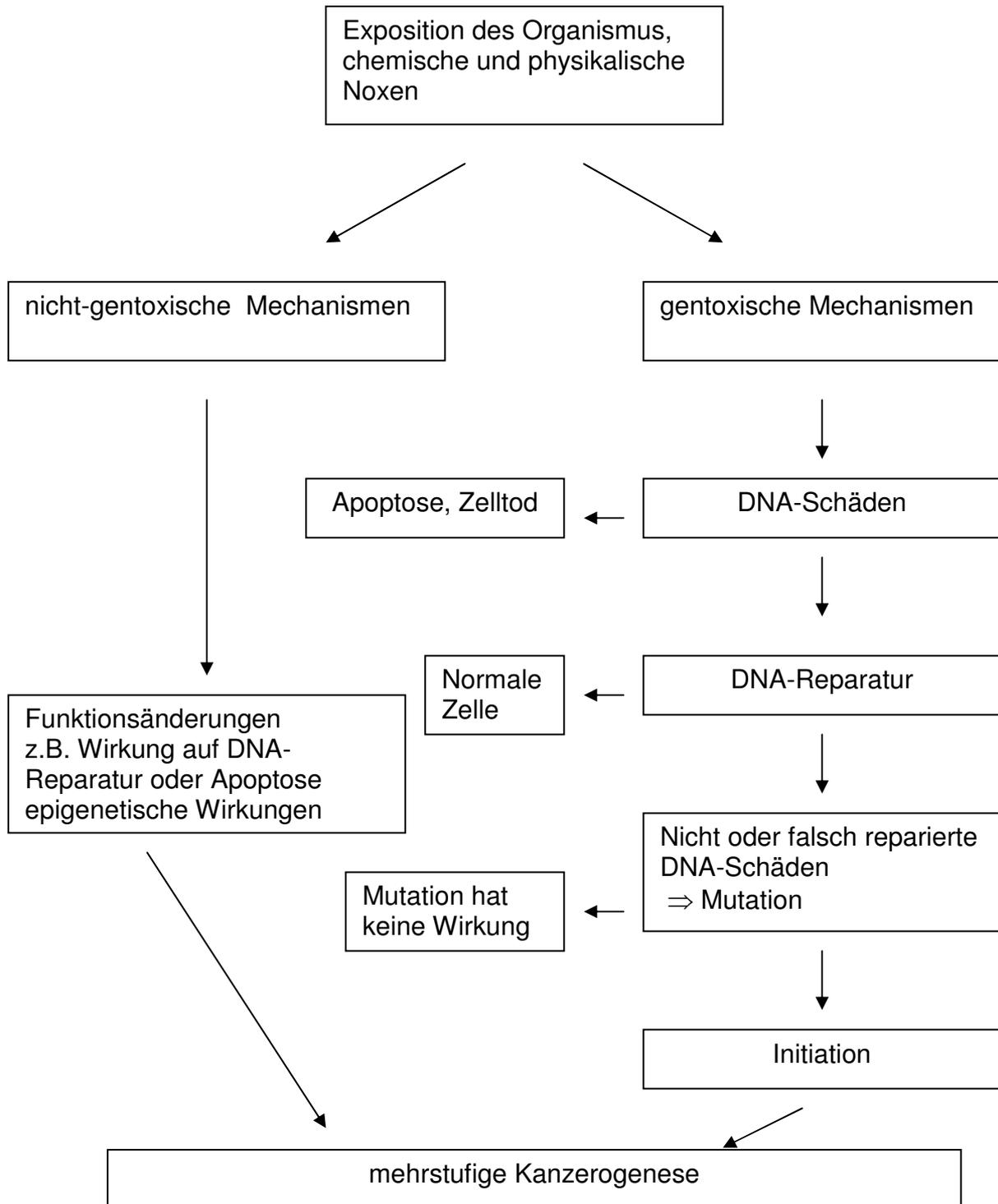
## **1.2 Gentoxizität und Krebsentstehung**

Nach der heutigen Auffassung ist Krebs das Ergebnis eines Zusammenwirkens von gentoxischen und nicht gentoxischen Einflüssen. Die Erkrankung beginnt mit einer einzelnen Genmutation in einer einzelnen Zelle (Initiation). Damit aus dieser Zelle schließlich ein bösartiger Tumor wird, bedarf es der clonalen Expansion und einer Reihe von weiteren Mutationen, sowohl von Protoonkogenen als auch von Supressorgen sowie Störungen der Chromosomenstruktur (maligne Progression). Die klinischen Symptome spiegeln dieses stufenweise Fortschreiten der Erkrankung wieder – präneoplastische Veränderungen, gutartige Geschwulste, prämaligener Tumor, infiltrierende und metastasierende Tumore. Dieses Fortschreiten der Erkrankung kann durch nicht-gentoxische Faktoren wesentlich beschleunigt werden. Man unterscheidet zur Zeit hauptsächlich zwei Typen von Mechanismen, die zur Krebsentstehung führen können: primär nicht-gentoxische Mechanismen und gentoxische Mechanismen.

Eine Noxe, die nicht-gentoxisch wirkt aber 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 den programmierten Zelltod (Apoptose) negativ beeinflusst oder epigenetische Wirkungen hat (Cohen and

Ellwein, 1991). Unter epigenetischen Veränderungen versteht man vererbare Änderungen in der Genexpression, die nicht auf der Sequenz der Nukleotide der DNA beruhen, sondern auf post-translationalen Modifikationen in DNA und Histonen (Adcock et al., 2006; Rodenhiser und Mann, 2006).

Abb. 2: Mechanismen der Krebsentstehung (in Anlehnung an Vijayalaxmi and Obe, 2005).



Auch wenn es nicht-gentoxische Kanzerogene gibt, so sind doch die meisten bekannten krebserregenden Noxen gentoxisch (Tennant and Zeiger, 1993). Nicht alle Gentoxine wirken jedoch kanzerogen. Dennoch werden in der Chemikalienbewertung in der Regel Tests auf Gentoxizität oder Mutagenität durchgeführt, um eine mögliche kanzerogene Wirkung vorherzusagen.

Die Methoden zum Nachweis von Gentoxizität, die in den meisten Studien mit der Fragestellung, ob EMF DNA-Schäden verursachen können, angewendet wurden und auch in diesem Projekt zur Anwendung kamen, sind im Folgenden aufgeführt:

#### Chromosomenaberrationstest: Nachweis struktureller Chromosomenaberrationen

Unter strukturellen Chromosomenaberrationen versteht man Veränderungen der Chromosomenstruktur, die lichtmikroskopisch erkennbar sind: Man unterscheidet:

Gap ("Lücke"): Ungefärbter Abschnitt auf einem Chromatidarm (Chromatidgap) oder homolog auf beiden Chromatidenarmen (Isochromatid- oder Chromosomengap). Der Abschnitt darf nicht länger sein als eine Chromatide breit ist.

Bruch: Dissoziiertes, abgebrochenes Chromatid- oder Chromosomenstück (Chromatid- oder Chromosomenbruch)

Deletion: Verlust eines Chromosomenstückes

Dizentrisches Chromosom: Chromosom mit zwei Zentromeren

Ringchromosom: Vereinigung des Chromosoms an seinen Telomeren zu einem Ring  
Austauschfigur: aus mehreren Chromosomen (Tri-/ Quadriradialfigur)

#### Mikrokerntest (Mikronukleustest, MNT)

Durch klastogene oder aneugene Wirkungen der Mutagene wird das Genom geschädigt und es verbleiben Chromosomenbruchstücke oder ganze Chromosomen im Cytoplasma, während die Chromosomen auf die beiden Tochterzellen verteilt werden. Ein im Cytoplasma verbliebenes Chromosomenfragment oder Chromosom wird in der Telophase mit einer eigenen Kernmembran umschlossen und wird als Mikronukleus sichtbar (Fenech, 1993). Da die Entstehung von Mikronuklei eine Zellteilung voraussetzt, müssen Lymphozyten mit einem Mitogen, wie beispielsweise Phytohämagglutinin, stimuliert werden. Eine Modifikation des MNT mit Cytochalasin B, das die Zellteilung, nicht jedoch die Kernteilung verhindert, ermöglicht die gezielte Auswertung von Zellen, die nach der Mutagenexposition genau eine Mitose durchlaufen haben (Fenech et al., 1997).

## Cometassay

Der Comet-Assay oder auch Einzelzellgelelektrophorese (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) und 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 erfolgreich gezeigt, dass DNA-DSB zu strahleninduzierter Migration der DNA führen. (Singh and Stephens, 1997; Wojewodzka et al, 2002).

## SCE

Der SCE-Test ist kein Mutationstest, da mit dem Nachweis von Schwesterchromatidaustauschen keine echten mutagenen Ereignisse, sondern nur Austausche (durch eine erhöhte Reparaturrate in der G2-Phase des Zellzyklus) erfasst werden.

## **1.2 Literatur zu hochfrequenten EMF und Gentoxizität (2003-2010)**

Es gibt eine Reihe von Studien, die über biologische Wirkungen im Bereich niedriger Intensitäten hochfrequenter Strahlung berichten. Es wird z. B. über Änderungen des Schlafverhaltens oder eine Beeinflussung der Leistungsfähigkeit des Gehirns diskutiert. Auch ist die thermische Abhängigkeit der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke nicht abschließend geklärt. Die Mehrheit der Studien zeigt aber, dass bei Feldstärken, die bei Nutzung von Mobiltelefonen auftreten, die Schrankenfunktion gewährleistet bleibt. Parameter des Blutes, des Immunsystems oder bestimmte Hormone (z.B. Melatonin) wurden im Tiermodell und z.T. auch beim Menschen untersucht. Zu den aktuellen Themen der laufenden Forschung gehören auch Untersuchungen zur Aufklärung eines möglichen Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von Krebserkrankungen und HF-Feldern. Viele dieser Ergebnisse wurden bisher nicht unabhängig bestätigt und insbesondere fehlt ein schlüssiger Wirkungsmechanismus, mit dem ein Einfluss hochfrequenter Felder auf die genannten biologischen Parameter erklärt werden könnte. In vielen Fällen ist auch unklar, ob die beobachteten Effekte eine gesundheitliche Relevanz für den Menschen haben. (aus [www.bfs.de/elektro/hff/wirkungen.html](http://www.bfs.de/elektro/hff/wirkungen.html))

Durch den enormen Anstieg in der Nutzung von hochfrequenten EMF in der Telekommunikation sowie zur Erwärmung in Industrie und Haushalt wurden mögliche

gesundheitliche Beeinträchtigungen von HF-EMF schon früh in den Blickpunkt der Öffentlichkeit sowie der Forschung gerückt. Gerade in bezug auf mögliche genetische Schäden oder die Entstehung von Krebs wurden schon früh Studien durchgeführt (Elwood, 2003). In einer wissenschaftlichen Abhandlung über mögliche genotoxische Wirkungen von HF-EMF kamen Brusick et al. (1998) nach Sichtung von über 100 Publikationen zu dem Schluss, dass HF-EMF nicht direkt mutagen und Beeinträchtigungen von Organismen durch die Exposition gegenüber hohen Frequenzen und Intensitäten das Resultat von Hyperthermie sind. Indirekte Effekte auf die Replikation oder die Transkription wären jedoch unter bestimmten Expositionsbedingungen nicht auszuschließen.

In einem Übersichtsartikel über mögliche genotoxische Wirkungen von hochfrequenten EMF stellten Vijayalaxmi und Obe (2004) Publikationen nach den Endpunkten DNA-Strangbrüche, Chromosomenaberrationen, Mikrokerne und Schwesterchromatidaustausche von 1990 – 2003 zusammen. Die meisten Ergebnisse (58%) dieser Studien sprachen für keine erhöhten genotoxischen Schäden in Säugerzellen nach Exposition in HF-EMF im Vergleich zu schein-exponierten Zellen. Einige Untersuchungen (23%) zeigten eine erhöhte genotoxische Schädigung infolge der Exposition gegenüber HF-EMF, während ca. 19 % der Publikationen keine eindeutigen Ergebnisse aufwiesen.

In der folgenden Tabelle sind Studien aufgeführt, die in dem Zeitraum von 2003-2010 publiziert wurden und sich mit DNA-Schäden in somatischen Zellen in vitro und der Exposition mit HF-EMF beschäftigen.

<b>Literatur</b>	<b>Modulation Frequenz</b>	<b>Exposition</b>	<b>Zelltypen</b>	<b>Effekt Erhöhung</b>	<b>Dosis- Wirkung</b>
Xu S., Zhou Z...2010	1800 MHz Pulsmod. 217 Hz,	SAR: 2W/Kg	Primärkulturen von Neuronen	oxidative Schäden Mitochondrien- DNA <b>ja</b> 24 h nach Exp.	nein
Kim JY, Hong SY .... 2010	835 MHz CDMA	Kombination mit Gentoxinen	Säugerzellen	keine direkte Wirkung - Effekt in Kombination mit NQO, CP	nein
Bouthoumie u, Joubert 2010	GSM, 900 MHz	SAR: 0,25 24 h Expos.	Humane Amnionzellen	Kein Effekt	nein
Luukonen J, Juutilainen J 2010	842 MHz, CW, moduliert	SAR: 5 W/kg, + Kombination mit FeCl	Humane Neuroblastomaz. SH-SY5Y	ROS-Comet Kein Effekt von HF-EMF	nein
Franzellitti S, Valbonesi P 2010	1,8 GHz, GSM, CW, GSM-217, GSM-Talk intermittierend	SAR: 2 W/kg	Humane Trophoblastz. HTR-8/SVneo	Comet: <b>ja</b> ,kurzfristiger Effekt bei GSM-Talk und -217	nein
Luukonen	872 MHz	SAR: 5 W/Kg	humane SH-	GSM: kein	nein

J., Hakulinen P. ...2009	CW GSM	Kombination mit Gentoxin (ROS)	SY5Y Neuroblastomzellen	Effekt auch nicht in CW: Effekt in Kombination	
Sannino A., Di Costanzo... 2009	900 MHz GSM	SAR: 1 W/kg SAR: 1 W/Kg + MX	humane Fibroblasten	kein Effekt	nein
Zhijian C. Xiaoxue L... 2010	1.8 GHz	SAR: 2 W/Kg +/- DOX	B-Zell Lymphoblastoid-Zellen	kein Effekt von RFR Effekt in Kombination mit DOX	nein
Hansteen IL, Clausen KO 2009	2,3 GHz Continuous, pulsed 10 W/m <sup>2</sup>		Humane Lymphozyten	Kein Effekt, CA	nein
Manti L., Braselmann H. 2008	1,95 GHz UMTS moduliert	SAR: 0,5; 2 W/Kg moduliert 24 h ohne u. in Kombination mit Röntgenstrahlung (4 Gy)	humane periphere Lymphozyten	kein Effekt, mit 4 Gy: geringe Erhöhung der Schäden pro Zelle (CA)	nein
Schwarz, Kratovil 2008	UMTS 1950 MHz	0,05 W/kg, 0,1 W/kg 24h, 12h, 8h	Fibroblasten, Lymphozyten human	Fibr.: ja, Effekt in MN, Comet Lymph. nein	nein, Expositions dauer
Zeni, Schiavoni 2008	UMTS	intermittierend, SAR: 2,2 6 min on, 2h off	Periphere Lymphozyten (un) + stimuliert	MN: nein Comet: nein	nein
Speit G., Schütz P 2007	1800 MHz CW intermittierend	SAR: 2 W/kg	Fibroblasten, V79-Zellen	MN: nein Comet: nein	nein
Vijayalaxmi 2006	2,45 GHz, 8,2	Pulsed-wave SAR: 20,71W/Kg	Periphere Lymphozyten, (un) + stimuliert	MN: nein CA: nein	nein
Diem, Schwarz, ...2005...	Pulsmod.; Sprechmod.; Kontinuierl.; Intermittierend 1800 MHz	SAR: 1,2; 2 4h; 16 h; 24 h	diploide humane Fibroblasten Granulosazellen, Ratte	4 h: nein 16 h: ja 24 h: ja	nein: keine Erhöhung von 16 h auf 24 h
Sakuma, Komatsubara, 2006	Kontinuierl. CDMA 2142,5 MHz	SAR: 0,08 – 0,8 W/Kg 2 h , 24 h	humane Glioblastomazellen, humane MR-90 Fibroblasten	nein	nein
Zeni, Romano 2005	GMSK TDMA 900 MHz	SAR: 0,3 , 1 W/Kg 2 h	Humane Leukozyten	nein	nein
Mc Namee, Bellier..., 2003	Kontinuierl. Pulsmod. 1900 MHz	SAR: 0-10	Humane Lymphozyten	nein	nein
Zeni, Schiavoni, 2003	GMSK, TDMA 900 MHz	SAR:	Humane Lymphozyten	nein	nein
Koyama, Nakahara ... 2003	HFEMF – keine Angabe	SAR: 13-100	CHO-K1	Bis 50 W/Kg: nein SAR: 78, 100	nein

				ja	
Komatsubara, Hirose 2005	Kontinuierlich Pulsmod. 2450 MHz	SAR: 5, 10, 20, 50, 100 W/Kg 2 h	Maus m5S-Zellen (Haut)	Nein, trotz Temperaturerhöhung	nein
Mashevich, Folkman, 2003	keine 830 MHz	SAR: 1,6 – 8,8 72 h	Humane, periphere Lymphozyten	Ab SAR: 2,9 W/Kg <b>ja</b>	<b>Ja</b> , SAR abhängig
Zotti-Martelli, Peccatori .. 2005	Kontinuierl. 1800 MHz	Leistungsflussdichte: 5,10 20 mW/qcm 1,2,3 h	Humane Lymphozyten	Ja, aber Spenderabhängig	Nein: Zeit- und Frequenzfenster
Baohong, Jiliang... 2005	1800 MHz	SAR: 3 W/Kg 2h	Humane Lymphozyten	nein, aber synergistische Effekte	nein
Chemeris, Capeyev,.. 2004	High peak power pulsed 8,8 GHz	SAR: 0,3 W/Kg	Erythrozyten, <i>Xenopus laevis</i>	nur Temperatur effekte	

Tabelle 3: Publikationen bezgl. HF-EMF und DNA-Schäden in somatischen Zellen in vitro (2003-2010)

Im Jahr 2003 veröffentlichten Mashevich und Kollegen, dass infolge der Exposition von humanen peripheren Lymphozyten in HF-EMF (830 MHz) in vitro ein linearer Anstieg von Aneuploidie (das Chromosom 17 betreffend) bei steigenden SAR-Werten erfolgte (1,6 – 8,8; 72 h Exposition; Effekt ab 2,9 W/Kg). Chou und Swicord (2003) kritisierten die Ergebnisse dieser Studie als Temperatureffekt, da bei höheren SAR-Werten deutliche Temperaturanstiege verzeichnet wurden. Korenstein und Barbul (2003) legten in einer Antwort dar, dass es schon bei SAR-Werten, die nur eine Temperaturerhöhung von 1 °C bewirkten zur einem Anstieg der Aneuploidie kam. In dieser Studie wurden keine Positivkontrollen mitgeführt.

Auch Diem und Kollegen (2005) fanden genotoxische Effekte in humanen diploiden Fibroblasten und Granulosazellen der Ratte in Form von DNA-Strangbrüchen nach Exposition in HF-EMF (1800 MHz, intermittierend, kontinuierlich, SAR: 1,2 und 2 W/Kg) bei verschiedenen Modulationen. Diese Publikation wurde öffentlich mehrfach kritisiert (Vijayalaxmi, McNamee und Scarfi, 2005). Der Versuch die Ergebnisse in einem anderen Labor zu bestätigen, ist fehlgeschlagen (Speit et al. 2007). Es konnten keine Effekte in Cometassay und Mikrokerntest bei gleichen Expositionsbedingungen und Zellen gefunden werden.

Die gleiche Arbeitsgruppe fand auch infolge von UMTS-Expositionen (Schwarz et al. 2008, siehe Tabelle 3) in Fibroblasten DNA-Strangbrüche und eine erhöhte Anzahl von Mikrokernen. Diese Arbeit wurde ebenfalls stark kritisiert, aufgrund der sehr gering – „ungewöhnlich“ - streuenden Ergebnisse (Lerchl, 2008).

Erhöhte Raten von Mikrokernen wurden von Zotti-Martinelli und Kollegen in humanen Lymphozyten von 9 Spendern nach Befeldung (1800MHz, kontinuierlich) nachgewiesen. Diese Ergebnisse wurden durch die Zusammenfassung der Spender oder der Expositionszeiten ermittelt. Es konnten jedoch keine eindeutigen Beziehungen zwischen Wirkung und Leistungsflussdichten oder Expositionszeiten festgestellt werden. Die Effekte traten bei den niedrigen Leistungsflussdichten von 5

und  $10 \text{ mW/cm}^2$  auf und sanken bei  $20 \text{ mW/cm}^2$  wieder. Die Effekthöhe war mit einem Faktor von ca. 2 relativ gering. Lymphozyten der Spender wurden zu zwei verschiedenen Zeiten im Abstand von ca. 3 Monaten exponiert und untersucht. Es zeigte sich, dass Lymphozyten von 4 der 9 Spender eine signifikant erhöhte Mikrokernrate nach Exposition in EMF im Vergleich zu nicht exponierten Zellen aufwiesen, während in Lymphozyten von 5 Spendern kein oder kein eindeutiger Effekt infolge der Exposition nachgewiesen werden konnte. Diese Unterschiede konnten in einem zweiten Experiment reproduziert werden. Die Autoren postulierten eine stark variierende Suszeptibilität von Menschen gegenüber der Exposition in HF-EMF aufgrund ihrer Ergebnisse und erklärten, dass die kontroversen Ergebnisse vieler wissenschaftlicher Studien auf diesem Gebiet auf dieser unterschiedlichen Suszeptibilität beruhen könnten. Leider wurden in dieser Studie keine Positivkontrollen durchgeführt, die ein besseres Bild, die Streuungen des Testsystems betreffend, ergeben hätten. Die Effekthöhen sind relativ gering und die Variation von Spender zu Spender und Experiment zu Experiment ist relativ groß. Statistisch gesehen wäre eine größere Anzahl von Spendern und eine höhere Anzahl von Testwiederholungen wünschenswert gewesen. Die Autoren haben keine spezifischen Absorptionsraten angegeben.

Baohong und Kollegen (2005) berichteten, dass die Exposition von humanen Lymphozyten eines Spenders in HF-EMF (1800 MHz) für 2 h zu keiner Erhöhung der DNA-Strangbrüche im Cometassay führte, bei Kombination der HF-EMF-Exposition mit einer Exposition der Mutagene Mitomycin C (vernetzendes Agens) oder 4-Nitrochinolinoxid (NQO, UV-nachahmendes Agens) jedoch synergistische Effekte nachgewiesen werden konnten. Die Kombination von Bleomycin- (bewirkt Doppelstrangbrüche) und Methylmethansulfonat- (alkylierendes Agens) mit HF-EMF-Exposition bewirkte keine Effekterhöhung verglichen mit der alleinigen Wirkung der Mutagene. Der Cometassay wurde direkt im Anschluß an die Exposition durchgeführt sowie 21 h nach der Exposition. Die Kombination der Exposition mit Mutagenen und HF-EMF erfolgte in unterschiedlicher Reihenfolge (EMF vor Mutagengabe, nach Mutagengabe, gleichzeitig). Die Autoren spekulierten, dass möglicherweise die Nukleotid-Exzissions-Reparatur eine Rolle bei diesen synergistischen Effekten spielt. Die Mutagene alleine bewirkten keine klaren Konzentration-Wirkungs-Beziehungen im Cometassay. Die Autoren erklärten dies mit teilweise zu niedrig gewählten Konzentrationen. Nach langjähriger eigener Erfahrung mit der Substanz NQO im Cometassay müssten die von Baohong und Kollegen eingesetzten Konzentrationen von 0,25; 0,5; 1 und  $2 \mu\text{M}$  NQO zu eindeutigen Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen führen, auch wenn Lymphozyten in der  $G_0$ -Phase weniger sensitiv sind als sich teilende Zellen. RTG-2-Zellen (RTG-2, rainbow trout gonad, geringe Zellteilungsrate) sowie Hep-G2-Zellen (humane Leberzelllinie) zeigen im Cometassay schon bei einer Konzentration von  $0,3 \mu\text{M}$  massive DNA-Schäden (Faktor  $> 10$ , eigene Daten), die 20 h nach der Exposition zu einem erheblichen

Umfang (~2/3) repariert sind. Die Tatsache, dass nach einer 2 h Exposition mit einer NQO-Konzentration von 2 µM nur eine 2-fache Erhöhung des Tailmoments, mit 1 µM NQO keine erhöhte Strangbruchrate gefunden wurde, spricht für die Verwendung einer sehr insensitiven Version des Cometassays. Dafür sprechen auch die Tailmoment-Werte der Kontrollen, die zwischen 0,1 und 0,2 liegen. In anderen Studien wurden mit diesen Substanzen bei ähnlichen Konzentrationen höhere Effekte erzielt (Zeni et al. 2003, Koyama et al. 2003). Die zweifache Erhöhung des Tailmoments infolge der NQO-Exposition war auch noch 21 h nach der Exposition vorhanden. Es erfolgte auch ohne Befeldung keine Reparatur. Die Substanz Mitomycin C ist für die Untersuchung mit dem herkömmlichen Cometassay ungeeignet, da sie Vernetzungen bewirkt und keine DNA-Strangbrüche. Die Tailmoments nach Mitomycin C Exposition müssten kleiner als die der Negativkontrolle sein. Dies ist bei Negativkontrollen mit Tailmomenten von ca. 0 nicht möglich. Dass infolge der kombinierten Exposition von HF-EMF und Mitomycin C (bis zu 30 µM) direkt nach der Exposition DNA-Strangbrüche auftraten, ist nicht nachvollziehbar.

Koyama und Kollegen (2003) untersuchten CHO-K1-Zellen (**ch**inese **h**amster **o**vary cells) nach Exposition (2,45 GHz, 18h, kontinuierlich) in HF-EMF auf Mikrokerne mit der Zytokineseblock-Methode. Die Zellen wurden bei mittleren spezifischen Absorptionsraten (SAR) von 0, 13, 39, 50, 78 und 100 W/Kg exponiert. Als Positivkontrolle diente Bleomycin (0 bis 20 µg/ml; 1h). Bleomycin wurde auch in Kombination mit der HF-EMF-Exposition eingesetzt. Die Vitalität der Zellen wurde nach der Exposition bestimmt. Bei SAR-Werten bis 50 W/Kg konnten keine erhöhten Mikrokernraten festgestellt werden. Bei diesen SAR-Werten kam es auch zu keiner synergistischen oder additiven Wirkung in Kombination mit Bleomycin. SAR-Werte von 78 und 100 führten zu einer 2-3 fach erhöhten Zahl an Mikronuklei, wobei vor allem eine Erhöhung von Kinetochor-positiven Mikrokernen ermittelt wurde. Die Expositionen bei den hohen SAR-Werten bewirkten eine Temperaturerhöhung im Medium. Anhand von entsprechend temperierten Kontrollen konnte ausgeschlossen werden, dass die nach EMF-Exposition gemessenen Effekte nur auf dieser Temperaturerhöhung basierten. In Kombination mit Bleomycin traten bei den höchsten (78, 100) SAR-Werten additive Effekte auf. Die Autoren wiesen daraufhin, dass die SAR-Werte von Expositionen im Mobilfunkbereich weitaus niedriger sind als die 50 W/Kg, die zu keiner erhöhten Mikrokernrate führten.

Komatsubara und Kollegen (2005) fanden keine Erhöhung von Chromosomenaberrationen (CAs) in Maus-m5S-Zellen nach Befeldung mit mittleren SAR-Werten von 5, 10, 20, 50 und 100 W/Kg (2,45 GHz, kontinuierlich, bei 100 SAR auch gepulst, 2h). Die Positivkontrollen Mitomycin C (0,3 µM) und Röntgenstrahlung (3 Gy) bewirkten hingegen um den Faktor 25 bzw. 10 erhöhte Raten an Chromosomenaberrationen. Die Expositionen bei 100 W/Kg, die zu einer deutlichen

Temperaturerhöhung von bis zu 4°C führten, bewirkten keine zusätzlichen Chromosomenaberrationen verglichen mit den entsprechenden Kontrollen.

Forscher der gleichen Arbeitsgruppe (Sakuma und Kollegen, 2006) exponierten humane Glioblastomazellen (A172) bei SAR-Werten von 80, 250, 800 mW/Kg (W-CDMA, 2,145 GHz) und von 80 mW/Kg (CW, continuous wave) sowie humane IMR-90 Fibroblasten bei 80 mW/Kg (W-CDMA, 2,145 GHz + CW) für 2 und 24 h und untersuchten die Zellen mit dem alkalischen Cometassay auf DNA-Strangbrüche. Die internationale Kommission für den Schutz vor nicht-ionisierender Strahlung [International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, ICNIRP, 1998] gab in Ihren Rahmenrichtlinien einen 80 mW/Kg als Grenzwert für die Ganzkörperexposition an. Als Positivkontrolle diente das Alkylanz Methylmethansulfonat (0-20 µg/ml, ab 4 µg/L positiv). Die Experimente wurden 3-fach mit 5 Parallelansätzen wiederholt. Die Autoren fanden bei keiner der beschriebenen EMF-Expositionsszenarien erhöhte Werte von DNA-Strangbrüchen. Die Positivkontrolle hingegen führte zu einer deutlichen Konzentrations-Wirkungsbeziehung.

Humane Leukozyten setzten Zeni und Kollegen (2003) in ihrer Studie ein. Endpunkte dieser Studie waren Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidaustausche und DNA-Strangbrüche. Die Exposition der nicht stimulierten Leukozyten (Vollblut) erfolgte bei einer Frequenz von 900 MHz und SAR-Werten von 0,3 und 1 W/Kg für 2 h. Pro SAR-Wert wurden Blutproben von je 5 Spendern untersucht. Als Positivkontrollen dienten Methylmethansulfonat (150 µM) im Cometassay und Mitomycin C (0,1 µM) für die zytogenetischen Untersuchungen. Die Exposition im Elektromagnetischen Feld bewirkte unter genannten Bedingungen keinen positiven Befund in allen 3 Testsystemen. Die Positivkontrollen hingegen zeigten die erwarteten deutlichen Effekte in allen Tests.

Chemeris und Kollegen (2004) fanden DNA-Strangbrüche in Froscherythrozyten nach Exposition in einem HPPP-EMF (high peak power pulsed, 8,8 GHz, 180 ns Puls, Wiederholungsrate 50 Hz, 65 kW). Anhand einer entsprechend temperierten Kontrolle konnte der Effekt jedoch auf die Temperaturerhöhung während der Exposition zurückgeführt werden.

Zeni et al. (2008) stellten in humanen Leukozyten keinen Effekt durch HF-EMF Exposition im Mikrokerntest und im alkalischen Cometassay fest (1959 MHz, intermittierend).

In einer weiteren Studie wurde von Vijayalaxmi und Prihoda (2008) eine Meta-Analyse der Daten von 63 Publikationen von 1990-2005, die sich mit somatischen Säugerzellen und hochfrequenten EMF beschäftigten, erstellt. Die Autoren resümierten, dass bei Versuchsbedingungen unterhalb der festgelegten Grenzwerte für HF-EMF, die ermittelten Gesamtindices für Gentoxizität von HF-EMF-exponierten Gruppen und der Sham-Expositionsgruppe gleich waren. Bei einzelnen Endpunkten traten signifikant erhöhte Werte auf, jedoch bei geringen Effekthöhen. Mikrokernraten

und Chromosomenaberrationen von befeldeten und scheinbefeldeten Gruppen lagen im Bereich der historischen Kontrollen.

Aus Tabelle 3 ist zu entnehmen, dass im Zeitraum von 2003-2010 (in peer-reviewed Journals) in 5 von 25 Studien genschädigende Effekte infolge von HF-EMF-Expositionen (SAR-Werte < 5 W/kg) gefunden wurden, in 4 davon bei SAR-Werten kleiner als 2 W/kg. In 10 Studien wurden humane periphere Lymphozyten als Untersuchungsmaterial verwendet, in keiner davon waren genschädigende Effekte unterhalb eines SAR-Wertes von 2 W/kg zu verzeichnen.

## 1.4 Studiendesign

Das Thema dieser Studie ist „Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut: A. Gentoxizität“.

Unter GSM versteht man das globale Mobilfunksystem (**G**lobal **S**ystem for **M**obile Communication). Mobilfunknetze arbeiten wie schon erwähnt mit hochfrequenten EMF. Die in Deutschland zur Zeit verwendeten Mobilfunknetze D (digitale D-Netze) und E (digitale E-Netze) arbeiten mit Mikrowellen der Frequenzbereiche 900 MHz und 1800 MHz.

Unter dem Begriff Gentoxizität sind toxische Wirkungen auf das Genom zusammengefasst. Gentoxizität beinhaltet neben der Entstehung von sekundären DNA-Veränderungen (Mutationen) auch die Entstehung von reversiblen primären DNA-Veränderungen. Die DNA (Desoxyribonukleinsäure/ Desoxyribo nuclein acid) ist der primäre Informationsträger aller Lebewesen und für die übergeordnete Steuerung sämtlicher Lebensfunktionen verantwortlich. Diese Aufgabe erfordert eine hohe Stabilität der DNA-Moleküle, da Veränderungen der DNA auch Veränderungen der primären Information bewirken können. Die DNA ist jedoch nicht im statischen Sinne stabil, vielmehr besitzt sie eine dynamische Stabilität, die auf einer weitgehend korrekten Selektion der Desoxynukleosid-Triphosphate (ihrer Bausteine) in der Polymerisierungsreaktion, auf DNA-Reparatursystemen sowie auf der korrekten Chromosomenverteilung während der Zellteilung gründet. DNA-Schäden, die zu Informationsänderungen oder -verlusten führen, können Änderungen von physiologischen Prozessen wie Wachstum, Zellteilung, Transkription, Zelltod und Induktion der zellulären Transformation hervorrufen (Setlow; 1968, Hart und Trosko, 1975). Zu den Folgen von derartigen Fehlfunktionen für den Menschen können Tumorigenese, Erbkrankheiten, Autoimmunkrankheiten, Atherosklerose sowie vorzeitiges Altern und verminderte Lebensqualität gehören.

Im Rahmen dieser Studie sollten mögliche gentoxische Effekte auf stimulierte Lymphozyten in isoliertem menschlichem Blut durch hochfrequente elektro-

magnetische Felder in Form eines Ringversuchs untersucht werden. Das Bundesamt für Strahlenschutz (BfS) hatte Vorgaben zum Studiendesign in der Ausschreibung der Studie festgelegt:

Die Untersuchungen sollten an peripheren Lymphozyten aus PHA-stimuliertem Vollblut von männlichen gesunden Spendern zweier Altersklassen (10 Jugendliche  $\leq$  18 Jahre und 10 Erwachsenen in der Altersgruppe von 50-60 Jahren), sämtlich Nichtraucher, vorgenommen werden. Der Blutentnahme sollte eine ausführliche und unauffällige Anamnese in Fragebogenform vorausgehen. Es sollten vier verschiedene Endpunkte (Chromosomenaberrationen, DNA-Strangbrüche, Mikrokerne, Schwesterchromatidaustausche) in jeweils 3 kompetenten Labors blind ausgewertet werden. Die Studie sollte somit in Form eines Ringversuches durchgeführt werden. Die Exposition und die Herstellung von Präparaten erfolgte in einem vierten Labor. Gemäß Vorgaben des BfS wurde die Exposition bei einer Frequenz von 1800 MHz mit 4 SAR-Werten (0; 0,2; 2; 10 W/Kg), die unter- und oberhalb des Grenzwertes liegen, durchgeführt. Die Befeldung des stimulierten Vollblutes erfolgte über 28 Stunden gepulst (intermittierend: 5 min an/ 10 min aus). Mit der Expositionsdauer von 28 h sollte der gesamte Zellzyklus abgedeckt werden und auch möglichst viele Zellen in der sensiblen Teilungsphase befeldet werden. Parallel wurden Positivkontrollen mitgeführt, um die Sensitivität der Tests zu dokumentieren.

Vorgaben Endpunkte:

**CA:** 48 h Kultur der Lymphozyten, Auswertung von 1000 Metaphasen pro Proband und SAR-Wert in der 1. Mitose. Dokumentation einzelner Aberrationstypen

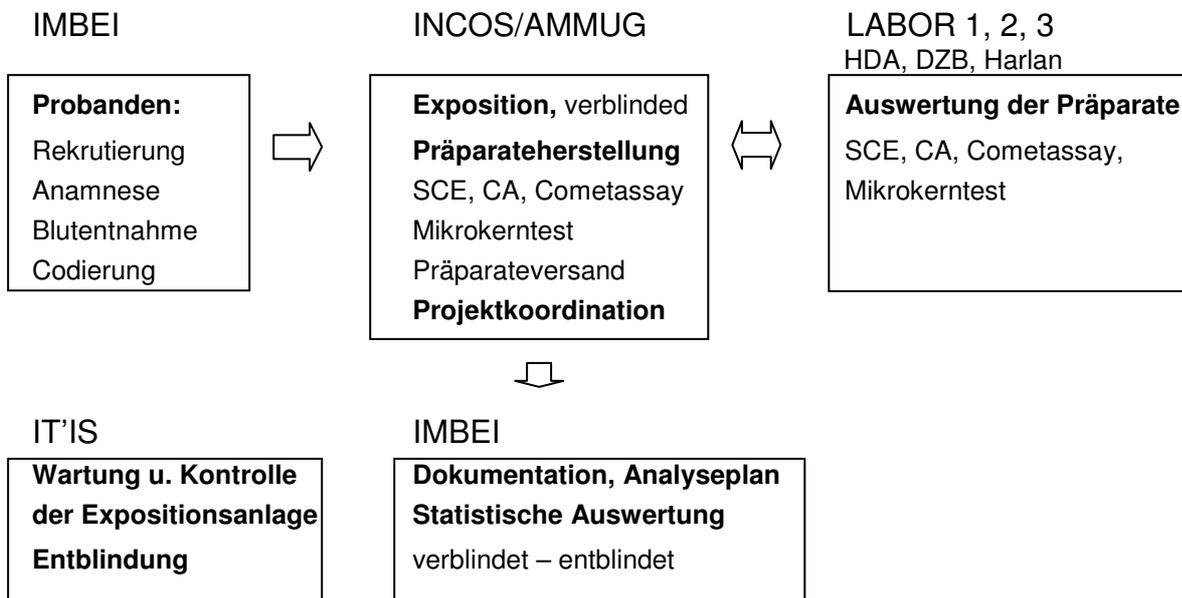
**MN:** mit Cytochalasin B, Auswertung von 2000 binucleären Zellen pro Proband und SAR-Wert.

**SCE-Test:** Durchführung nach Standardprotokoll (72h-Kultur, Bromdesoxyuridin, Färbung FPG), Auswertung von 50 Metaphasen pro Proband und SAR-Wert in der 2. Mitose.

**Comet-Assay (alkalisch):** Auswertung von 100 Zellen von 2 Objektträgern pro SAR-Wert und Proband.

Insgesamt nahmen 6 Institutionen (siehe Projektpartner) an der Studie teil.

Abbildung 3: Schema des Studiendesigns



Das IMBEI war für die Rekrutierung, die Anamnese, die Blutentnahme und die Anonymisierung der Probanden zuständig, die Fa. Incos Boté für die Exposition des Probandenblutes und die Herstellung stabiler Präparate der 4 zytogenetischen Tests sowie für die Koordination des Projektes. Die Exposition wurde über vom Steuerungscomputer aufgezeichnete Daten durch Mitarbeiter der IT'IS überwacht. Die Zuordnung der Dosen zu den entsprechenden Expositions-kammern (wave guides) erfolgte zufällig durch den Steuerungscomputer und war verblindet. Die stabilen Präparate wurden von 3 kompetenten Labors ausgewertet und die Daten zur Projektkoordination (Fa. Incos Boté) gegeben. Die Projektkoordination leitete die Rohdaten an das IMBEI weiter, das die statistische Auswertung der Daten übernahm. Die Entblindung der Daten erfolgte erst nach Erhalt der Rohdaten und einer Vorauswertung der verblindeten Daten. Für die Entblindung der Daten war IT'IS zuständig. Die Zusammenführung von Dosis und Probandennummer erfolgte durch die Projektkoordination nach der verblindeten Vorauswertung.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Probandenrekrutierung und Blutentnahme

Die Rekrutierung der Probanden sowie die Blutentnahme erfolgten durch das IMBEI (Universität Mainz). Ausgewählt wurden Schüler von 2 Gymnasien sowie am Schreibtisch arbeitende Mitarbeiter der Universität Mainz. Ursprünglich sollten Lehrer der gleichen Schulen rekrutiert werden, es war jedoch keiner der Lehrer bereit

sich für diese Studie Blut abnehmen zu lassen. Beide Gruppen sollten möglichst homogen und beruflich keinen Schadstoffen ausgesetzt sein.

Die Blutentnahme erfolgte mit 3 heparinisierten 10-ml-Monovetten und einer 5-ml-Monovette.

Nach der Blutentnahme wurden die Positivkontrollen für den CA-Test und den Mikrokerntest mit 2 Gy bestrahlt (Cs 137). Danach erfolgte die Kultivierung des Blutes.

Dabei wurden 24 ml Blut für die Befeldung mit folgenden sterilen Lösungen auf 240 ml aufgefüllt (unter sterilen Bedingungen):

24,0 ml FBS (fötales Kälberserum)

2,4 ml Penicillin/Streptomycin (Pen. 10.000 units/ml; Strep. 10 mg/ml)

9,6 ml Amphotericin (250 µg/ml)

180,0 ml RPMI 1640 Medium mit stabilem Glutamin

zu diesen 240 ml Suspension wurden 4,8 ml PHA (Phytohemagglutinin; 2,4 mg/ml) gegeben.

Entsprechend erfolgte die Verdünnung der bestrahlten 5 ml Blut für die Positivkontrollen.

Mit der unbestrahlten Blutkultur wurden 72 (3,5 cm Durchmesser, 3ml) Petrischalen für die Befeldung gefüllt sowie 8 Petrischalen für die Positivkontrollen des SCE-Tests und des Cometassays.

Mit der bestrahlten Blutkultur wurden Petrischalen für die Positivkontrollen des CA-Tests und des MN-Tests vorbereitet.

Die Positivkontrollen wurden in einem separaten Brutschrank inkubiert, die anderen Schälchen in der Befeldungsanlage. Die Befeldung erfolgte nach 20 h, also nach der Stimulation der Lymphozyten durch Phytohemagglutinin. Die Dauer der Befeldung betrug 28 h. Nach 46 –52 h Inkubation mit PHA erfolgt in der Regel die erste Mitose der meisten Lymphozyten, die zweite Mitosewelle ca. 24 h später.

## **2.2 Studienpopulation**

Bei insgesamt 13 jungen Männern zwischen 16 und 17 Jahren und bei 10 Männern zwischen 50 und 60 Jahren kam es zu einer Blutabnahme. Von einem jungen Probanden wurden die Proben aufgrund von Pilzbefall bei Befeldung verworfen bei zwei andern Probanden konnten die Proben aufgrund von Gerätedefekten nicht verwertet werden.

Somit wurden insgesamt die Blutproben von 20 Probanden befeldet, jeweils 10 aus einer Altersgruppe.

Die folgenden Daten beziehen sich auf den Analysedatensatz mit den 20 Probanden.

Die Probanden mussten neben der Einverständniserklärung noch einen Fragebogen mit über 30 Fragen zum Alter, Beruf, gesundheitlicher Zustand, sowie Fragen zum Alkoholkonsum und zur Mobilfunkexposition ausfüllen.

In den Tabelle 4 und 5 sind die Personenbezogenen Daten der Probanden dargestellt.

Tabelle 4: Personenbezogene Daten der jüngeren Probanden (n=10)

<b>Alter bei Blutabnahme</b>	Mittelwert $\pm$ STD (Min - Max)	18.01 $\pm$ 0.76 (16.56 – 19.38)
<b>Körpergröße</b>	Mittelwert $\pm$ STD (Min - Max)	183.40 $\pm$ 7.04 (172 – 197)
<b>Gewicht</b>	Mittelwert $\pm$ STD (Min - Max)	75.20 $\pm$ 11.97 (60 - 99)
<b>Seit der Geburt in Deutschland</b>	Ja (Anzahl)	10
<b>Gesundheitszustand</b>	Sehr gut (Anzahl)	4
	gut (Anzahl)	6
	zufrieden	0
<b>Herz- und Kreislauferkrankungen</b>	Ja (Anzahl)	0
<b>Diabetes</b>	Ja (Anzahl)	0
<b>Letztes Röntgen</b>	Im letzten halben Jahr (Anzahl)	1
	Vor 6 – 12 Monaten (Anzahl)	2
	Vor mehr als einem Jahr (Anzahl)	6
	Noch nie geröntgt (Anzahl)	1
<b>Sport treiben</b>	Ja (Anzahl)	8
<b>Alkoholkonsum</b>	Weniger als 1 mal pro Woche (Anzahl)	3
	1- 2 mal pro Woche (Anzahl)	4
	Mehrmals pro Woche (Anzahl)	1
	Keine Angabe (Anzahl)	2
<b>Telefonieren</b>	Täglich < 15 Min (Anzahl)	3
	Mehrmals pro Woche (Anzahl)	6
	Seltener (Anzahl)	1
<b>Wohnen Nähe eines Sendemasten</b>	Ja (Anzahl)	1
	Nein (Anzahl)	4
	Weiß nicht (Anzahl)	5

Tabelle 5: Personenbezogene Daten der älteren Probanden (n=10)

<b>Alter bei Blutabnahme</b>	Mittelwert $\pm$ STD (Min - Max)	56.39 $\pm$ 4.53 (50.50 – 64.30)
<b>Körpergröße</b>	Mittelwert $\pm$ STD (Min - Max)	179.40 $\pm$ 7.90 (170 – 192)
<b>Gewicht</b>	Mittelwert $\pm$ STD (Min - Max)	81.40 $\pm$ 11.68 (65 - 99)
<b>Seit der Geburt in Deutschland</b>	Ja (Anzahl)	9
<b>Gesundheitszustand</b>	Sehr gut (Anzahl)	2
	gut (Anzahl)	6
	zufrieden (Anzahl)	2
<b>Herz- und Kreislauferkrankungen</b>	Ja (Anzahl)	3
<b>Diabetes</b>	Ja (Anzahl)	1

<b>Letztes Röntgen</b>	im letzten halben Jahr	0
	Vor 6 – 12 Monaten (Anzahl)	2
	Vor mehr als einem Jahr (Anzahl)	7
	Noch nie geröntgt (Anzahl)	1
<b>Sport treiben</b>	Ja (Anzahl)	4
<b>Alkoholkonsum</b>	Weniger als 1 mal pro Woche (Anzahl)	2
	1- 2 mal pro Woche (Anzahl)	4
	Mehrmals pro Woche (Anzahl)	2
	Keine Angabe (Anzahl)	2
<b>Telefonieren</b>	Täglich bis 1 Std	1
	Täglich < 15 Min (Anzahl)	2
	Mehrmals pro Woche (Anzahl)	3
	Seltener (Anzahl)	3
	Keine Angabe (Anzahl)	1
<b>Wohnen Nähe eines Sendemasten</b>	Ja (Anzahl)	2
	Nein (Anzahl)	5
	Weiß nicht (Anzahl)	3

Beide Altersgruppen unterscheiden sich im Bezug auf die Größe und das Gewicht nicht wesentlich voneinander. Jüngere Probanden sind im Schnitt etwas größer als ältere und wieder durchschnittlich etwas leichter.

Bis auf einen älteren Probanden gaben die Probanden an seit Ihrer Geburt in Deutschland zu leben. Es gibt 3 Probanden, die an einer Herz- und Kreislauferkrankung leiden, dieses waren Probanden aus der älteren Gruppe. Ein älterer Proband leidet an Diabetes, ein jüngerer Proband an Heuschnupfen. Jeweils 1 älterer Proband gab an früher einmal eine schwere infektiöse Reaktion, bzw. Salmonellen gehabt zu haben. Zwei jüngere und zwei ältere Probanden hatten schon einmal eine ansteckende Krankheit, worunter hier allerdings nur Kinderkrankheiten wie Windpocken zu finden waren.

Zwei der älteren Probanden gaben an, an einer Krebserkrankung zu leiden. Ein Proband gab an 2003 an Speiseröhrenkrebs erkrankt zu sein, der Andere sagte, dass er an Hautkrebs in einem minimalen Stadium leidet. Die Diagnose ist vom Jahre 2000 und bezieht sich auf ein „Melanoma in situ“. Da beide Erkrankungen 5 Jahre zurücklagen, konnten die besagten Probanden an der Studie teilnehmen.

Bei drei älteren Probanden, sowie bei einem jüngeren, wurden Impfungen zwischen Oktober 2006 und Oktober 2008 durchgeführt. Dies bezog sich dreimal auf eine Grippeimpfung sowie einmal auf eine Tetanusimpfung.

Zur sportlichen Aktivität ist zu sagen, dass mehr als die Hälfte aller Probanden angaben Sport zu treiben. Darunter war ein jüngerer Proband, der angab Leistungssportler zu sein.

Eine Frage bezog sich auf die Röntgenexposition.

Bis auf zwei Probanden wurden alle schon einmal geröntgt. Ein Proband verneinte die Frage nach der Röntgenexposition, gab allerdings unter der Frage nach dem Zeitpunkt des letzten Röntgens an, vor mehr als einem Jahr geröntgt worden zu sein.

Bei der Frage nach dem Alkoholkonsum gaben bis auf 4 Probanden (2 jüngere und 2 ältere) alle an Alkohol zu trinken. Unter der älteren Gruppe gibt es zwei, die täglich Alkohol trinken.

Zur Frage, ob geraucht wird, gab 1 älterer Proband an, dass er gelegentlich raucht. Alle Probanden gaben an, schon einmal gelegentlich mehr als 6 Monate geraucht zu haben. 6 von den 10 älteren Probanden hatten früher sogar regelmäßig geraucht.

Zur Frage nach der Mobilfunk-Exposition gab nur 1 älterer Proband an kein Handy zu besitzen.

Zur Frage, ob die Probanden in der Nähe eines Mobilfunkturms wohnen, antworteten insgesamt 3 mit ja, 9 mit nein und 8 Probanden wussten es nicht genau.

## **2.3 Exposition**

Die Exposition erfolgte in einer speziell für dieses Projekt gebauten Befeldungsanlage (siehe 6.3) der Fa. ITIS (Zürich). Das GSM-Signal hatte eine Frequenz von 1800 MHz und es wurde intermittierend (5 min an, 10 min aus) befeldet. Die Zugabe von Substanzen während der Exposition erfolgte in den Phasen, in denen die Befeldung aus war. Diese Expositionsanlage verfügt über 8 Kammern in denen jeweils ein Ständer mit 9 Petrischalen (3,5 cm Durchmesser, 3 ml Blutlösung) exponiert werden kann. Die Exposition erfolgte pro Experiment mit 4 verschiedenen Dosen (SAR-Werte 0; 0,2; 2 und 10 W/Kg). Dabei wurden die Schälchen von je 2 Kammern mit der gleichen Dosis befeldet. Insgesamt konnten 18 Petrischalen pro Dosis befeldet werden. Für die 3 Labore wurden Präparate aus unterschiedlichen Petrischalen hergestellt. Die Expositionsdauer betrug 28 h.

## **2.4 Methoden**

### **2.4.1 Chromosomenaberrationstest**

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 50% 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, so dass in der Regel ein Test nach 48 h PHA und nach 50 h PHA-Inkubation mit den gleichen Proben durchgeführt wurde. Die Colcemidinkubation dauerte 2-3 h.

#### Testdurchführung:

Die Zellen wurden nach der Befeldung resuspendiert und das Blut je Dosis und Zeit in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert. Die Zentrifugation erfolgte bei 300 g (10

min). Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgesaugt, das Pellet resuspendiert und tropfenweise 9 ml hypotone Lösung bei gleichzeitigem Vortexen der Suspension zugegeben.

Es erfolgte eine erneute Zentrifugation und die tropfenweise Zugabe von 9 ml Fixativ. Der Fixiervorgang wurde wiederholt und der Überstand bis auf 0,5-1 ml abgesaugt. Danach erfolgte das Auftragen der Zellsuspension auf mit Wasser beschichtete Objektträger mit der Pipette (ca. 30 µl) sowie die Trocknung der Präparate für 24 h. Die Präparate wurden anschließend mit Giemsa (5 % in Weisepuffer pH= 7,2, 10 min) gefärbt und mit Weisepuffer gespült.

#### Lösungen:

hypotone Lösung: 0,075 M KCl, 37 °C

Fixativ: Methanol: Eisessig 3 + 1, -20 °C

Weisepuffer: Puffertabletten (1 St./l) : NaHPO<sub>4</sub> 2 H<sub>2</sub>O 0,63 g/l; KHPO<sub>4</sub> 0,31 g/l

Die Auswertung erfolgte nach den Vorgaben der WHO Guidelines. Aberrationen wurden als chromosomal (beide Chromatiden an der Aberration beteiligt) oder Chromatidtyp (nur ein Chromatid an der Aberration beteiligt) klassifiziert. Als Chromosomen Aberration wurden dizentrische und polyzentrische Chromosomen, zentrische Ringe, azentrische Fragmente (inklusive azentrische Ringe), extra-azentrische Fragmente (Anzahl der azentrischen Fragmente minus der Anzahl der dizentrischen Chromosome) und Chromatidtyp Aberrationen erfasst. Polyzentrische Chromosomen wurden als n-1 dizentrische detektiert. Diese typischen Varianten der Chromosomen Aberration können leicht durch die lichtmikroskopische Auswertung von Giemsa gefärbten Präparaten ermittelt werden.

Pro Dosis wurden 1000 Metaphasen in der ersten Mitose auf Aberrationen untersucht.

#### **2.4.2 Mikrokerntest**

2 Stunden vor dem Ende der Exposition erfolgte die Zugabe von 1,5 µl Cytochalasin B-Lösung (10 mg/ml) in die Schälchen (3 ml Blut). Cytochalasin B verhindert die Zytokinese der Zelle, so dass nach der Zellteilung eine doppelkernige Zelle bleibt. Diese binuklearen Zellen werden für die Auswertung herangezogen. Einen Tag nach dem Ende der Exposition (insgesamt 72 h nach Kulturbeginn) wurden die Zellen einer jeden Dosis (6 Schälchen pro Dosis) in je 2 15 ml-Zentrifugenröhrchen gegeben.

#### Testdurchführung:

Das Blut wurde resuspendiert, bei 300 g 10 min zentrifugiert und der Überstand bis auf 2 ml abgesaugt. Danach erfolgte die tropfenweise Zugabe von 8 ml hypotoner

Lösung bei gleichzeitigem Vortexen. Die Suspension wurde bei 300 g 5 min zentrifugiert, der Überstand bis auf 2 ml abgesaugt und 8 ml Mischlösung bei gleichzeitigem Vortexen langsam hinzugegeben. Anschließend inkubierte die Suspension für 15 min bei Raumtemperatur. Die Zellsuspension wurde bei 300 g 5 min zentrifugiert, der Überstand bis auf 2 ml abgesaugt und tropfenweise 8 ml Fixativ bei gleichzeitigem Vortexen langsam hinzugegeben. Diese Fixierung wurde wiederholt, der Überstand bis auf 1,5 –2 ml abgesaugt. Danach erfolgte das Auftragen der Zellsuspension auf mit Wasser beschichtete Objektträger mit der Pipette (ca. 50 µl) sowie die Trocknung der Präparate für 24 h. Die Präparate wurden anschließend mit May-Grünwald-Lösung für 5 min und mit Giemsa (5 % in Weisepuffer pH= 7,2, 10 min) gefärbt und mit Weisepuffer gespült.

#### Lösungen:

hypotone Lösung: 0,075 M KCl, 37 °C

Fixativ: Methanol: Eisessig 4 + 1, -20 °C

Mischlösung: Fixativ + 0,9% Na Cl-Lösung, 1 + 1

Die Auswertung der Präparate erfolgte nach Fenech et al. (2003). Der CBPI (Cytochalasin Block Proliferation Index) ist definiert als  $[M_1 + 2M_2 + 3(M_3+M_4)]/N$ , wobei  $M_1$  bis  $M_4$  für Zellen mit 1-4 Mikrokernen stehen und N die gesamte Anzahl der untersuchten Zellen angibt. Pro Dosis wurden 2000 binukleare Zellen auf Mikrokern untersucht.

#### **2.4.3 Cometassay**

Nach der Exposition wurden die Zellen resuspendiert und 40 µl Zellsuspension in 180 µl LM-Agarose (37 °C) pipettiert. Die Agarose-Zellsuspension (100µl) wurde auf gekühlte mit NM-Agarose beschichtete Objektträger gegeben und anschließend nochmal mit 100 µl LM-Agarose beschichtet. Die Zellen wurden danach in einer Lyselösung ( 0,01 M Tris, 0,1 M Na<sub>2</sub>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 Na<sub>2</sub>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, in dem sie 3 x 5 min mit Neutralisationspuffer beschichtet wurden. Anschließend erfolgte die Trocknung der Präparate in Äthanol für mindestens 20 min.

Die haltbaren Präparate wurden den 3 Labors zur Auswertung gesendet.

Der Vitalitätstest 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.

Ausgewertet wurden die stabilen Präparate des Cometassays mit verschiedenen Bildanalyse-Systemen (s. S 32). Insgesamt wurden 100 Zellkerne pro Dosis und Labor nach Färbung mit Ethidiumbromid vermessen.

#### **2.4.4 Schwesterchromatidaustausche (SCE-Test)**

Schwesterchromatidaustausche sollten in der 2. Mitose untersucht werden. Die Zellen wurden daher nach der Exposition noch 24 h im Brutschrank inkubiert. Pro Dosis wurden 4 Schälchen á 3 ml Blutlösung (siehe 2.1, + 45 µl BrdU /Schale, BrdU: 1mg/ml) exponiert. Als Positivkontrolle wurde Mitomycin C (0,008 µg/ml) verwendet. Nach ca. 48 h wurden 15 µl BrdU-Lösung zudosiert.

Zu Beginn der 2. Mitosewelle (70h nach Stimulation) der Lymphozyten erfolgte die Zugabe von Colcemid (0,2 mg/ml). Zunächst zu je 2 Schälchen einer jeden Dosis, 2 h später zu den restlichen Schälchen. Die befeldeten Blutsuspensionen wurden entsprechend zeitversetzt wie folgt bearbeitet:

Die Zellsuspensionen der einzelnen Dosen wurden in je 2 15-ml-Zentrifugenröhrchen (je Mitosezeitpunkt ein Röhrchen) überführt und bei 300 g für 10 min zentrifugiert. Die Zentrifugenröhrchen waren mit Klebeband umwickelt, so dass die Präparation der Zellen im Dunkeln stattfand. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgesaugt und 9 ml hypotone Lösung unter Vortexen tropfenweise zum Pellet hinzugefügt. Danach erfolgte erneut eine Zentrifugation (300 g, 10 min). Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgesaugt und 9 ml Fixativ (4 °C) tropfenweise unter Vortexen zum Pellet pipettiert. Dieser Vorgang wurde nochmals wiederholt und der verbleibende 1ml Zellsuspension bis zur Weiterverarbeitung bei –20 °C aufbewahrt.

Die Metaphasen wurden auf mit A. dest. beschichtete Objektträger mit der Pipette (30-40 µl) aufgebracht. Anschließend erfolgte eine Färbung der Präparate in Bisbenzimid-Lösung (5 µg/ml) für eine Stunde (dunkel). Bei 60 °C in 2xSSC wurden die Präparate inkubiert und danach mit Weise-Puffer B überschichtet und für 90 min mit UVC bestrahlt. Im Anschluß daran erfolgte eine Färbung mit Giemsa (5 % in Weisepuffer A pH= 7,2) für 10 min.

Es erfolgte die Auswertung von 50 Metaphasen in der 2. Mitose. Jeder Farbwechsel auf den Chromatiden wurde als Austausch gezählt – ausgenommen waren Farbwechsel die direkt am Centromer zu sehen waren, da hier auch eine Drehung der Chromatiden vorliegen konnte.

#### **2.4.5 Pretests**

Vor Beginn der eigentlichen Studie wurden für jeden Test die Zielvariablen und die Auswertekriterien festgelegt. Um die Umsetzung in den Laboren zu überprüfen erfolgten Vorversuche mit ionisierender Strahlung (Caesium 137). Die Präparate wurden ohne Angabe der Dosis ausgewertet.

## Chromosomenaberrationstest:

Tabelle 6: Ergebnisse der Summe der Aberrationen der 3 auswertenden Labors im Vergleich.

<b>Dosis (Gy)</b>	<b>Labor 1 % Zellen mit CAs</b>	<b>Labor 2 % Zellen mit CAs</b>	<b>Labor 3 % Zellen mit CAs</b>
0	4,5	2,5	1,5
2	67,5	46,5	49,5
4	73	57,5	87,5
6	97,5	100	100

Tabelle 7: Chromosomenaberrationen - Mittelwerte und Standardabweichungen.

<b>Dosis (Gy)</b>	<b>Mittelwert d. Labors % Zellen mit CAs</b>	<b>Standardabw. % Zellen mit CAs</b>
0	2,8	1,5
2	54,5	11,3
4	72,7	15,0
6	99,2	1,4

Die Ergebnisse aller Labore zeigen eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung. Insgesamt stimmen die Ergebnisse der 3 Labors gut überein. Die Standardabweichung ist nur bei den Negativkontrollen, deren Werte sehr klein sind, deutlich größer als 30 %. Bei den bestrahlten Proben liegen die Abweichungen bei 20 % und kleiner.



Abbildung 4: Metaphase mit 3 dizentrischen Chromosomen (Dic).

Tabelle 8: Die Ergebnisse des CA-Tests im Detail.

	<b>Dosis</b>	<b>Ausgew. Mitosen</b>	<b>Dic/Zelle</b>	<b>extra Ac/ Zelle</b>	<b>Ringe/ Zelle</b>	<b>Chromatidt./ Zelle</b>
<b>Labor 1</b>	0	200	0,000	0,030	0,000	0,000
	2	200	0,430	0,550	0,060	0,000
	4	200	0,630	0,615	0,100	0,005
	6	83	3,723	3,566	0,361	0,012
<b>Labor 2</b>	0	200	0,015	0,010	0,000	0,000
	2	200	0,310	0,295	0,000	0,000
	4	200	0,470	0,375	0,040	0,000
	6	200	2,015	1,320	0,095	0,000
<b>Labor 3</b>	0	200	0,000	0,015	0,000	0,000
	2	200	0,230	0,260	0,005	0,005
	4	200	0,370	0,490	0,015	0,000
	6	80	1,750	2,850	0,138	0,013

Dic: dizentrische Chromosomen extra Ac: extra azentrische Fragmente

Chromatidt.: Chromatidtyp Aberration

Die Ergebnisse der einzelnen Aberrationstypen variieren bei der höchsten Dosis etwas stärker, da hier aufgrund der vielen Aberrationen nur wenige Zellen ausgewertet wurden. Die Dosen insgesamt waren relativ hoch gewählt, da je Dosis das Blut von unterschiedlichen Probanden verwendet wurde, um die durchschnittlichen Ausbeuten an Metaphasen ermitteln zu können. Anhand dieses Pretests wurde eine Datenvorlage erstellt, die jeder Auswerter für das Projekt nutzen sollte und die einzelnen Aberrationstypen wurden mit dem auswertenden Personal noch einmal durchgesprochen. Unterschiede in der Auswertung konnten aufgrund der hohen Anzahl an Aberrationen ermittelt und minimiert werden.

### Mikrokerntest

Pro Dosis wurden 500 binukleare Zellen ausgewertet.

Tabelle 9: Die Ergebnisse des Mikrokerntests der 3 auswertenden Labore. Prozentualer Anteil von binuklearen Zellen mit Mikrokernen = % bin. MN-Zellen.

Dosis (Gy)	Labor 1 (% bin. MN-Zellen)	Labor 2 (% bin. MN-Zellen)	Labor 3 (% bin. MN-Zellen)
0	1	1,6	0,5
1	13,4	19,3	10,8
2	23,9	28,8	20,2
3	36,4	36,4	35,2

Die Ergebnisse der 3 Labore zeigen eine klare Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit und stimmen gut überein. Zwischen den Ergebnissen aller 3 Labors lassen sich nur geringfügige Abweichungen feststellen.

Abbildung 5: Binukleare Zelle mit Mikrokern.



### Schwesterchromatidaustausche (SCE-Test)

Als genotoxische Noxe wurde Mitomycin C eingesetzt. Ausgewertet wurden je Konzentration 25 zweite Metaphasen. Die Auswertung erfolgte nach gemeinsam festgelegten Kriterien. Farbwechsel am Centromer wurden bei der Auswertung zwar mit erhoben, aber nicht mitgewertet.

Tabelle 10: Ergebnisse der auswertenden Labore mit dem SCE-Test.

Konzentration MitomycinC ( $\mu\text{g/mL}$ )	Labor 1 (SCEs / Mitose)	Labor 2 (SCEs / Mitose)	Labor 3 (SCEs / Mitose)
0	4,88	3,48	2,44
0,005	10,52	5,35	9,10
0,025	15,30	10,62	14,24
0,1	21,22	-	18,00

Die Ergebnisse aller Labors zeigen eine deutliche Konzentrations-Wirkungs-Beziehung und liegen auch im gleichen Bereich.

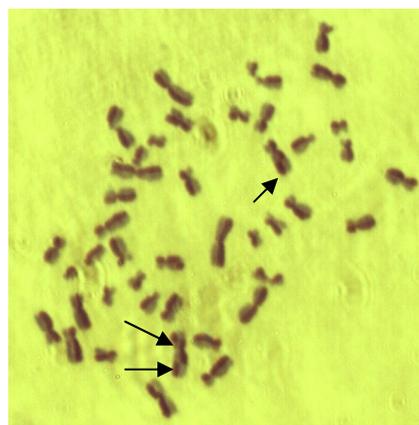


Abbildung 6: Metaphase mit Schwesterchromatidaustauschen.

## Cometassay

Bei der Auswertung des Cometassay kamen verschiedene Bildanalysen bzw. Auswerteprogramme zum Einsatz. Das Labor 1 verwendet das Analysesystem Komet 4.0 und das Labor 3 das System Komet 6.0 GLP von Kinetik Imaging. Das Labor 2 wertete die Präparate mit dem System „casp“ aus, das als Freeware erhältlich ist. (<http://casp.sourceforge.net/index.php>)  
Pro Dosis wurden 50 Zellen bzw. Nuklei von je 2 OTs ausgewertet.

Die Ergebnisse der 3 Labors, den Endpunkt % DNA im Kometenschweif betreffend, verlaufen parallel. Es konnte eine deutliche Dosis-Wirkungs-Beziehung ermittelt werden. Alle 3 Labors erzielten einen deutlichen Effekt bei 1 Gray (Gy).

Tabelle 11: Cometassay - Dosis-Wirkungs-Beziehungen in Zahlen.

Labor	% DNA im Schweif (% tail DNA)				
	NK	1 Gy	2 Gy	5 Gy	10 Gy
Labor 1	7,99	13,96	17,47	34,96	50,80
Labor 2	0,05	15,91	20,25	42,85	55,42
Labor 3	5,55	13,99	15,74	32,55	51,90
Mittelwert	4,53	14,62	17,82	36,79	52,71
Standardabweichung	3,32	0,91	1,86	4,40	1,97

Die Tabelle 11 zeigt, dass die Dosis-Wirkungs-Beziehungen der 3 Labors nicht nur parallel verlaufen, sondern die ermittelten Werte auch im gleichen Bereich liegen. Anders sieht es bei den Werten aus, die gemessen wurden und keine relativen Werte darstellen (keine % Angaben).

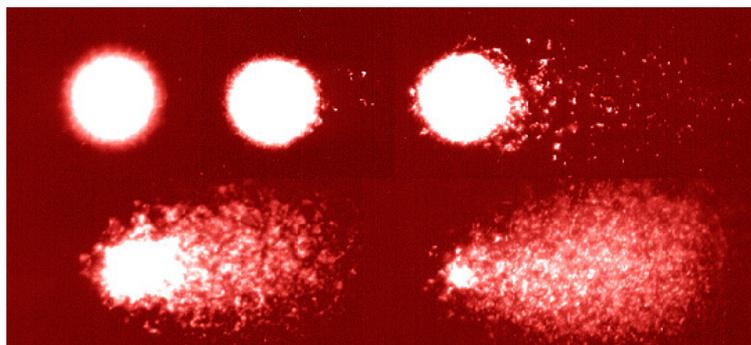
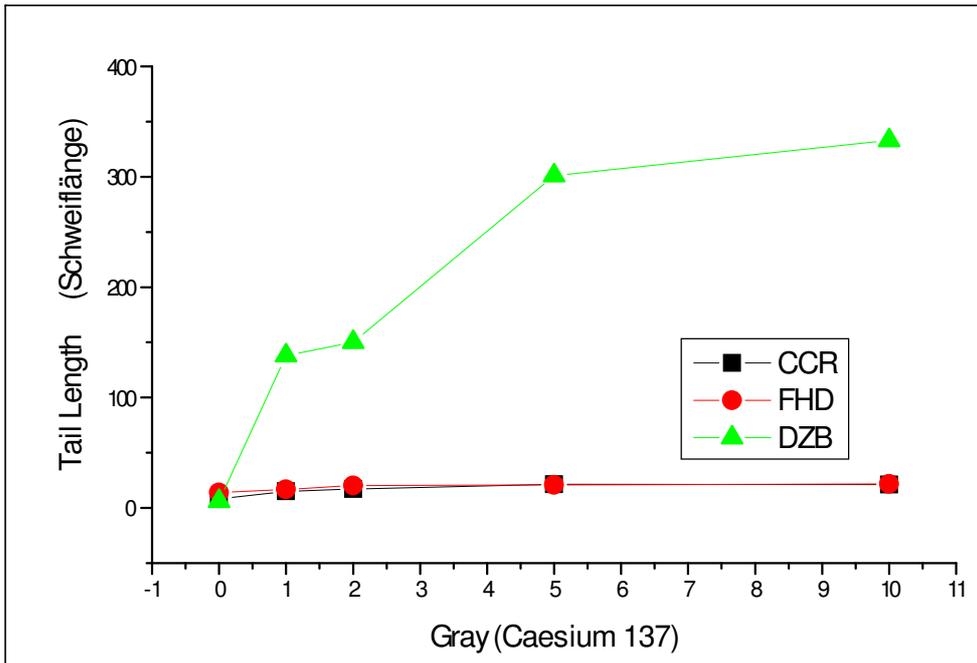


Abbildung 7: Zellkerne mit zunehmendem Schädigungsgrad im Cometassay.



FHD: Labor 1; DZB: Labor 2; CCR: Labor 3

Abbildung 8: Schweiflänge – Dosis-Wirkungsbeziehungen der 3 Labore

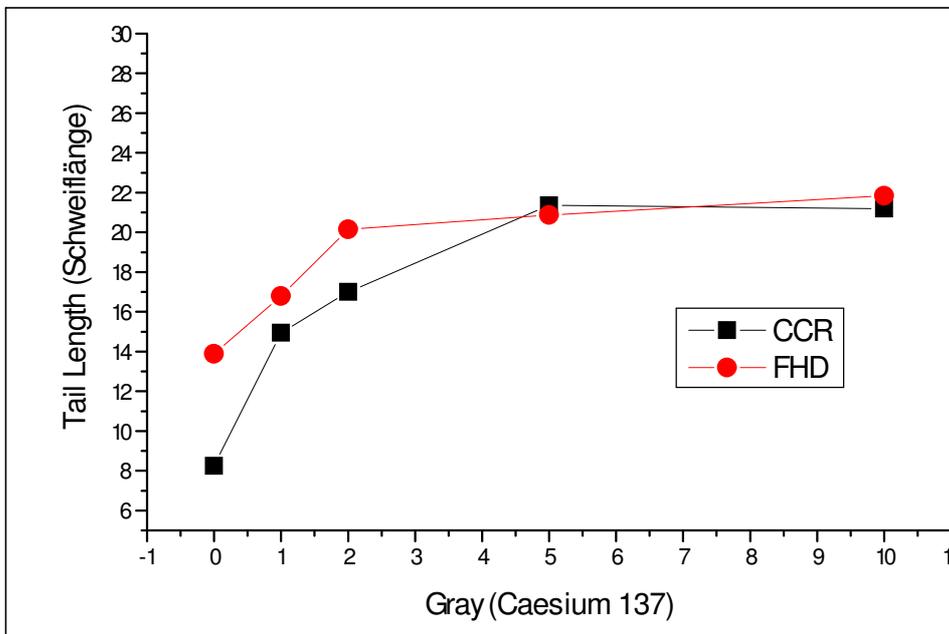


Abbildung 9: Schweiflänge – Dosis-Wirkungsbeziehungen der 2 Labore.

Hier sind deutliche Unterschiede zwischen den Laboren zu erkennen (Abbildung 8). Labor 2 wertet mit einem anderen System aus als die Labore 1 und 3. Des Weiteren wertete Labor 2 die Präparate mit einem Objektiv mit 63 facher Vergrößerung aus, die anderen Labors hingegen nur mit 40 facher Vergrößerung. Insgesamt war Labor

2 mit dieser Auswertung bei den gemessenen Werten deutlich empfindlicher als die Labore 1 und 3. Um hier einheitlichere Ergebnisse zu erlangen wurde für die eigentliche Studie auch in Labor 2 ein Objektiv mit 40 facher Vergrößerung verwendet. Dies entspricht dem beim Cometassay verwendeten Standard.

## 2.5 Statistische Analyse, Strategie

Vor der Entblindung der Daten wurde in Absprache mit allen Projektpartnern ein Analyseplan (Anlage 5.2) erstellt, in dem die statistischen Tests und zu ermittelnden Parameter für jeden cytogenetischen Test festgelegt wurden sowie die Wertung von signifikanten Ergebnissen. Die Daten wurden auf Vollständigkeit und Plausibilität überprüft. Es erfolgte auch die Prüfung von Verteilungsannahmen vor der Entblindung.

Die Hauptfragestellung: Besteht ein Befeldungseffekt ?. Innerhalb eines jeden Probanden sind dazu Messergebnisse aus 4 Dosisgruppen und 4 Testsystemen zu berücksichtigen. Dazu wurde primär ein statistischer Test auf Trend durchgeführt. Anschließend wurden Effektschätzer für jede der 4 Dosisgruppen und für paarweise Differenzen zwischen Dosisgruppen mit 95%-Konfidenzintervallen präsentiert. Daneben wurde der Kontrast zwischen Negativ- und Positiv-Kontrolle – ebenfalls als Effektschätzung mit 95%-Konfidenzintervallen – 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 dem Abstand zwischen Negativ- und Positiv-Kontrolle einfließen.

Für die Interpretation von (lokal) signifikanten Befunden wurden folgende Regeln vorgesehen:

- a) Jeder signifikant steigende Dosistrend generiert einen Verdacht auf einen Befeldungseffekt.
- b) Für die Variablen eines Assays innerhalb eines Labors wird zum globalen Niveau 0.05 getestet. Wenn ein solcher Test für zwei Labore signifikant ist, soll ein ernster Verdacht begründet sein.
- c) Wenn einer der unter b genannten Tests in zwei Laboren zum lokalen Niveau von 0,0125 signifikant ist, gilt ein Befeldungseffekt als bestätigt.

Weitere Details des Analyseplans sind der Anlage 6.2 zu entnehmen.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Datensichtung

Die Daten wurden auf fehlende Werte und Ausreißer untersucht.

#### 3.1.1 Fehlende Werte

Es wurde das Blut von 20 Probanden untersucht, es fanden 5 Expositionen statt und es wurden Präparate für 3 Labore hergestellt. Damit müssten pro Variable jeweils 300 Werte existieren.

Letzteres war bei zwei Variablen nicht der Fall. Bei der Variable CoA\_ext\_tailmom (Extent Tailmoment, Cometassay) fehlten von den 300 insgesamt 97 Werte. Die fehlenden Werte im Cometassay beruhten auf unterschiedlichen Auswertesystemen der Labore. Labor 3 verfügt über ein Analysesystem, das nur die Parameter Olive-Tailmoment und % DNA im Kopfbereich angibt. Die fehlenden Werte kamen bei dieser Variable zu 100 % aus Labor 3. Auch beim Mikrokerntest fehlten 96 von 300 Werten (zu 95% Labor 1). Hier wurden die Mitosen nicht angegeben, die Zielvariablen und der CBPI waren jedoch vorhanden.

Fehlende Werte in den Zielvariablen:

Bei den Zielvariablen vom Schwesterchromatidaustausch, vom Mikrokerntest, der Chromosomenaberration und des Cometassays gab es keinerlei fehlende Werte.

#### 3.1.2 Ausreißer und auffällige Werte

Vor der Entblindung wurden die Daten auf Ausreißer und andere auffällige Werte getrennt nach den Laboren überprüft.

Beim Betrachten der Daten in Bezug auf die drei verschiedenen Labore gab es bei folgenden Probanden und Laboren folgende Auffälligkeiten in den Daten zu erkennen:

##### a) Chromosomenaberration:

*Variable Dizentrische Chromosomen:* Keine Auffälligkeiten

*Variable Extra azentrische Chromosomen:* Keine Auffälligkeiten

*Variable Chromatidtyp:* Bei Labor 2 bei allen Probanden fast nur Nullen

*Variable Ringe:* Keine Auffälligkeiten in den Daten

*Variable Summe aus geschädigten Chromosomen:* Keine Auffälligkeiten in den Daten

##### b) Mikrokerntest:

*Variable Mikrokerne:* Keine Auffälligkeiten in den Daten

**c) Schwesterchromatidaustausch:**

*Variable Schwesterchromatidaustausche:* Keine Auffälligkeiten in den Daten

**d) CometAssay:**

*Variable: Mediane DNA im Kopf (%):* Keine Auffälligkeiten in den Daten

*Variable Olive-Tail-Moment:* Keine Auffälligkeiten in den Daten

Bei den Zielgrößen ergaben sich also keine auffälligen Werte. Dass Labor 2 bei einer Variablen der Chromosomenaberration (Chromatidtyp Aberration ) viele Nullen gemessen hat, stellt keine Auffälligkeit dar.

In den folgenden Abbildungen sind die verschiedenen Zielvariablen der unterschiedlichen Tests jeweils in einem Diagramm dargestellt, dabei ist auf der x-Achse jeweils die Expositionsgruppe 1-5 getrennt nach den 3 Laboren dargestellt. Hierbei sind die jeweils ersten Werte von Labor 1, die jeweils zweiten Werte von Labor 2 und die dritten Werte von Labor 3 für die Expositionen 1 bis 5. Zur besseren Veranschaulichung der Werte von der Positivkontrolle werden diese in rot dargestellt. Jedes „+“ steht für den Wert der Blutprobe eines Probanden.

**Chromosomenaberrations-Test:**

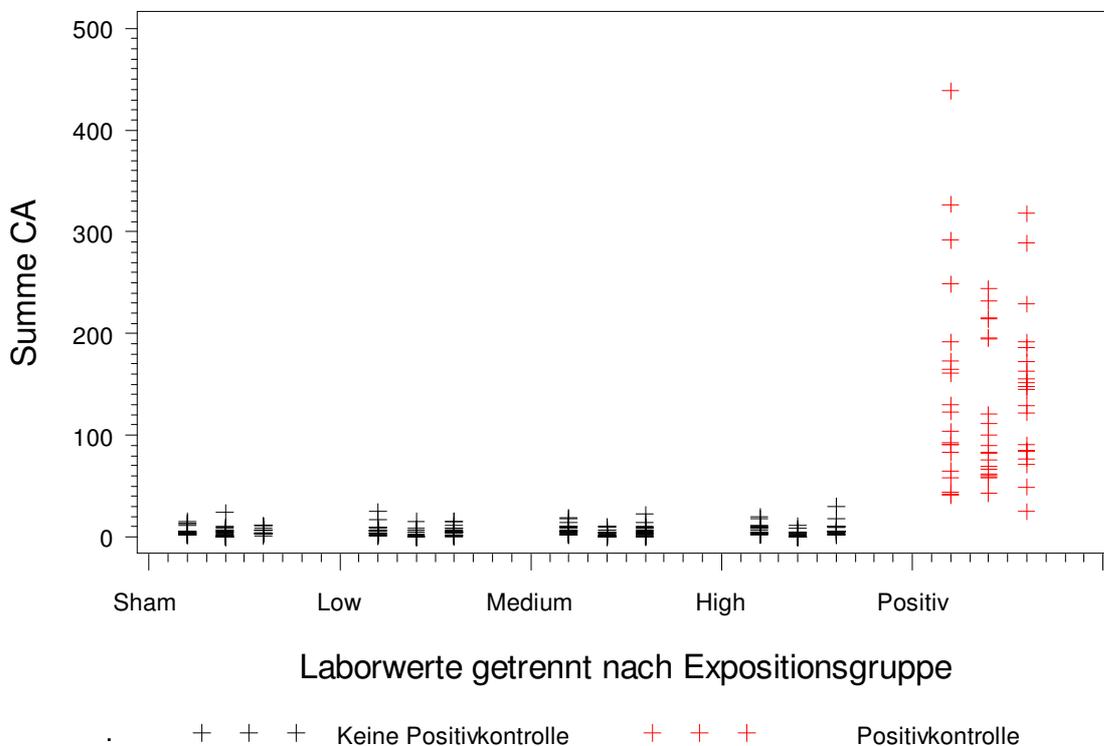


Abbildung 10: Summe geschädigter Chromosomen (Summe aus Ca\_Dic, Ca\_Chromatid, Ca\_Ringe, Ca\_extra\_Ac pro ausgewertete Mitosen) (Es sind die jeweiligen Expositionen 1 bis 5 aufgetragen, die ersten Werte innerhalb einer Exposition gehören zu Labor 1, die zweiten zu Labor 2 und die dritten zu Labor 3)

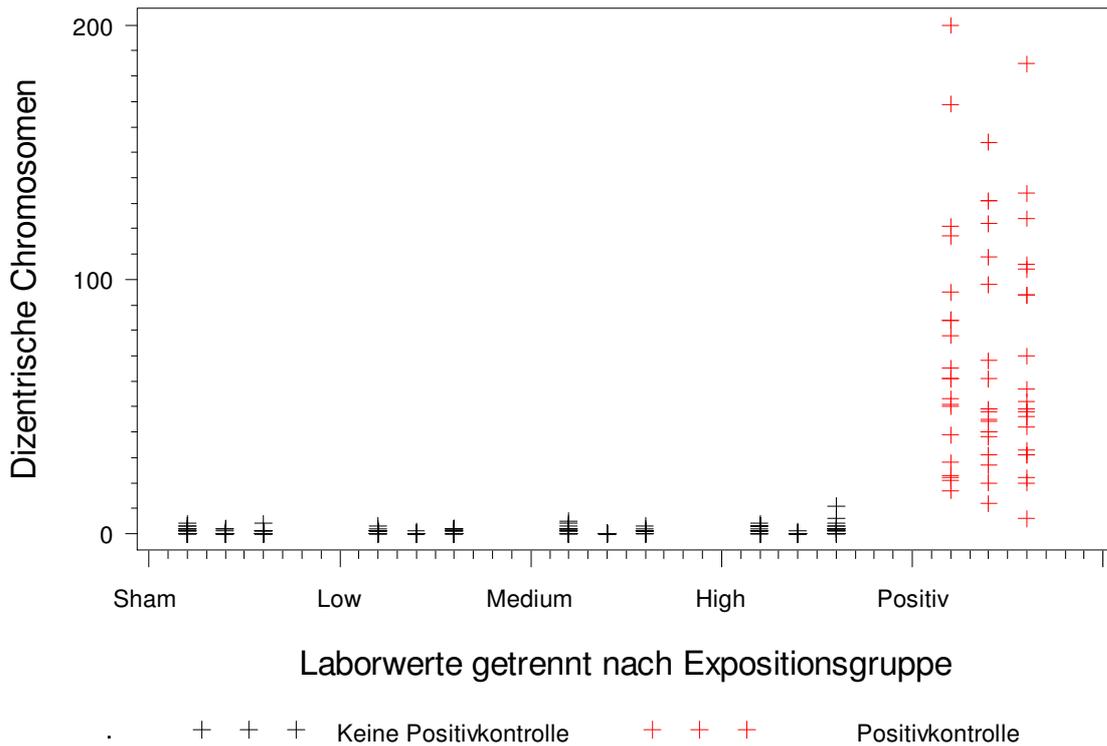


Abbildung 11: Dizentrische Chromosomen (Es sind die jeweiligen Expositionen 1 bis 5 aufgetragen, die ersten Werte innerhalb einer Exposition gehören zu Labor 1, die zweiten zu Labor 2 und die dritten zu Labor 3)

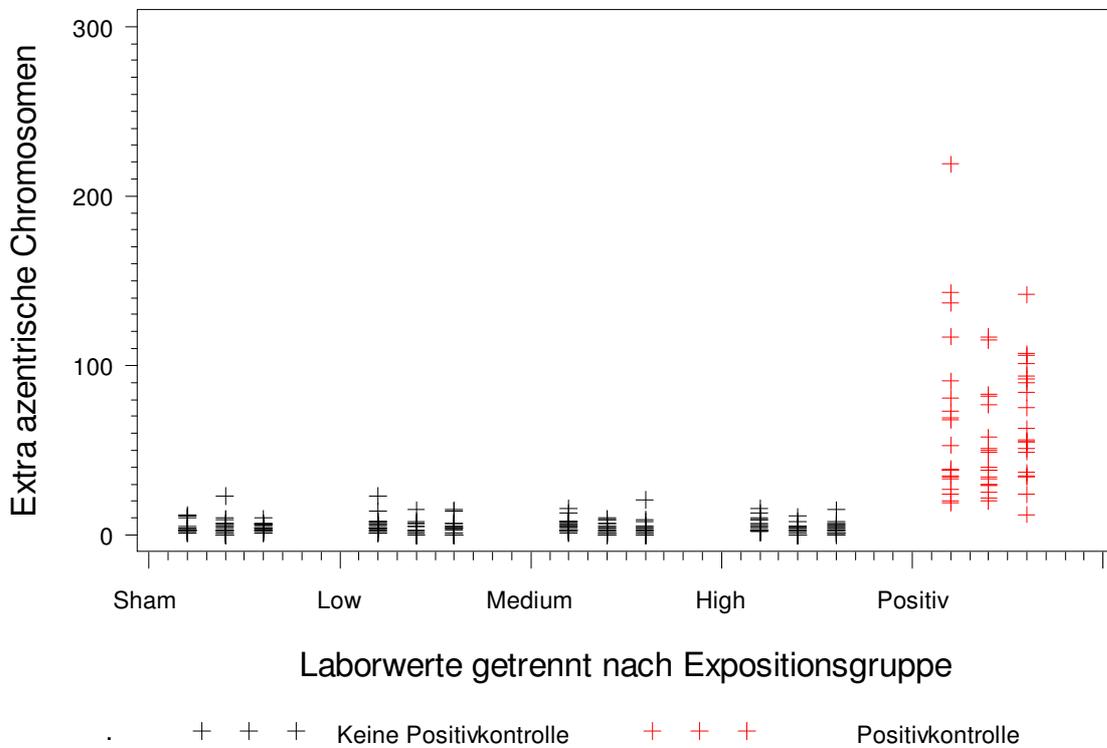


Abbildung 12: Extra azentrische Chromosomen (Es sind die jeweiligen Expositionen 1 bis 5 aufgetragen, die ersten Werte innerhalb einer Exposition gehören zu Labor 1, die zweiten zu Labor 2 und die dritten zu Labor 3)

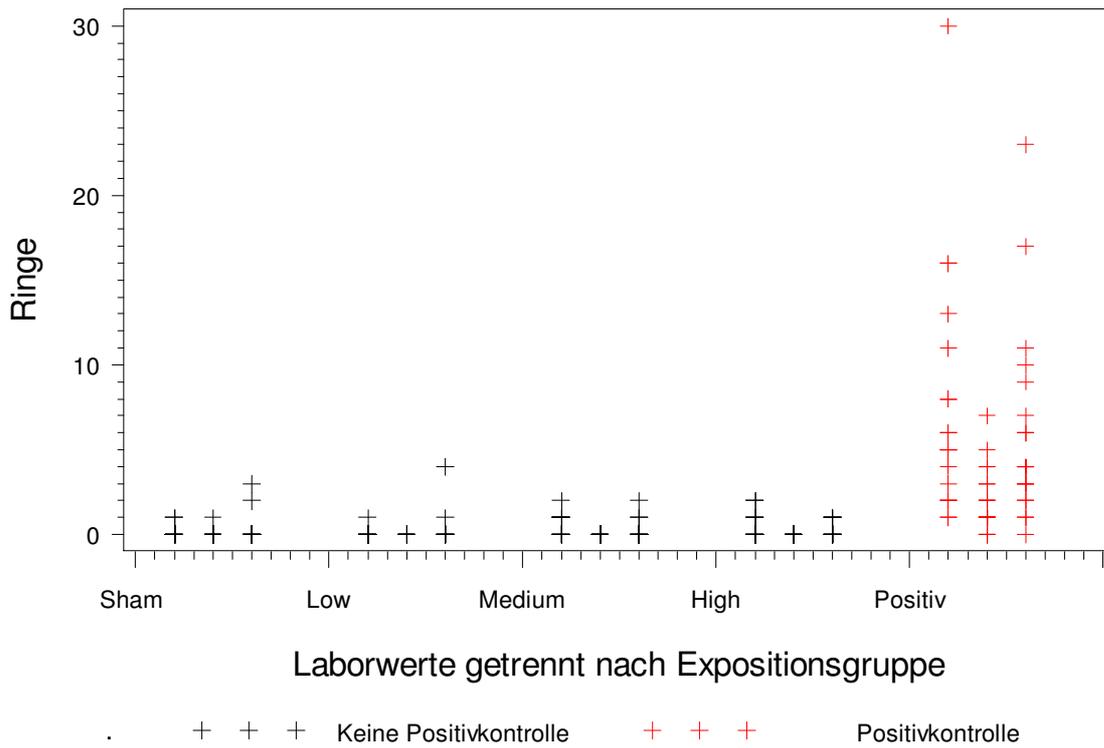


Abbildung 13: Ringe (Es sind die jeweiligen Expositionen 1 bis 5 aufgetragen, die ersten Werte innerhalb einer Exposition gehören zu Labor 1, die zweiten zu Labor 2 und die dritten zu Labor 3)

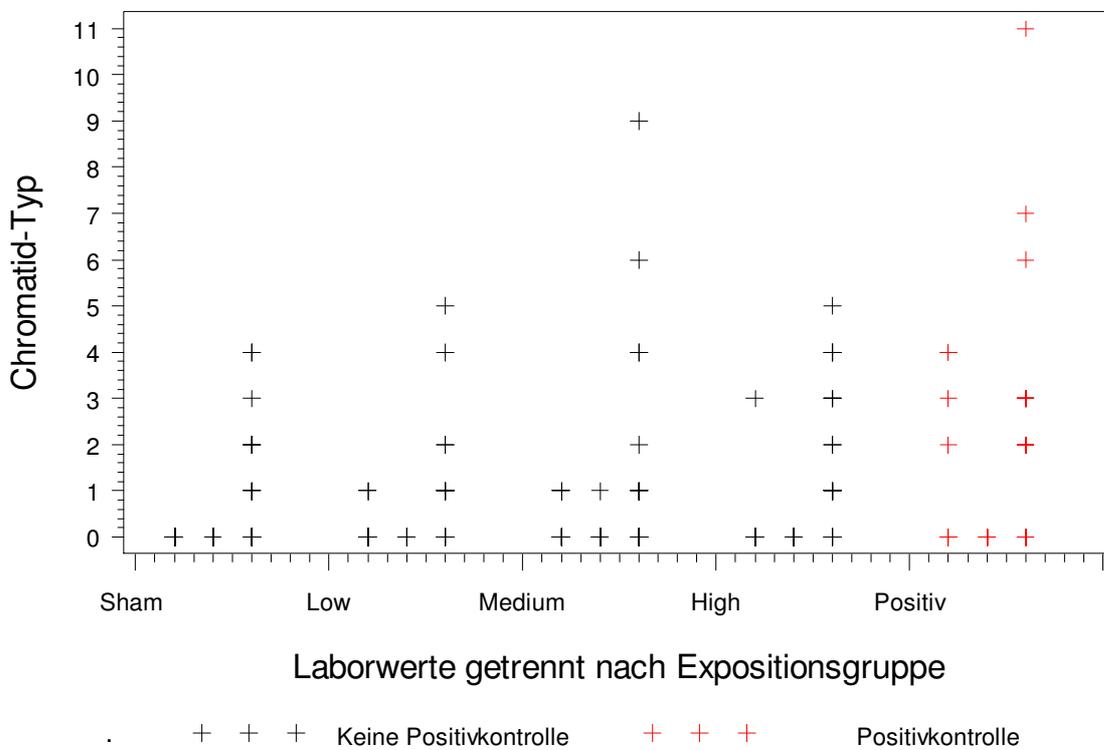


Abbildung 14: Chromatidtyp Aberration (Es sind die jeweiligen Expositionen 1 bis 5 aufgetragen, die ersten Werte innerhalb einer Exposition gehören zu Labor 1, die zweiten zu Labor 2 und die dritten zu Labor 3)

Die Abbildungen 10 bis 13 verdeutlichen, dass die Werte der 20 Probanden aller 3 Labore der einzelnen Aberrationstypen (Ringe, extra azentrische Chromosomen, dizentrische Chromosomen) sowie der Summe der Aberrationen keine Auffälligkeiten aufweisen. Die Werte der verschiedenen Expositionsgruppen (SAR-Werte) und der 3 Labore liegen dicht beieinander und zeigen keine Ausreißer. Bei den Chromatidtyp-Aberrationen (Abb.: 14) sind Unterschiede zwischen den Labors erkennbar. Labor 2 detektierte fast keine Chromatidtyp-Aberrationen (0-1) in den Expositionsgruppen (SAR-Wert: 0; 0,2; 2 10) sowie auch nicht in der Positivkontrolle, während die anderen beiden Labors Anzahlen von 0-3 bzw. von 0-9 in den Expositionsgruppen (SAR-Werte) auszählten sowie 0-4 und 0-11 in der Positivkontrolle. Grundsätzlich ist in der Positivkontrolle nicht mit einer erhöhten Anzahl von Chromatidtyp-Aberrationen zu rechnen, da die Bestrahlung der Zellen in der G0-Phase des Zellzyklus stattfand und Chromatidtyp-Aberrationen durch eine Schadenssetzung in der Synthese-Phase des Zellzyklus induziert werden. Aus diesem Grund ist die insgesamt geringe Anzahl von Aberrationen des Chromatidtypes in der Positivkontrolle – bei allen 3 Labors – auf die Bestrahlung in G0 zurückzuführen (Abb. 14 andere Skala).

### Mikrokerntest

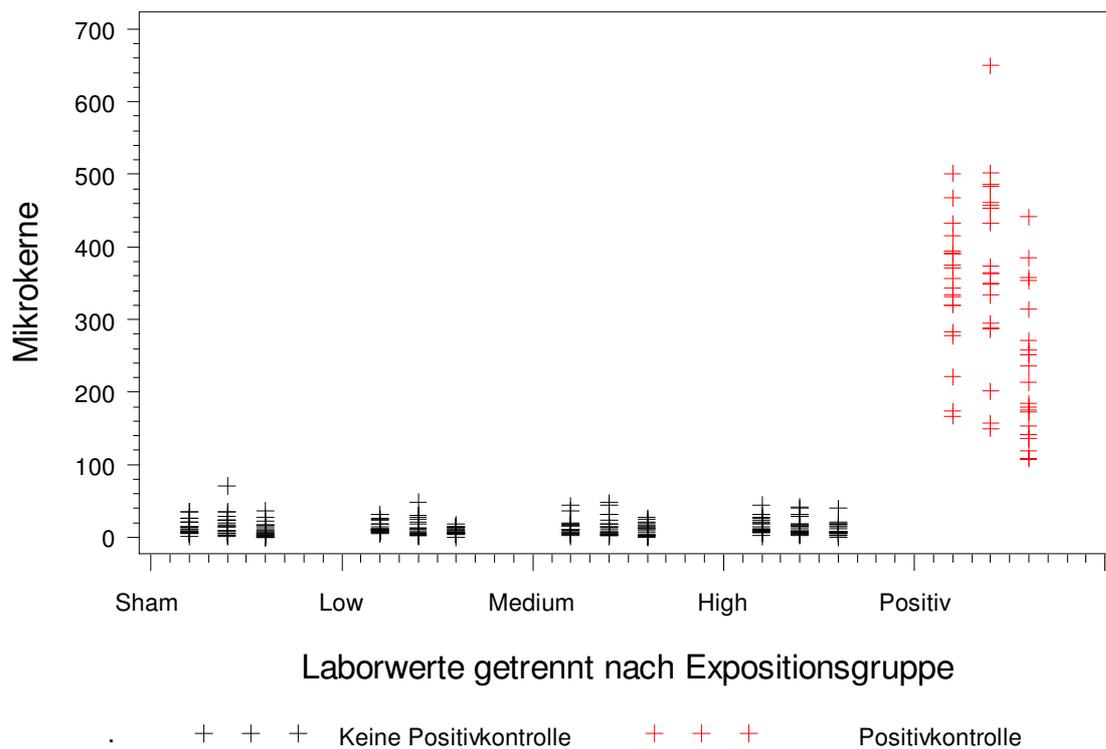


Abbildung 15: Mikrokerne (Es sind die jeweiligen Expositionen 1 bis 5 aufgetragen, die ersten Werte innerhalb einer Exposition gehören zu Labor 1, die zweiten zu Labor 2 und die dritten zu Labor 3)

Auch die Werte der Mikrokernuntersuchungen zeigen keine Auffälligkeiten und Ausreißer.

**SCE-Test:**

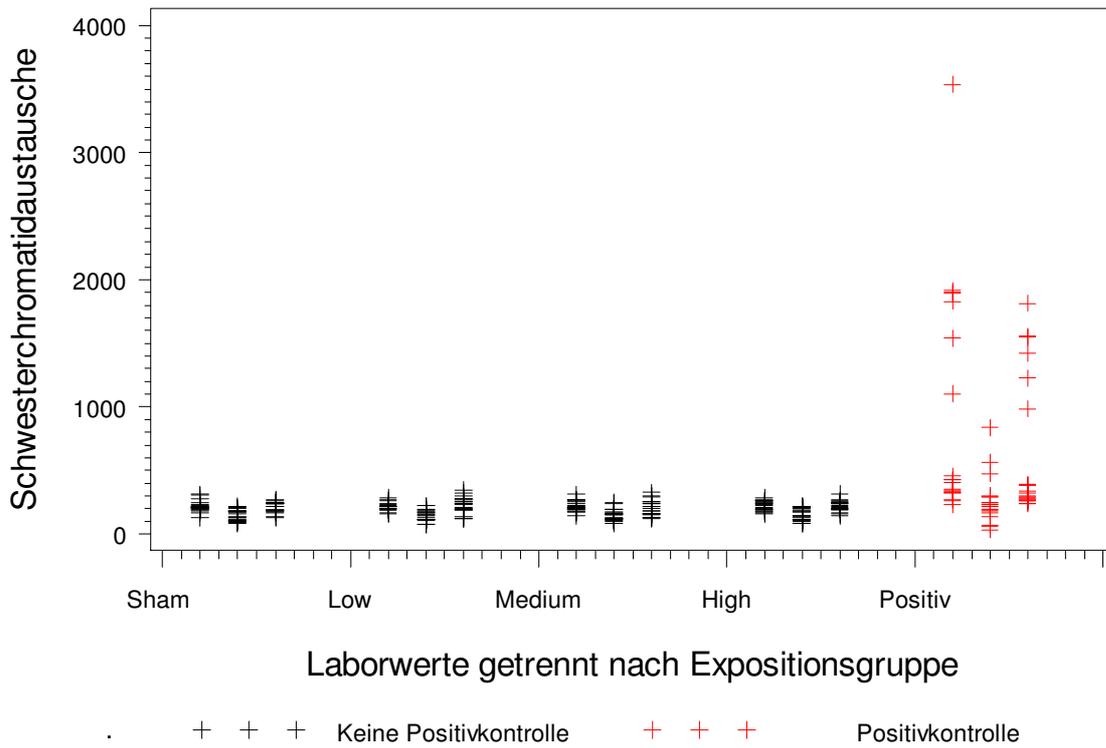


Abbildung 16: Schwesterchromatidaustausche (Es sind die jeweiligen Expositionen 1 bis 5 aufgetragen, die ersten Werte innerhalb einer Exposition gehören zu Labor 1, die zweiten zu Labor 2 und die dritten zu Labor 3)

**Cometassay**

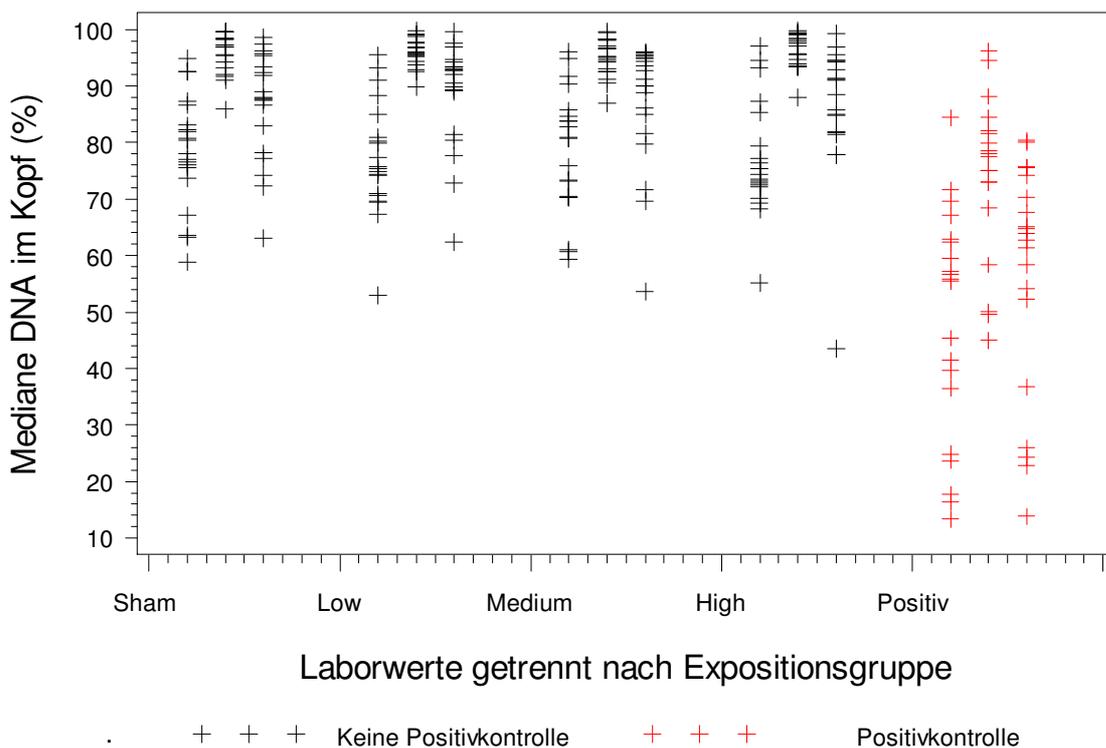


Abbildung 17: Mediane DNA im Kopf (%) (Es sind die jeweiligen Expositionen 1 bis 5 aufgetragen, die ersten Werte innerhalb einer Exposition gehören zu Labor 1, die zweiten zu Labor 2 und die dritten zu Labor 3)

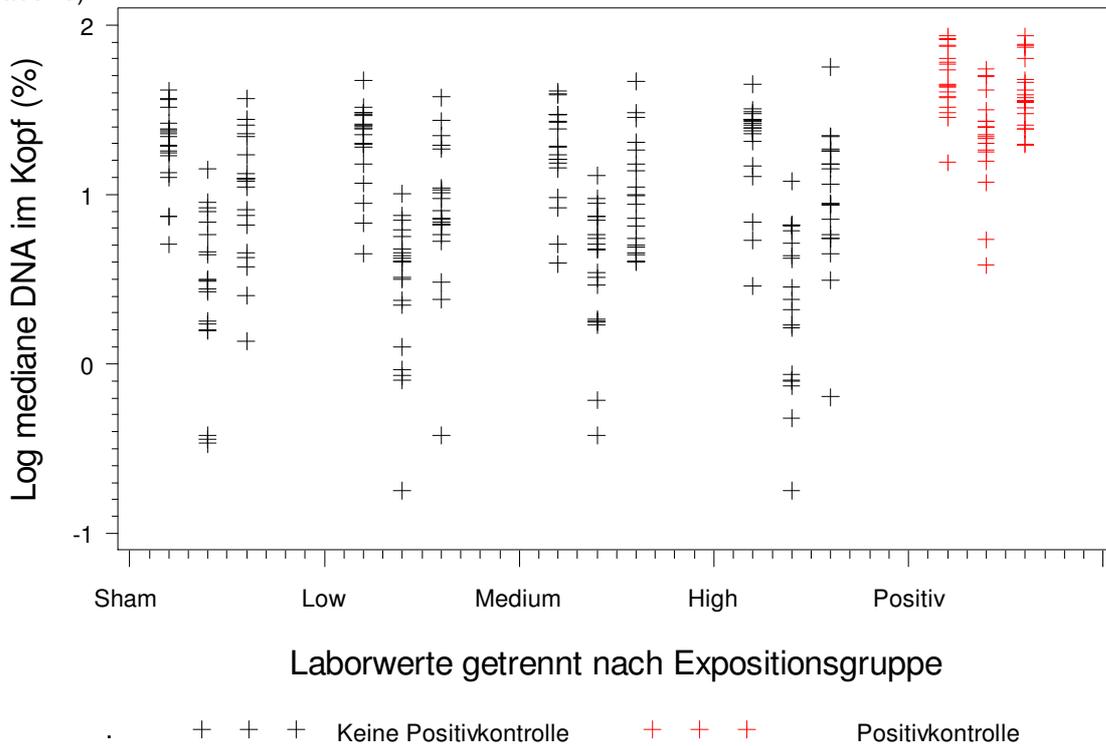


Abbildung 18: Log(100-Mediane DNA im Kopf (%)) (Es sind die jeweiligen Expositionen 1 bis 5 aufgetragen, die ersten Werte innerhalb einer Exposition gehören zu Labor 1, die zweiten zu Labor 2 und die dritten zu Labor 3; n=97 fehlend)

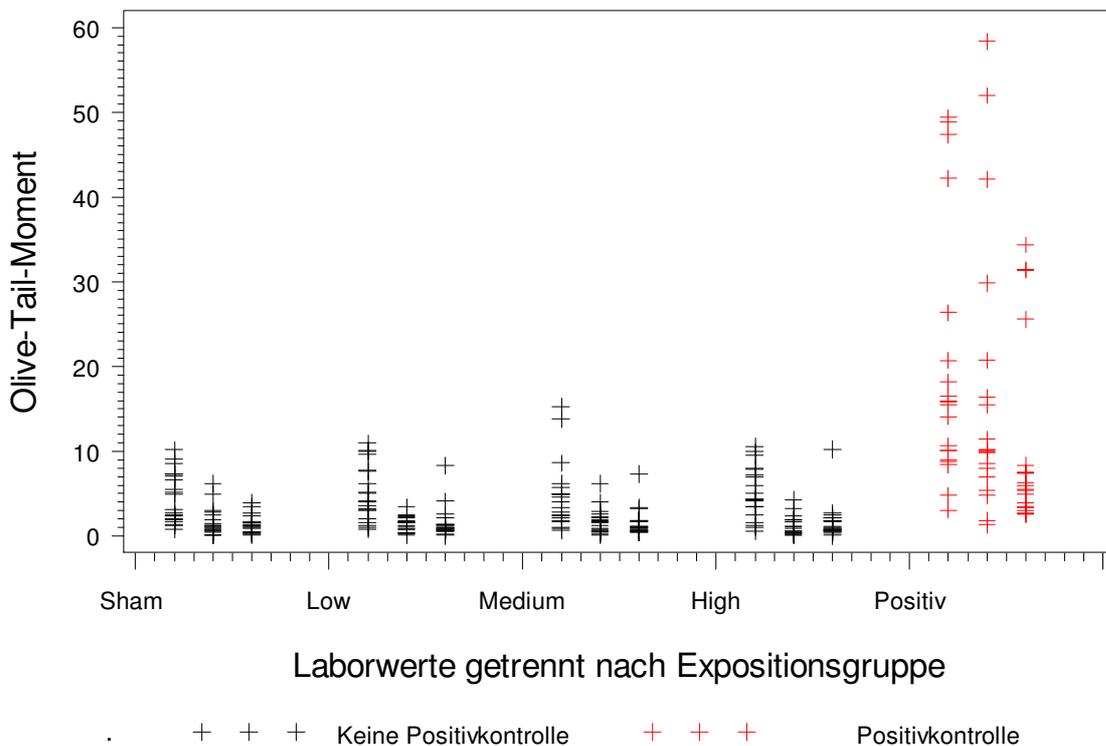


Abbildung 19: Olive-Tail-Moment (Median) (Es sind die jeweiligen Expositionen 1 bis 5 aufgetragen, die ersten Werte innerhalb einer Exposition gehören zu Labor 1, die zweiten zu Labor 2 und die dritten zu Labor 3)

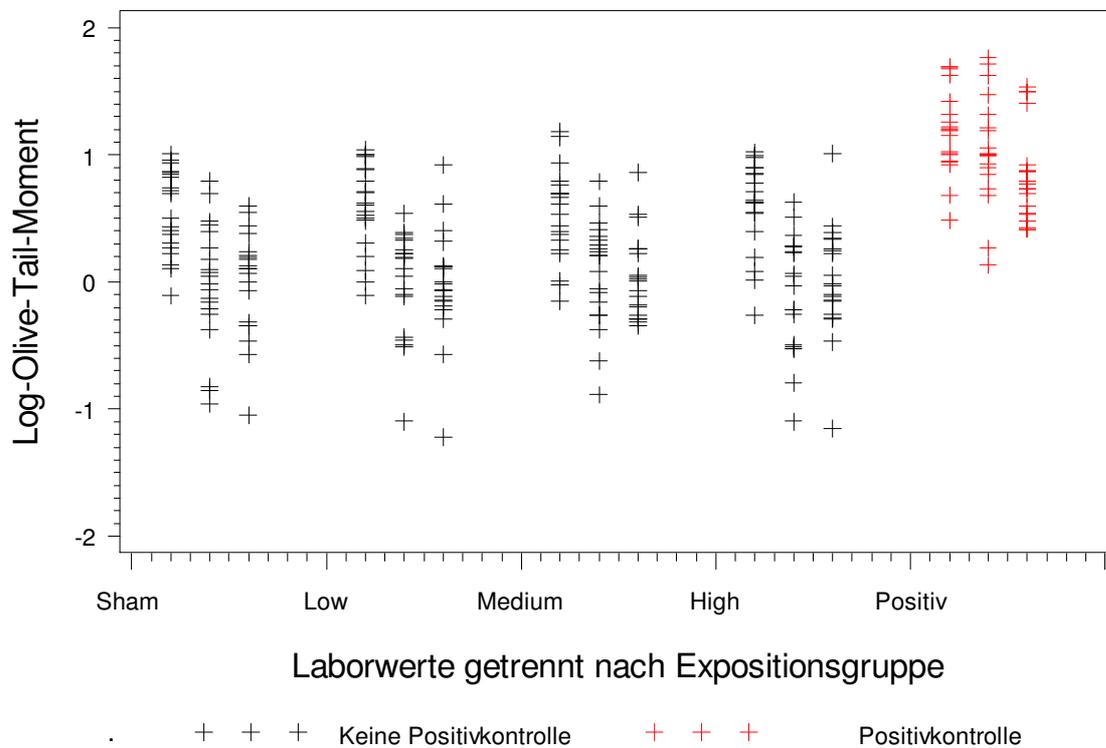


Abbildung 20: Log-Olive-Tail-Moment (Median) (Es sind die jeweiligen Expositionen 1 bis 5 aufgetragen, die ersten Werte innerhalb einer Exposition gehören zu Labor 1, die zweiten zu Labor 2 und die dritten zu Labor 3)

Es konnten auch keine Auffälligkeiten und Ausreißer in den Daten des Cometassays und bei den Schwesterchromatidaustauschen gefunden werden.

### 3.1.3 Laboreffekte

Die Daten wurden auf einen bestehenden Laboreffekt überprüft. Die Positiv-Kontrolle wurde hierbei nicht berücksichtigt. Die Werte für alle Probanden bei den 4 Expositionen je Labor gemittelt. In Tabelle 12 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen dargestellt.

Für einen Vergleich der Labore untereinander, wurden für die Zielvariablen der jeweiligen Testsysteme Friedman-Tests durchgeführt. Überprüft wurde dabei, ob die Unterschiede zwischen den Laboren, die schon anhand der Mittelwerte erkennbar auch statistisch signifikant sind. In Tabelle 12 sind nun die entsprechenden P-Werte aufgeführt.

Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichung getrennt nach Laboren, sowie p-Wert des Friedman-Tests ohne Positivkontrolle (Die Werte zu den 4 Expositionen wurden je Labor und Proband gemittelt)

Variable	Labor 1		Labor 2		Labor 3		p-Wert
	MW	Std Dev	MW	Std Dev	MW	Std Dev	
Olive-Tail-Moment	<b>4.78</b>	3.38	<b>1.48</b>	1.28	<b>1.73</b>	1.74	<.0001
Mediane DNA im Kopf (%)	<b>78.22</b>	10.14	<b>95.87</b>	3.12	<b>86.54</b>	10.49	<.0001
Schwesterchromatidau- stausche/50 M.	<b>217.69</b>	38.25	<b>148.77</b>	43.38	<b>215.23</b>	52.65	<.0001
Dizentrische Chromosomen/1000 M.	<b>1.04</b>	1.23	<b>0.09</b>	0.36	<b>1.03</b>	1.60	<.0001
Extra azentrische Chromosomen/1000 M.	<b>5.39</b>	4.09	<b>3.33</b>	4.03	<b>3.88</b>	3.85	0.0078
Ringe/ 1000 M.	<b>0.21</b>	0.50	<b>0.01</b>	0.11	<b>0.23</b>	0.67	0.0078
Chromatid-Typ/ 1000 M.	<b>0.10</b>	0.41	<b>0.01</b>	0.11	<b>1.35</b>	1.74	<.0001
Summe geschädigter Chromosomen/1000 M.	<b>6.74</b>	4.86	<b>3.44</b>	4.13	<b>6.45</b>	4.87	0.021
Mikrokerne/2000 Z.	<b>14.54</b>	9.61	<b>15.90</b>	14.42	<b>10.21</b>	8.21	0.0006

Es sind hoch signifikante systematische Unterschiede zwischen den drei Laboren zu erkennen, die jedoch teilweise durch die Standardabweichungen relativiert werden. Die Unterschiede beruhen z.T. auf qualitativ unterschiedlichen Analysesystemen und Mikroskopen.

Anhand der Ergebnisse des Friedman-Tests für verbundene Daten ist zu sehen, dass Unterschiede zwischen den Laboren bei allen Zielvariablen vorliegen. Hier wurde jeweils die Positivkontrolle aus der Auswertung weggelassen.

### 3.1.4 Korrelation zum Alter

Vor der Entblindung wurde eine Korrelation zum Alter getrennt für die jüngeren und älteren Probanden untersucht. In der folgenden Tabelle werden die Korrelationskoeffizienten des Alters mit den verschiedenen Zielvariablen dargestellt. Es sind jeweils die Spearman'schen Korrelationskoeffizienten zunächst getrennt nach Altersgruppe und dann für alle Probanden gesamt aufgeführt. Die Positivkontrolle wurde bei der Berechnung weggelassen. Für die vier Expositionswerte wurden die Einzelwerte der Probanden gemittelt

Tabelle 13: Spearmannscher Korrelationskoeffizient für die Zielvariablen zum Alter für jeweils getrennt für jüngere und ältere Probanden, sowie für alle Probanden zusammen.

Variable	Jüngere Probanden (n=10)	Ältere Probanden (n=10)	Alle Probanden (n=20)
	Spearman'scher Korrelationskoeffizient und p-Wert	Spearman'scher Korrelationskoeffizient und p-Wert	Spearman'scher Korrelationskoeffizient und p-Wert
	Alter bei Blutabnahme	Alter bei Blutabnahme	Alter bei Blutabnahme
Schwesterchromatid- austausche	0.61 0.06	0.64 0.05	0.65 0.0020
Mikrokerne	0.48 0.16	0.62 0.05	0.89 <.0001
Log- Mediane DNA im Kopf (%)	-0.22 0.53	-0.33 0.35	-0.05 0.83
Mediane DNA im Kopf (%)	-0.15 0.68	0.38 0.28	0.03 0.91
Log- Olive-Tail-Moment	-0.10 0.78	-0.47 0.17	-0.34 0.14
Olive-Tail-Moment	0.37 0.29	-0.55 0.10	-0.36 0.12
Summe geschädigter Chromosomen	-0.59 0.07	0.07 0.85	-0.71 0.0005
Dizentrische Chromosomen	-0.43 0.21	0.50 0.14	-0.47 0.04
Extra azentrische Chromosomen	-0.32 0.37	0.05 0.89	-0.68 0.0009
Ringe	-0.33 0.35	0.48 0.16	-0.26 0.27
Chromatidtyp Aberration	-0.01 0.99	0.07 0.84	-0.46 0.04

Die älteren Probanden weisen bei der Zielvariablen „Mikrokerne“ größere Korrelationen auf als die jüngeren Probanden. Bei dieser Zielvariablen ist für den gesamten Datensatz eine starke positive Korrelation ( $r = 0.89$ ) zu erkennen. Ebenfalls stark aber negativ korreliert ist die Zielvariable Anzahl geschädigter Chromosomen ( $r = -0.71$ ).

### 3.1.5 Präzisionsunterschiede innerhalb der Labore und Expositionsgruppen

Die Präzisionsunterschiede zwischen den Laboren und Expositionen wurden ohne Positivkontrolle ermittelt. In Tabelle 14 sind jeweils getrennt für die drei Labore und alle Zielvariablen die intraindividuellen Standardabweichungen, sowie die p-Werte für den Unterschied in der Fehlerstreuung der drei Labore aufgeführt. Die Standardabweichung kann hier als ein Präzisions- oder Genauigkeitsmaß der Messwerte gesehen werden.

Für die Berechnung der intraindividuellen Standardabweichung wurde die SAS-Prozedur MIXED verwendet. Die Positivkontrolle wurde hierbei weggelassen. Die p-Werte zum Vergleich der drei Labore wurden anhand eines Friedman Tests berechnet

Tabelle 14: Intraindividuelle Standardabweichung im Laborvergleich.

Variable	Labor 1 Standard- abweichung	Labor 2 Standard- abweichung	Labor 3 Standard- abweichung	P-Wert
Schwesterchromatid- austausche	29.73130	13.8304	40.26462	<.0001
Mikrokerne	4.949283	5.469488	5.219866	0.7047
Log(100-Mediane DNA im Kopf (%))	0.1316435	0.3698648	0.2728186	<.0001
Log- Olive-Tail-Moment	0.1641036	0.3811824	0.3084153	<.0001
Summe geschädigter Chromosomen	3.443719	2.787059	4.731923	0.2122
Dizentrische Chromosomen	1.066536	0.3649658	1.589025	<.0001
Extra azentrische Chromosomen	3.154853	2.695812	3.702796	0.2274
Ringe	0.4347413	0.1120268	0.6897101	0.0080
Chromatid-Typ	0.3748333	0.1117587	1.800528	<.0001

Nur in drei Fällen (Mikrokerne, Summe geschädigter Chromosomen Extra azentrische Chromosomen) wurden keine statistisch auffälligen Präzisionsunterschiede zwischen den Laboren festgestellt. Bis auf die Ergebnisse des SCE-Tests handelt es sich bei den auffälligen Werten um Zielvariablen, die sehr seltene Ereignisse darstellen und durch sehr niedrige Werte gekennzeichnet sind.

## 3.2 Auswertung der entblindeten Daten

Für die verschiedenen Assays wurden im Analyseplan jeweils ein primärer Test auf einen Dosistrend und ein Test als Sensitivitätsanalyse festgelegt.

### 3.2.1 Dosistrendanalyse

Wie bereits bei der Analyse der verblindeten Daten erwähnt, wurden in der statistischen Analyse folgende neun Zielvariablen berücksichtigt:

#### Chromosomenaberrationen

- Ca\_y= Geschädigte Zellen (Summe aus CA\_Dic, CA\_extra\_Ac, CA\_Ringe und CA\_Chromatid)

- CA\_Dic =Dizentrische Chromosomen
- CA\_extra\_Ac= Extra azentrische Chromosomen
- CA\_Ringe= Ringe
- CA\_Chromatid= Chromatidtyp

### Mikrokerntest

- $MN = (1 \cdot mn_1 + 2 \cdot mn_2 + 3 \cdot mn_3) =$  Mikrokerne

### CometAssay

- CoA\_head\_DNA=  $\text{Log}(100 - \text{mediane DNA im Kopf } (\%))$
- CoA\_olive\_tail= Log- Olive-Tail-Moment

### Schwesterchromatidaustausche (SCE)

- SCE\_Anzahl= Schwesterchromatidaustausche

**Hinweis:** Waren die Werte von den ermittelten Endpunkten 0 (z.B. bei Chromatidtyp Aberration), so konnten zwar Mittelwerte berechnet werden, eine statistische Auswertung (p-Werte, Konfidenzintervalle KI etc.) konnte mit diesen Werten jedoch nicht durchgeführt werden. In den Tabellen ist dieser Fall mit einem Punkt gekennzeichnet.

### 3.2.1.1 SAS Prozedur Mixed - Cometassay

Die Berechnung auf einen Dosis-Trend für die Zielvariablen des Cometassays erfolgte gemäß des Analyseplans mit der SAS-Prozedur MIXED. Ergebnisse von Proc Mixed für die Zielvariablen des Cometassays sind in den Tabellen 15 und 16 aufgeführt. Die Schätzer berechneten sich nach folgender Formel  $T_i = \frac{1}{10}(-3Y_{i1} - Y_{i2} + Y_{i3} + 3Y_{i4})$ . Nähere Informationen dazu sind im Analyseplan zu finden.

Tabelle 15: Primäre Analyse für Log-Olive-Tail-Moment: Schätzer und p-Werte getrennt für die drei Labore (n=20)

	Schätzwert	Standardfehler	p-Wert	Unteres 95% KI	Oberes 95% KI
Trend Labor 1	0.007482	0.01149	0.5232	-0.0167	0.0316
Trend Labor 2	-0.01251	0.03379	0.7155	-0.0835	0.0585
Trend Labor 3	0.01025	0.03044	0.7403	-0.0537	0.0742

Tabelle 16: Primäre Analyse für  $\text{Log}(100 - \text{mediane DNA im Kopf } (\%))$ : Schätzer und p-Werte getrennt für die drei Labore(n=20)

	Schätzwert	Standardfehler	p-Wert	Unteres 95% KI	Oberes 95% KI
Trend Labor 1	0.000890	0.009805	0.9287	-0.0197	0.0215
Trend Labor 2	-0.01181	0.03276	0.7227	-0.0806	0.0570
Trend Labor 3	0.005833	0.02682	0.8303	-0.0505	0.0622

Die Zielvariablen des Cometassays zeigen keinen signifikanten Trend in allen drei Laboren.

### 3.2.1.2 Permutationstest – Chromosomenaberration, Mikrokerntest, SCE-Test

Für die Zielvariablen der Chromosomenaberration, des Mikrokerntests und des Schwesterchromatidaustausches wurde als primärer Test ein Permutationstest durchgeführt.

In Tabelle 17 sind die Ergebnisse des Permutationstests (für alle Zielvariablen) zum Testen auf einen Dositrend innerhalb der 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 hierbei nicht berücksichtigt. Die fettgedruckten p-Werte zeigen zum 5% Niveau signifikante Trends an.

Tabelle 17: Ergebnisse des Permutationstests für die Zielvariablen für alle Probanden (n=20)

Variable	Labor	Z-Wert	p-Wert
<b>Dizentrische Chromosomen</b>	1	1.1005	0.2919
	2	-1.7926	0.0988
	3	3.1894	<b>0.00024</b>
<b>Extra azentrische Chromosomen</b>	1	0.7453	0.4701
	2	-1.2404	0.2253
	3	-0.676	0.5152
<b>Ringe</b>	1	2.1195	<b>0.0415</b>
	2	-1.3416	0.4997
	3	-0.2965	0.8323
<b>Chromatidtyp</b>	1	1.2232	0.2999
	2	0.4472	1.000
	3	1.7205	0.0909
<b>Gesamtanzahl geschädigter Chromosomen</b>	1	1.2238	0.2285
	2	-1.3932	0.1707
	3	1.0894	0.2879
<b>Mikrokerne</b>	1	0.3693	0.7193
	2	-0.5959	0.5594
	3	0.5423	0.5969
<b>Schwesterchromatidaustausche</b>	1	0.2941	0.7717
	2	0.3112	0.7581
	3	0.188	0.8523

Die Permutationstests zeigen bei 2 Zielvariablen der Chromosomenaberration (Dizentrische Chromosomen Labor 3: p = 0,00024 und Ringe Labor 1: p = 0,0415) p-Werte kleiner 0.05. Diese Signifikanzen treten jedoch jeweils nur in einem Labor auf, so dass kein begründeter Verdacht auf einen Bestrahlungseffekt besteht. Auffällig ist der p-Wert von 0,00024 in Labor 3 bei dizentrischen Chromosomen, der auch nach korrigieren des Niveaus ( $0,05/5=0,001$ ) nach Bonferroni signifikant ist. Das Niveau muss durch 5 geteilt werden, da es 5 Zielgrößen bei der Chromosomenaberration gibt. Hier zeigen Labor 1 und Labor 2 nicht mal p-Werte kleiner 0,05.

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwerte und Standardabweichungen für alle Zielvariablen und Dosisgruppen getrennt nach den 3 Laboren aufgeführt.

Tabelle 18: Mittelwerte der Probanden (n=20) und Standardabweichung für alle Zielvariablen und Expositionsbedingungen

		Mittelwert			Standardabweichung		
		Labor			Labor		
		1	2	3	1	2	3
Summe geschädigter Chromosomen	Exposition						
	sham	5.60	4.70	6.05	4.04	5.61	3.12
	low	6.55	2.90	5.90	5.65	3.91	4.17
	medium	7.55	3.60	6.10	4.82	3.42	5.27
	high	7.25	2.55	7.75	4.94	3.09	6.41
	positiv	148.2	118.9	144.1	106.6	68.50	75.23
Dizentrische Chromosomen	Exposition						
	sham	1.00	0.25	0.40	1.26	0.64	0.94
	low	0.65	0.05	0.65	0.81	0.22	0.81
	medium	1.25	0.00	0.95	1.45	0.00	0.69
	high	1.25	0.05	2.00	1.29	0.22	2.66
	positiv	71.95	65.85	67.40	49.31	42.29	45.77
Extra azentrische Chromosomen	Exposition						
	sham	4.50	4.40	4.30	3.49	5.38	2.32
	low	5.75	2.85	3.40	5.14	3.94	3.47
	medium	5.80	3.55	3.15	3.74	3.33	4.74
	high	5.50	2.50	3.75	3.99	3.12	3.57
	positiv	67.90	51.05	66.35	51.79	29.09	34.86
Ringe	Exposition						
	sham	0.10	0.05	0.25	0.31	0.22	0.79
	low	0.05	0.00	0.25	0.22	0.00	0.91
	medium	0.35	0.00	0.20	0.59	0.00	0.52
	high	0.35	0.00	0.20	0.67	0.00	0.41
	positiv	7.45	1.95	6.00	7.00	1.88	5.72
Chromatid-Typ	Exposition						
	sham	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	1.38
	low	0.10	0.00	1.05	0.31	0.00	1.36
	medium	0.15	0.05	1.50	0.37	0.22	2.44
	high	0.15	0.00	1.85	0.67	0.00	1.57
	positiv	0.85	0.00	2.60	1.57	0.00	2.76

		Mittelwert			Standardabweichung		
		Labor			Labor		
		1	2	3	1	2	3
Mikrokerne	Exposition						
	sham	14.70	18.35	10.20	10.00	16.24	9.98
	low	13.80	14.50	8.90	7.49	12.39	4.73
	medium	13.75	15.35	10.65	10.66	13.69	8.40
	high	15.90	15.40	11.10	10.55	11.65	9.20
	positiv	343.4	371.8	228.1	87.83	124.0	98.91
Schwesterchromatidaustausche	Exposition						
	sham	217.7	152.5	204.1	42.81	40.58	43.00
	low	215.5	160.8	223.2	32.38	43.34	61.83
	medium	216.5	157.0	199.4	40.59	42.53	62.69
	high	221.1	163.1	215.0	39.19	50.08	46.45
	positiv	910.6	258.9	639.4	898.9	185.1	550.2
Log mediane DNA im Kopf (%)	Exposition						
	sham	1.28	0.44	0.99	0.24	0.46	0.37
	low	1.30	0.45	0.90	0.25	0.43	0.43
	medium	1.26	0.55	0.99	0.28	0.40	0.32
	high	1.29	0.36	0.98	0.30	0.48	0.41
	positiv	1.68	1.34	1.59	0.19	0.29	0.20
Log-Olive-Tail-Moment	Exposition						
	sham	0.55	-0.02	0.00	0.33	0.48	0.41
	low	0.59	-0.00	-0.02	0.35	0.41	0.43
	medium	0.53	0.08	0.05	0.36	0.41	0.33
	high	0.60	-0.09	0.01	0.35	0.46	0.44
	positiv	1.18	1.04	0.83	0.33	0.42	0.37

Da bei einigen Probanden bei den Schwesterchromatidaustauschen in der Positivkontrolle eine höhere Konzentrationen Mitomycin C eingesetzt wurde, werden nun noch die Mittelwerte (nur SCE Positivkontrolle) aufgeführt, wenn alle Probanden mit den höheren PK-Konzentrationen nicht mit in die Analyse eingehen:

Labor 1: Mittelwert = 345.1 ; Standardabweichung = 67.28

Labor 2: Mittelwert = 228.2 ; Standardabweichung = 49.31

Labor 3: Mittelwert = 307.4; Standardabweichung = 50.25

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Ergebnisse der primären Analyse (Permutationstest, SAS-Prozedur Mixed).

Tabelle19: Ergebnisse der primären Analyse

Variable	Labor	Z-Wert und Schätzer	p-Wert
<b>Dizentrische Chromosomen Permutation test</b>	1	1.1005	0.2919
	2	-1.7926	0.0988
	3	3.1894	<b>0.00024</b>
<b>Extra azentrische Chromosomen Permutation test</b>	1	0.7453	0.4701
	2	-1.2404	0.2253
	3	-0.676	0.5152
<b>Ringe Permutation test</b>	1	2.1195	<b>0.0415</b>
	2	-1.3416	0.4997
	3	-0.2965	0.8323
<b>Chromatiden Permutation test</b>	1	1.2232	0.2999
	2	0.4472	1.000
	3	1.7205	0.0909
<b>Gesamtanzahl geschädigter Chromosomen Permutation test</b>	1	1.2238	0.2285
	2	-1.3932	0.1707
	3	1.0894	0.2879
<b>Mikrokerne Permutation test</b>	1	0.3693	0.7193
	2	-0.5959	0.5594
	3	0.5423	0.5969
<b>Schwesterchromatidaustausche Permutation test</b>	1	0.2941	0.7717
	2	0.3112	0.7581
	3	0.188	0.8523
<b>Log mediane DNA im Kopf (%) PROC MIXED</b>	1	0.000890	0.9287
	2	-0.01181	0.7227
	3	0.005833	0.8303
<b>Log-Olive-Tail-Moment PROC MIXED</b>	1	0.007482	0.5232
	2	-0.01251	0.7155
	3	0.01025	0.7403

### 3.2.1.3 Trendscores - Hauptanalyse

Die Ergebnisse der Hauptanalyse auf einen Dosistrend anhand der Trendscores bei 20 Probanden sind in der Tabelle 20 aufgeführt.

Es sind jeweils der Mittelwert, die 95 % Konfidenzintervallgrenzen sowie der p-Wert für die 9 Zielvariablen der verschiedenen Assays dargestellt. Dabei wurden jeweils Trendscores der Zielvariablen verwendet. Die Positivkontrolle wurde bei der Analyse nicht mit berücksichtigt.

Tabelle 20: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für neun die Gentoxizitätsmarker. N=20 Probanden

Alle		Mittel	95% KI	95% KI	P-Wert
	Trendscore von:				
Summe aus geschädigten Chromosomen	labor				
	1	0.60	-0.02	1.21	0.0574
	2	-0.58	-1.39	0.24	0.1557
	3	0.53	-0.51	1.57	0.3011
Dizentrische Chromosomen	labor				
	1	0.14	-0.05	0.32	0.1518
	2	-0.07	-0.16	0.03	0.1792
	3	0.51	0.12	0.90	<b>0.0124</b>
Extra azentrische Chromosomen	labor				
	1	0.30	-0.30	0.91	0.3072
	2	-0.50	-1.30	0.30	0.2062
	3	-0.26	-1.00	0.48	0.4708
Ringe	labor				
	1	0.11	-0.00	0.21	0.0514
	2	-0.02	-0.05	0.02	0.3299
	3	-0.02	-0.15	0.11	0.7592
Chromatidtyp	labor				
	1	0.05	-0.06	0.16	0.3348
	2	0.01	-0.01	0.02	0.3299
	3	0.30	0.04	0.56	<b>0.0284</b>
Mikrokerne	labor				
	1	0.35	-0.85	1.56	0.5442
	2	-0.80	-2.12	0.52	0.2201
	3	0.45	-0.67	1.56	0.4149
Schwesterchromatid-austausche	labor				
	1	1.13	-6.24	8.49	0.7526
	2	1.35	-1.20	3.90	0.2822
	3	0.99	-6.19	8.17	0.7760
Log mediane DNA im Kopf (%)	labor				
	1	0.00	-0.02	0.02	0.9286
	2	-0.01	-0.08	0.06	0.7224
	3	0.01	-0.05	0.06	0.8301
Log-Olive-Tail-Moment	labor				
	1	0.01	-0.02	0.03	0.5228
	2	-0.01	-0.08	0.06	0.7153
	3	0.01	-0.05	0.07	0.7401

Nur in Labor 3 jeweils bei den Dizentrischen Chromosomen ( $p=0,0124$ ) und bei der Chromatidtyp-Aberration ( $p=0,284$ ) ergibt sich ein p-Wert unter 0.05. Da dies allerdings nur in einem der drei Labore vorkommt, bedeutet dieses Ergebnis keinen begründeten Verdacht auf einen Bestrahlungseffekt bzw. signifikanten Dosistrend.

### 3.2.2 Sensitivitätsanalysen - Page-Trend-Test

In Tabelle 21 sind die Ergebnisse der Sensitivitätsanalyse anhand des Page-Trend-Tests zum Testen auf einen Dosistrend innerhalb der verschiedenen Expositionsgruppen aufgeführt.

Der Page-Trend-Test soll nach Analyseplan für die Zielvariablen der Chromosomenaberration, und des Mikrokerntests durchgeführt werden. 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 hierbei weggelassen.

Die fettgedruckten p-Werte zeigen zum 5% Niveau signifikante Trends an. Zum besseren Vergleich beinhaltet die Tabelle 21 neben dem p-Wert der Sensitivitätsanalyse auch den p-Wert der primären Analyse aus Tabelle 19.

Tabelle 21: Ergebnisse des Page-Trend-Tests (Sensitivitätsanalyse) für die Zielvariablen der Chromosomenaberration und des Mikrokerntests für alle Probanden ( $n=20$ )

Variable	Labor	Chi-Quadrat	p-Wert	p-Wert primäre Analyse
<b>Dizentrische Chromosomen</b>	1	1.8481	0.1819	0.2919
	2	1.96	0.2364	0.0988
	3	13.2993	<b>0.0002</b>	<b>0.00024</b>
<b>Extra azentrische Chromosomen</b>	1	1.2511	0.2737	0.4701
	2	0.5287	0.4833	0.2253
	3	1.6787	0.2030	0.5152
<b>Ringe</b>	1	4.9	<b>0.0372</b>	<b>0.0415</b>
	2	1.8	0.4992	0.4997
	3	0.6857	0.4418	0.8323
<b>Chromatid-Typ</b>	1	0.8379	0.4272	0.2999
	2	0.2	1.000	1.000
	3	5.2669	<b>0.0224</b>	0.0909
<b>Gesamtanzahl geschädigter Chromosomen</b>	1	3.7565	0.0546	0.2285
	2	1.2865	0.2685	0.1707
	3	0.2641	0.6233	0.2879
<b>Mikrokerne</b>	1	0.0597	0.8238	0.7193
	2	1.2062	0.2828	0.5594
	3	2.025	0.1618	0.5969

Die Page-Trend-Tests zeigen bei 3 Zielvariablen der Chromosomenaberration p-Werte kleiner 0,05. Diese Signifikanzen beschränken sich jedoch auf nur jeweils ein Labor, so dass zwar der Verdacht eines Bestrahlungseffektes aufgeworfen wird,

jedoch keine Bestätigung dieses Verdachtes durch ein oder beide anderen Labors gegeben ist.

Bei den dizentrischen Chromosomen in Labor 3 und den Ringen in Labor 1 zeigten sich auch schon bei den Ergebnissen des Permutationstests p-Werte kleiner 0.05.

Bei Labor 3 liegt für die dizentrischen Chromosomen wie auch schon in der primären Analyse ein signifikanter Trend zum Bonferroni adjustierten Niveau von 0,00125 vor.

Bei dem SCE-Test wurde als Sensitivitätsanalyse ein lineares gemischtes Modell mit der SAS Prozedur durchgeführt.

Tabelle 22: Sensitivitätsanalyse für Schwesterchromatidaustausche: Schätzer und p-Werte getrennt für die drei Labore(n=20)

	Schätzwert	Standardfehler	p-Wert	Unteres 95% KI	Oberes 95%KI
Trend Labor 1	1.1250	3.5287	0.7535	-6.2885	8.5385
Trend Labor 2	1.3500	1.2197	0.2830	-1.2126	3.9126
Trend Labor 3	0.9900	3.4301	0.7762	-6.2165	8.1965

Entsprechend der primären Analyse anhand des Permutationstests ergaben in keinem Labor signifikante p-Werte.

### 3.2.3 Dosistrendanalyse getrennt nach Altersgruppe

Unter diesem Punkt sind die Ergebnisse der primären Auswertungen getrennt für jüngere und ältere Probanden aufgeführt.

Bevor die Analyse der jüngeren und älteren Probanden erfolgt, werden in Tabelle 23 zunächst die Ergebnisse des unverbundenen T-Tests zum Vergleich der beiden Altersgruppen für alle Zielvariablen mit Mittelwertsdifferenz, 95 % Konfidenzintervall und p-Wert dargestellt. Verwendet wurden jeweils nur die Daten der Negativkontrolle (Sham).

Tabelle 23: t-Test zum Vergleich der beiden Altersgruppen (nur für die Negativgruppe=Sham) (Mittelwertsdifferenz: jung – alt)

Variable	Labor	Mittelwertsdifferenz und 95% KI	p-Wert
<b>Dizentrische Chromosomen</b>	1	0.6 (-0.58 - 1.78)	0.2991
	2	0.5 (-0.11 - 1.11)	0.0957
	3	0.2 (-0.74 - 1.14)	0.6501
<b>Extra azentrische Chromosomen</b>	1	3.8 (0.85 - 6.75)	<b>0.0165</b>
	2	6.4 (2.28 - 10.52)	<b>0.0081</b>

	3	0 (-2.18 - 2.18)	1
<b>Ringe</b>	1	0 (-0.30 - 0.30)	1
	2	0.1 (-0.13 - 0.33)	0.3434
	3	0.5 (-0.27 - 1.27)	0.1773
<b>Chromatid-Typ</b>	1	0	.
	2	0	.
	3	1.4 (0.23 - 2.57)	<b>0.0232</b>
<b>Gesamtanzahl geschädigter Chromosomen</b>	1	4.4 (0.97 - 7.83)	<b>0.0170</b>
	2	7.0 (2.61 - 11.39)	<b>0.0051</b>
	3	2.1 (-0.73 - 4.93)	0.1433
<b>Mikrokerne</b>	1	-12.8 (-20.07 - -5.53)	<b>0.0041</b>
	2	-20.3 (-32.78 - -7.82)	<b>0.0041</b>
	3	-14.0 (-20.68 - -7.32)	<b>0.0012</b>
<b>Schwesterchromatidaustausche</b>	1	-3.8 (-45.08 - 37.48)	0.8489
	2	-58.6 (-88.28 - -28.92)	<b>0.0007</b>
	3	-17.8 (-57.12 - 21.52)	0.3547
<b>Log mediane DNA im Kopf (%)</b>	1	-0.14 (-0.37 - 0.09)	0.2148
	2	0.01 (-0.44 - 0.46)	0.9481
	3	0.12 (-0.24 - 0.47)	0.4942
<b>Log-Olive-Tail-Moment</b>	1	0.15 (-0.17 - 0.46)	0.3340
	2	0.08 (-0.39 - 0.54)	0.7326
	3	0.22 (-0.16 - 0.60)	0.2361

In allen Zielvariablen bis auf die des Cometassays, den dizentrischen Chromosomen und den Ringen ergeben sich in mindestens einem Labor statistisch auffällige Unterschiede zwischen den beiden Altersgruppen.

Chromosomenaberrationstest: Zwischen beiden Altersgruppen besteht kein Unterschied in den Mittelwerten von Ring- und dizentrischen Chromosomen. Die Mittelwerte der extra azentrischen Chromosomen unterscheiden sich bei Labor 1 und Labor 2, während eine signifikante Mittelwertsdifferenz der Chromatidtyp-Aberration nur in Labor 3 detektiert wurde. Es sind ebenfalls signifikante Unterschiede in den Mittelwerten der Gesamtanzahl der geschädigten Chromosomen beider Altersgruppen in Labor 1 und Labor 2 festzustellen. Letztere sind durch die hohen Differenzen der Mittelwerte der extra azentrischen Chromosomen geprägt. Die Mittelwerte der jüngeren Probanden sind höher als die der älteren Probanden.

Mikrokerntest: Im Mikrokerntest weisen die älteren Probanden im Schnitt deutlich mehr Mikrokerne auf als die jüngeren Probanden. Dies wurde von allen 3 Laboren ermittelt. Die Ergebnisse sind hoch signifikant.

SCE-Test: Die Mittelwerte der Schwesterchromatidaustausche waren in allen 3 Laboren bei den älteren Probanden höher als bei den jungen Probanden, die Ergebnisse waren jedoch nur bei Labor 2 signifikant. In Tabelle 24 sind nun die Analyseergebnisse für die jüngeren Probanden aufgeführt.

Tabelle 24: Primäre Analyseergebnisse nur für die jüngeren Probanden (n=10)

Variable (jüngere Probanden)	Labor	Z-Wert und Schätzer	p-Wert
<b>Dizentrische Chromosomen Permutationstest</b>	1	0.6015	0.5868
	2	-1.7566	0.1107
	3	2.0977	<b>0.02326</b>
<b>Extra azentrische Chromosomen Permutationstest</b>	1	0.2095	0.8502
	2	-1.8459	0.0642
	3	-0.3936	0.7226
<b>Ringe Permutationstest</b>	1	1.7556	0.1033
	2	-1.3416	0.4998
	3	-1.4915	0.1697
<b>Chromatid-Typ Permutationstest</b>	1	1.254	0.2863
	2	0.4472	1
	3	0.7541	0.4824
<b>Summe aus geschädigten Chromosomen Permutationstest</b>	1	0.6437	0.5366
	2	-2.0279	<b>0.03906</b>
	3	0.5752	0.6135
<b>Mikrokerne Permutationstest</b>	1	0.2014	0.8614
	2	-0.5042	0.6405
	3	0.7806	0.456
<b>Schwesterchromatidaustausche Permutationstest</b>	1	0.1428	0.8906
	2	0.1884	0.8554
	3	0.0937	0.9275
<b>Log mediane DNA im Kopf (%) PROC MIXED</b>	1	-0.01378	0.3309
	2	-0.00397	0.9357
	3	-0.00589	0.8887
<b>Log-Olive-Tail-Moment PROC MIXED</b>	1	-0.01211	0.3991
	2	2.797E-6	1
	3	-0.01857	0.6987

Der Permutationstest weist bei zwei Zielvariablen p-Werte kleiner 0.05 auf (Labor 3 Dizentrische Chromosomen, Labor 2: Summe geschädigter Chromosomen).

In Tabelle 25 sind die Ergebnisse der Dosistrendanalyse anhand des Trendscores für die 10 jüngeren Probanden dargestellt. Entgegen den Ergebnissen in Tabelle 18 gibt es hier in keinem der 4 Testsysteme (9 Endpunkte) einen p-Wert unter 0.05. Diese bestätigen die zwei statistisch auffälligen Ergebnisse des Permutationstests folglich nicht.

Tabelle 25: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die neun Gentoxizitätsmarker nur für jüngere Probanden

Trendscore von:		Mittelwert	95% KI Untere Grenze	95% KI Obere Grenze	P-Wert
Jüngere Probanden					
Summe aus geschädigten Chromosomen	labor				
	1	0.50	-0.70	1.70	0.3688
	2	-1.31	-2.86	0.24	0.0888
Dizentrische Chromosomen	labor				
	1	0.12	-0.14	0.38	0.3250
	2	-0.12	-0.33	0.09	0.2229
Extra azentrische Chromosomen	labor				
	1	0.14	-1.08	1.36	0.8006
	2	-1.17	-2.72	0.38	0.1220
Ringe	labor				
	1	0.14	-0.05	0.33	0.1270
	2	-0.03	-0.10	0.04	0.3434
Chromatidtyp	labor				
	1	0.10	-0.13	0.33	0.3485
	2	0.01	-0.01	0.03	0.3434
Mikrokerne	labor				
	1	0.09	-0.70	0.88	0.8022
	2	-0.32	-1.82	1.18	0.6398
Schwesterchromatid-austausche	labor				
	1	0.66	-9.80	11.12	0.8896
	2	0.80	-2.38	3.98	0.5837
Log mediane DNA im Kopf (%)	labor				
	1	-0.01	-0.04	0.02	0.3309
	2	-0.00	-0.11	0.10	0.9357
	labor				
	3	-0.01	-0.10	0.09	0.8887

Jüngere Probanden

Trendscore von:		Mittelwert	95% KI Untere Grenze	95% KI Obere Grenze	P-Wert
Log-Olive-Tail-Moment	labor				
	1	-0.01	-0.04	0.02	0.3991
	2	0.00	-0.11	0.11	1.0000
	3	-0.02	-0.12	0.09	0.6987

In Tabelle 26 sind die Ergebnisse des Permutationstests für die älteren Probanden dargestellt.

Tabelle 26: Analyseergebnisse nur für die älteren Probanden (n=10)

Variable (ältere Probanden)	Labor	Z-Wert und Schätzer	p-Wert
<b>Dizentrische Chromosomen Permutationstest</b>	1	1.194	0.2708
	2	-0.4472	1
	3	2.7563	<b>0.00212</b>
<b>Extra azentrische Chromosomen Permutationstest</b>	1	1.6409	0.1083
	2	0.8556	0.4308
	3	-0.5503	0.6074
<b>Ringe Permutationstest</b>	1	1.2243	0.3176
	2	.	.
	3	2.3202	<b>0.02211</b>
<b>Chromatid-Typ Permutationstest</b>	1	.	.
	2	.	.
	3	1.6798	0.09882
<b>Summe aus geschädigten Chromosomen Permutationstest</b>	1	2.123	<b>0.03438</b>
	2	0.811	0.4571
	3	0.9591	0.3546
<b>Mikrokerne Permutationstest</b>	1	0.4399	0.6708
	2	-0.6993	0.5009
	3	0.4974	0.635
<b>Schwesterchromatidaustausche Permutationstest</b>	1	0.2593	0.8004
	2	0.4044	0.6917
	3	0.1681	0.8698
<b>Log mediane DNA im Kopf (%) PROC MIXED</b>	1	0.01555	0.2742
	2	-0.01965	0.6867
	3	0.01755	0.6424
<b>Log-Olive-Tail-Moment PROC MIXED</b>	1	0.02707	0.1434
	2	-0.02503	0.6328
	3	0.03907	0.3497

Im Permutationstest ergaben sich 3 p-Werte kleiner 0,05 (Dizentrische Chromosomen, Ringe, Summe geschädigter Chromosomen). Diese p-Werte wurden jedoch nur jeweils in einem Labor ermittelt.

Tabelle 27: Test auf Dosistrend und Mittelwerte der Trend-Scores mit 95% Konfidenzintervallen für die neun Gentoxizitätendpunkte nur für ältere Probanden

Ältere Probanden			95% KI	95% KI	
Trendscore von:		Mittelwert	Untere Grenze	Obere Grenze	P-Wert
Summe aus geschädigten Chromosomen	labor				
	1	0.69	0.03	1.35	<b>0.0413</b>
	2	0.16	-0.33	0.65	0.4800
Dizentrische Chromosomen	labor				
	1	0.15	-0.18	0.48	0.3294
	2	-0.01	-0.03	0.01	0.3434
Extra azentrische Chromosomen	labor				
	1	0.47	-0.09	1.03	0.0897
	2	0.17	-0.32	0.66	0.4516
Ringe	labor				
	1	0.07	-0.07	0.21	0.2712
	2	0.00	.	.	.
Chromatidtyp	labor				
	1	0.00	.	.	.
	2	0.00	.	.	.
Mikrokerne	labor				
	1	0.62	-1.92	3.16	0.5939
	2	-1.28	-3.75	1.19	0.2712
Schwesterchromatid-austausche	labor				
	1	1.59	-11.0	14.15	0.7811
	2	1.90	-2.75	6.55	0.3798
Log mediane DNA im Kopf (%)	labor				
	1	0.02	-0.01	0.05	0.2742
	2	-0.02	-0.13	0.09	0.6867
	3	0.02	-0.07	0.10	0.6424

Ältere Probanden					
Trendscore von:		Mittelwert	95% KI Untere Grenze	95% KI Obere Grenze	P-Wert
Log-Olive-Tail-Moment	labor				
	1	0.03	-0.01	0.07	0.1434
	2	-0.03	-0.14	0.09	0.6328
	3	0.04	-0.05	0.13	0.3497

Die Dosistrendanalyse zeigt, dass auch für die 10 älteren Probanden zumeist keine p-Werte  $< 0,05$  auftreten. Nur bei einigen Zielvariablen des Chromosomenaberrations-Tests kommt es zu p-Werten kleiner 0.05. Dies bezieht sich aber wieder, wie auch schon bei den Ergebnissen der Gesamtpopulation auf jeweils 1 Labor pro Zielvariable. Durch die einzelnen signifikanten Werte wird zwar der Verdacht auf einen Befeldungseffekt bei den älteren Probanden generiert, die Bestätigung der Werte durch ein zweites Labor ist jedoch nicht gegeben.

### 3.2.4 Differenzen zu Sham

Neben den Dosistrends bzw. Dosis-Wirkungsbeziehungen sind auch die Differenzen der einzelnen Dosisgruppen zur Sham-Exposition (0 W/Kg) von Interesse.

In den folgenden Abbildungen werden die Differenzen zur Shamgruppe graphisch dargestellt. Damit die Differenzen der Expositionen Low bis High (0,2; 2;10 W/Kg) zur Sham Exposition besser sichtbar werden, wurden bei den folgenden Abbildungen die y-Achsen angeglichen. Die erste Referenzlinie ist immer die Nulllinie, die zweite Referenzlinie deutet an, dass ab hier eine neue Skala anfängt. Die Einheiten werden jeweils in der Abbildungsbeschriftung angegeben.

Hinweis: Für die folgenden neun Abbildungen gilt:

Auf der x-Achse sind jeweils die 3 Labore mit 1, 2 und 3 gekennzeichnet. An erster Stelle steht jeweils die Differenz von Low zu Sham, an zweiter Stelle die Differenz von Medium zu Sham, an dritter Stelle die Differenz von High zu Sham und an vierter Stelle die Differenz von der Positivkontrolle (rot) zu Sham.

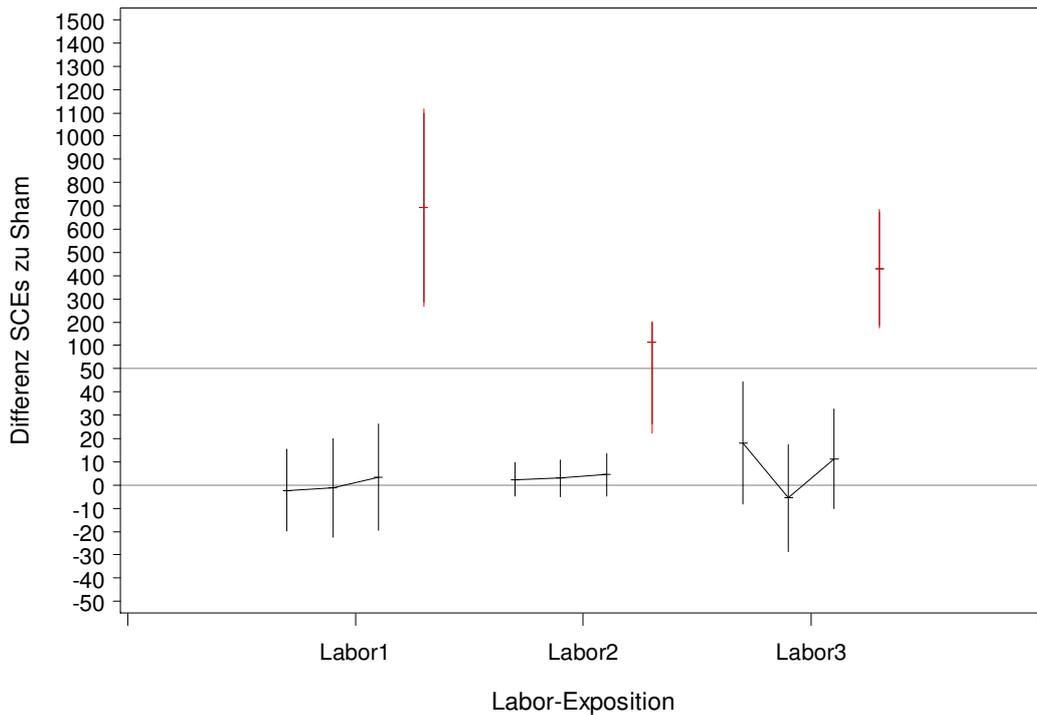


Abbildung 21: Schwesterchromatidaustausche: Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für die drei Labore (y-Achse: bis 50 in 10er Schritten ab 100 in 100er Schritten)

Die Abbildung 21 zeigt, dass die SCE-Werte der 3 SAR-Werte im Bereich der Negativkontrolle (Sham) liegen.

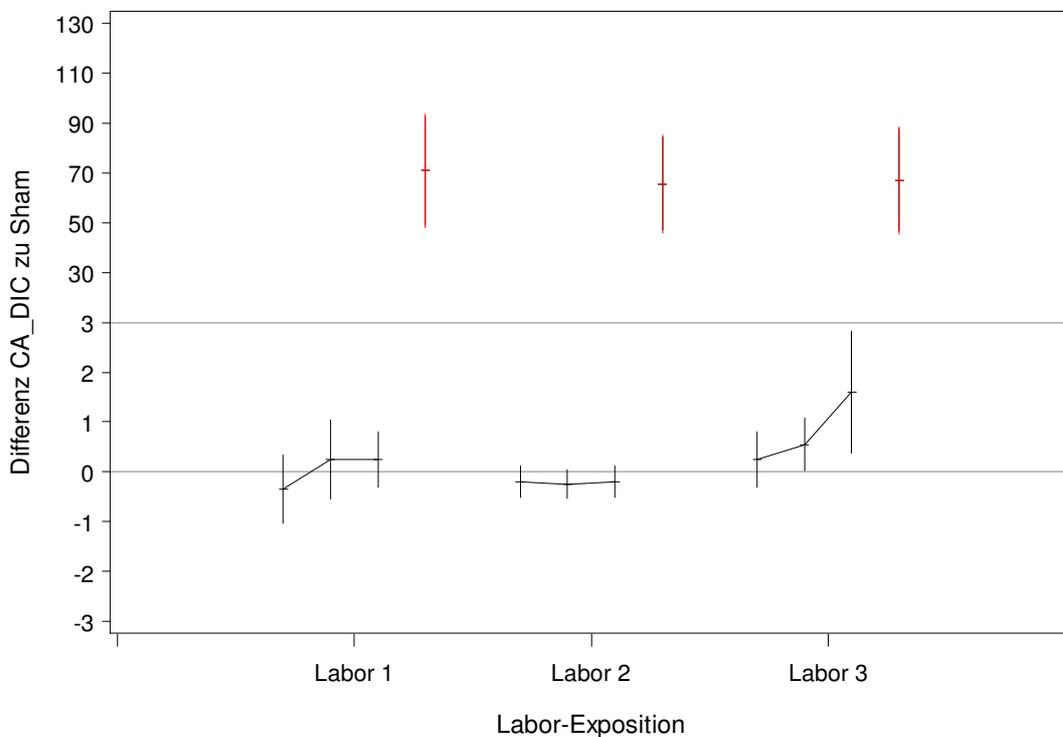


Abbildung 22: Dizentrische Chromosomen: Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für die drei Labore ( y-Achse: bis 3 in einer Schritten ab 30 in 20er Schritten)

Die Kurven in Abbildung 22 zeigen, dass bei 2 Laboren die Werte der Dosisgruppen 0,2, 2 und 10 Watt/Kg im Bereich der Werte der Sham (Scheinexposition) liegen. Bei Labor 3 gibt es einen Anstieg der Werte mit der Dosis. Letzteres war auch schon anhand der Dosistrendanalysen erkennbar. Die Grafik zeigt jedoch, dass es sich um kleine Differenzen handelt und nur die höchste Dosis deutlich über der Sham liegt.

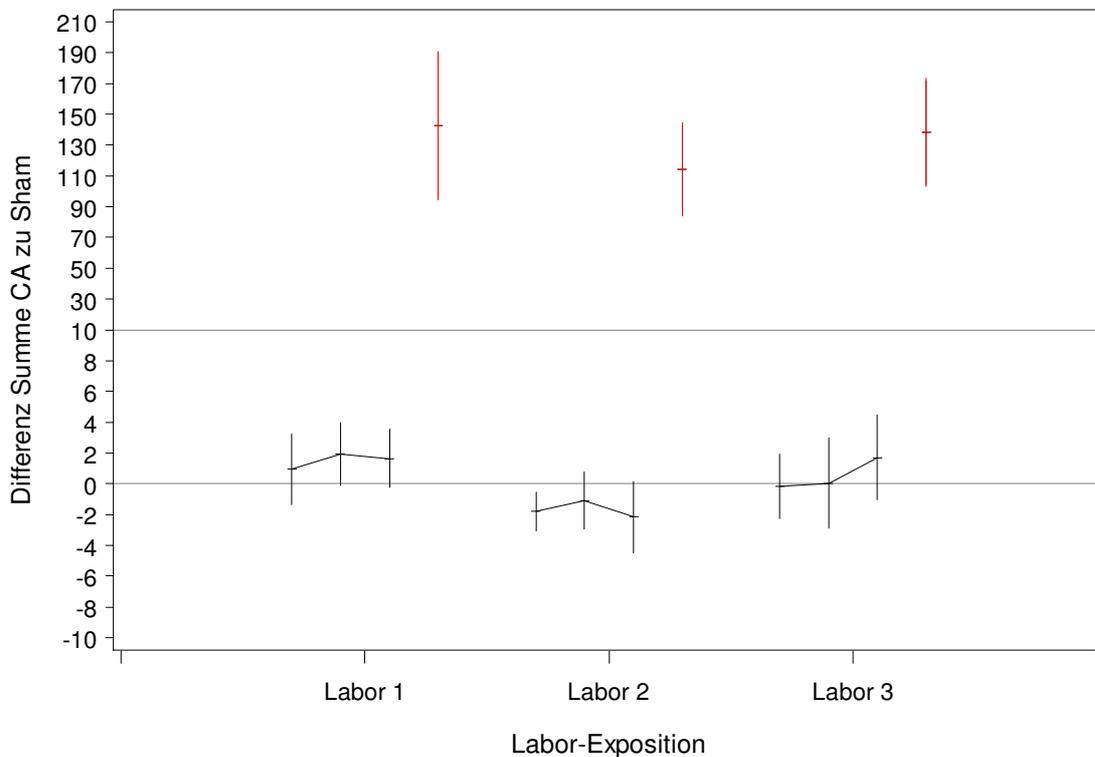


Abbildung 23: Summe CA: Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für die drei Labore ( y-Achse: bis 10 in 2er Schritten ab 10 in 20er Schritten)

Entsprechend der Trendanalyse ist in Abbildung 23 bei allen 3 Laboren keine Dosisabhängigkeit der Summe der geschädigten Chromosomen zu erkennen. Die Werte aller Labore liegen im Bereich der Sham-Exposition.

Die Positivkontrollen sind bei den 3 Laboren deutlich gegenüber der Sham-Exposition erhöht.

Ein ähnliches Bild zeigt die Abbildung 24, in der die Differenzen der verschiedenen SAR-Werte zur Sham-Exposition des Endpunktes extra azentrische Chromosomen dargestellt sind. Kein Dosistrend. Die für die SAR-Werte gemessenen Werte liegen im Bereich der Sham-Exposition. Die Positivkontrollen sind bei allen Laboren deutlich gegenüber der Sham erhöht.

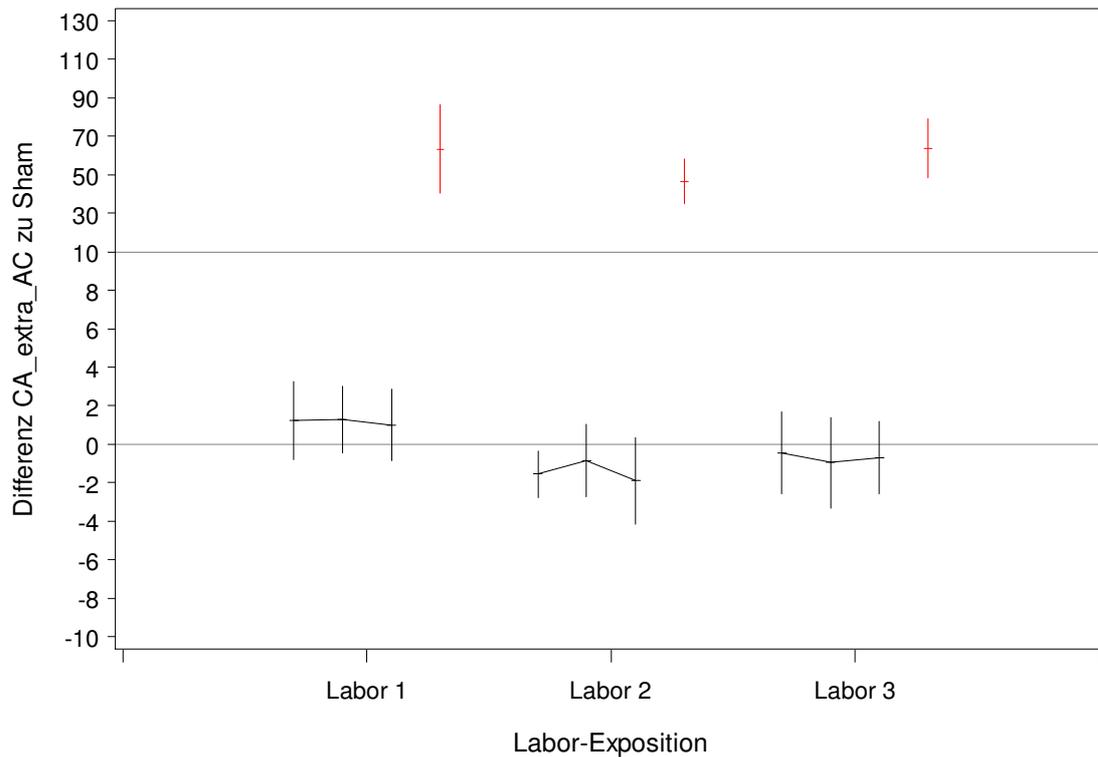


Abbildung 24: Extra azentrische Chromosomen: Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für die drei Labore ( y-Achse: bis 10 in 2er Schritten ab 10 in 20er Schritten)

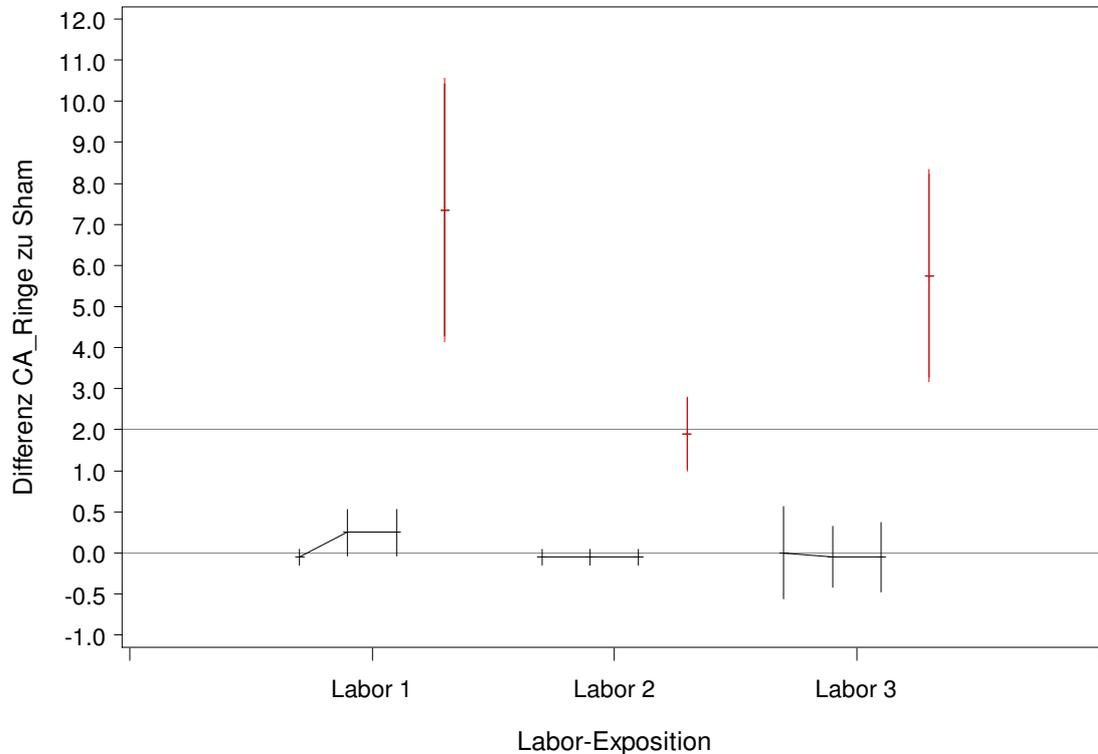


Abbildung 25: Ringe: Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für die drei Labore ( y-Achse: bis 1 in 0.5er Schritten ab 1 in einer Schritten)

Auch bei den Ring-Aberrationen sind keine Differenzen gegenüber der Sham-Exposition zu sehen.

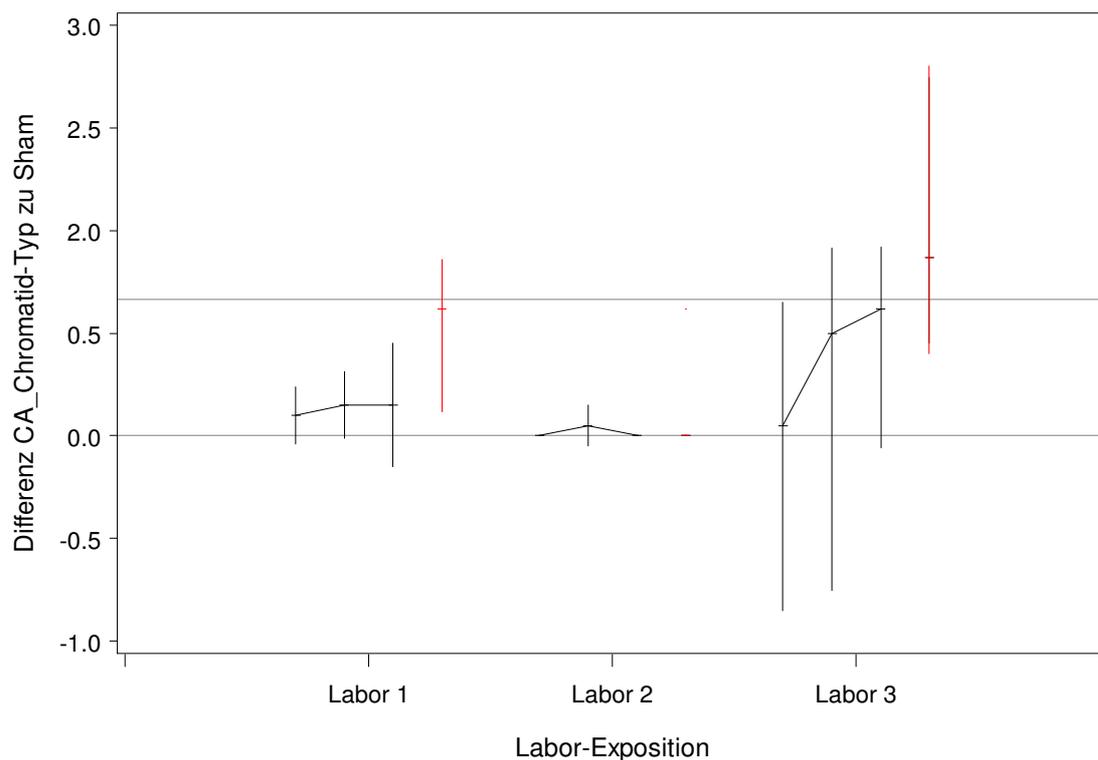


Abbildung 26: Chromatidtyp Aberration: Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für die drei Labore ( y-Achse: bis 1 in 0.5er Schritten ab 1 in einer Schritten).

Die Chromatidtyp Aberrationen zeigen auch in den Positivkontrollen niedrige Werte, da die Bestrahlung der Zellen in der Zellzyklusphase  $G_0$  stattfand und somit keine einzelnen Chromatide treffen konnte. Insgesamt waren viele der für die verschiedenen Expositionsgruppen ermittelten Werte 0 (siehe Anhang Tab. 27-29). Auch bei den verschiedenen SAR-Werten Wie schon die Trendanalysen veranschaulichen, sind auch in dieser Darstellung bei dem Parametern Chromatidtyp-Aberration Dosiseffekte bei Labor 3 zu sehen. Die Differenzen zur Sham-Exposition insgesamt sind sehr niedrig, die Streuungen hingegen relativ hoch.

Die Abbildung 27 zeigt die Differenzen der mittleren Mikrokernzahl/2000 binukleare Zellen von SAR-Werten zur Sham-Exposition. Die Mittelwerte der befeldeten Proben weichen im Bereich der Streuung nicht von den Sham-Mittelwerten ab. Die Positivkontrollen hingegen zeigen einen deutlichen Effekt in allen Laboren.

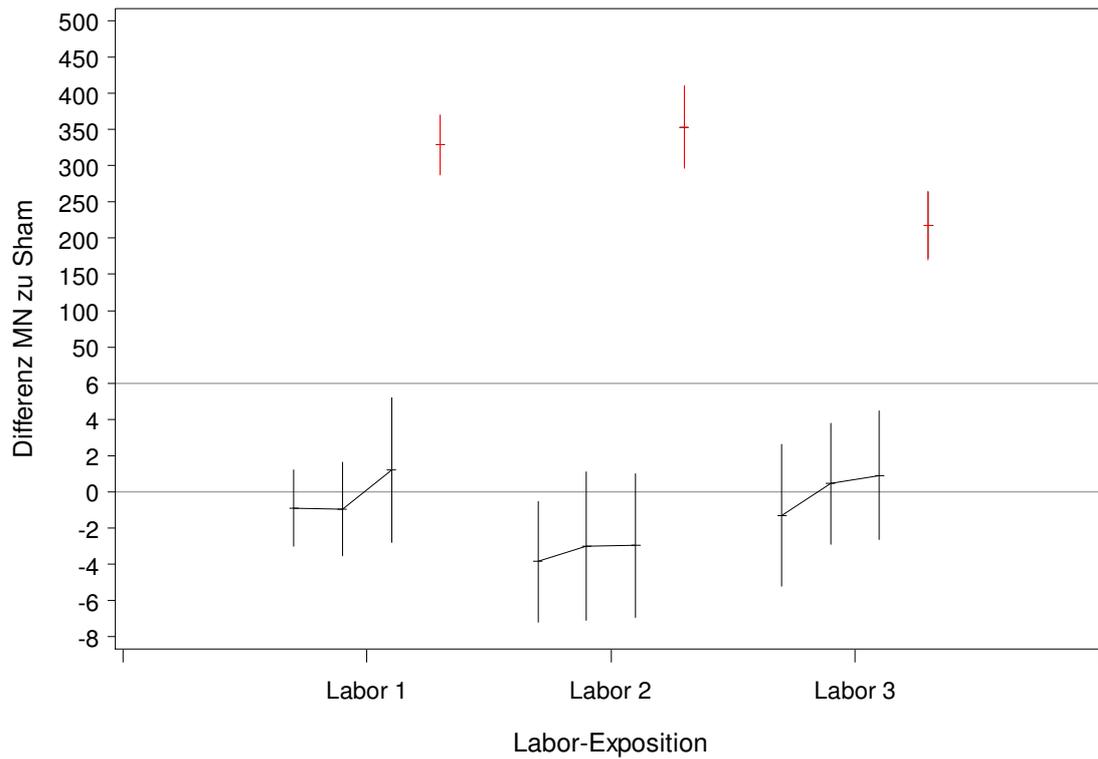


Abbildung 27: Mikrokerne: Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für die drei Labore (y-Achse: bis 6 in zweier Schritten ab 50 in 50er Schritten)

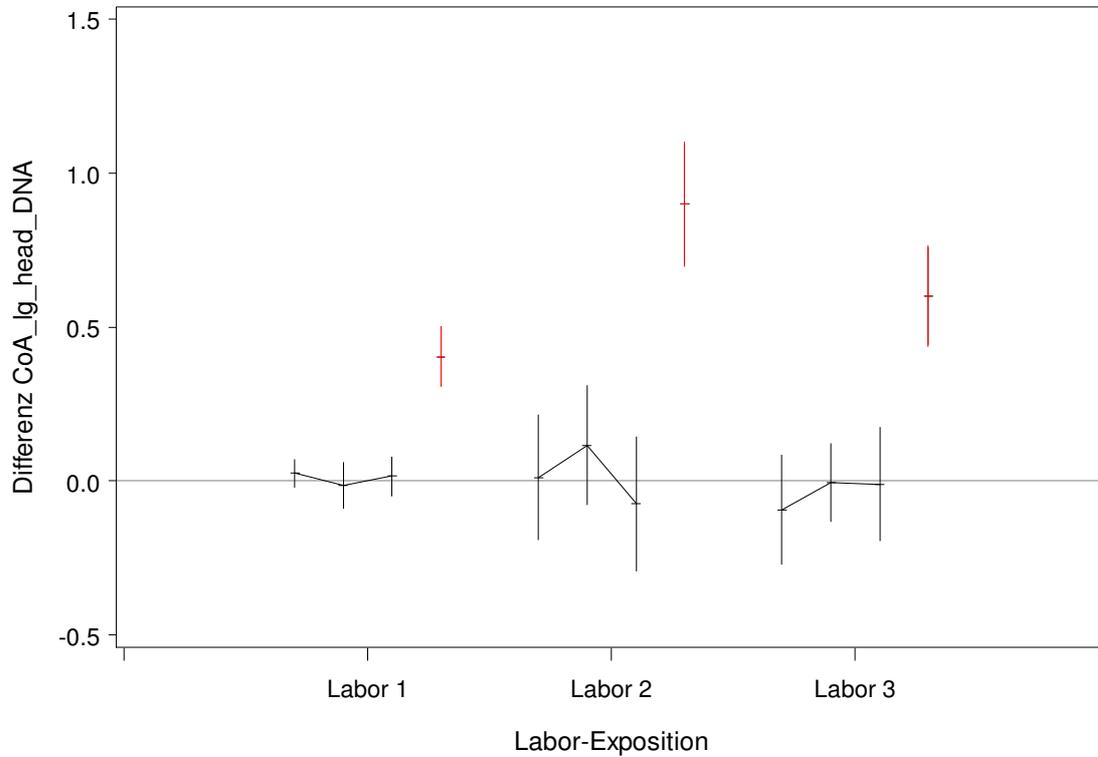


Abbildung 28: Log(10)- mediane DNA im Kopf: Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für die drei Labore.

Die Mittelwerte des Cometassay-Endpunktes % DNA im Kopfbereich (Abb. 28: hier angegeben als lg DNA im Kopf) weichen ebenfalls nur im Rahmen der Streuung von den Mittelwerten der Sham-Exposition ab. Ein entsprechendes Bild zeigt bei den Olive Tailmomenten (OTM, Abb.: 29). Die Positivkontrollen zeigen deutlich erhöhte Werte.

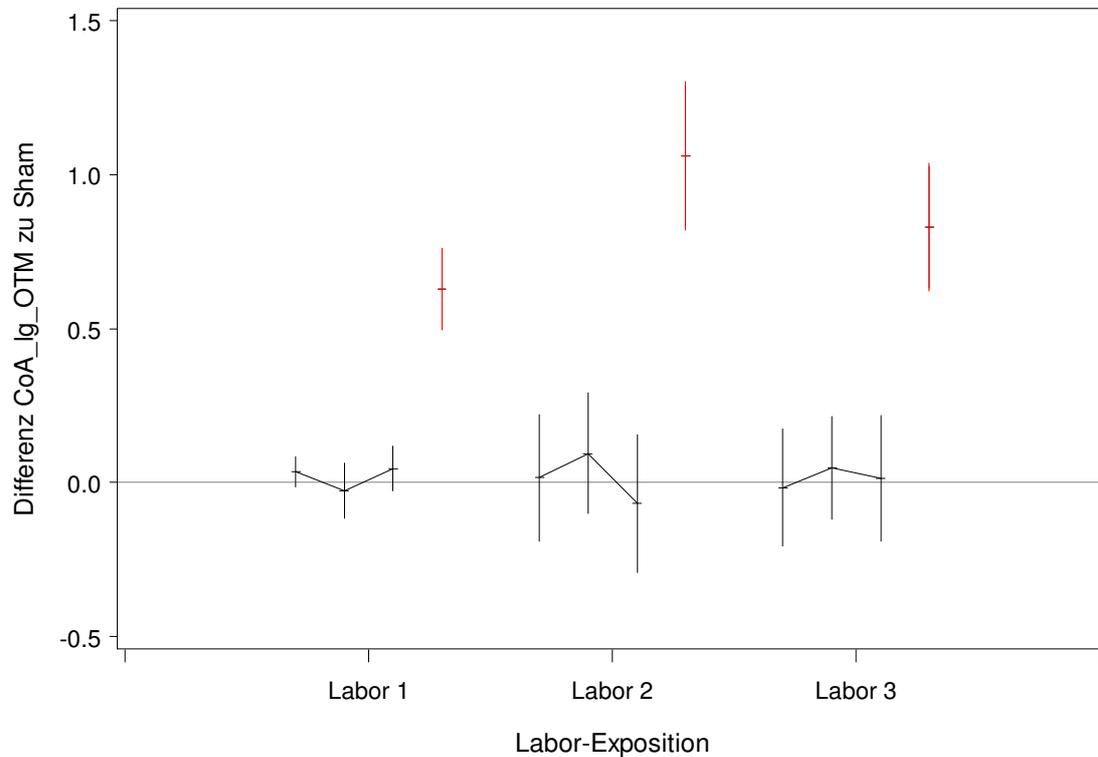


Abbildung 29: Log-Olive-Tail-Moment: Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für die drei Labore.

In der folgenden Tabelle sind die Mittelwertsdifferenzen, deren Konfidenzintervalle und p-Werte für alle 9 Zielvariablen getrennt nach Laboren und Expositionsgruppe aufgeführt.

Die Differenzen von der Positivkontrolle zur Sham-Gruppe sind verständlicherweise jeweils signifikant unterschiedlich. P-Werte kleiner 0.05 – die Positivkontrolle ausgenommen - sind fett gedruckt.

Tabelle 28: Differenzen zur Sham Exposition für alle 20 Probanden getrennt nach Labor und Expositionsgruppe (EG). Einige Werte der Positivkontrollen im SCE-Test wurden bei der Berechnung weggelassen, da hier höhere Konzentrationen von Mitomycin C eingesetzt wurden, so dass keine Mittelwertbildung möglich war. Für die Berechnung wurden die Positivkontrollen mit der niedrigeren Mitomycin C Konzentration ausgewählt.

		Labor											
		1			2			3					
		MW	95% Konfidenz- intervall		p- Wert	MW	95% Konfidenz- intervall		p-Wert	MW	95% Konfidenz- intervall		p-Wert
Summe geschädigter Chromosomen	EG												
	2	0.95	-1.42	3.32	0.4127	-1.80	-3.09	-0.51	<b>0.0089</b>	-0.15	-2.35	2.05	0.8881
	3	1.95	-0.18	4.08	0.0710	-1.10	-3.04	0.84	0.2509	0.05	-3.04	3.14	0.9733
	4	1.65	-0.34	3.64	0.0984	-2.15	-4.58	0.28	0.0792	1.70	-1.17	4.57	0.2307
	5	142.6	94.22	190.9	<.0001	114.2	83.94	144.4	<.0001	138.1	102.9	173.2	<.0001
Dizentrische Chromosomen	EG												
	2	-0.35	-1.07	0.37	0.3195	-0.20	-0.53	0.13	0.2141	0.25	-0.34	0.84	0.3828
	3	0.25	-0.58	1.08	0.5359	-0.25	-0.55	0.05	0.0961	0.55	-0.01	1.11	0.0528
	4	0.25	-0.34	0.84	0.3828	-0.20	-0.53	0.13	0.2141	1.60	0.33	2.87	<b>0.0165</b>
	5	70.95	48.19	93.71	<.0001	65.60	45.90	85.30	<.0001	67.00	45.50	88.50	<.0001
Extra azentrische Chromosomen	EG												
	2	1.25	-0.86	3.36	0.2310	-1.55	-2.82	-0.28	<b>0.0190</b>	-0.45	-2.67	1.77	0.6759
	3	1.30	-0.52	3.12	0.1506	-0.85	-2.80	1.10	0.3735	-0.95	-3.41	1.51	0.4289
	4	1.00	-0.93	2.93	0.2909	-1.90	-4.27	0.47	0.1092	-0.70	-2.68	1.28	0.4685
	5	63.40	40.33	86.47	<.0001	46.65	34.88	58.42	<.0001	63.70	48.22	79.18	<.0001
Ringe	EG												
	2	-0.05	-0.15	0.05	0.3299	-0.05	-0.15	0.05	0.3299	0.00	-0.59	0.59	1.0000
	3	0.25	-0.05	0.55	0.0961	-0.05	-0.15	0.05	0.3299	-0.05	-0.44	0.34	0.7894
	4	0.25	-0.05	0.55	0.0961	-0.05	-0.15	0.05	0.3299	-0.05	-0.49	0.39	0.8154
	5	7.35	4.13	10.57	0.0001	1.90	0.99	2.81	0.0003	5.75	3.17	8.33	0.0002
Chromatid-Typ	EG												
	2	0.10	-0.04	0.24	0.1625	0.00	.	.	.	0.05	-0.89	0.99	0.9127
	3	0.15	-0.02	0.32	0.0828	0.05	-0.05	0.15	0.3299	0.50	-0.81	1.81	0.4345
	4	0.15	-0.16	0.46	0.3299	0.00	.	.	.	0.85	-0.10	1.80	0.0770
	5	0.85	0.12	1.58	0.0253	0.00	.	.	.	1.60	0.40	2.80	0.0116
Mikrokerne	EG												
	2	-0.90	-3.08	1.28	0.3981	-3.85	-7.34	-0.36	<b>0.0322</b>	-1.30	-5.40	2.80	0.5152
	3	-0.95	-3.66	1.76	0.4714	-3.00	-7.31	1.31	0.1611	0.45	-3.04	3.94	0.7900
	4	1.20	-2.96	5.36	0.5534	-2.95	-7.10	1.20	0.1531	0.90	-2.80	4.60	0.6166
	5	328.7	287.6	369.7	<.0001	353.5	296.2	410.7	<.0001	217.9	170.5	265.2	<.0001
Schwesterchro- matid- austausche	EG												
	2	-2.25	-20.6	16.06	0.7998	2.35	-5.19	9.89	0.5218	18.15	-9.35	45.65	0.1831
	3	-1.20	-23.5	21.11	0.9115	2.80	-5.47	11.07	0.4870	-5.70	-29.7	18.28	0.6245
	4	3.40	-20.5	27.31	0.7692	4.35	-5.16	13.86	0.3506	11.25	-11.1	33.58	0.3049
	5	692.9	268.8	1117	0.0029	112.5	22.17	202.8	0.0173	430.1	174.1	686.1	0.0023

		Labor										
		1			2			3				
		MW	95% Konfidenz- intervall	p- Wert	MW	95% Konfidenz- intervall	p-Wert	MW	95% Konfidenz- intervall	p-Wert		
Log mediane DNA im Kopf (%)	EG											
	2	0.02	-0.03 0.07	0.3479	0.04	-0.17 0.26	0.6769	-0.05	-0.23 0.13	0.5495		
	3	-0.02	-0.10 0.06	0.6526	0.16	-0.05 0.37	0.1372	0.04	-0.12 0.19	0.6126		
	4	0.01	-0.05 0.08	0.6617	-0.04	-0.28 0.19	0.6987	0.03	-0.17 0.24	0.7409		
	5	0.40	0.30 0.50	<.0001	0.93	0.74 1.13	<.0001	0.64	0.47 0.81	<.0001		
Log-Olive-Tail- Moment	EG											
	2	0.03	-0.02 0.08	0.2307	0.06	-0.16 0.28	0.5855	0.02	-0.18 0.21	0.8551		
	3	-0.03	-0.13 0.07	0.5100	0.15	-0.07 0.36	0.1701	0.08	-0.11 0.28	0.3749		
	4	0.04	-0.03 0.12	0.2515	-0.03	-0.27 0.21	0.8138	0.05	-0.18 0.28	0.6541		
	5	0.63	0.49 0.76	<.0001	1.10	0.87 1.34	<.0001	0.86	0.65 1.07	<.0001		

Da bei einigen Probanden bei den Schwesterchromatidaustauschen bei der Positivkontrolle höhere Konzentrationen Mitomycin C eingesetzt wurden, werden nun noch die Mittelwertsdifferenzen (MWD, nur SCE Positivkontrolle) aufgeführt, wenn alle Probanden mit den höheren Konzentrationen nicht mit in die Analyse eingehen: Labor 1: MWD = 122.1 Labor 2: MWD = 102.4 Labor 3: MWD = 108.5

Bei den Zielvariablen „Summe aus geschädigten Chromosomen“, „Dizentrische Chromosomen“, „Extra azentrische Chromosomen“ und bei den „Mikrokernen“ ergeben sich in jeweils einem Labor (dreimal Labor 2, einmal Labor 3) p-Werte kleiner 0.05.

Die drei signifikanten Mittelwertsdifferenzen von Labor 2 sind bei der niedrigsten Dosis zu finden und sind negativ, d.h. die Mittelwerte der Sham-Exposition liegen höher als die der niedrigsten Dosis (0,2 W/kg). Die Mittelwerte der anderen SAR-Werte liegen ebenfalls im Bereich der niedrigsten Dosis, sind jedoch aufgrund der höheren Streuung der Werte nicht signifikant.

Die signifikante Mittelwertsdifferenz bei den dizentrischen Chromosomen - ermittelt von Labor 3 – tritt in der höchsten Dosis (10 W/kg) auf. Im Trendscore waren auch schon p-Werte kleiner 0,05 zu sehen, was auf einen Dosis-abhängigen Effekt hinweist. Die Mittelwertsdifferenzen zur Sham-Exposition der niedrigen und mittleren Dosis waren jedoch nicht signifikant.

## 4. Diskussion

### 4.1 Bewertung der Daten aus biometrischer Sicht (IMBEI)

In der Studie wurde an zehn jüngeren und zehn älteren männlichen Probanden geprüft, ob hochfrequente elektromagnetische Felder eine dosisabhängige genschädigende Wirkung auf stimulierte periphere Lymphozyten haben. Dazu wurden den Probanden Blutproben entnommen und mit unterschiedlichen SAR-Werten befeldet (0 W/kg – sham, 0,2 W/kg –low, 2 W/kg – medium, 10 W/kg – high). Nach der Befeldung erfolgte die Herstellung stabiler Präparate von 4

zytogenetischen Tests (Chromosomenaberration, Mikrokerntest, Schwesterchromatidaustausche und Cometassay). Die Präparate wurden in jeweils 3 Laboren ausgewertet. Die Expositionsinformationen waren bis zur statistischen Auswertung für alle Projektteilnehmer verblindet. Aus den 4 Gentoxizitätstests resultierten insgesamt 9 Zielgrößen.

Im statistischen Analyseplan wurde vor der Entblindung die Analysemethode für jede Zielgröße festgelegt (ein vorsepezifiziertes gemischtes lineares Modell für die logarithmierten Zielgrößen des Cometassays und Permutationstests für die übrigen Zielgrößen). Der Analyseplan sieht getrennte Analysen für jedes Labor vor, da das Blind Data Review starke Laboreffekte ergab, die ein Zusammenfassen der Daten über Labore hinweg problematisch machen. Der Plan legt auch eine Strategie zur Interpretation multipler statistischer Tests fest. Danach gilt ein Dosiseffekt erst dann als statistisch bestätigt, wenn eine Zielgröße in zwei Laboren zum globalen Niveau 5% einen signifikanten Trend aufweist.

Die Daten der im statistischen Analyseplan festgelegten Zielvariablen waren vollständig vorhanden. Daher mussten keine fehlenden Werte bei der statistischen Analyse berücksichtigt werden.

Beim Cometassay, Mikrokerntest und dem SCE-Test ergaben sich in keinem der 3 Labore und bei keinem Trendtest p-Werte unter 0,05.

Beim Chromosomenaberrationstest ergaben sich beim Permutationstest zur primären Analyse zwei p-Werte unter 0,05. Labor 1 hat bei der Zielvariablen CA-Ringe einen p-Wert von 0,04 und bei Labor 3 ergab sich bei den dizentrischen Chromosomen ein hochsignifikanter p-Wert von 0,00024. Laut Analyseplan soll innerhalb eines Assays und zum globalen Niveau 0,05 getestet werden. Da fünf Arten von Chromosomenaberrationen geprüft wurden, lautet der nach Bonferroni korrigierte p-Wert  $5 \times 0,00024 = 0,0012$ . Kriterium 2 des Analyseplans ist damit erfüllt und somit liegt ein *ernster Verdacht* vor.

Nach Punkt 3 des Analyseplans ist der p-Wert mit der korrigierten Schranke  $0,0125 = 0,05/4$  zu vergleichen, da vier Assays durchgeführt wurden. Auch auf dem so korrigierten Niveau ist das Ergebnis für Labor 3 signifikant. Da dies allerdings in keinem der anderen Labore repliziert wurde (alle p-Werte über 0,1), gilt der Dosiseffekt von Labor 3 als nicht bestätigt.

Der Analyseplan sieht vor, im Sinne einer Sensitivitätsanalyse, zusätzlich alle Dositrends auch mit einem Rang-Trend-Test, dem Page-Test zu prüfen. Die Ergebnisse waren denen der primären Analyse sehr ähnlich und ergaben keine neuen Hinweise. Bei den dizentrischen Chromosomen (Labor 3) ergab sich beim Page-Trend-Test ein p-Wert von 0,0002.

Die Trendscoreanalysen wurden auch für beide Altersgruppen getrennt durchgeführt. Es fällt auf, dass in keinem Labor und bei keiner Zielvariablen ein signifikanter Trend

bei den jüngeren Probanden festzustellen war. Der für die dizentrischen Chromosomen gefundene Trend von Labor 3 fand sich nur in der älteren Probandengruppe wieder.

Die Positivkontrollen zeigten in allen Zielgrößen (ausgenommen die Chromatidtyp Aberration – hier waren niedrigere Differenzen) und in allen Laboren sehr starke und statistisch signifikante Unterschiede zu allen anderen Expositionsdosen. Qualitativ kann daraus geschlossen werden, dass auch Labor 1 und Labor 2 einen Auswertungsstandard hatten, der ausreicht, um einen Effekt auf dizentrische Chromosomen aufzudecken.

In allen neun Zielgrößen zeigten sich starke Laboreffekte. Für die Interpretation der Dosiseffekte ist das zunächst nicht bedeutsam. Die Tatsache, dass ein Effekt in einem Labor gefunden wurde und in keinem anderen repliziert wurde, ist vor diesem Hintergrund jedoch plausibel und streicht die Notwendigkeit der Replikation heraus. Darüber hinaus ist zu beachten, dass die Befundung der Chromosomenaberrationen in Labor 3 für die Dosen oftmals von verschiedenen Personen vorgenommen wurde.

Mit Ausnahme des Kriteriums „dizentrische Chromosomen“ in Labor 3 zeigte sich statistisch kein signifikanter Dosisstrend. Ob damit ein relevanter Dosiseffekt positiv ausgeschlossen werden kann, lässt sich durch Begutachtung der Effektschätzer und Konfidenzintervalle beurteilen (Tabelle 20 und Abbildungen 20 bis 28).

Welche Schlüsse aus einer Studie an 20 Probanden sind aus statistischer Sicht zulässig?

Das Hauptergebnis der Studie muss als Durchschnittsaussage verstanden werden. Die Studie war nicht angelegt, die individuelle Heterogenität in Hinblick auf Strahlensensibilität zu untersuchen. Somit kann aufgrund der Ergebnisse auch nicht positiv ausgeschlossen werden, dass in seltenen Einzelfällen Menschen gentoxische Befundungseffekte zeigen. Ein solcher Effekt könnte aber nicht weit verbreitet sein, da sonst auch unter den zwanzig Probanden auch im Durchschnitt ein Trend erkennbar wäre.

## **4.2 Bewertung der Daten aus biologischer Sicht**

### **4.2.1 Laborunterschiede**

Zu Beginn des Projektes wurden von allen Projektpartnern gemeinsam Auswertekriterien definiert, nach denen jedes Labor bei der Auswertung vorgehen sollte. Zur Überprüfung wurde ein Pretest mit allen 4 Testsystemen und mit verschiedenen Dosen ionisierender Strahlung durchgeführt. Die Abweichungen der Ergebnisse der 3 Labore waren bei bestrahlten Proben  $\leq 30\%$ . Die Streuung der Negativkontrollen waren prozentual größer, da hier vor allen bei den klassischen cytogenetischen Tests (CA, SCE, MN) die Werte nahezu bei null lagen. Auffallend war, dass bei Labor 2 die Werte des SCE-Tests tiefer lagen als die der beiden

anderen Labore. Dieser Unterschied konnte in diesem Fall auf eine qualitativ schlechtere mikroskopische Ausstattung bei Labor 2 zurückgeführt werden. Die Werte des Cometassays streuten bei prozentualen Werten (Schweif-DNA, Kopf-DNA) nur in sehr geringem Maße, wurden jedoch die Parameter verglichen, die mit realen Messwerten berechnet wurden, zeigten sich aufgrund von unterschiedlich sensitiven Analysesystemen und mikroskopischen Ausstattungen erhebliche Differenzen zwischen den Labors. Es wurde daraufhin – soweit möglich – eine Angleichung des Equipments vorgenommen (Verwendung von Objektiven mit gleicher Vergrößerung).

In der Hauptstudie wurden zum Laborvergleich der verschiedenen Endpunkte der jeweiligen Assays Friedman-Tests durchgeführt. Diese ergaben signifikante systematische Unterschiede zwischen den Laboren bei allen Zielvariablen (Tabelle 12). Gemittelt wurden dabei alle Expositiongruppen bis auf die Positivkontrollen. Insgesamt zeigten fast bei allen Endpunkten 2 Labore vergleichbare Werte, während ein Labor stärker abwich. Die Abweichungen waren zumeist auf Labor 2 zurückzuführen (5 von 9 Zielvariablen, SCE und CA-Endpunkte), das – abgesehen vom Mikrokerntest - insgesamt niedrigere Werte ermittelte, als die beiden anderen Labore. Dabei ist zu berücksichtigen, dass Chromosomenaberrationen bei allen Expositiongruppen und Laboren (außer PK), trotz der hohen Anzahl an untersuchten Metaphasen sehr seltene Ereignisse waren und die Werte der einzelnen CA-Zielvariablen sehr niedrig sind, so dass schon geringe Abweichungen signifikant werden können. Im Pretest, wo infolge ionisierender Strahlung höhere Werte der CA-Zielvariablen auftraten, waren keine Unterschiede zwischen den Laboren zu sehen. Die Werte der Positivkontrollen waren in allen 3 Laboren deutlich erhöht und hoch signifikant. Die Abweichungen der Labore für die CA-Zielvariablen im Pretest lagen mit 2-20 % in einem Bereich, der auch schon im Rahmen von Ringversuchen für ISO-Guidelines bei (mit bis zu 5 Gy) bestrahlten Blutproben ermittelt wurde ( $\pm 15\%$  - nur für dizentrische Chromosomen; Wilkins et al., 2008).

Die Tabelle 14 zeigt anhand der intraindividuellen Standardabweichung, dass zwischen den 3 Laboren auch Präzisionsunterschiede festzustellen waren. Die Zielvariablen „Mikrokerne, Summe der geschädigten Chromosomen und extra azentrische Chromosomen“ zeigten keine statistisch auffälligen Werte. Bei Schäden, die sehr selten auftreten, wie einige Aberrationstypen oder Zielvariablen, wo die Sensitivität des Testsystems stark von der mikroskopischen Ausstattung abhängt (vor allem Cometassay, aber auch SCE-Test) konnten deutliche Präzisionsunterschiede zwischen den Laboren festgestellt werden. Labor 2, das bei vielen Zielvariablen niedrigere Werte ermittelte, wies auch geringere intraindividuelle Streuungen auf. Bei Labor 3, wo das auswertende Personal sehr oft wechselte, waren die intraindividuellen Standardabweichungen am größten.

Vor dem Hintergrund der Laborunterschiede war es für die Studie von erheblicher Bedeutung, dass sie in Form eines Ringversuches mit verblindeten Präparaten und 3 Laboren angelegt war.

## 4.2.2 Altersunterschiede

### Korrelation zum Alter

Spearman'sche Korrelationskoeffizienten der verschiedenen Zielvariablen zum Alter (Tabelle 13) zeigen Korrelationen vor allem bei den Zielvariablen des Mikrokerntests und des SCE-Tests. Bei der Mikrokernrate ist für den gesamten Datensatz eine stark positive Korrelation ( $r=0,89$ ) mit einem p-Wert von 0,0001 zu erkennen. Dass die Mikrokernrate mit dem Alter in peripheren Lymphozyten zunimmt, wurde schon in anderen Studien beschrieben (Fenech, 1998; Bonassi et al., 2005). Bei Fenech lagen die Korrelationskoeffizienten für männliche Probanden  $r= 0,62$  ( $p=0,0001$ ). Auch für das Auftreten von Schwesterchromatidaustauschen ist eine Alters-abhängige Zunahme bekannt (Bolognesi et al, 1997). Bolognesi und Kollegen fanden jedoch ebenfalls eine Zunahme von Chromosomenaberrationen in humanen Lymphozyten mit zunehmendem Alter. In dieser Studie ist die Zielvariable Summe „geschädigter Chromosomen“ negativ mit dem Alter der Probanden korreliert ( $r=0,71$ ,  $p=0,0005$ ). Dieser Korrelationskoeffizient wird weitgehend durch die jüngeren Probanden bestimmt, die Werte der älteren Probanden zeigen keine negativen Korrelationen. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass die Sensitivität des Chromosomenaberrationstests geringer ist als die des Mikrokerntests, da mit dem CA-Test nur die Schäden der Zellen erfasst werden, die sich zum Zeitpunkt der Colcemidgabe (3-4h) teilen (Werte sehr niedrig). Beim Mikrokerntest hingegen werden die Zellen, die sich in einem Zeitraum von 24-26 h teilen in der Untersuchung erfasst und es wurde die doppelte Anzahl an Zellen erfasst. Dementsprechend liegen die Basiswerte (Negativkontrollen) des Mikrokerntests deutlich höher als die des CA-Tests. Bolognesi und Kollegen haben von mehr als 2000 Probanden Werte von Chromosomenaberrationen, Mikrokernen und Schwesterchromatidaustauschen für ihre Studie verwendet, da gerade für die Korrelation von Chromosomenaberrationen und Alter widersprüchliche Daten publiziert waren. Die große Menge an Daten führte zu einer größeren Präzision.

Auch im t-Test zum Vergleich der beiden Altersgruppen (nur Sham-Exposition) wurden signifikante Mittelwertsdifferenzen ( $p<0,05$ ) ermittelt. Im Mikrokerntest waren die Mittelwertsdifferenzen aller 3 Labore erwartungsgemäß hoch signifikant. Des Weiteren traten bei einigen Zielvariablen in einem oder 2 jedoch nie in allen 3 Laboren p-Werte kleiner 0,05 auf. Die Zielvariablen des Cometassays sowie Dizenrische Chromosomen und Ringe zeigten keine signifikanten Unterschiede.

### Dosistrend getrennt nach Alter

In der primären Analyse (Permutationstest, Tabelle 24) wies jeweils ein Labor bei den Zielvariablen „dizenrische Chromosomen“ (Labor 3) und „Summe geschädigter Chromosomen“ einen signifikanten p-Wert auf. In der Hauptanalyse auf Dosistrend (Tabelle 25) konnten diese zwei statistisch auffälligen Ergebnisse nicht betätigt werden.

Im Permutationstest ergaben sich bei den älteren Probanden (Tabelle 26) bei 3 Zielvariablen des CA-Tests (Dizentrische Chromosomen – Labor 3, Ringe – Labor 3 und Summe der geschädigten Chromosomen) signifikante p-Werte. Diese Ergebnisse wurden durch die Trendscore-Analysen bestätigt. In der Hauptanalyse erwies sich auch der Endpunkt „Chromatidtyp Aberration“ in Labor 3 als signifikant auf einen Dosistrend. Alle anderen Tests wiesen bei keinem Labor signifikante Ergebnisse auf. Die signifikanten Ergebnisse bei 4 Zielvariablen des CA-Tests in jeweils einem Labor werfen den Verdacht eines Befeldungseffektes auf. Der Umstand, dass nur in jeweils einem Labor signifikante Dosistrends gefunden wurden, deutet daraufhin, dass hier kein begründeter Verdacht auf einen Dosistrend vorliegt. Drei der signifikanten Dosistrends wurden aus den Werten von Labor 3 berechnet (dizentr. Chromosomen, Ringe, Chromatidtyp Aberration), dennoch war in Labor 3 kein signifikanter Dosistrend bei der Summe der geschädigten Chromosomen zu verzeichnen. Dies gründet darauf, dass diese 3 Aberrationstypen bei den befeldeten Expositionsgruppen sehr seltene Ereignisse waren. Die Mittelwerte für alle 20 Probanden lagen bei allen 3 Laboren und Expositionsgruppen (außer Positivkontrolle) bei den Ringen bei 0, bei den dizentrischen Chromosomen bei 0-2 und bei der Chromatidtyp Aberration 0-2, wobei Labor 1 und 2 Mittelwerte von 0 aufwiesen (Tabellen 30-33). Auffällig ist, dass diese seltenen Ereignisse gerade in Labor 3 einen Dosistrend aufweisen, wo eine sehr hohe Fluktuation bei den auswertenden Mitarbeitern zu verzeichnen war.

#### **4.2.3 Analysen zum Dosistrend**

Die primäre Analyse der Daten auf einen Dosistrend (Cometassay-SAR-Prozedur Mixed; MN-, CA- und SCE-Test – Permutationstest; Tabellen 15-17) zeigt bei zwei Endpunkten des Chromosomenaberrationstests jeweils in einem Labor p-Werte kleiner 0,05. Bei den Zielvariablen handelt es sich um „Ringe“ und „dizentrische Chromosomen“. In der Hauptanalyse (Trendscores, Effektschätzer; Tabelle 20) bestätigte sich nur das Ergebnis für die dizentrischen Chromosomen. Es wurde jedoch noch ein weiterer p-Wert kleiner 0,05 bei der Zielvariablen Chromatidtyp Aberration ermittelt. Beide Hinweise auf einen Dosistrend wurden bei Labor 3 gefunden. In der Sensitivitätsanalyse (Page-Trend-Tests) bestätigten sich die beiden Trends und die Zielvariable „Ringe“ von Labor 1 wies ebenfalls wie im Permutationstest einen p-Wert kleiner 0,05 auf. Nach der Korrektur des Niveaus nach Bonferroni ( $0,05/5 = 0,01$ ), die laut Analyseplan vorgesehen ist, da es sich hier insgesamt um 5 Zielvariablen eines Tests handelt, verbleibt nur noch ein signifikanter Trend bei den dizentrischen Chromosomen bei Labor 3 ( $p=0,0002$ ). Bei Labor 1 und 2 zeigten die Werte der dizentrischen Chromosomen keinen signifikanten Trend. Die p-Werte lagen mit 0,18 und 0,23 deutlich über 0,05. Somit wurde der Verdacht der Befeldungseffektes, der durch die Ergebnisse von Labor 3 generiert wurde, nicht bestätigt. Wie schon unter Punkt 4.1 angeführt, ist anhand der Ergebnisse des

Pretests und der Positivkontrollen davon auszugehen, dass der Auswertestandard von Labor 1 und Labor 2 ausreicht, um eine Erhöhung von dizentrischen Chromosomen zu detektieren, zumal die intraindividuellen Standardabweichungen beider Labore geringer waren als die von Labor 3.

Die Untersuchung von 9 Endpunkten für Gentoxizität führte nur zu einem signifikanten Dositrend in einem Labor (dizentrische Chromosomen, Labor 3), der durch die anderen Labore nicht und auch nicht tendenziell bestätigt wurde, so dass insgesamt bei keinem der Endpunkte ein dosisabhängiger Effekt gefunden wurde. Auch die Werte der einzelnen Befeldungsdosen (0,2; 2; 10 W/kg) zeigen bis auf die Anzahl der dizentrischen Chromosomen bei Labor 3 in der höchsten Dosis keinen signifikanten Effekt (Tabelle 28, Abbildungen 20-28). Auch bei der höchsten Dosis von 10 W/kg, wo Temperaturerhöhungen zu verzeichnen waren, traten keine Effekte auf. Die Expositionsprotokolle zeigen jedoch auch nur geringe Temperaturerhöhungen von durchschnittlich 0,2 °C und maximal 0,35°C (auf alle Positionen in der Befeldungskammer bezogen). Kurzfristig traten an manchen Positionen in der Befeldungskammer auch Temperaturanstiege von 0,47 °C auf, die jedoch in der Phase in der die Befeldung ausgeschaltet war (off-Phase der Exposition; 5 min on, 10 min off) wieder absanken.

Die Dosis von 2 W/kg zeigte auch in Labor 3 keine signifikante Erhöhung von dizentrischen Chromosomen.

Ein Fehler 2. Art ist zwar grundsätzlich nicht auszuschließen, die Wahrscheinlichkeit eines solchen Fehlers wurde jedoch in dieser Studie durch die Maßnahmen „multiples Testen“ und „Adjustierung“ minimiert. Es wurden auch mehrere Methoden zum Nachweis von Gentoxizität mit ähnlichem Endpunkt verwendet. Bei einem positiven Trend bei den dizentrischen Chromosomen (Grundlage sind 2 Doppelstrangbrüche in G0,G1, Nachweis 1. Mitose) in einem Labor, müßte auch ein Trend oder erhöhte Werte im Mikrokerntest zu verzeichnen sein (Nachweis binukleare Zelle – 1. vollzogene Mitose, Basis: Doppelstrangbruch oder aneugener Effekt), was jedoch in keinem der 3 Labore der Fall war. Der alkalische Cometassay weist zwar Einzelstrang-, Doppelstrangbrüche und alkalilabile Stellen nur summarisch nach, aber auch hier war kein Hinweis auf erhöhte, dosis-abhängige Werte zu finden. Die Anzahl der dizentrischen Chromosomen zeigte in den anderen Laboren nicht den Ansatz eines Trends.

Ein Einfluss auf die Ergebnisse der Gentoxizitätstests von möglichen Befeldungsbedingten Effekten auf den Zellzyklus, kann ausgeschlossen werden, wie aus den Daten des im Rahmen des Mikrokerntests erhobenen CBPI hervorgeht (siehe 6.2.2). Der CBPI variierte von Proband zu Proband (unterschiedliche Stimulierbarkeit), zeigte aber keinen Dosis-abhängigen Trend.

Insgesamt wurden im Rahmen dieser Studie keine Befeldungseffekte für die getesteten Dosen im Hinblick auf Gentoxizität gefunden.

#### 4.2.4 Schlußfolgerungen

Ziel der Studie "Einfluss von GSM-Signalen auf isoliertes menschliches Blut. Gentoxizität" war es, mögliche DNA-, Chromosomen- und Genom-schädigende Wirkungen der für Mobilfunksysteme genutzten hochfrequenten elektromagnetischen Felder in Form eines Ringversuches an peripheren humanen Lymphozyten zu untersuchen. Dabei wurde das mögliche gentoxische Schadensspektrum mit den Endpunkten „strukturelle Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatid-austausche, Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkali-labile Stellen“ weitgehend abgedeckt. Für eine möglichst hohe statistische Aussagekraft erfolgten die Untersuchungen mit unterschiedlich hohen Dosen (SAR-Werten), die Auswertungen wurden in 3 Laboren durchgeführt und die Endpunkte wurden in vielen Zielzellen untersucht. Mit 20 blutspendenden Probanden war der Stichprobenumfang im Vergleich zu anderen Studien mit ähnlichen Zielen groß (Zeni et al., 2008; Schwarz et al, 2008; Zhijian et al. 2009). Dennoch konnten keine signifikanten gentoxische Effekte infolge der Befeldung mit GSM-Signalen gefunden werden, auch nicht bei einem SAR-Wert von 10 W/kg, der weit über dem aktuellen Grenzwert liegt.

Rein statistisch gesehen, ist die Studie aufgrund des „limitierten“ Stichprobenumfanges nicht geeignet, um sehr selten auftretende Unterschiede bezüglich der individuellen Strahlensensibilität, zu erfassen. Die Ergebnisse dieser Studie sind als belastbare Durchschnittsaussage zu werten. Auch seltene Effekte wären erfasst worden.

Die meisten bislang veröffentlichten Untersuchungen, die sich mit dem Nachweis von DNA-schädigenden Wirkungen und hochfrequenten elektromagnetischen Feldern beschäftigten, stützen die Ergebnisse dieser Studie. Aus Tabelle 3 ist zu entnehmen, dass im Zeitraum von 2003-2010 (in peer-reviewed Journals) in 5 von 25 Studien genschädigende Effekte infolge von HF-EMF-Expositionen (SAR-Werte < 5 W/kg) gefunden wurden, in 4 davon bei SAR-Werten kleiner als 2 W/kg. In 10 Studien wurden humane periphere Lymphozyten als Untersuchungsmaterial verwendet, in keiner davon waren genschädigende Effekte unterhalb eines SAR-Wertes von 2 W/kg zu verzeichnen. Nur Mashevich et al. (2003) fanden eine dosisabhängige aneugene Wirkung ab einer Dosis von 2,9 W/kg (830MHz). Mc Namee et al. hingegen wiesen keinen gentoxischen Effekt auf humane Lymphozyten bei Dosen zwischen 0 und 10 W/kg nach. Insgesamt ist davon auszugehen, dass hochfrequente elektromagnetische Felder unterhalb der Grenzwerte nicht gentoxisch wirken.

## 5. Literaturverzeichnis

Adcock, Ian M; Paul Ford; Peter J Barnes; K. Ito (2006) Epigenetics and airways disease. *Respiratory Research*: 7(1), 21

Ahlbom, A.; N. Day; M. Feycgtng; E. Roman; J. Skinner; j. Dockerty, M. Linet; M. McBride; J. Michaelis; J.H. Olsen; T. Tynes; P.K. Verkasalo (2000) A pooled analysis of magnetic fields and childhood leujemia. *Br. J. Cancer*: 83, 692-698

Baohong, Wang; He Jiliang; Jin Lifen ; Lu Deqiang; Zheng Wei ; Lou Jianlin;; Deng Hongping  
Studying the synergistic damage effects induced by 1.8 GHz radiofrequency field radiation (RFR) with four chemical mutagens on human lymphocyte DNA using comet assay in vitro. *Mutation Research* 578 (2005) 149–157

Bolognesi C, Abbondandolo A, Barale R, Casalone R, Dalpa L, De Ferrari M, Degrassi F, Forni A, Lamberti L, Lando C, Migliore L, Padovani P, Pasquini R, Puntoni R, Sbrana I, Stella M, S Bonassi (2008). Age related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchanges, chromosome aberrations and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiology* 6: 249-56

Bourthoumieu S, Joubert V, Marin B, Collin A, Leveque P, Terro F, C Yardin (2010) Cytogenetic studies in human cells exposed in vitro to GSM-900 MHz radiofrequency radiation using R-banded karyotyping. *Radiat. Res.*: [Epub ahead of print]

Chemeris, N. K. , A. B. Gapeyev, N. P. Sirota, O. Yu. Gudkova, N.V. Kornienko, A.V. Tankanag, I.V. Konovalov, M.E. Buzoverya, V. G. Suvorov, Vyacheslav, A. Logunov (2004). DNA damage in frog erythrocytes after in vitro exposure to a high peak-power pulsed electromagnetic field. *Mutation Research* 558, 27–34

Crumpton, Michael J. and Andrew R. Collins (2004). Are environmental electromagnetic fields genotoxic? *Hot Topics in DNA Repair* No. 11, DNA Repair 3, 1385–1387

Diem, E.; C. Schwarz; F. Adlkofer; O. Jahn; H. Rüdiger (2005). Non-thermal DNA breakage by mobile-phone radiation (1800 MHz) in human fibroblasts and in transformed GFSH-R17 rat granulosa cells in vitro. *Mutation Research*: 519, 178-183

Fenech M. (1993) The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ. Health Perspect.* 101 (Suppl. 3), 101-107

Fenech M: The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res* 392:11-18 (1997).

Fenech M (1998) Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes .- a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat. Res.*: 404 (1-2): 155-65

Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E, Human Micronucleus project. HUMN project: detailed description off the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* 534 (1-2): 65-75

Franzellitti S, Valbonesi P, Ciancaglini N, Biondi C, Contin A, Bersani F, E Fabbri (2010) Transient DNA damage induced by high-frequency electromagnetic fields (GSM 1.8 GHz) in the human trophoblast HTR-8/SVneo cell line evaluated with the alkaline comet assay. *Mutat. Res.*: 683 (1-2): 35-42

Hansteen IL, Clausen KO, Haugan V, Svendsen M, Svendsen MV, Eriksen JG, Skiaker R, Hauger E, Lgeide L, Vistnes AL, EH Kure (2009) *Anticancer Res.*: 29 (11): 4323-30

Hart, R.W. and J.E. Trosko (1975) DNA repair processes in mammals. *Gerontologia*: 15, 204-215

Komatsubara, Yoshiki ; Hideki Hirose; Tomonori Sakurai; Shin Koyamaa; Yukihisa Suzuki; Masao Taki, Junji Miyakoshi (2005) Effect of high-frequency electromagnetic fields with a wide range of SARs on chromosomal aberrations in murine m5S cells

Korenstein, Rafi and A. Barbul (2003) Reply to the Comment on "Exposure of Human Peripheral Blood Lymphocytes to Electromagnetic Fields Associated With Cellular Phones Leads to Chromosomal Instability" *Bioelectromagnetics* 24:583-585

Koyama, Shin; Takehisa Nakahara; Kanako Wake; Masao Taki; Yasuhito Isozumi; Junji Miyakoshi (2003) Effects of high frequency electromagnetic fields on micronucleus formation in CHO-K1 cells *Mutation Research* 541 81–89

Kim JY, Hong SY, Lee YM, Yu SA, Koh WS, Hong JR, Son T, Chang SK, Lee M. (2008). In vitro assessment of clastogenicity of mobile-phone radiation (835 MHz) using the alkaline comet assay and chromosomal aberration test. *Environ Toxicol.* 23(3):319-27.

Lerchl A (2008) 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*: 81 (6): 755-67

Luukonen J., Hakulinen P., Mäki-Paakanen J., Juutilainen J., Naarala J. (2009) Enhancement of chemically induced reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by 872 MHz radiofrequency radiation. *Mutat. Res.*: 662(1-2) 54-58.

Luukonen J, Juutilainen J, J Naarala (2010) Combined effects of 872 MHz radiofrequency radiation and ferrous chloride on reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Bioelectromagnetics* 31 (6): 417-24

Manti L., Braselmann H., Clabrese ML., Massa R., Pugliese M., Scampoli P., Grossi G. (2008) Effects of modulated microwave radiation at cellular telephone frequency (1.95 GHz) on X-ray-induced chromosome aberrations in human lymphocytes in vitro. *Radiat. Res.*: 169(5): 575-583

Mashevich, Maya; Dan Folkman; Amit Kesar; Alexander Barbul; Rafi Korenstein; Eli Jerby and Lydia Avivi (2003) Exposure of Human Peripheral Blood Lymphocytes to Electromagnetic Fields Associated With Cellular Phones Leads to Chromosomal Instability. *Bioelectromagnetics* 24:82-90

McNamee, J.P.; P.V. Bellier; G.B. Gajda; B.F. Lavalley, L. Marro; E. Lmay ans A. Thansandote (2003) No evidence for genotoxic effects from 24 h exposure of human leucocytes to 1,9 GHz radiofrequency fields. *Radiation Research*: 159, 693-697

Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, Natarajan AT, Martinez-Lopez W, Folle GA, Drets ME: Chromosomal aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res* 504:17-36 (2002).

Sakuma, N.; Komatsubara, Y.; Takeda, H.; Sekijima, M.; Nojima, T.; J. Miyakoshi (2006) 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* 27, 51-57

Sannino A., Di Costanzo G., Brescia F., Zeni O., Juutilainen J., Scarfi MR. (2009) 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.*: 171, (6): 743-751

Schwarz C, Kratovil E, Pilger A, Kuster N, Adlkofer F, Rüdiger HW (2008) Radiofrequency electromagnetic fields (UMTS, 1,950 MHz) induce genotoxic effects in vitro in human fibroblasts but not in lymphocytes. *Int. Arch Occup Environ Health.* 81 (6): 755-67

Singh NP; McCoy MT; Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175: 184-191 (1988).

- Speit G, Schütz P, Hoffmann H (2007) Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible. *Mutat. Res.*: 626 (1-2): 42-7
- Vijayalaxmi and Guenter Obe (2005) Controversial Cytogenetic Observations in Mammalian Somatic Cells Exposed to Extremely Low Frequency Electromagnetic Radiation: A Review and Future Research Recommendations. *Bioelectromagnetics*: 26, 412-430
- Vijayalaxmi, James P. McNamee, Maria Rosaria Scarfi. *Mutation Research* 603 (2006) 104–106  
Letter to the Editor: 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]
- Vijayalaxmi (2006) Cytogenetic studies in human lymphocytes exposed in vitro to 2.45 GHz or 8.2 GHz radiofrequency radiation. *Radiat. Res.*: 166: 532-38
- Vijayalaxmi and T Prihoda (2008) Genetic damage in mammalian somatic cells exposed to radiofrequency radiation: A meta-analysis of data from 63 publications (1990-2005) *Radiat. Res.*: 169; 561-74
- WHO (1985) Guide to short-term tests for detecting mutagenic, carcinogenic chemicals. WHO Geneva, Switzerland *Env. Health Crit.* 51, 57-67
- Wilkins RC, Romm H, Kao TC, Awa AA, Yoshida MA, Livingstone GK, Jenkins MS, Oestrischer U, Pellmar TC, Prasana PG (2008). Interlaboratory comparison of the dicentric chromosome assay for radiation biodosimetry in mass casualty events. *Radiat. Res.*: 169 (5): 551-60
- Xu S., Zhou Z., Yu Z., Zhang W., Wang Y., Wang X., Li M., Chen Y., Chen C., He M., Zhang G., Zhong M. (2010)  
Exposure to 1800 MHz radiofrequency radiation induces oxidative damage to mitochondrial DNA in primary cultured neurons. *Brain Res.*: 1311, 189-196
- Zeni O, Schiavoni A, Perrotta A, Forigo D, Deplano M, MR Scarfi (2008) Evaluation of genotoxic effects in human leukocytes after in vitro exposure to 1950 MHz UMTS radiofrequency field. *Bioelectromagnetics*: 29 (3): 177-84
- Zhijian C, Xiaoxue L, Yezhen L, Degiang L, Shijie C, Lifan J, Jianlin L, H Jiliang (2009) Influence of 1.8-GHz (GSM) radiofrequency radiation (RFR) on DNA damage and repair induced by X-rays in human leukocytes in vitro. *Mutat. Res.*: 677 (1-2): 100-4
- Zotti-Martelli, Laura; Mario Peccatori; Valentina Maggini; Michela Ballardini; Roberto Barale. Individual responsiveness to induction of micronuclei in human lymphocytes after exposure in vitro to 1800-MHz microwave radiation. *Mutation Research* 582 (2005) 42–52

## Zusammenfassung

In den letzten 15 Jahren wurden immer wieder widersprüchliche Daten über eine mögliche genschädigende Wirkung von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern auf Menschen veröffentlicht. Zur besseren Abklärung der Frage „wirken hochfrequente elektromagnetische Felder genotoxisch auf menschliche Zellen?“ wurde im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz diese Studie mit folgendem Design entwickelt: Untersuchungen an menschlichen peripheren, zur Teilung stimulierten Lymphozyten, da die Entnahme von Blutproben einfach und wenig invasiv ist und sich der Einsatz von Lymphozyten in der Chemikalienbewertung bewährt hat. Entnahme der Blutproben von 20 männlichen, gesunden, nicht-rauchenden Probanden zweier Altersgruppen (10 Probanden  $\leq 18$  Jahre, 10 Probanden 50-60 Jahre), um auch mögliche unterschiedliche Empfindlichkeiten in Bezug auf das Lebensalter zu erfassen. 20 Probanden sind für Studien dieser Art als vergleichsweise große Studienpopulation anzusehen. Nachweis von 4 zytogenetischen Endpunkten (strukturelle Chromosomenaberrationen, Schwesterchromatidaustausche, Mikrokerne und Einzel- und Doppelstrangbrüche sowie alkalilabile Stellen – Cometassay) zur Erfassung eines möglichst großen genschädigenden Schadensspektrums. Der Nachweis der Endpunkte in vielen Zielzellen und in 3 verschiedenen kompetenten Laboren in Form eines Ringversuches zur Erzielung einer guten statistischen Aussagekraft der Ergebnisse. Die Auswertung verblindeter Präparate, um eine unvoreingenommene Auswertung zu gewährleisten. Die Exposition des Blutes in einer Anlage, die gut beschrieben ist und die auch in kleinerer Version in anderen Studien schon eingesetzt und erprobt wurde (von IT'IS Zürich). Die Exposition erfolgte mit verschiedenen Dosen (0; 0,2; 2; 10 W/kg), parallel wurde bei jedem Test eine Positivkontrolle mitgeführt. Die Befeldung erfolgte mit 1800 MHz, GSM, Intermittierend (5 min an, 10 min aus). Die Analyse der Daten wurde von einem Statistiker vorgenommen.

In der statistischen Analyse zeigte sich, dass obwohl die Auswertekriterien im Vorfeld festgelegt wurden und eine Angleichung der mikroskopischen Ausstattung (soweit möglich) vorgenommen wurde, bei allen Zielgrößen Unterschiede zwischen den Laboren auftraten. Anhand der Positivkontrollen, die bei allen Tests und Laboren hoch signifikant waren und anhand von Dosis-Wirkungs-Beziehungen, die in Vortests ermittelt wurden, ist nachgewiesen, dass jedes Labor über einen Auswertestandard verfügt, mit dem auch kleinere Effekte in den Zielgrößen nachgewiesen werden können. Die statistische Analyse der Daten ergab für keine der Zielvariablen einen signifikanten Dosis-Trend. Die Aussage, dass GSM-Signale keine genotoxische Wirkung auf menschliche Lymphozyten haben, ist als belastbare Durchschnittsaussage zu werten. Auch seltene Befeldungseffekte wären mit 20 Probanden erfasst worden. Dennoch kann aus statistischen Gründen nicht positiv ausgeschlossen werden, dass in sehr seltenen Einzelfällen Menschen genotoxische Befeldungseffekte zeigen.

## 6. Anhang

### 6.1 Analyseplan zur Statistik

28.06.2010 Jochem König und Veronika Weyer Institut für Medizinische Biometrie,  
Epidemiologie und Informatik (IMBEI),  
Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

#### Zielsetzung des statistischen Analyseplans

Auf Grundlage des im April 2009 niedergelegten Analyseplans der damals im IMBEI projektverantwortlichen Frau Katrin Kuhr wurde eine Inspektion der verblindeten Daten vorgenommen (blind data review), mit der Zielsetzung: Prüfung auf Vollständigkeit und Plausibilität, Prüfung von Verteilungsannahmen.

Ziel des nun 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 Aureißern) ein.

Im folgenden wird zu nächst die Analysestrategie übergreifend über aller vier Gentoxizitätsassays beschrieben. Dannach werden für jeden der Assays wesentliche Ergebnisse des Blind Data Review benannt, Analyse-Modell und -Methode spezifiziert, und die Wahl der Methodik begründet.

#### Analysestrategie

Die Hauptfragestellung ist die nach dem Bestehen eines Befeldungseffektes. Dazu sind die innerhalb jeden Probanden für jedes Labor die Messergebnisse aus vier Dosisgruppen zu berücksichtigen. Dazu wird primär ein statistischer Test auf Trend durchgeführt. Anschließend werden Effektschätzer für jede der vier Dosisgruppen und für paarweise Differenzen zwischen Dosisgruppen 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 Dositrends (Monotonie) die Größe des Trendeffektes und das Verhältnis zwischen Dositrend und Abstand zwischen Negativ- und Positiv-Kontrolle einfließen.

#### Umgang mit multiplen Hypothesentestens

Mit neun Zielvariablen aus vier Assays gibt die in drei Laboren ermittelt wurden liegen 27 statistische Test- und Schätzprobleme vor.

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 27 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 27 Nullhypothesen) nicht hoch. Die Blinddateninspektion ergab hohe Korrelationen zwischen Variablen eines Assays und zwischen Laboren, dagegen niedrige Korrelationen zwischen Variablen verschiedener Assays. Wir erwarten daher eine globalen Fehler 1. Art von wenig über 0.20, wenn nur lokale Fehlerkontrolle angestrebt wird (d.h. wenn das Signifikanzniveau nicht für multiples Testen adjustiert wird.)

Für die Interpretation von (lokal) signifikanten Befunden werden folgende Regeln vorgesehen:

1. Jeder signifikant steigende Dosis-trend generiert einen Verdacht auf einen Befeldungseffekt.
2. Für die Variablen eines Assays innerhalb eines Labors wird zum globalen Niveau 0.05 getestet. Wenn ein solcher Test für zwei Labore signifikant ist, soll ein ernster Verdacht begründet sein.
3. Wenn einer der unter 2 genannten Tests in zwei Laboren zum lokalen Niveau von 0.0125 signifikant ist gilt ein Befeldungseffekt als bestätigt.

Wie oben erwähnt, sollten in die Diskussion der Ergebnisse auch Form und Ausmaß der Dosis-trends und deren Verhältnis zum Abstand zwischen Negativ- und Positivkontrolle einfließen.

## **Spezifikation und Begründung der Analysemethoden**

### **Zielvariable**

Folgende Zielvariablen werden in der statistischen Analyse berücksichtigt:

#### **Chromosomenaberrationen**

- Summe der Chromosomschäden (Summe von (CA\_Dic, CA\_extra\_Ac, CA\_Ringe, CA\_Chromatid))
- Anzahl dizentrischen Chromosome (CA\_Dic)
- Anzahl Chromosomen vom Typ 'extra-Ac' (CA\_extra\_Ac)
- Anzahl Ringe (CA\_Ringe)
- Anzahl 'Chromatid.' (CA\_Chromatid)

Dazu wurden die Anzahlen pro Zelle jeweils über 1000 Zellen addiert.

#### **Mikrokerntest**

- Anzahl der Mikrokerne in 2000 Zellen. (Errechnet als  $MNI=1*mn_1+2*mn_2+3*mn_3$  plus)

#### **Cometassay**

- medianer Anteil DNA im Kopf (%) (CoA\_head\_DNA)
- Olive Tailmoment (CoA\_olive\_tail)

#### **Schwesterchromatidaustausche (SCE)**

- Anzahl der Schwesterchromatidaustausche in 50 ausgezählten Metaphasen (SCE\_Anzahl)

## 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 einzelner Werte der Positivkontrolle vollzählig. Verfahren für Umgang mit Ausreißern und fehlenden Werten müssen daher nicht spezifiziert werden.

### Chromosomenaberrationen

Für die 5 Zielvariablen der Chromosomenaberrationen, wird ein Permutationstest auf Dosistrend als primäre Analyse durchgeführt.

Anhand der Blindanalyse der fünf Zielvariablen mit Zähldatencharakter wurde festgestellt, dass die Poissonannahme verletzt ist. Da unter der Nullhypothese der Abwesenheit eines Befeldungseffektes die Verteilung der Zielvariablen der Chromosomenaberration in den 4 Dosisbedingungen gleich ist, sind die Voraussetzungen für Permutationstests jedoch erfüllt.

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 Poissonmodells als Score-Test ergibt. Die zweite, skalierte, Variante wird zur Quantifizierung des Dosistrends verwendet. Mittelwerte mit t-testbasierten 95%-Konfidenzintervallen ergeben eine Schätzung der durchschnittlichen Differenz zwischen zwei Dosisstufen.

Da bei der Chromosomenaberration 5 Zielvariablen vorliegen, entsteht innerhalb der Chromosomenaberration das Problem des multiplen Testens. Die Kontrolle des multiplen Fehlers wird nach dem Permutationsalgorithmus (multiple Testprozedur) von Westfall & Young. (Westfall, P. J. and Young, S. S. (1993), Resampling-Based Multiple Testing, New York: John Wiley & Sons.) vorgenommen.

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 auf Zähldaten die Funktion `independence_test`, für den Page-Test die Funktion `„friedman_test“`).

### **Mikrokerntest**

Auch bei der Zielvariablen des Mikrokerntests wird ein Permutationstest, wie bei der Chromosomenaberration, und als Sensitivitätsanalyse ein Page-Trend-Test durchgeführt.

### **Cometassay**

Beim CometAssay gibt es zwei Zielgrößen, die stark miteinander korrelieren. Die Zielgröße „CoA\_olive\_tailm“ wird logarithmiert und die Zielgröße „mediane DNA im Kopf (%) (Coa\_head\_dna)“ wird folgendermaßen transformiert:

$$\text{CoA\_head\_dna\_LN} = \log_{10}((100 - \text{CoA\_head\_dna})/100).$$

Es wird ein Modell für Dosiseffekttestung mit allgemeiner Annahme über die Kovarianzstruktur verwendet. In SAS geht das mit der Prozedur Mixed, mit der allgemeine gemischte lineare Modelle ausgewertet werden können. Der SAS-Code für das entsprechende Modell ist der folgende:

```
proc mixed noprofile covtest ratio;  
  by labor ;  
  class pb exposition alterskat;  
  model Coa_head_dna_LN= exposition alterskat;  
  repeated exposition /type=un subject=pb ;  
  estimate 'Trend' exposition -3 -1 1 3/divisor=10 CL;  
  lsmeans exposition /pdiff adj=scheffe CL;  
run;
```

wobei pb=Probandennummer, exposition=Befeldungsdosis, alterskat=Alterskategorie ist.

Die Schätzer und Konfidenzintervalle im gemischten linearen Modell wird mit dem Statement Type=un (unstrukturierte Kovarianzmatrix) erreicht, entsprechend der einfaktoriellen multivariaten repeated measures Analyse und der univariaten Analyse der Basisschätzer (Kontraste innerhalb der Probanden  $T_i = \frac{1}{10}(-3Y_{i1} - Y_{i2} + Y_{i3} + 3Y_{i4})$ ).

Da zwei Zielvariablen behandelt werden, wird zum multivariaten Vergleich ein Hotelling's  $T^2$ -Test für abhängige Stichproben durchgeführt.

### **Schwesterchromatidaustausche**

Da die Zielvariable des Schwesterchromatidaustausches den Charakter von Zähldaten sind, wird zunächst ein Permutationstest der Originaldaten durchgeführt und anschließend zur Dosiseffektschätzung ein gemischtes lineares Modell, wie beim CometAssay, verwendet.

## **Nebenfragestellungen**

### **Alterseffekte**

Der Einfluss des Alters auf alle neun Gentoxizitätsindikatoren wird durch Vergleich der Altersgruppen unter der Negativ-Kontroll-Bedingung mittels Satterthwaite T-Test für unverbundene Stichproben ohne Annahme gleicher Varianzen untersucht.

Der Einfluss des Alters auf den Dositrend (m.a.W die Interaktion zwischen Dosis und Alter) wird durch Vergleich der Altersgruppen in Hinsicht auf Lageunterschiede der individuellen Dositrendscores

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

mittels Satterthwaite T-Test für unverbundene Stichproben ohne Annahme gleicher Varianzen untersucht.

Die Analyse hat explorativen Charakter. Die Kontrolle des multiplen Fehlers erster Art wird nicht angestrebt.

### **Vergleichende Untersuchungen zu systematischen und zufälligen Fehlern in den drei Prüflaboren**

Die Blinddatenanalyse ergab bereits deutliche systematische Unterschiede zwischen den Laboren. Für die Analyse Hauptfragestellung ist das von nachrangiger Bedeutung, da die Prüfung des Dosiseffektes innerhalb eines Labors und eines Probanden erfolgt. So sind systematische Labor und Auswertereffekte ausgeschlossen.

Zur Darstellung der Effekte sind Bland-Altman-Diagramme für jedes Paar von Laboren unter alleiniger Berücksichtigung der Negativkontrollen vorgesehen. Zusätzliche Informationen liefert dabei die Angabe des jeweiligen Auswerters. Es kann überprüft werden, ob die Variabilität innerhalb eines Labors größer ist, wenn verschiedene Mitarbeiter für die Auswertung der Proben zuständig sind.

Die Präzision lässt sich schwer vergleichen da die systematischen Effekte Lage und Skalenunterschiede bedingen. Als skalenunabhängige Maßzahlen werden gebildet

- Mittlere Differenz zwischen der Positivkontrolle und dem Mittel der vier Dosiswerte dividiert durch die Standardabweichung innerhalb der Probanden (zwischen den vier Dosiswerten und dosistrendbereinigt).
- Standardabweichung zwischen den Probanden (ohne Positivkontrolle) dividiert durch Standardabweichung innerhalb der Probanden.

Datum, Unterschrift

Mainz, 28.6.2010

Datum, Unterschrift

Jochem König

## Variablenliste

### Allgemeine Variablen

Pb	Probanden-ID
Labor	Prüflabor, 1=HDA, 2=DZB, 3=RCC
Exposition_blind	Befeldung, 1=K1, 2=K2, 3=K3, 4=K4, 5=Positivkontrolle

[Untersuchung]_Datum	Datum der Blutabnahme zu jedem Test
[Untersuchung]_Mitarb	Mitarbeiter im Labor (Auswerter)
[Untersuchung]_Slides	Anzahl verwendeter Slides für die Auswertung

### Chromosomenaberrationen (CA)

CA_ausg_Mitosen	ausgewertete Mitosen (vorgegeben: 1000)
CA_Dic	Anzahl, Summe über alle Mitosen
CA_extra_Ac	Anzahl, Summe über alle Mitosen
CA_Ringe	Anzahl, Summe über alle Mitosen
CA_Chromatid	Anzahl, Summe über alle Mitosen
Ca_geschaedigt	Geschädigte Zellen

### Mikrokerntest (MN)

MN_c1	mononuklear
MN_c2	binuklear
MN_c4	bis teranuklear
MN_c8	bis oktanuklear
MN_CBPI	
MN_ausg_Zellen	ausgewertete Zellen (vorgegeben: 2000)
MN_1	Anzahl Zellen mit 1 Mikrokern
MN_2	Anzahl Zellen mit 2 Mikrokernen
MN_3plus	Anzahl Zellen mit mehr als 2 Mikrokernen
MN_Mitosen	

### Schwesterchromatidaustausche (SCE)

SCE_ausgew_Mitosen	ausgewertete Mitosen (vorgegeben: 50)
SCE_Anzahl	Anzahl Schwesterchromatidaustausche, Summe über alle Mitosen

### Comet-Assay

CoA_comet	deutlich sichtbare Kometen (nur Positivkontrolle); 1=ja, 0=nein
CoA_head_DNA	mediane DNA im Kopf (%)
CoA_tail_lenght	mediane Schweiflänge
CoA_ext_tailmoment	Median
CoA_olive_tail	Median

Tabelle 29: Liste der erfassten Variablen und der Zielvariablen

## 6.2 Ergebnisse der 3 Labors

### 6.2.1 Rohdaten

Tabelle 30: Zielvariablen der Chromosomenaberration und des Mikrokerntests für Labor 1

Labor 1																														
Mikrokerne					Summe geschädigter Chromosomen					Dizentrische Chromosomen					Extra azentrische Chromosomen					Ringe					Chromatidtyp Aberration					
Exposition					Exposition					Exposition					Exposition					Exposition					Exposition					
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
pb																														
101	6	8	5	11	468	5	9	10	9	249	2	1	2	0	117	3	8	8	9	117	0	0	0	0	11	0	0	0	0	4
102	11	11	18	8	343	13	25	19	7	292	0	1	1	0	121	12	23	16	3	137	1	1	1	1	30	0	0	1	3	4
103	7	7	7	14	371	11	6	5	11	165	0	2	1	1	78	11	4	3	10	68	0	0	0	0	16	0	0	1	0	3
105	8	10	10	10	334	6	6	14	9	192	2	1	5	3	95	4	4	8	6	91	0	0	0	0	6	0	1	1	0	0
106	5	5	2	6	331	6	17	18	18	173	1	3	3	3	84	5	14	13	13	81	0	0	2	2	8	0	0	0	0	0
107	7	6	4	2	174	15	9	9	20	327	4	1	0	4	169	11	8	8	16	143	0	0	1	0	13	0	0	0	0	2
108	8	10	11	7	375	13	6	10	8	439	3	0	4	3	200	10	6	5	5	219	0	0	1	0	16	0	0	0	0	4
110	11	10	11	12	278	3	8	8	4	130	0	0	1	0	53	3	8	6	3	73	0	0	1	1	4	0	0	0	0	0
112	13	9	8	9	357	2	6	2	3	93	0	1	0	0	61	2	5	2	3	27	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
115	7	8	5	8	432	4	4	6	4	161	1	1	0	1	84	3	2	6	3	69	0	0	0	0	8	0	1	0	0	0
202	15	12	17	9	416	5	1	4	3	91	2	0	0	1	50	3	1	4	2	39	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
203	36	32	44	45	390	3	2	3	8	91	0	1	2	3	51	3	1	1	5	35	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0
204	15	18	19	10	167	4	7	2	10	42	3	0	0	1	17	1	7	2	9	24	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
205	21	12	10	18	501	5	1	5	3	58	0	0	2	0	23	4	1	3	2	33	1	0	0	1	2	0	0	0	0	0
206	26	26	10	26	320	3	7	3	5	65	0	1	0	1	28	3	6	3	4	34	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0

Labor 1

	Mikrokerne					Summe geschädigter Chromosomen					Dizentrische Chromosomen					Extra azentrische Chromosomen					Ringe					Chromatidtyp Aberration				
	Exposition					Exposition					Exposition					Exposition					Exposition					Exposition				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
208	1	11	5	31	320	4	3	7	3	41	1	0	0	1	21	3	3	7	2	19	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
209	21	15	16	21	394	2	4	9	3	83	1	0	1	0	39	1	4	8	3	38	0	0	0	0	6	0	0	0	0	0
210	14	18	16	27	221	2	4	5	2	44	0	0	2	0	22	2	4	3	2	20	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
211	26	23	20	20	392	4	2	6	5	104	0	0	0	2	61	4	2	5	3	38	0	0	1	0	5	0	0	0	0	0
213	36	25	37	24	283	2	4	6	10	123	0	0	1	1	65	2	4	5	7	53	0	0	0	2	5	0	0	0	0	0
Alle	15	14	14	16	343	6	7	8	7	148	1	1	1	1	72	5	6	6	6	68	0	0	0	0	7	0	0	0	0	1

Tabelle 31: Zielvariablen der Chromosomenaberration und des Mikrokerntests für Labor 2

Labor 2

	Mikrokerne					Summe geschädigter Chromosomen					Dizentrische Chromosomen					Extra azentrische Chromosomen					Ringe					Chromatidtyp Aberration				
	Exposition					Exposition					Exposition					Exposition					Exposition					Exposition				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
pb																														
101	5	3	4	4	363	7	2	5	8	195	0	0	0	0	109	7	2	5	8	82	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0
102	9	5	4	3	433	7	8	7	0	214	0	0	0	0	98	7	8	7	0	115	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
103	8	2	3	5	457	10	7	9	11	111	0	0	0	0	61	10	7	9	11	49	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
105	15	3	6	8	373	9	5	5	2	196	0	0	0	0	131	9	5	5	2	58	0	0	0	0	7	0	0	0	0	0
106	1	5	6	6	461	5	0	4	1	232	0	0	0	1	154	5	0	4	0	77	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0

Labor 2

	Mikrokerne					Summe geschädigter Chromosomen					Dizentrische Chromosomen					Extra azentrische Chromosomen					Ringe					Chromatidtyp Aberration								
	Exposition					Exposition					Exposition					Exposition					Exposition					Exposition								
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5				
107	5	8	3	8	157	8	7	10	5	215	2	0	0	0	131	6	7	9	5	83	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
108	3	4	2	5	150	24	15	7	4	244	1	0	0	0	122	23	15	7	4	117	0	0	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	
110	3	5	5	15	287	6	3	10	5	100	2	0	0	0	49	4	3	10	5	51	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
112	9	12	14	7	486	4	5	4	0	83	0	0	0	0	45	3	5	4	0	38	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
115	24	7	11	9	650	2	2	0	0	121	0	0	0	0	68	2	2	0	0	50	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	
202	14	13	18	18	483	2	0	0	5	82	0	0	0	0	48	2	0	0	5	34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
203	71	49	44	42	364	3	0	3	3	76	0	0	0	0	44	3	0	3	3	30	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
204	16	21	14	12	202	0	1	0	4	43	0	0	0	0	12	0	1	0	4	30	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
205	29	25	31	40	453	0	1	1	1	69	0	0	0	0	40	0	1	1	1	25	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	
206	24	30	19	18	295	5	0	2	0	61	0	0	0	0	20	5	0	2	0	40	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
208	20	18	31	16	348	0	1	0	0	59	0	1	0	0	38	0	0	0	0	20	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
209	17	11	13	16	350	1	0	2	0	58	0	0	0	0	27	1	0	2	0	29	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
210	23	12	8	16	288	1	1	1	0	66	0	0	0	0	31	1	1	1	0	33	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	
211	35	27	23	31	502	0	0	1	2	62	0	0	0	0	40	0	0	1	2	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
213	36	30	48	29	334	0	0	1	0	90	0	0	0	0	49	0	0	1	0	38	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alle	18	15	15	15	372	5	3	4	3	119	0	0	0	0	66	4	3	4	3	51	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle 32: Zielvariablen der Chromosomenaberration und des Mikrokerntests für Labor 3

Labor 3																														
	Mikrokerne					Summe geschädigter Zellen					Dizentrische Chromosomen					Extra azentrische Chromosomen					Ringe					Chromatidtyp Aberration				
	Exposition					Exposition					Exposition					Exposition					Exposition					Exposition				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
pb																														
101	0	9	4	7	314	8	7	2	6	155	0	2	1	0	57	4	3	1	5	92	0	1	0	0	4	4	1	0	1	2
102	5	11	12	6	236	4	4	9	2	186	0	2	1	0	94	4	0	3	2	90	0	0	1	0	2	0	2	4	0	0
103	0	4	7	8	358	11	5	1	10	229	0	0	1	0	124	10	1	0	5	94	0	0	0	0	9	1	4	0	5	2
105	8	8	3	8	153	11	2	3	3	145	0	0	1	2	42	4	1	0	0	75	3	0	1	0	17	4	1	1	1	11
106	3	0	0	6	185	4	4	3	5	163	1	0	1	4	106	1	4	1	1	51	0	0	0	0	4	2	0	1	0	2
107	1	5	2	3	119	7	8	8	10	172	0	2	2	3	52	5	5	5	3	106	0	0	0	0	7	2	1	1	4	7
108	0	7	1	5	173	1	6	9	9	289	0	1	3	1	134	1	5	0	7	142	0	0	0	0	11	0	0	6	1	2
110	5	7	3	0	141	11	11	6	6	152	4	1	1	2	46	6	5	1	1	101	0	4	0	0	3	1	1	4	3	2
112	4	5	3	3	385	11	8	6	30	192	0	1	1	11	104	6	7	5	15	84	2	0	0	0	4	3	0	0	4	0
115	6	5	3	5	441	3	1	7	4	318	0	1	1	0	185	3	0	4	3	107	0	0	0	0	23	0	0	2	1	3
202	17	15	12	6	271	4	1	14	6	77	0	0	1	0	31	2	0	2	6	37	0	0	2	0	6	2	1	9	0	3
203	37	18	21	40	258	4	0	1	9	148	0	0	1	1	94	4	0	0	4	49	0	0	0	0	2	0	0	0	4	3
204	9	15	27	19	180	4	8	5	6	49	1	1	1	2	22	3	7	4	4	24	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
205	11	13	16	19	175	7	2	22	18	122	1	0	1	6	49	6	0	21	8	63	0	0	0	1	10	0	2	0	3	0
206	17	6	25	21	213	7	5	4	5	129	0	0	1	2	70	7	4	2	1	55	0	0	0	1	4	0	1	1	1	0
208	16	15	20	18	109	3	5	0	6	25	0	0	0	2	6	3	0	0	1	12	0	0	0	1	1	0	5	0	2	6
209	3	13	9	16	354	7	15	0	3	71	1	0	0	1	33	6	14	0	0	35	0	0	0	0	0	0	1	0	2	3
210	13	6	13	14	136	4	15	10	2	84	0	0	0	0	20	4	15	9	1	55	0	0	0	0	6	0	0	1	1	3

Labor 3

Mikrokerne					Summe geschädigter Zellen					Dizentrische Chromosomen					Extra azentrische Chromosomen					Ringe					Chromatidtyp Aberration					
Exposition					Exposition					Exposition					Exposition					Exposition										
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	
211	27	5	17	6	252	3	5	8	10	85	0	0	0	0	48	2	4	8	6	34	0	0	0	1	3	1	1	0	3	0
213	22	11	15	12	108	7	6	4	5	91	0	2	1	3	31	7	4	3	1	56	0	0	0	0	1	0	0	0	1	3
Alle	10	9	11	11	228	6	5	6	8	142	0	1	1	2	68	4	3	3	4	66	0	0	0	0	6	1	1	1	2	2

Die Positivkontrollen des CA-Tests variieren stark von Proband zu Proband (bei allen Laboren), da bei den ersten Probanden 1000 Metaphasen untersucht wurden, bei den letzten Probanden aus Zeitgründen nur 400.

Tabelle 33: Zielvariablen des Cometassays und des Schwesterchromatidaustausches für Labor 1

Labor 1

	Mediane DNA im Kopf (%)					Olive-Tail-Moment					Schwesterchromatidaustausche				
	Exposition					Exposition					Exposition				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
pb															
101	63	70	73	70	62	10	10	6	7	10	202	233	238	222	347
102	93	91	90	93	70	2	2	2	1	9	203	199	201	200	454
103	93	93	95	95	84	1	1	1	1	5	192	203	173	181	352
105	75	70	59	72	13	7	10	14	11	49	247	265	219	260	272
106	95	96	96	97	72	1	1	1	1	9	183	187	208	197	424
107	67	75	81	74	60	9	6	4	8	14	305	240	269	266	428
108	74	71	61	69	56	9	10	15	10	16	213	189	198	232	331
110	76	77	92	77	18	5	8	2	8	47	219	193	181	170	230
112	87	88	85	85	25	5	4	5	6	42	168	225	212	288	323
115	82	67	83	72	16	7	11	5	10	49	226	214	195	182	265
202	74	78	81	73	56	7	7	5	6	16	131	157	146	163	1896
203	77	75	70	87	40	7	8	9	4	26	212	267	199	245	327
204	87	80	84	73	67	2	3	2	4	8	216	217	191	241	332
205	82	85	86	76	63	1	1	1	2	3	188	216	255	261	1543
206	81	76	81	79	57	2	3	2	3	10	313	287	223	254	401
208	83	80	84	73	37	2	2	2	4	16	277	164	210	155	1902
209	64	71	76	68	41	5	5	3	5	18	213	220	268	236	3537
210	80	74	70	75	45	3	4	5	4	17	206	215	169	211	1914
211	76	74	70	75	57	3	4	5	3	11	209	215	313	194	1829
213	61	55	59	53	24	3	4	3	3	21	231	203	262	264	1104
Alle	79	77	79	77	48	5	5	5	5	20	218	215	217	221	911

Bei einigen Probanden wurden im SCE-Test höhere Konzentrationen Mitomycin C (Positivkontrolle) eingesetzt (202, 205, 208, 209 210, 211 und 213).

Tabelle 34: Zielvariablen des Cometassays und des Schwesterchromatidaustausches für Labor 2

Labor 2

	Mediane DNA im Kopf (%)					Olive-Tail-Moment					Schwesterchromatidaustausche				
	Exposition					Exposition					Exposition				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
pb															
101	91	99	99	98	50	3	0	0	1	52	175	164	156	170	234
102	92	96	87	93	73	5	2	6	3	21	125	116	119	103	215
103	94	99	93	99	78	2	0	3	0	10	110	114	113	110	250
105	97	90	93	99	82	1	3	2	0	5	183	170	162	178	191
106	98	96	95	98	80	1	2	2	1	10	103	108	100	114	291
107	95	93	94	94	84	2	2	2	2	8	101	111	112	96	247
108	97	98	95	88	88	1	1	2	4	5	98	150	117	135	218
110	98	95	97	97	45	1	1	1	1	42	88	77	82	85	179
112	100	100	98	100	50	0	0	1	0	58	106	114	120	129	188
115	98	96	90	96	58	1	2	4	2	30	82	78	108	82	132
202	98	92	94	95	78	1	3	2	2	11	137	127	131	114	839
203	86	95	93	98	75	6	2	3	1	15	130	146	148	145	303
204	100	99	100	100	96	0	0	0	0	1	175	187	155	217	290
205	100	99	98	99	95	0	0	1	0	2	206	223	242	184	70
206	97	97	98	93	75	1	1	0	2	10	160	153	149	141	229
208	98	97	97	93	75	0	1	1	2	10	216	223	248	207	167
209	97	96	98	99	79	1	2	1	0	10	175	161	158	174	63
210	96	98	91	94	73	1	1	2	2	9	203	187	198	213	33
211	97	93	97	96	82	1	2	1	1	7	177	172	171	216	564
213	94	95	93	94	68	2	2	2	2	16	178	194	195	202	475
Alle	96	96	95	96	74	1	1	2	1	17	146	149	149	151	259

Tabelle 35: Zielvariablen des Cometassays und des Schwesterchromatidaustausches für Labor 3

Labor 3															
	Mediane DNA im Kopf (%)					Olive-Tail-Moment					Schwesterchromatidaustausche				
	Exposition					Exposition					Exposition				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
pb															
101	89	62	94	82	26	1	8	1	2	26	249	279	220	242	277
102	88	91	96	94	65	1	1	0	1	6	135	193	130	145	379
103	88	93	96	94	68	1	1	0	1	4	186	201	150	162	325
105	99	98	94	88	54	0	0	1	1	6	239	298	292	267	265
106	93	93	90	93	76	2	1	1	1	3	250	119	160	223	386
107	72	82	86	82	70	4	2	2	2	5	242	321	219	195	386
108	87	80	80	78	65	2	3	3	2	5	170	253	183	236	300
110	63	92	72	85	23	4	1	3	2	31	187	189	155	196	259
112	78	93	54	91	24	2	1	7	1	31	129	242	202	264	286
115	92	73	89	91	52	1	4	1	1	7	217	208	253	209	241
202	97	88	93	85	74	0	1	1	2	3	187	194	160	155	269
203	74	78	70	82	37	0	1	2	1	3	181	237	154	185	289
204	92	95	96	94	80	1	1	1	1	3	167	121	129	205	1815
205	97	100	95	99	80	0	0	1	0	3	241	256	240	318	1549
206	95	89	93	96	58	0	1	1	1	8	214	133	123	250	334
208	96	94	95	78	63	0	1	1	3	7	241	269	327	204	1558
209	77	90	82	86	61	3	1	2	2	8	236	274	180	239	984
210	96	93	95	91	64	0	1	1	1	5	270	345	241	251	238
211	88	89	91	85	76	2	1	1	2	3	181	186	253	250	1421
213	90	44	83	97	14	1	10	2	1	34	264	231	301	215	1227
Alle	88	86	87	89	57	1	2	2	1	10	209	227	204	221	639

Tabelle 36: Korrelationskoeffizienten (nach Spearman) der Zielvariablen von SCE-Test, Mikrokerntest und Cometassay getrennt nach drei Laboren.

Labo	r	sce_anzahl	mni	Coa_head_dna_Lg	CoA_head_DNA	CoA_olive_Tailm_lg	CoA_olive_Tailm
1	sce_anzahl	1.000	0.537	0.456	-0.405	0.482	0.358
1	mni	0.537	1.000	0.480	-0.442	0.426	0.409
1	Coa_head_dna_Lg	0.456	0.480	1.000	-0.894	0.941	0.706
1	CoA_head_DNA	-0.405	-0.442	-0.894	1.000	-0.866	-0.891
1	CoA_olive_Tailm_lg	0.482	0.426	0.941	-0.866	1.000	0.752
1	CoA_olive_Tailm	0.358	0.409	0.706	-0.891	0.752	1.000
1	CA_y_	0.266	0.555	0.460	-0.423	0.445	0.478
1	CA_Dic	0.273	0.564	0.471	-0.431	0.453	0.486
1	CA_extra_AC	0.281	0.528	0.437	-0.405	0.425	0.453
1	CA_Ringe	0.340	0.573	0.474	-0.412	0.462	0.439
1	CA_Chromatidt	0.042	0.282	0.141	-0.077	0.082	0.023
2	sce_anzahl	1.000	0.436	0.290	-0.268	0.309	0.317
2	mni	0.436	1.000	0.518	-0.576	0.527	0.621
2	Coa_head_dna_Lg	0.290	0.518	1.000	-0.850	0.984	0.753
2	CoA_head_DNA	-0.268	-0.576	-0.850	1.000	-0.872	-0.957
2	CoA_olive_Tailm_lg	0.309	0.527	0.984	-0.872	1.000	0.796
2	CoA_olive_Tailm	0.317	0.621	0.753	-0.957	0.796	1.000
2	CA_y_	0.427	0.532	0.441	-0.525	0.464	0.575
2	CA_Dic	0.468	0.564	0.438	-0.518	0.456	0.562
2	CA_extra_AC	0.375	0.446	0.451	-0.513	0.477	0.563
2	CA_Ringe	0.081	0.350	0.428	-0.406	0.422	0.392

Labo	r	_NAME_	sce_anzahl	mni	Coa_head_dna_Lg	CoA_head_DNA	CoA_olive_Tailm_lg	CoA_olive_Tailm
2		CA_Chromatidt	0.013	-0.142	-0.049	0.087	-0.052	-0.080
3		sce_anzahl	1.000	0.342	0.373	-0.337	0.405	0.372
3		mni	0.342	1.000	0.422	-0.465	0.410	0.456
3		Coa_head_dna_Lg	0.373	0.422	1.000	-0.909	0.947	0.788
3		CoA_head_DNA	-0.337	-0.465	-0.909	1.000	-0.911	-0.892
3		CoA_olive_Tailm_lg	0.405	0.410	0.947	-0.911	1.000	0.869
3		CoA_olive_Tailm	0.372	0.456	0.788	-0.892	0.869	1.000
3		CA_y_	0.198	0.702	0.433	-0.476	0.432	0.498
3		CA_Dic	0.224	0.780	0.437	-0.489	0.436	0.477
3		CA_extra_AC	0.232	0.602	0.462	-0.502	0.470	0.557
3		CA_Ringe	0.252	0.562	0.429	-0.411	0.431	0.433
3		CA_Chromatidt	0.041	0.120	0.024	-0.064	0.063	0.123

Tabelle 37: Korrelationskoeffizienten (nach Spearman) der Zielvariablen von der Chromosomenaberration getrennt nach den drei Laboren

<i>labor</i>	<i>_NAME_</i>	<i>CA_y_</i>	<i>CA_Dic</i>	<i>CA_extra_</i> <i>AC</i>	<i>CA_Ringe</i>	<i>CA_Chrom</i> <i>atidt</i>
1	sce_anzahl	0.266	0.273	0.281	0.340	0.042
1	mni	0.555	0.564	0.528	0.573	0.282
1	Coa_head_dna_Lg	0.460	0.471	0.437	0.474	0.141
1	CoA_head_DNA	-0.423	-0.431	-0.405	-0.412	-0.077
1	CoA_olive_Tailm_lg	0.445	0.453	0.425	0.462	0.082
1	CoA_olive_Tailm	0.478	0.486	0.453	0.439	0.023
1	CA_y_	1.000	0.986	0.974	0.916	0.554
1	CA_Dic	0.986	1.000	0.932	0.905	0.560
1	CA_extra_AC	0.974	0.932	1.000	0.872	0.522
1	CA_Ringe	0.916	0.905	0.872	1.000	0.552
1	CA_Chromatidt	0.554	0.560	0.522	0.552	1.000
2	sce_anzahl	0.427	0.468	0.375	0.081	0.013
2	mni	0.532	0.564	0.446	0.350	-0.142
2	Coa_head_dna_Lg	0.441	0.438	0.451	0.428	-0.049
2	CoA_head_DNA	-0.525	-0.518	-0.513	-0.406	0.087
2	CoA_olive_Tailm_lg	0.464	0.456	0.477	0.422	-0.052
2	CoA_olive_Tailm	0.575	0.562	0.563	0.392	-0.080
2	CA_y_	1.000	0.972	0.940	0.598	0.067
2	CA_Dic	0.972	1.000	0.866	0.584	0.056
2	CA_extra_AC	0.940	0.866	1.000	0.573	0.057
2	CA_Ringe	0.598	0.584	0.573	1.000	-0.066
2	CA_Chromatidt	0.067	0.056	0.057	-0.066	1.000
3	sce_anzahl	0.198	0.224	0.232	0.252	0.041
3	mni	0.702	0.780	0.602	0.562	0.120
3	Coa_head_dna_Lg	0.433	0.437	0.462	0.429	0.024
3	CoA_head_DNA	-0.476	-0.489	-0.502	-0.411	-0.064
3	CoA_olive_Tailm_lg	0.432	0.436	0.470	0.431	0.063
3	CoA_olive_Tailm	0.498	0.477	0.557	0.433	0.123
3	CA_y_	1.000	0.943	0.937	0.773	0.257
3	CA_Dic	0.943	1.000	0.818	0.707	0.169
3	CA_extra_AC	0.937	0.818	1.000	0.742	0.187
3	CA_Ringe	0.773	0.707	0.742	1.000	0.301
3	CA_Chromatidt	0.257	0.169	0.187	0.301	1.000

## 6.2.2 Daten zum CBPI

Hinweis: Für die folgende Abbildung gilt:

Auf der x-Achse sind jeweils die 3 Labore mit 1, 2 und 3 gekennzeichnet. An erster Stelle steht jeweils die Differenz von Low zu Sham, an zweiter Stelle die Differenz von Medium zu Sham, an dritter Stelle die Differenz von High zu Sham und an vierter Stelle die Differenz von der Positivkontrolle (rot) zu Sham.

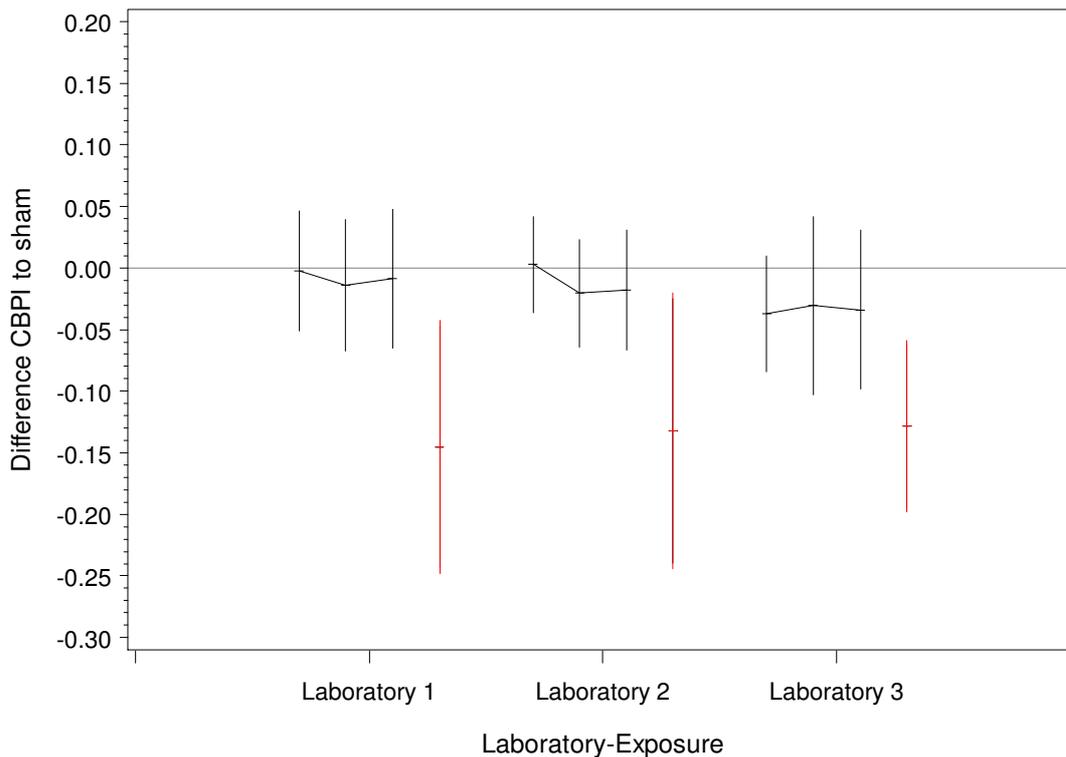


Abbildung 30: CBPI: Mittelwertsdifferenz in Bezug auf die Sham-Expositions-Werte mit 95 % Konfidenzintervall für die drei Labore.

Tab. 38: CBPI – Test auf Trend

Trendscores:		Upper 95 % CI	Lower 95 % CI	p-value primär analysis
CBPI	lab			
	1	-0.02	0.02	0.91
	2	-0.03	0.01	0.81
	3	-0.03	0.01	0.73

Tab. 39: CBPI - Sensitivitätsanalyse

		Laboratory											
		1			2			3					
		Mean	95% Confidence-interval		P-value	Mean	95% Confidence-interval		P-value	Mean	95% Confidence-interval		P-value
CBPI	EG												
	2	-0.00	-0.05	0.05	0.9188	0.00	-0.04	0.04	0.8906	-0.04	-0.09	0.01	0.1316
	3	-0.01	-0.07	0.04	0.6041	-0.02	-0.07	0.02	0.3573	-0.03	-0.11	0.05	0.4087
	4	-0.01	-0.07	0.05	0.7673	-0.02	-0.07	0.03	0.4699	-0.03	-0.10	0.03	0.3050
	5	-0.15	-0.25	-0.04	0.0079	-0.13	-0.24	-0.02	0.0233	-0.13	-0.20	-0.06	0.0010

### 6.3 Expositionsanlage

Die Expositionsanlage ist einer eigenen PDF-Datei der Fa. IT'IS beschrieben, die dem Bericht beiliegt.