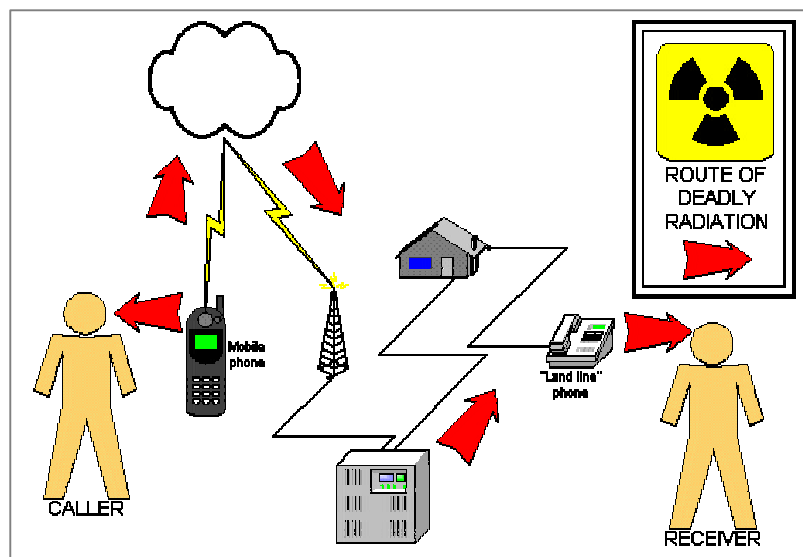


# MOBILTELEFONER OG HELSEFARE

En cytogenetisk *in vitro* studie av radiofrekvente felters påvirkning på humant arvemateriale

Lars Lågeide



Hovedfagsoppgave til cand. scient. graden

i Miljø- og helsevern

2003

# **MOBILTELEFONER OG HELSEFARE**

En cytogenetisk *in vitro* studie av radiofrekvente  
felters påvirkning på humant arvemateriale

Lars Lågeide u961476

2003.04.07

## Forord

Arbeidet som ligger til grunn for denne hovedfagsoppgaven er til dels gjennomført i laboratoriene til Telenor Forskning og Utvikling (FoU) på Kjeller, hos Genetisk seksjon ved Sykehuset Telemark HF og ved Institutt for natur-, helse- og miljøvern ved Høgskolen i Telemark, avd. Bø.

Oppgaven inngår som en del av cand. scient. studiet i miljø- og helsevern ved Høgskolen i Telemark.

Mange har vært involvert. Derfor vil jeg takke gjengen på Telenor FoU som har vært til uvurderlig hjelp for gjennomføring av den fysiske delen av oppgaven. Videre må jeg takke de som jobber ved Genetisk seksjon, Sykehuset Telemark HF, for opplæring i laboratoriet. Biblioteket ved Høgskolen i Telemark har vært til stor hjelp ved anskaffelse av litteratur. En spesiell takk til mine veiledere, professor Elin Kure ved Høgskolen i Telemark og avd. leder ved Genetisk seksjon, Sykehuset Telemark HF, Inger-Lise Hansteen. Takk for nært samarbeid i en lærerik prosess.

Bø i Telemark, april 2003.

Lars Lågeide

---

## Innhold

<b>Ordforklaringer og forkortelser</b>	<b>6</b>
<b>Sammendrag</b>	<b>9</b>
<b>1 Innledning</b>	<b>10</b>
<b>2 Teori</b>	<b>12</b>
<b>2.1 Radiofrekvente felt</b>	12
2.1.1 Det elektromagnetiske spekter	12
2.1.2 Kilder i miljøet	13
2.1.3 Radiofrekvente felter fra kommunikasjonsteknologi	13
<b>2.2 Mobiltelefoner og trådløst kommunikasjonsutstyr</b>	16
2.2.1 NMT: Nordic Mobile Telephone	16
2.2.2 GSM: Global System for Mobile Communication	16
2.2.3 Trådløs telefoni	17
2.2.4 UMTS: Universal Mobile Telecommunication	17
2.2.5 Trådløse LAN: Local Area Network	17
2.2.6 LMDS: Local Multipoint Distribution System	18
<b>2.3 Dosimetri</b>	18
<b>2.4 Retningslinjer og grenseverdier</b>	20
<b>2.5 Helse, effekter og mekanismer</b>	22
2.5.1 Ikke- termiske effekter	23
<b>2.6 Biologiske effekter – vitenskapelige funn</b>	23
2.6.1 Effekter på cellemembraner	24
2.6.2 Effekter på utskillelse av kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ )	24
2.6.3 Effekter på nervesystemet	25
2.6.4 Effekter på blod – hjerne barrieren	26
2.6.5 Andre plager	27
<b>2.7 Genotoksiske effekter og kreft – vitenskapelige funn</b>	28
2.7.1 Kromosomaberrasjoner som biomarkør for effekt	29
2.7.2 Mikrokjerner som biomarkør for effekt	30
2.7.3 RF- felt som promotor i kreftutviklingen	31

---

2.7.4 Epidemiologiske studier	32
<b>3 Metoder og materialer</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Generelt</b>	34
<b>3.2 Materialer og teknisk utstyr</b>	34
<b>3.3 Donorutvelgelse</b>	34
3.3.1 Genotyping av <i>GSTM1</i>	35
<b>3.4 Blodprøver til cellekulturer</b>	36
<b>3.5 Kulturoppsett</b>	36
<b>3.6 Lymfocyttkulturer med helblod</b>	37
<b>3.7 Eksponering for radiofrekvente felt</b>	37
<b>3.8 Behandling av lymfocyttkulturer under eksponering</b>	42
3.8.1 Inhiberte og konvensjonelle kulturer	42
3.8.2 Mikrokjerne-kulturer	42
<b>3.9 Fiksering, tillaging av utstryk og farging av lymfocyttkulturer</b>	43
<b>3.10 Cytogenetisk analyse</b>	43
3.10.1 Cytogenetisk analyse av inhiberte og konvensjonelle kulturer	43
3.10.2 Cytogenetisk analyse av mikrokjerne-kulturer	44
3.10.3 Kriterier for scoring av kromosomaberrasjoner	44
3.10.4 Kriterier for scoring av mikrokjerner	46
<b>3.11 Utprøving til flow cytometri</b>	46
<b>3.12 Statistisk bearbeiding</b>	49
<b>4 Resultater</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Generelt</b>	50
<b>4.2 Temperatur</b>	50
<b>4.3 Magnetfelt - 50 Hz</b>	50
<b>4.4 Kromosomaberrasjonsanalyser</b>	51
<b>4.5 Utprøving til flow cytometri</b>	62
<b>5 Diskusjon</b>	<b>63</b>
<b>6 Referanser</b>	<b>75</b>

---

<b>Appendiks A</b>	<b>Oversikt over kjemikalier, materialer og teknisk utstyr</b>	<b>82</b>
<b>Appendiks B</b>	<b>Ekstraksjon av DNA fra humant EDTA- blod</b>	<b>84</b>
<b>Appendiks C</b>	<b>Oppsett av Polymerase Chain Reaction</b>	<b>86</b>
<b>Appendiks D</b>	<b>Estimering av antall hvite blodceller</b>	<b>88</b>
<b>Appendiks E</b>	<b>Fiksering, tillaging av utstryk og farging av inhiberte og konvensjonelle lymfocyttkulturer</b>	<b>89</b>
<b>Appendiks F</b>	<b>Fiksering, tillaging av utstryk og farging av mikrokjerne-kulturer</b>	<b>91</b>

## Ordforklaringer og forkortelser

3 G	Tredje generasjon mobilsystemer
Addukt	Kompleks som dannes når kjemikalie eller metabolitt binder seg til DNA, protein eller annet makromolekyl i en celle
Akson	Nervecelleutløper som leder nerveimpulsen
Allel	En bestemt form av etgen ved et lokus (spesifikk plass på kromosomet)
Aneuploidogen	Stoff som gjennom deler av celledyklus kan forårsake aneuploidi; forårsake unormalt antall kromosomer i en celle
Apoptose	En cellulær forsvars mekanisme som fører til at cellen dør
BHB	Blod- hjernebarrieren
Biomarkør	En substans, struktur eller prosess som kan måles i kroppen eller i dens produkter, og som kan påvirke eller forutsi insidens (sykdomstendens) eller utkomme av sykdom
Biomonitoring	Måling av biomarkører
CA	Kromosomaberrasjoner
Carcinogen	Stoff/agens som fører til kreft
Carcinogenese	Kreftutvikling
Case-control studie	Pasient- kontroll- studie; vitenskapelig metode brukt i epidemiologi
Celleproliferasjon	Celledeling
Celledyklus	Syklus hvor cellene formerer seg; består av en vekstperiode ( $G_1$ ), en periode hvor DNA kopieres (S), videre vekst ( $G_2$ ) og mitosefasen (M) hvor cellen deler seg i to identiske datterceller
Clastogen	Stoff/agens som danner strukturelle endringer i DNA
Cytogenetikk	Cellegenetikk
Detoksifisering	Avgiftning
DNA	Deoksyribonukleinsyre; arvestoff
EDTA	Etylendiamintetraacetat
EEG	Elektroencefalogram; brukes til registrering av hjernens elektriske aktivitet
Epidemiologi	Studie av sykdommers utbredelse i befolkningen

Epigenetiske faktorer	Ikke- genotoksiske stoffer/agens som reagerer med andre stoffer og gjør disse carcinogene
Epoksider	Svært reaktive kjemiske forbindelser som kan forårsake mutasjoner
Flow cytometri	Automatisk metode for til å måle karakteristikk hos partikler i en løsning
Genom	Arvestoffet (Total genetisk informasjon) i en celle
Genotoksisk stoff/agens	Et stoff/agens som har evnen til å virke toksisk (skadelig) på DNA
Genotype	Et individs arvelige (genetiske) egenskaper
GHz	Gigahertz; en milliard hertz
GSM	Global System for Mobile Communication
GST	Glutation S- transferase; enzymfamilie som er viktige i avgiftningen av en rekke kjemiske forbindelser
<i>GSTM1</i>	Gen som koder for dannelsen av et bestemt enzym i GST- familien
Heterozygot	Individ med ulike alleler ved korresponderende lokus
Homozygot	Individ med det samme allel ved det korresponderende lokus
Hz	Hertz; benevnelsen for frekvens - antall bølgetopper som passerer et bestemt punkt pr. sekund
ICNIRP	International Commission on Non-Ionizing Radiation
<i>In vitro</i>	I en eksperimentell situasjon (i laboratoriet)
<i>In vivo</i>	I kroppen
Ion	Positivt eller negativt elektrisk ladet atom eller molekyl
Ioniserende stråling	Stråling som kan slå ut elektroner fra atomer/molekyler og bryte kjemiske bindinger
kHz	Kilohertz; tusen hertz
Kohorte studie	Oppfølgingsundersøkelse av sykdoms -/dødshyppighet i en gruppe over tid
Kromatide	Datterkromosom; en del av et kromosom i delingsfasen
Kromosom	Bærer av arveanleggene i celler med kjerne
Kromosomaberrasjoner	Strukturelle skader på kromosomene
LAN	Local Area Network
LMDS	Local Multipoint Distribution System
Lymfocytter	En type hvite blodceller med kjerne som inneholder DNA
Metabolisme	Kjemisk omdanning av kjemiske substanser i kroppen
Metastasere	Spredning av kreft til omkringliggende vev eller andre plasser i kroppen



MHz	Megahertz; en million hertz
MI	Mitotisk indeks; antall celler i mitosefase pr. 1000 celler
Mitomycin C	Kjemikalie med direkte carcinogen effekt
Mitose	Spredning av kondenserte kromosomer; synlig i lysmikroskop
MMC	Mitomycin C
MN	Mikrokjerner; dannes av fragmenter av kromosomer eller hele kromosomer som av spesielle grunner ikke tas med i cellens hovedkjerne
Mutagen	Stoff/agens som kan forårsake mutasjoner (forandring i arvestoffet)
Neurotransmittere	Signalstoff som overfører nerver signaler fra en nervecelle til en annen
NMT	Nordic Mobile Telephone
<i>NQO1</i>	Gen som koder for et enzym som metaboliserer mitomycin C
Oksidativt stress	Økt opphopning av frie oksygenradikaler (svært reaktive oksygenforbindelser) som kroppens forsvarsmekanismer ikke greier å nøytralisere p.g.a. skade, infeksjon eller kjemiske/fysiske påvirkninger mv.
PBL	Perifere blodlymfocytter
PCR	Polymerase Chain Reaction
Polymorfi	Mange former/varianter
RF	Radiofrekvent
SAR	Spesifikk absorpsjonsrate
Somatiske celler	Kroppsceller
Synapse	Knutepunkt mellom to nerveceller
Synergisme	Samspill
Toksisk	Giftig
<i>TP53</i>	Gen; tumor protein 53
Tumorigenese	Dannelse/utvikling av en tumor (godartet eller ondartet svulst)
Tverrsnittundersøkelse	Undersøkelse av sykdomsbildet til en bestemt gruppe i et bestemt tidspunkt
UMTS	Universal Mobile Telecommunication
WLAN	Wireless Local Area Network

## Sammendrag

Hypotesen for denne undersøkelsen var at eksponering for høyfrekvente elektromagnetiske felter innenfor de fastsatte, internasjonale grenseverdiene ikke gir celledskader som direkte eller indirekte, kan føre til kreft. Humane perifere blod lymfocytter (PBL) med og uten tilleggseksponering for tobakksrøyk *in vivo*, ble eksponert for radiofrekvent (RF) stråling. Det ble gitt en tilleggseksponering *in vitro* for et kjemikalie kjent for å være mutagent; mitomycin C (MMC). Det ble kjørt MN- kulturer og inhiberte og konvensjonelle CA- kulturer. Kromosomaberrasjoner (CA) og mikrokjerner (MN) ble benyttet som effektparametere. Det ble undersøkt om de genererte RF- feltene kunne forårsake økning i CA/MN- frekvensen som følge av RF- strålingen direkte eller i samspill med de nevnte tilleggseksponeringene.

Cellene ble eksponert gjennom hele inkubasjonstiden (gjennom hele cellesyklus) for alle kulturtypene. Eksponeringen med pulsede felter på 2,3 og 16,5 GHz, førte til en målbar oppvarming (0,5 °C for 2,3 GHz og 0,8 °C for 16,5 GHz) i RF- eksponerte kulturer. Gjennomsnittlig signaleffekt for begge frekvensbåndene var 10 W/m<sup>2</sup>. På grunn av temperaturøkningen i RF- eksponerte kulturer ble temperaturen regulert. Det ble gjennomført nye serier for 16,5 GHz.

I denne rapporten presenteres preliminnære resultater for en del av studien ved 16,5 GHz. Det er gjennomført CA- analyser på seriene 7, 8 og 11 for to røykende kvinner (person E og F). Resultatene sett under ett gir ingen indikasjon på at de genererte RF- feltene alene eller gjennom samspill, kan føre til en økt CA- frekvens som lar seg avdekke ved hjelp av den benyttede metoden. Ingen økt CA- frekvens ble funnet som følge av temperaturstigningen i de RF- eksponerte kulturene. De preliminnære resultatene fra denne studien støtter hypotesen for undersøkelsen.

## 1 Innledning

Den omfattende bruken av trådløst kommunikasjonsutstyr spesielt mobiltelefoner, er et kjent faktum. Bruken av denne typen kommunikasjonsutstyr har økt voldsomt det siste tiåret, og for mange brukere er mobiltelefonen en viktig del av forretnings-, handels- og dagliglivet [1]. Stadig flere skaffer seg mobiltelefon, og en del bedrifter og privatpersoner velger vekk fasttelefon til fordel for denne typen telefon. Også barn og unge er utstrakte brukere. På verdensbasis regner man med at det vil være om lag en milliard brukere av denne typen kommunikasjonsutstyr ved utgangen av 2005 [2].

Andelen nordmenn som selv eide mobiltelefon økte raskt på 1990- tallet. Ved utgangen av 2001 var det i den norske befolkningen mellom 9 og 79 år en mobiltetthet på 76 %. Av barn i alderen 9 til 13 år er 35 % eiere av mobiltelefon. For aldersgruppene 13–15 år, 16–19 år, 20–24 år og 25–44 år er respektive 84 %, 95 %, 91 % og 83 % av befolkningen eiere. I gruppene 45–66 år og 67–79 år er andelen henholdsvis 76 % og 49 % [3].

Nå lanseres tredje generasjon telekommunikasjonsutstyr (3 G). UMTS- mobilsystemer, distribusjonssystem for multimedia (LMDS) og trådløse LAN i ulike former (Bluetooth, HiperLAN II) vil med årene tas i bruk av flere. Dette fører nødvendigvis til en økt eksponering av høyfrekvente elektromagnetiske felt i miljøet generelt.

Den økende bruken av trådløst kommunikasjonsutstyr har resultert i en allmenn debatt rundt spørsmålet om ugunstige helseeffekter relatert til radiofrekvent (RF) stråling [1]. Skulle det være slik at eksponering for RF- stråling fra trådløst kommunikasjonsutstyr øker risikoen for ugunstige helseeffekter hos mennesket, vil det på grunn av det store antallet brukere medføre et potensielt, signifikant helseproblem [4]. Bekymringene kommer som følge av at ny teknologi introduseres uten tilstrekkelig informasjon, diskusjon, forskning og utprøving i forskningsmiljøene [2].

En av hovedbekymringene blant forskerne er hvorvidt RF- felter kan forårsake kreft. På grunn av ulike kreftformers lange latenstid og mobiltelefonens relativt nye opprinnelse er

det samlet lite data gjennom epidemiologiske undersøkelser av kreftutvikling som følge av mobiltelefonbruk [5]. *In vivo* og *in vitro* genotoksisitets- og carcinogenese studier vil bli viktig som en del av vurderingsgrunnlaget når det gjelder kreftrisiko [5].

Flere vitenskapelige studier [1,6-8] konkluderer med at RF- felt, ved ikke- termiske effekter, ikke har noen direkte mutagen, genotoksisk eller carcinogen effekt. 3 G vil ta i bruk nye frekvensområder som tidligere ikke har vært vanlig i bruk hos den generelle befolkning. Det er ikke godt kartlagt hvilken virkning og effekt en økt eksponering av denne type RF- felter kan ha.

I denne *in vitro* studien ble det undersøkt om RF- felter ved 2,3 og 16,5 GHz kan gi arvestoffskader ved eksponering under første celledeling hos humane perifere blodlymfocytter (PBL). Antall skader som ble indusert og reparert i PBL eksponert for RF- felter med og uten tilleggseksponering ble studert. Eksponering for tobakksrøyk *in vivo*, og mitomycin C (MMC) *in vitro* ble benyttet som tilleggseksponering.

Kromosomaberrasjoner (CA) og mikrokjerner (MN) ble brukt som effektparametere. Metoder for fiksering av helblodskulturer til bruk i flow cytometri for testing av celleproliferasjon, ble prøvd ut. Hypotesen for undersøkelsen var at eksponering for høyfrekvente elektromagnetiske felter innenfor de fastsatte, internasjonale grenseverdiene ikke induserer skader i kromosomene.

## 2 Teori

### 2.1 Radiofrekvente felt

#### 2.1.1 Det elektromagnetiske spekter

Radiofrekvent (RF) stråling er en del av det elektromagnetiske spekter (tabell 2.1), plassert mellom frekvensene for svært lavfrekvente felt (VLF) og frekvensene for synlig lys [8]. RF-stråling er normalt definert i området mellom 100 kHz og 300 GHz [9,10], og er ikkeioniserende. Det betyr at strålingen ikke bryter de svakeste kjemiske bindinger direkte og ioniserer molekyler [1,7]. Annen høyfrekvent stråling som for eksempel ultrafiolett-, røntgen- og gamma- ( $\gamma$ ) stråler kan ionisere atomer eller molekyler [11], og forårsake skade på biologisk vev selv ved svært lave intensitetsnivåer. Dette kalles ioniserende stråling. Ikkeioniserende elektromagnetisk stråling regnes som harmløs ved lave intensitetsnivåer, men kan være skadelig ved høy intensitet (for eksempel mikrobølger ved svært høye intensitetsnivåer i mikrobølgeovner) [1].

**Tabell 2.1 Det elektromagnetiske spekter**

	Bølgelengde ( $\lambda$ )	Frekvens ( $f$ )
Ioniserende stråling	< 100 nm	$> 3 \cdot 10^{15}$ Hz
Ultrafiolett stråling (UV)	100–400 nm	800–3000 THz
Synlig lys	400–700 nm	400–800 THz
Infrarød stråling	0,7–1 mm	0,3–400 THz
Mikrobølger	1–1000 mm	0,3–300 GHz
Radiofrekvent stråling	1 mm–3 km	0,1 MHz–300 GHz
Svært lavfrekvente elektromagnetiske felt (VLF)	3–1000 km	0,3–100 kHz
Ekstremt lavfrekvente elektromagnetiske felt (ELF)	> 1000 km	< 300 Hz
Statisk elektriske og magnetiske felt	$\infty$	0

Kilde; Juutilainen J og de Seze R (1998) [9].

### *2.1.2 Kilder i miljøet*

Naturlig eksponering for RF- stråling er ubetydelig [12]. Det innebærer at de RF- kildene mennesket omgir seg med er skapt av mennesker. Antropogene RF- felt har lenge vært representert i vårt miljø. En vanlig kilde utenfor hjemmet er kommersiell radio- og tv- kringkasting. I tillegg kommer ulike telekommunikasjonsfasiliteter. Radio- og tv- kringkastingen står for størsteparten av strålingen fra disse kildene. Sterkere elektromagnetiske felter enn de vi utsettes for av radio- og tv- kringkasting og ulike telekommunikasjonsfasiliteter kan oppstå i nærheten av radarsystemer. I hjemmet finner vi kilder som mikrobølgeovner, mobiltelefoner og annet trådløst kommunikasjonsutstyr. I arbeidsmiljøet utsettes man for RF- stråling fra en rekke industrielle prosesser. Industrien benytter utstyr (mikrobølgeovner, lamineringsmaskiner for tre og plastikk etc.) som avgir slik stråling, og ofte finner vi RF- felter med relativ høy intensitet i disse miljøene [13].

### *2.1.3 Radiofrekvente felter fra kommunikasjonsteknologi*

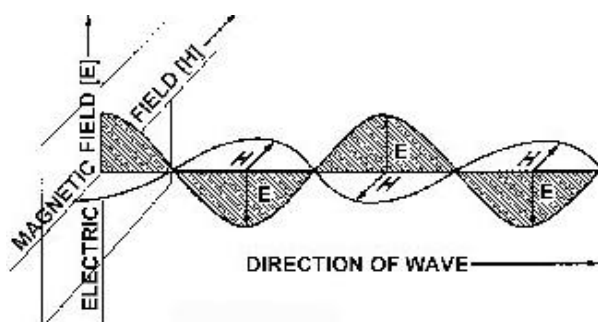
Mobiltelefoner og deres basestasjoner mottar og sender signaler ved hjelp av elektromagnetiske bølger. Dette er også referert til som elektromagnetisk stråling, felt, eller radio- bølger [1]. En elektromagnetisk bølge har et elektrisk og et magnetisk felt som bølger mellom deres høyeste verdier (både positive og negative) og null [1]. Elektriske felter (E) dannes når det oppstår spenningsforskjeller som fører til at elektrisk ladde partikler (elektroner eller ioner) erfarer en viss, elektrisk kraft. Er de ladde partiklene frie til å bevege seg dannes en elektrisk strøm [14]. E- feltet måles i volt pr. meter (V/m).

Magnetiske felter er på lik linje med E- feltet et fysisk felt. Feltet oppstår rundt elektriske ledere som transporterer elektrisk strøm, beveger ladde objekter eller magnetiserte gjenstander. Magnetfeltene kan være statisk eller variere over tid. Magnetiske felter kan angis som magnetisk flukstetthet (B) eller som magnetisk feltstyrke (H), hvor enheten er ampere pr. meter (A/m) [1]. Litteratur som omtaler RF- felter, bruker magnetisk feltstyrke (H) og A/m som benevnelse, mens de fleste forskere på ekstremt lavfrekvente felter (ELF) benytter magnetisk flukstetthet (B). Videre i denne rapporten vil H- felt brukes som betegnelse på magnetiske felter.

E- og H- feltene i den elektromagnetiske bølgen brer seg ut i rommet fra en kilde [14]. Intensiteten ( $I$ ) til den elektromagnetiske bølgen er den energien som passerer gjennom et tverrsnitt på en kvadratmeter pr. sekund, og oppgis som watt pr. kvadratmeter ( $\text{W}/\text{m}^2$ ) [1].

Egenskapene til det elektromagnetiske feltet varierer med avstanden til kilden, og det deles inn i fjernfelt og nærfelt. Fjernfeltet er feltet som vi finner i en avstand på en eller flere bølgelengder fra kilden [9,15]. Det er her viktig å være klar over at det mellom nærfeltet og fjernfeltet ikke er noe absolutt skille, men en gradvis overgang. Avhengig av hvor mange bølgelengder man beveger seg bort fra feltet, vil fjernfeltkomponentene eller nærfeltkomponentene dominere i ulik grad. Det hele avhenger en god del av kildens geometri. I fjernfeltet kan vi betrakte de typiske trekkene for en elektromagnetisk bølge hvor E- og H- feltene er i fase (figur 2.1). Det vil si at feltenes høyeste verdier (både positive og negative) inntreffer samtidig [1]. Feltet kan her tilnærmes en plan bølge, som kjennetegnes ved at feltfronten innehar en plan geometri, E- og H- feltene er i fase, og vektorene er koblet vinkelrett på hverandre [16]. Den elektromagnetiske bølgen beveger seg med lyshastigheten i en retning som er vinkelrett på E og H feltet (figur 2.1). Bølgelengden ( $\lambda$ ) til en elektromagnetisk bølge kan beregnes ved  $\lambda = \frac{c}{f}$  hvor  $c$  er lyshastigheten ( $3 \times 10^8$  m/s) og  $f$  er frekvensen. Bølgelengden på strålingen som sendes ut fra en GSM mobiltelefon (GSM 1800) er med utgangspunkt i dette ca. 20 cm. Bølgelengden for en GSM 900 vil være omtrent dobbel så lang. Avstanden fra kilden til de stedene der fjernfeltet dominerer, er altså avhengig av frekvensen. Det vil si antall bølger som passerer et tenkt punkt pr. tidsenhet. En syklus pr. sekund benevnes hertz (Hz). For de høyeste frekvensene innen RF- felter, mikrobølger med frekvenser fra 300 MHz til 300 GHz, er bølgelengden så kort at mennesket hovedsaklig eksponeres i fjernfeltet [14].

I nærfeltet er situasjonen mer komplisert, og det vil her være liten umiddelbar sammenheng mellom de elektriske og magnetiske feltene. Ved antennen vil det lagres opp en betydelig mengde elektromagnetisk energi som strømmer fra og til. Dette innebærer at maksimum og minimum til E- og H- feltet ikke opptrer til samme tid. Feltet vil i nærområdet ikke utvise likhet med en plan bølge [16]. I praksis vil dette si at det er svært vanskelig å fastslå eksponeringen i nærfeltet, og E- og H- feltene må evalueres separat.



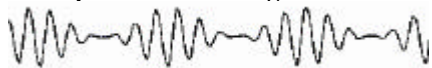
Figur 2.1 Elektrisk- (E) og magnetisk (H) felt i fase. E- og H feltets høyeste positive og negative verdier inntreffer samtidig.

En konstant radiofrekvent bølge som utgangspunkt for kommunikasjon, kan også kalles en ”bærebølge”. Denne kan etter visse grep transportere informasjon fra kilde til mottaker. Informasjonen må legges eller kodes til bærebølgen, og dette er en prosess som kalles modulasjon [1]. Modulasjonen kan gjøres på flere måter. Ved frekvensmodulasjon (FM) varierer frekvensen mens feltstyrken (amplituden) er konstant. En annen form for modulasjon er amplitudemodulasjon (AM) hvor frekvensen er konstant mens amplituden varierer [13]. Pulsmodulasjon er en form for AM (figur 2.2). Informasjonen kan overføres analogt eller digitalt.

**A. Umodulert signal**



**B. Amplitudemodulert signal**



**C. Pulsmodulert signal**



Figur 2.2 Skjematisk presentasjon av et umodulert (kontinuerlig) signal (A) og to former for amplitudemodulerte signal; amplitudemodulasjon (B) og pulsmodulasjon (C).

Kilde; Juutilainen J og de Seze R (1998) [9].



Det er hovedsakelig to typer av RF- signaler, kontinuerlige og pulsede. Kontinuerlige signaler sendes hele tiden senderen er slått på. Amplituden eller styrken signalet sendes med kan variere. Pulsede signaler sendes i pulser når senderen er slått på. Pulsene er som regel overført ved regelmessige intervaller, i en svært rask rekkefølge, med forbigående små opphold mellom pulsene. Når det gjelder overføring av informasjon ved hjelp av trådløs kommunikasjon er pulsens mønster av stor betydning [8].

Styrken på signalene nær mobiltelefonen som genereres ved kommunikasjon mellom telefon og basestasjon, er langt sterkere ved sending fra mobiltelefonen enn ved mottak av signaler fra basestasjonen [13]. Det er altså hovedsakelig under en samtale at telefonen er aktiv. Flere faktorer influerer på de elektromagnetiske feltene som dannes under en samtale og gjør dem komplekse.

## **2.2 Mobiltelefoner og trådløst kommunikasjonsutstyr**

Under følger en beskrivelse av ulike mobiltelefonsystemer som brukes og vil bli brukt i Norge, samt kjennetegn ved disse:

### *2.2.1 NMT: Nordic Mobile Telephone*

Dette er første generasjons mobiltelefonsystem. Systemet benytter analog teknikk, frekvensmodulerte og ikke pulsede felt med frekvenser omkring 450 (NMT 450) og 900 MHz (NMT 900). Utsendt effekt for NMT 450 er maksimalt 1,5 W og maksimalt 1,0 W for NMT 900. Nivået reguleres automatisk ned til en tidel av maksimal utgangseffekt dersom kommunikasjonen med basestasjonene er god [13].

### *2.2.2 GSM: Global System for Mobile Communication*

GSM kalles andre generasjons mobiltelefonisystem. Systemet benytter en digital teknikk med fasemodulerte, pulsede felter og bæreølger rundt 900 (GSM 900) og 1800 MHz (GSM 1800). De fleste nyere telefoner kan motta og sende signaler i begge disse frekvensbåndene (dualbandtelefoner). Informasjonen kodes inn i et frekvensbånd på ca. 200 kHz omkring selve bæreølgen. Telefonene avgir maksimalt en effekt på 2 W (GSM 900) respektivt 1 W (GSM

1800) under selve pulsene. Gjennomsnittlig utgående effekt er høyst på 0,25 W respektive 0,125 W. Utsendt effekt reguleres automatisk etter hvor god forbindelsen med basestasjonen er (adaptive power control, APC), ved gode forhold helt ned til et minimumsnivå på ca. 1/100 av maksimalt nivå [1,13,17].

### *2.2.3 Trådløs telefoni*

Første generasjon trådløse telefoner, det analoge systemet CT1, benytter frekvenser omkring 900 MHz, og har en uteffekt på 0,01 W. Andre generasjons trådløse telefoner, CT2 og DECT (Digital European Cordless Telecommunication system), benytter digital teknikk og pulsede felter. Systemene brukes i private hjem og på arbeidsplasser. Frekvensområdene er på ca. 900 MHz for CT2 og 1900 MHz for DECT. Utsendt effekt i pulsen for telefonene vil være på 0,125–0,25 W, med en middeffekt på 0,005–0,01 W [17].

### *2.2.4 UMTS: Universal Mobile Telecommunication*

Tredjegerasjons mobiltelefoner (UMTS) ble lansert i Europa i 2002. Utenfor Europa vil dette systemet bære navnet IMT–2000 (International Mobile Telecommunication–2000) [1]. Systemet vil tilby et spekter av tjenester. UMTS vil gjøre samkjøring mellom telekommunikasjon, IT og media lettere og bedre. Det vil tilbys multimedietjenester og raskere overføring av data enn det som er mulig med GSM [18]. Systemet vil anvende frekvenser i området 2000–2200 MHz. Maksimal intensitet vil være 10 ganger høyere enn gjennomsnittlig intensitet. Høyeste gjennomsnittlige utgangseffekt for en terminal som sender tale vil være det samme som for GSM 1800, rundt 0,125 W. For dataterminaler vil denne utgangseffekten være i størrelsesorden 0,250 W [13]. Som for GSM vil nivået reguleres ned når forbindelsen til basestasjonene er god. UMTS vil ikke sende signaler med høyere intensitet enn det som er nødvendig for at basestasjonen skal oppfatte signalet.

### *2.2.5 Trådløse LAN: Local Area Network*

Flere ulike typer trådløse LAN (WLAN) blir benyttet i dag. Dette er trådløse applikasjoner som benytter frekvenser mellom 2450 og 5000 MHz. Bluetooth er et system for å erstatte kabel- og infrarød overføring mellom ulike IT-komponenter. Systemet bruker frekvenser på

2450 MHz med en gjennomsnittlig uteffekt på 0,001 W. Bluetooth kan også brukes til trådløs telefoni, men vil da ha en gjennomsnittlig uteffekt på 0,03W. Hiperlan2 er en ny standard for WLAN som skal kunne overføre informasjon raskere enn tidligere utgaver. Frekvenser rundt 5000 MHz blir brukt med en utgangseffekt på 0,2 W [17].

### 2.2.6 LMDS: Local Multipoint Distribution System

Dette er ny (3 G) trådløs bredbåndteknologi som vil brukes til overføring av lyd, data, internett og video. Frekvensområdene som vil bli benyttet er avhengig av lisensen til den enkelte operatør i markedet, men vil trolig ligge i frekvensområdet rundt 40 GHz [19].

De elektromagnetiske feltene som genereres fra de ulike typene telekommunikasjons-utstyr, varierer både med tanke på frekvenser og intensitetsnivåer. Likeledes er det stor variasjon i hvordan feltene sendes ut fra kilden, om signalene har kontinuerlig eller pulset karakter, og hvilken modulasjon som er valgt. Dette vil sammen med avstanden til kilden (antennen), lokalisering for eksponering, tilstedeværelse av faktorer/strukturer som skjermer eller reflekterer feltene og tiden et menneske befinner seg i disse omgivelsene, ha betydning for den totale eksponeringen [8].

## 2.3 Dosimetri

Dosimetri er en viktig komponent for enhver vitenskapelig studie som vurderer effekter av RF-felter på biologiske systemer [20]. Kroppen absorberer energi fra de elektromagnetiske feltene den eksponeres for. Feltene trenger bare et stykke inn i biologisk vev, og dybden avtar når frekvensen øker. Frekvensstørrelsen er derfor viktig med tanke på hvor mye energi kroppen absorberer, og hvor absorpsjonen finner sted. For absorpsjon av energi i kroppen kan man dele de elektromagnetiske feltene inn i fire områder etter frekvens [2]:

- Fra ca. 100 kHz til mindre enn 20 MHz hvor absorpsjonen i kroppen øker raskt med økende frekvens og signifikant absorpsjon kan oppstå i nakke og legger.
- Fra ca 20 MHz til ca. 300 MHz hvor relativ høy absorpsjon kan oppstå i hele kroppen, samt at det kan oppstå resonans i deler av kroppen (for eksempel hode).

- Fra ca. 300 MHz til flere GHz hvor signifikant lokal, ikke- uniform absorpsjon kan oppstå.
- Og til slutt for frekvenser over 10 GHz, hvor energiabsorpsjon hovedsakelig oppstår i kroppens overflate.

Med bakgrunn i ovenfor nevnt vil det være behov for å bestemme styrken på feltet i de forskjellige delene av kroppen som er eksponert. Dette krever kjennskap til de elektriske egenskapene til forskjellige typer vev. Når de elektriske egenskapene er kjent, kan man beregne både de elektriske (E) og magnetiske (H) feltene i den eller de delene av kroppen som er eksponert for elektromagnetiske felt [1]. Spesifikk absorpsjonsrate (SAR) er den fundamentale og vidt aksepterte RF- dosimetri parameteren [21]. Parameteren benyttes hovedsakelig for frekvenser høyere enn 100 kHz [16], og beskriver mengden energi som absorberes pr. sekund i et kilogram vev. SAR angis i watt pr. kilogram (W/kg).

Eksponering for lavfrekvente elektriske og magnetiske felter resulterer normalt i uvesentlig økning av kroppstemperaturen. For høyere frekvenser (>100 MHz) kan en slik eksponering føre til at temperaturen stiger som følge av energiabsorpsjon [16]. Mekanismen bak en slik økning i temperatur er at frie ioner i kroppsvevet settes i bevegelse av det elektriske feltet og danner en elektrisk strøm [1]. Størrelsen på de induerte strømmingene øker med frekvensen, men er også avhengig av andre variabler. Den elektriske motstanden i vevet hvor strømmen har oppstått, fører til oppvarming [1]. Temperaturen vil øke helt til varmetilførselen er i balanse med temperaturavgivelsen. Det er estimert at det tar flere minutter (ca. 6 minutter) fra RF- eksponeringen oppstår til temperaturlikevekt oppnås [1]. Fører de ovenfor nevnte prosessene til at kjernetemperaturen i organismen øker i forhold til den normale temperaturen, kan såkalte termiske effekter induseres. De retningslinjene som i dag er utformet (se pkt. 2.4), er basert på den termiske virkningen av en slik energiabsorpsjon.

Om det er hele kroppen, deler av kroppen eller kun mindre plasser på kroppen som absorberer energien fra en elektromagnetisk kilde er altså frekvensavhengig. Hvor godt kroppen klarer å kvitte seg med den tilførte energien vil være viktig for hvor mye energi som skal til for å forårsake termiske virkninger. Blodgjennomstrømningen i det eksponerte vevet er derfor

viktig. SAR- verdiene vil variere i ulike deler av kroppen, noe som avhenger av følgende faktorer [2,16]:

- Egenskapene til kilden for feltene, feltenes frekvens, intensitet, polarisasjon og avstand mellom kilde og objekt (nærfelt eller fjernfelt).
- Den eksponerte kroppens størrelse, indre og ytre geometri og dielektriske egenskaper til forskjellige typer vev.
- Refleksjon, absorpsjon og eventuelle spredningseffekter assosiert med overflater eller gjenstander i området rundt den eksponerte kroppen.

Menneskekroppens sammensetning varierer mellom individer, og kanskje er forskjellen størst mellom barn og voksne. Barns kropp inneholder normalt en større mengde ioner enn voksne, noe som følgelig øker konduktiviteten i vevet. De SAR- verdiene som oppstår inne i kroppen vil derfor kunne bli noe høyere hos barn enn hos voksne [1].

## 2.4 Retningslinjer og grenseverdier

I 1988 publiserte forløperen til dagens internasjonale komité for ikke- ioniserende stråling (International Non- Ionizing Radiation Committee, INIRC) retningslinjer for eksponering overfor elektromagnetiske felter i området 100 kHz til 300 GHz. Retningslinjene ble revidert i 1996 og sist i 1998, hvor det samtidig ble utformet og publisert et tillegg for eksponering av tidsvarierende elektriske, magnetiske og elektromagnetiske felt. Disse retningslinjene tar i betraktning den stadig økende bruken av pulsmodulerte elektromagnetiske bølger og beskyttelse for den generelle befolkningen [16].

Dagens internasjonale komité for ikke- ioniserende stråling (International Commission on Non- Ionizing Radiation Protection, ICNIRP) er en uavhengig organisasjon som vurderer den vitenskapelige kunnskapen på helseeffekter av ikke- ioniserende stråling. Med utgangspunkt i denne kunnskapen utarbeider ICNIRP retningslinjer for begrensnig av eksponering [17]. Det er i dag ingen vedtatte forskrifter om RF- stråling i Norge, men det vises i Norge som i EU til retningslinjene utarbeidet av ICNIRP (1998) for frekvenser opp til og med det radiofrekvente området [13].

De internasjonale retningslinjene baserer seg som nevnt, på termiske virkninger fra elektromagnetiske felter [8]. Retningslinjene er ment å beskytte mot dokumenterte korttidsvirkninger av elektriske og magnetiske felt [13]. Det vil si at kun umiddelbare helseeffekter av eksponeringen er lagt til grunn for retningslinjene. Langtidseffekter som for eksempel kreft, er dermed ikke med som en del av vurderingsgrunnlaget [16]. Grunnlaget for retningslinjene er basert på allerede gjennomførte vitenskapelige studier. Det innebærer at de vil være gjenstand for oppdatering dersom ny forskning legger frem resultater av en slik karakter at det er behov for revisjon av grenseverdiene.

Retningslinjene fra ICNIRP (1998) ble utarbeidet i flere trinn. Detaljerte vurderinger av kunnskapsgrunnlaget for å identifisere helserisiko forbundet med eksponering var det første. Deretter ble det, med utgangspunkt i tilstrekkelig etablert kunnskap som viste at eksponering ga grunnlag for helserisiko, utformet grunnrestriksjoner. Disse ble satt på et nivå hvor det ikke var forventet at det skulle oppstå noen helseeffekt. På grunn av usikkerheter i de biologiske data som ble lagt til grunn for grunnrestriksjonene, ble det innført en ytterligere reduksjonsfaktor på ti for elektromagnetiske felter. For den generelle befolkning ble det i tillegg innført en reduksjonsfaktor på fem for samme eksponering [16].

Elektromagnetiske felter mellom 100 kHz og 10 GHz kan ved helkroppseksponeringer føre til økning i kroppstemperaturen [2,17]. En eksponering som gir en temperaturøkning på ca. 1 °C, har en SAR- verdi på ca. 4 W/kg. En høyere intensitet i feltene enn det retningslinjene fra ICNIRP tilråder, har vist seg å gi signifikant oppvarming [16,22].

Mobiltelefoner vil hovedsakelig gi lokal eksponering til hodet, og det vil derfor være ønskelig å beregne en lokal dose for denne aktuelle kroppsdel. Vanligvis sender mobiltelefoner ved effektnivåer som svarer til 0,25 W. Dette medfører en SAR- verdi i biologisk vev på ca. 1,5 W/kg ved 915 MHz, avhengig av telefonens posisjon [23]. Beregninger av temperaturøkning i vev (hodet) ved bruk av mobiltelefoner (915 MHz frekvens, effektnivå 0,25 W og SAR på ca. 1,6 W/kg) er gjennomført av Van Leeuwen et al. (1999) [24]. Studien resulterte i en estimert temperaturøkning på 0,11 °C i det eksponerte området. Økningen oppstod i løpet av den tiden det tar å oppnå likevektstemperatur. Andre, nyere studier [25,26] viser tilsvarende resultater.

Grunnrestriksjonene som er formulert, med bakgrunn i kunnskapen om elektromagnetiske felters innvirkning på kroppen ved ulike SAR- verdier og reduksjonsfaktorer, er forskjellig for yrkeseksponerte og for allmennheten. For det aktuelle frekvensområdet (100 kHz til 10 GHz) gjelder det at eksponeringen ikke bør gi opphav til en helkroppseksponering uttrykt i SAR (midlet over 6 minutter) som overstiger 0,4 W/kg for yrkeseksponerte, og 0,08 W/kg for allmennheten [16]. Disse referansenivåene er ekvivalent med en effektetthet på  $200 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  for 10–400 MHz,  $f/2 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  (hvor  $f$  = frekvens i MHz) for 400–2000 MHz og  $1000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  for 2–300 GHz [11]. For lokal eksponering til hodet bør SAR- verdiene (midlet over 10 gram vev og 6 minutter) for yrkeseksponering og allmennheten ikke overstige 10 W/kg respektive 2 W/kg. Eksponering av ekstremiteter bør på samme måte, ikke gi opphav til SAR- verdier som overstiger 20 W/kg for yrkeseksponering og 4 W/kg for allmennheten [16].

## 2.5 Helse, effekter og mekanismer

Verdens helseorganisasjon (WHO) definerer helse som en tilstand hvor det råder fullstendig fysisk, mental og sosial tilfredshet [1,21]. En slik definisjon gir rom for individuelle tolkninger. Derfor er det viktig å klargjøre betydningen av forskjellige begreper som brukes ved beskrivelse av helse, effekter på helse og bakenforliggende mekanismer.

Biologiske systemer responderer som en del av livsprosessen på en rekke typer stimuli [21]. En biologisk effekt blir til når en eksponering forårsaker merkbare, eller detekterbare fysiologiske forandringer/responser i et biologisk system [27]. Helsefare medfører en effekt som den eksponerte vil se på som ugunstig for sin helsetilstand [21].

Ikke alle biologiske effekter som følge av eksponeringer trenger være farlige for helsen. Noen kan også, under visse forhold, være gunstige. Mange rapporterte biologiske effekter er ubestemmelige når det gjelder deres innvirkning på helse. Derfor er det viktig å forstå biologiske effekter, slik at deres helseskadelige potensial kan vurderes [21].

Noen eksponeringer kan assosieres med målbare biologiske eller fysiologiske forandringer. Om forandringene er bevis for om eksponeringen innebærer en helsefare, avhenger av om skadene er reversible eller ikke, eller om de er i stand til å føre til ufordelaktige effekter på

menneskets fysiske, mentale eller sosiale tilfredshet. Dette vil være gjenstand for individuelle vurderinger, avhengig av individenes mottagelighet [21].

Enhver vurdering av helserisiko fra mobiltelefoner bør avhenge av resultater fra vel overveide, reproduerbare studier. Slike studier kan være eksperimentelle på biologiske systemer (*in vitro* og *in vivo*), eller epidemiologiske på populasjoner av mennesker. Tendensen i det publiserte, vitenskapelige materialet om mobiltelefoner og helsefare, er en overvekt av studier med eksperimentell design. Risikovurderinger av RF- felters virkninger på helse baseres generelt på data fra eksperimenter på biologiske systemer [1]. For å kunne trekke konklusjoner fra eksperimentelle data, slik at de kan ekstrapoleres til virkninger på menneskets helse, må man ha god kjennskap til og forståelse av underliggende mekanismer for de oppnådde resultatene i undersøkelsene.

#### 2.5.1 Ikke- termiske effekter

Som nevnt under pkt. 2.3, kan eksponering for elektromagnetiske felter med frekvenser høyere enn 100 kHz, og med tilstrekkelig høy intensitet, øke kroppstemperaturen. Er økningen i kroppstemperatur på om lag 1 °C vil det kunne induseres termiske effekter. Dette tilsvarer en SAR på ca. 4 W/kg. Dersom temperaturløførselen ikke er av en slik størrelsesorden at den trigger termoregulatorsystemet kan det oppstå ikke- termiske eller spesifikke effekter [9]. De ikke- termiske effektene kalles også biologiske effekter.

### 2.6 Biologiske effekter – vitenskapelige funn

Eksponeering for elektromagnetiske felter som ikke inneholder nok energi til å øke temperaturen i det eksponerte vevet i forhold til kjernetemperaturen, kan hypotetisk påvirke biologiske systemer. Påvirkningen kan være av negativ så vel som positiv art. Slike virkninger som ikke oppstår på grunn av økt temperatur, kalles her for biologiske effekter. De biologiske effektene beskrevet i litteraturen er mange. Under følger en beskrivelse av noen av disse effektene. Se for øvrig Royal Society of Canada, (1999) [8] og Independent Expert Group on Mobile Phones, IEGMP (2000) [1].



### 2.6.1 Effekter på cellemembraner

Elektriske og magnetiske felter virker inn på positivt og negativt ladde partikler (ioner) i menneskekroppen. Cellene i kroppen omslutes av membraner hvor hovedbestanddelene er fett og proteiner. Cellemembranen er viktig for å ivareta cellenes normale funksjon og avgrense cellen fra det omkringliggende miljøet. Proteiner i cellemembranen deltar i aktiviteter som for cellen er svært nødvendig. Slike aktiviteter kan være utveksling av stoffer mellom cellens indre og miljøet som omslutter den, eller signaloverføring innad i cellen. Proteinene kan fungere som reseptorer for hormoner og neurotransmittere, eller de kan regulere innholdet av ioner i cellen ved hjelp av aktiv eller passiv transport gjennom membranen.

Det er gjennomført en del forskning på hvordan proteinmolekyler i cellemembraner påvirkes av RF- felter, og spesielt hvordan en slik eksponering kan ha innvirkning på transporten av ioner som  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  og  $\text{Ca}^{2+}$  over membraner. En økt transport av disse ionene kan påvirke membranens elektriske egenskaper og cellens biologiske funksjoner [8]. IEGMP (2000) konkluderer i sin rapport med at det er beviser for at RF- felter påvirker membranproteiner og forandringer i bevegelsen av ioner over membraner [1]. Effektene oppstår i følge rapporten, når cellene har temperaturer godt under normal kroppstemperatur, eller ved en intensitet i RF- feltene som gir signifikant oppvarming. IEGMP (2000) refererer i tillegg til forskning som viser at RF- stråling fra mobiltelefoner kan påvirke bestanddeler av cellemembranen til hjerneceller. Hvilke effekter forandringene i cellefunksjon kan føre til er ennå usikkert. Den uavhengige ekspertgruppen konkluderer med at det kreves ytterligere forskning for å bekrefte de foreliggende resultatene.

### 2.6.2 Effekter på utskillelse av kalsium ( $\text{Ca}^{2+}$ )

$\text{Ca}^{2+}$  er et viktig ion for flere cellulære mekanismer. Dette kan være muskelkontraksjon hos muskelceller, og overføring av impulser mellom neuroner (nerveceller). Flere forsøk har vist at RF- felter påvirker utstrømmingen av  $\text{Ca}^{2+}$  fra vev i hjernen, og at dette er registrert for felter langt under de fastsatte grenseverdiene [13]. Ettersom resultatene stammer fra studier hvor feltene har hatt frekvenser under 1000 MHz og vært amplitudemodulert ved svært lave frekvenser, har de ingen klar relevans til mobiltelefonetnologi [1,13]. I følge Oftedal og

Johnsson (2002) viser resultater fra mobiltelefoneksponering ingen effekt på  $\text{Ca}^{2+}$ -utstrømming. Det er heller ikke avklart om en slik  $\text{Ca}^{2+}$ -utstrømming kan ha uheldige virkninger [13].

### 2.6.3 Effekter på nervesystemet

Skulle RF-eksponering påvirke utskillelsen av neurotransmittere vil det kunne påvirke hjernefunksjonen [1]. Som nevnt over, spiller  $\text{Ca}^{2+}$  en viktig rolle i overføringen av nerveimpulser. Neurotransmittere er hormonlignende kjemikalier (for eksempel acetylcholine) som skilles ut fra endene til aksonet (nervetråden) og inn i spalten mellom to synapser. Her stimulerer transmitterne dendritter (signalmottakere på en annen nervecelle/akson), og nerveimpulsen overføres til neste nervecelle. Utskillelsen av neurotransmittere involverer  $\text{Ca}^{2+}$  som er til stede i den ekstracellulære væsken omkring nervecellene.

Ved å benytte elektroencefalogram (EEG) kan nervecellenes aktivitet i hjernen registreres. Akutte effekter fra mobiltelefonssignaler har latt seg studere ved hjelp av EEG. Nedenfor beskrives nyere studier som har benyttet RF-felter tilnærmet lik den som genereres fra mobiltelefoner.

Freude et al. (1998) studerte en gruppe friske unge menn i et eksperiment hvor to tester ble utført. En på motoriske egenskaper (fingerbevegelser) og en hvor forsøkspersonene ble gitt visuelle registreringsoppgaver. Begge testene ble utført med og uten eksponering for standard GSM-signaler (916,2 MHz, pulset med en frekvens på 217 Hz). SAR-verdiene ble vurdert til å være vesentlig lavere enn eksisterende grenseverdier. Studien ga ingen målbare forskjeller i motoriske egenskaper hos personene. For den visuelle testen ble det påvist en effekt av de genererte feltene [28]. Forskergruppen gjennomførte samme eksperiment i en ny studie et halvt år etter. Tilsvarende resultater for den komplekse, visuelle testen ble funnet [29]. Preece et al. (1999) testet hvordan mobiltelefonlignende signaler ville gi utslag på reaksjonstiden for flere kognitive funksjoner hos en gruppe personer. Eksponeringene i forsøket simulerte analoge telefoner (kontinuerlige signal, gjennomsnittlig effekt 1 W) og

GSM- telefoner (pulset med frekvens på 217 Hz og gjennomsnittlig effekt 0,125 W). Felles frekvens på 915 MHz ble valgt. Studien viste en effekt på reaksjonshastighet (lavere reaksjonstid) ved eksponering for kontinuerlige signal [30]. Senere har to lignende undersøkelser [31,32] blitt gjennomført av to ulike grupper forskere med Mika Koivisto i spissen. Forsøkene som brukte GSM- eksponering (902 MHz frekvens, pulset med en frekvens på 217 Hz og gjennomsnittlig effekt på 0,25 W), konkluderer med en positiv effekt på responstiden (lavere reaksjonstid) i reaksjons- og årvåkenhetstester.

Krause et al. (2000) studerte effekter av elektromagnetiske felter på hjernens elektriske aktivitet ved hjelp av EEG [33]. Studiepersonene ble eksponert for felter fra en standard GSM- telefon som var festet til hodet. Samtidig ble det gitt oppgaver rettet mot hukommelse. Resultatene ble registrert både med og uten eksponering (902 MHz frekvens, pulset med en frekvens på 217 Hz og gjennomsnittlig effekt på 0,25 W). Det ble konkludert med at de genererte feltene ikke påvirket EEG i hvilende tilstand, men at de kan modifisere hjernens responser ved hukommelsestester.

#### *2.6.4 Effekter på blod – hjerne barrieren*

Blod- hjernebarrieren (BHB) kan karakteriseres som et blodårenett i hjernen med svært selektiv permeabilitet for mange substanser. Ved bruk av telefon holdes denne tradisjonelt svært tett inn mot hodet. For mobiltelefoner innebærer det at antennen og den RF- eksponeringen som genereres, plasseres tett inn mot skallen. Effekter på BHB som følge av eksponering for RF- felter er funnet [8]. Flere studier for å undersøke om BHBs permeabilitet endres av RF- eksponering er gjennomført.

Neubauer et al. (1990) og Salford et al. (1994) viste gjennom sine studier en økt permeabilitet i BHB for SAR- verdier helt nede i 0,016 W/kg [34,35]. I etterkant av dette har lignende forsøk med eksponeringer lavere enn anbefalte grenseverdier, blitt gjennomført uten å finne tilsvarende resultater [13]. Oftedal og Johnson (2002) [13] refererer i sin rapport til følgende studier; Fritze et al. (1997), Tsurita et al. (2000) og Finnie et al. (2001). Disse studiene benyttet signaler opp mot det som brukes av GSM- telefoner. Fritze et al. (1997) viste at

eksponering for GSM- lignende frekvenser med en SAR- verdi på 7 W/kg, kan gi økt lekkasje i BHB umiddelbart etter eksponering. Ingen økning i BHBs permeabilitet funnet i de øvrige studiene.

Kort oppsummert konkluderer store litteraturundersøkelser [1,8] med at det kan være mulige effekter av RF- felter på BHB og biologiske membraners permeabilitet. På grunn av motstridende resultater i forskningen kan man ikke utelukke slike effekter.

### *2.6.5 Andre plager*

Subjektive plager og ulike former for ubehag er rapportert fra mobiltelefonbrukere [36,37]. Som oftest er ikke plagene noen indikasjon på varige skader, men de kan gi innvirkning på den innsatsen som legges ned i ulike typer arbeid [13]. Ved overgangen fra det analoge NMT-systemet til det digitale GSM- systemet ble det rapportert om symptomer i forbindelse med bruk av de nye mobiltelefonene. Symptomene kunne være hodepine, følelse av nedsatt velbehag, varme på og rundt øret og problemer med konsentrasjonen [36]. Disse rapporterte subjektive følelsene sammenfaller med de som ble rapportert i en australsk undersøkelse gjennomført av Hocking (1998) [37].

Med bakgrunn i de rapporterte symptomene ble det utført en omfattende norsk- svensk undersøkelse [36,38]. Tverrsnittundersøkelsen inkluderte om lag 12000 personer som brukte GSM 900 og/eller NMT 900 mobiltelefoner i arbeidssammenheng. Hensikten var å finne ut om GSM- brukere hadde høyere prevalens av de omtalte, subjektive følelsene enn NMT- brukere. Hos 22 % av de norske og 7,4 % av de svenske deltakerne, ble det rapportert at de opplevde symptomer relatert til bruken av mobiltelefon. Varmefølelse på og rundt øret var vanligste rapporterte symptom fra de norske deltagerne. Vanligste rapporterte plage fra de svenske deltagerne var fornemmelse av tretthet. Totalt ble ingen økt risiko for symptomer funnet for de som brukte GSM- telefoner [36,38].

Koivisto et al. (2001) undersøkte hvorvidt digitale RF- felter fra GSM- telefoner kunne ført til subjektive plager/fornemmelser hos 48 frivillige, friske personer (24 av hvert kjønn). To blinde eksperimenter ble utført. Eksponeringstiden var henholdsvis 30 og 60 minutter.

Deltagerne skulle rangere en rekke på forhånd bestemte symptomer. Ingen rapporteringsforskjell ble registrert mellom eksponering og ikke-eksponering. Resultatet stod i kontrast til hva noen av deltakerne rapporterte under intervju i forbindelse med undersøkelsen [39].

De nevnte studiene er gjennomført på friske, frivillige mennesker. Personer som selv sier de er hypersensitive for stråling fra mobiltelefoner finnes. Symptomene disse opplever er trolig individuelle. Det er i dag lite kunnskap om hva hypersensitivitet for elektromagnetiske felt skyldes. Hietanen et al. (2002) [40] gjennomførte et eksperiment med 20 frivillige som selv rapporterte at de var hypersensitive for stråling fra mobiltelefoner. Personene (13 kvinner og sju menn) ble gjennom tre til fire perioder på 30 minutter hver, bedt om å rapportere symptomer/fornemmelser når de opplevde dette. Eksponeringen var med eller uten RF-felter. Kildene var en NMT 900 telefon og to GSM-telefoner (900 og 1800 MHz). Forskjellige symptomer ble rapportert. De fleste hadde relasjon til hoderegionen. Personene ga hyppigere rapportering av fornemmelser da de ikke ble eksponert enn ved eksponering. Ingen av personene kunne skille mellom periodene med eller uten eksponering for elektromagnetiske felt.

De ovenfor beskrevne studiene gir ikke klare svar på hvorvidt eksponering fra mobiltelefoner gir plager i form av varmfølelse, eller andre subjektive følelser som vanskelig lar seg måle. Allikevel kan man ikke utelukke individuelle forskjeller.

Andre studier [28,30,32,33] som har sett på adferd hos mennesket, antyder at RF-felter har målbar innvirkning på menneskets hjernefunksjon og læreevne.

## **2.7 Genotoksiske effekter og kreft – vitenskapelige funn**

Forskjellige studietyper (*in vivo*-, *in vitro*- og epidemiologiske studier) gjennomføres for å få svar på spørsmålet om eksponering fra mobiltelefoner kan føre til kreft.

For at kreft skal utvikle seg kreves det skade på DNA, og det er vanlig å dele carcinogenesen (utviklingen av kreft) inn i tre hovedtrinn; initiering, promosjon og progresjon. I initieringstrinnet oppstår skade(r) i DNA som følge av eksponering for et carcinogent stoff/agens. De fleste av disse skadene repareres. Etter initiering kan cellen dersom skadene

ikke blir reparert og det dannes mutasjoner, bli direkte ondartet. Det vanligste er at flere hendelser må finne sted. Dette kan være genomiske endringer eller stimuli, som kan få den mutante cellen til å dele seg og kanskje føre til økt celleproliferasjon. En slik utvikling kalles progresjon. De stoff/agens som virker inn og fremskynder for eksempel celledelingen, kalles gjerne promoterende agens. Resultatet av promosjon kan være akkumulasjon av DNA-skader. Progresjonsfasen kjennetegnes ved at svulsten blir ondartet, sprer seg (metastaserer) og invaderer omkringliggende vev.

Genotoksisitet har vært fokusområde for en stor mengde studier som er gjennomført. Studiene inkluderer stor variasjon i valg av "endpoints" som tumorigenese, promosjon, progresjon, celleproliferasjon og endpoints relatert til mer direkte DNA-skade. Det kan være kromosomaberrasjoner, mikrokjerner og mutasjoner [8].

### *2.7.1 Kromosomaberrasjoner som biomarkør for effekt*

Endringer i den normale kromosomstrukturen kalles kromosomaberrasjoner (CA). CA kan klassifiseres som intra- og inter- kromosomale aberrasjoner. Den første klassen omfatter aberrasjoner innen et kromosom, mens den andre omfatter rearrangement mellom to eller flere kromosomer [41]. I somatiske celler er frekvensen av spontant oppståtte CA svært lav, men en eksponering for clastogener (agens som danner strukturelle endringer i DNA) kan øke frekvensen betraktelig [42,43].

Økt frekvens av CA er ofte korrelert med økt risiko for kreft [44], og en sammenheng mellom skade på kromosomene og utviklingen av kreft har vært antydning siden begynnelsen av det 20. århundret [45]. Ideen om en kausal assosiasjon mellom CA og kreftrisiko er basert på konseptet om, at genetisk skade i lymfocytter reflekterer lignende skade i celler som gjennomgår carcinogenesen [46]. CA-analyser for biomonitoring av mennesker har vært tilgjengelig siden sent på 1960-tallet [47].

Gjennom en større studie i de nordiske landene (Sverige, Finland, Danmark og Norge) og Italia ble det funnet en økt CA-frekvens i PBL hos personer med påvist kreft [44].

Resultatene støtter tidligere observasjoner fra den nordiske studiegruppen (Nordic Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health) [48]. Resultatene fra studiene viser at CA kan regnes som valide og pålitelige prediktorer for kreft, blant annet som følge av eksponering for carcinogener i miljøet og sigarettøyking [46].

Undersøkelser av kreftfremkallende substanser og ioniserende stråling gjennom eksperimenter på dyr, har vært av stor verdi som supplement til befolkningsstudier av sykdom hos mennesket [1]. Hvorvidt RF- stråling forårsaker kromosomale aberrasjoner har vært studert både *in vivo* og *in vitro*. Resultatene er blandet [1,8,49], og ofte viser svært like studier forskjellige resultater [8]. Det er gjennomgående to forskjellige hypoteser som testes med relasjon til RF- felter og genotoksisk effekt. Den første er om radiofrekvent elektromagnetisk stråling er skadelig for genmaterialet. Den andre hypotesen er om radiofrekvent elektromagnetisk stråling sammen med et kjent genotoksisk agens (kjemisk eller fysisk) kan påvirke det genotoksiske stoffets effekt [50]. En slik påvirkning kan være både positiv og negativ.

### 2.7.2 Mikrokjerner som biomarkør for effekt

Biomonitoring av tidlig genetisk effekt hos mennesket krever nøyaktige, sensitive, helst lettvinde og tidsbesparende metoder [51]. Metoder med mikrokjerner (micronucleus, MN) som mål på kromosomskade i PBL ble først lagt frem på begynnelsen av 1970- tallet. Senere er metodene utviklet trinnvis til det som i dag omtales som ”cytokinesis- block micronucleus test” (CBMN) [52].

MN- analyser fremstår i dag som et godt *in vitro* redskap til å undersøke om clastogener og andre agens/aneuploidogener inducerer avvik i kromosomene [53]. Aneuploidogener er kjemikalier/agens som hemmer dannelsen av spindelapparatet i mitosen, og på denne måten forårsaker at kromosomer trekkes ujevnt til hver sin dattercelle. En eller flere kromosomer kan derfor forbli på utsiden av de to nye kjernene [46].

MN er små ekstra kjerner som kan observeres i interfaseceller. MN dannes fra små asentriske kromosom- eller kromatin- type fragmenter. De kan også dannes av hele kromosomer som er isolert fra kjernen eller henger igjen i celledelingen. Fragmentene/kromosomene etterlates på utsiden av begge dattercellenes kjerner [54]. På grunn av deres forskjellige opprinnelse (fragment eller kromosom) kan MN- induksjon trigges av både clastogener og agens som påvirker celledelingsapparatet [53]. Til MN- studier *in vitro* brukes gjerne humane PBL [51]. MN- analyser regnes i dag som sensitive indikatorer på DNA- skade, men deres innvirkning på menneskets helse er ennå ikke godt forstått [8].

### 2.7.3 RF- felt som promotor i kreftutviklingen

Bevisene for at RF- eksponering har en clastogen eller genetisk effekt ved ikke- termale intensitetsnivåer, og ved intensitetsnivåer hvor man kan forvente termale effekter, er selvmotsigende. Generelt konkluderes det med at RF- stråling ikke er genotoksisk. Ut i fra det kan man anta at en slik eksponering heller ikke kan være initiator for kreft. Skulle elektromagnetiske felter som genereres av mobiltelefoner, kunne relateres til carcinogenesen må det være gjennom andre mekanismer [49]. Dette kan for eksempel være promosjon. Faktorer som selv ikke er genotoksiske, men som reagerer synergistisk med andre stoffer og gjør disse carcinogene, kalles epigenetiske faktorer.

Flere *in vivo* studier har undersøkt om RF- felter kan øve innflytelse på akselerasjonen av kreftutviklingen hos rotter og mus. Royal Society of Canada konkluderer i sin rapport [8] med at slike promosjonsstudier viser en tendens til hyppigere dannelse av brystkreft og hudkreft, og at de gir lavere overlevelse, hos mus. *In vitro* studier av RF- felters innvirkning på celleproliferasjon og transformasjon kan gi verdifull innsikt i hvordan feltene virker inn på promosjon av kreft [21].

Som nevnt er det publisert en stor mengde vitenskapelig litteratur som omhandler eksponering for RF- felter og utvikling av kreft. Beskrivelse, sammenligning og diskusjon av relevante studier med hensyn til CA og MN som biomarkør for effekt er presentert i



diskusjonskapitlet (kapittel 5). Det samme gjelder for RF- felters innflytelse på celleproliferasjon.

#### *2.7.4 Epidemiologiske studier*

For å gi svar på hvorvidt RF- eksponering kan føre til kreft er det også gjennomført epidemiologiske studier på populasjoner/grupper i befolkningen. Epidemiologiske undersøkelser kan brukes til å gi svar på om mobiltelefoner og trådløse telefoner utgjør en risiko for menneskets helse [49]. Studiene baseres oftest på observerte data og sammenhengen mellom eksponering og effekt slik den forekommer i befolkningen. To hovedtyper av design er vanlig: Case- control og kohorte studier.

Som tidligere omtalt er kreft en flertrinnsprosess. Det vil kunne ta år fra en initiering finner sted til sykdommen gjør seg gjeldende. Lang latenstid vil gjøre epidemiologiske studier på kreft, relatert til eksponering fra mobiltelefoner, vanskelig siden bruken av denne typen teknologi stort sett har blitt vanlig de siste 10–15 årene. I tillegg blir det stadig utviklet ny teknologi, noe som gjør eksponeringsbildet komplisert. Korrekt kartlegging av individuelle eksponeringsmønstre kan derfor bli vanskelig. I forhold til mengden eksperimentelle undersøkelser er få epidemiologiske studier gjennomført. Nedenfor følger en kort oppsummering av nyere epidemiologiske studier hvor man ser på sammenhengen mellom bruken av mobiltelefoner/trådløse telefoner og kreft i hoderegionen. Det er valgt å fokusere på lokal eksponering til hodet og ikke helkroppseksponering. Lokal eksponering er synonym med den man utsettes for ved bruk av mobiltelefoner.

Muscat et al. (2000) gjennomførte en case- control studie hvor sammenhengen mellom bruken av trådløse telefoner og risiko for kreft i hjernen ble undersøkt. Casene (469 menn og kvinner) ble plukket ut blant pasienter med hjernekreft fra fem amerikanske sykehus. 422 matchende kontroller ble brukt. Bruken av de trådløse telefonene og parametre som demografi, røyke- og alkoholvaner, utdanning, medisinsk historie mv. ble kartlagt gjennom spørreskjema. Ingen sammenheng mellom bruken av trådløse telefoner og risiko for kreft i hjernen ble funnet [55].

Johansen et al. (2002) har gjennomført en tilbakeskuende kohorte- studie hvor de undersøkte forekomsten av kreft (i hjernen, i spyttkjertlene og leukemi) blant 420095 danske mobiltelefonbrukere i perioden 1982–1995. Det ble ikke funnet noen generell økt risiko for de nevnte kreftformene [23].

Heller ikke Auvinen et al. (2002) fant assosiasjoner mellom kreft i hjernen eller i spyttkjertlene (eng.; Salivary glands) og bruken av mobiltelefon. Som grunnlag for case-control studien plukket forskergruppen ut 398 personer med hjernekreft og 34 personer med spyttkjertelkreft fra det finske kreftregisteret. Fem kontroller ble plukket for hver case [56].

En annen case- control undersøkelse hvor 1429 caser med hjernekreft ble koblet med hver sin kontroll, har sett på sammenhengen mellom bruken av digitale og analoge mobiltelefoner og sykdommen. Denne svenske undersøkelsen som ble utført av Hardell et al. (2002), kunne ikke avdekke noen sammenheng mellom sykdom og bruken av digitale telefoner (GSM og trådløse telefoner). Det ble funnet en assosiasjon mellom bruken av analoge telefoner (NMT-systemet) og kreft. Sammenhengen var tydelig for de som hadde brukt analoge telefoner i lang tid (>10 år). Det var også en sammenheng mellom hvilken side kreften var lokalisert på i forhold til hvor telefonen normalt ble holdt [57].

## 3 Metoder og materialer

### 3.1 Generelt

Det er gjennomført en *in vitro* eksponering av humane perifere blodlymfocytter (PBL). Inhiberte og konvensjonelle kulturer til kromosomaberrasjon (CA) analyse og mikrokjerne (MN) kulturer til MN- analyse er utsatt for radiofrekvente (RF) elektromagnetiske felter med frekvensene 2,3 og 16,5 GHz. I tillegg ble det gjort forsøk på å kjøre egne kulturer til undersøkelse av celleproliferasjon ved hjelp av flow cytometri. Dette ble begrenset til metodeutprøving i laboratoriet.

### 3.2 Materialer og teknisk utstyr

Kjemikalier, materialer og teknisk utstyr er fremstilt i appendiks A.

### 3.3 Donorutvelgelse

Til sammen seks friske og frivillige blodgivere (A–F) var med i undersøkelsen. Tabell 3.1 beskriver egenskapene til blodgiverne.

For å kunne avdekke eventuelle forskjeller i følsomhet mellom kjønnene var personer av begge kjønn med. I tillegg ble det plukket ut to røykende kvinner. Disse hadde i forhold til de andre blodgiverne en ”frivillig” *in vivo* eksponering for tobakksrøyk. Donorene ble genotypet for *GSTM1*, og skulle ha genotype null (være homozygot for polymorfismen) for dette genet. Det vil si at de mangler dette genet som koder for et enzym som avgifter en rekke kjemiske forbindelser. Røykerne har derfor nedsatt evne til å avgifte stoffer de eksponeres for gjennom røykingen, ved hjelp av dette enzymet. De fire ikke-røykerne hadde derfor gunstigere utgangspunkt enn røykerne med hensyn til *GSTM1*. Ved å bruke blod fra samme person til både eksponert prøve og kontrollprøve, ble det tatt hånd om en rekke individuelle faktorer som det ellers ville være vanskelig å kontrollere for.

**Tabell 3.1 Egenskaper hos bloddonorer**

Kode	Beskrivelse
A:	Kvinne, 26 år, ikke røyker
B:	Kvinne, 44 år, ikke røyker
C:	Mann, 40 år, ikke røyker
D:	Mann, 44 år, ikke røyker
E:	Kvinne, 41 år, røyker
F:	Kvinne, 55 år, røyker

Alle har null- genotype for *GSTM1*

### 3.3.1 Genotyping av *GSTM1*

Glutation S- transferaser (GSTs) er viktige i detoksifiseringen av epoksider fra forskjellige PAH- komponenter, for eksempel fra tobakksrøyk som inneholder omtrent femti kjente carcinogener. Det vil derfor være en teoretisk større sjans for at relevante carcinogener i sigarett røyk kan nå DNA, og danne DNA- addukter, hos personer som har genotype null for *GSTM1*- genet [58]. Det er funnet polymorfi i *GSTM1*- genet med begge alleler deletert i omtrent halvparten av befolkningen [59]. Det vil si at omtrent halvparten av befolkningen er homozygot eller heterozygot for villtypen av genet, og at den andre halvparten av befolkningen mangler (er null genotype for) *GSTM1*- genet. I denne studien skulle alle bloddonorer ha genotype null for *GSTM1*.

Genotypingen av bloddonorene ble gjennomført av personell ved Genetisk seksjon, Sykehuset Telemark HF, etter etablerte prosedyrer med bakgrunn i Kristensen et al. (1998) [59]. Første hovedtrinn i en genotyping består av å ekstrahere DNA fra for eksempel blod. I denne undersøkelsen ble DNA ekstrahert fra humant EDTA- blod som beskrevet i appendiks B. I andre trinn amplifiseres (forsterkes) et stort antall kopier av en bestemt DNA- sekvens i dette materialet. Amplifiseringen ble gjennomført ved hjelp av *in vitro* Polymerase Chain Reaction (PCR) som beskrevet i appendiks C. For *GSTM1* dannes det, dersom personen har genet, et PCR- produkt med en lengde på 275 basepar. For personer som ikke har genet (nullgenotype) dannes det ikke noe produkt fra PCR- reaksjonen. Som internkontroll brukes et pseudogen (*GSTM2*) for å vise at PCR- reaksjonen har gått som den skal. Etter PCR- reaksjonen kontrolleres resultatet (PCR- produktet) mot markører med kjente størrelser (kjent antall

basepar) ved hjelp av polyacrylamid gelelektroforese. Etter oppblanding med et "loading" fargestoff, appliseres (overføres) prøven og den kjente størrelsesmarkøren i hver sin brønn i gelen. Gelen plasseres i et kar med en bufferløsning før spenning settes på. Fragmenter fra PCR-reaksjonen har like negative elektriske ladninger, men ulik lengde. I gelelektroforesen vandrer fragmentene på grunn av deres negative ladning, mot anoden i det påførte, elektriske feltet. Korte fragmenter vandrer raskere enn lengre fragmenter. På gelen dannes det horisontale bånd med ulik plassering vertikalt. For å kunne se DNA-fragmentene på gelen farges den med for eksempel, et fluorescerende stoff som etidiumbromid. DNA-fragmentene vil på grunn av oppbundet etidiumbromid fluorescere under UV-lys. Båndene fra fragmentene til den kjente størrelsesmarkøren sammenlignes med båndene fra prøvene.

### **3.4 Blodprøver til cellekulturer**

Blodprøvene ble tatt av personell ved Sykehuset Telemark HF og legekantoret på Bø i Telemark. Tre ganger 6 ml blod fra hver av blodgiverne ble tatt i separate vacutainere tilsatt litium-heparin som antikoagulant. Bloddonorene ble delt inn i følgende par (blokker): A+B, C+D og E+F. Ved hvert prøveoppsett ble det tatt blodprøver fra ett par. Blodpøveuttakingen ble gjennomført på morgenen, og prøvene ble lagret ved romtemperatur til de ble brukt i kulturoppsett samme dag.

### **3.5 Kulturoppsett**

Ekperimentet ble delt inn i serier. Ved hver serie ble blod fra to personer (en blokk) satt opp i kulturer. Hver serie består av til sammen 32 blodkulturer satt opp i kulturdyrkningsrør av typen "tc tube flat side 110 x 16 mm" (Nunc A/S, Danmark). Det ble satt opp 16 cellekulturer for hver av donorene med følgende fordeling:

- Fire kulturer til eksponering for RF- felt.
- Fire kulturer til eksponering for RF- felt i kombinasjon med mitomycin C (MMC). Dette er positivkontroll for RF- eksponerte kulturer.
- Fire kulturer til kontrollkulturer (uten eksponering for RF- felt).
- Fire kulturer til kontroll uten eksponering for RF- felt, men tilsatt MMC (positivkontroll for kontrollkulturer).

### 3.6 Lymfocyttkulturer med helblod

Følgende oppsett ble brukt for alle kulturtypene i denne studien.

I fire sterile flasker av typen "tc flask 25 cm<sup>2</sup>" (Nunc A/S, Danmark) ble det under sterile arbeidsbetingelser, blandet kulturdyrkningsmedium etter følgende oppsett:

- 16,00 ml RPMI- 1640 m/ L- glutamin
- 4,00 ml FBS (Foetal Bovine Serum), kalveserum
- 40 µl gentamicin (antibiotikum)
- 200 µl PHA (phytohemagglutinin P)

Kulturdyrkningsmediet ble blandet godt før fordeling på de 32 merkede kulturdyrkningsrørene (se pkt. 3.5). Fire og fire rør ble tilsatt 2,5 ml medium om gangen. Korkene ble skrudd på etter hvert for å sikre minimal forandring av mediets pH.

Til hvert av de 32 kulturdyrkningsrørene ble det fra blodprøvene tilsatt helblod i en mengde på 300–500 µl. Blodet ble fordelt på samme måte som kulturdyrkningsmediet. Like etter tilsetning ble kulturene blandet for å sikre blodet hurtig kontakt med mediet. Mengden blod var avhengig av andelen hvite blodceller i blodet. Estimering av hvite blodceller ble gjort ved hjelp av Bürkers tellekammer (se appendiks D). Tettheten skulle være minimum en million celler pr. ml ferdig cellekultur. Total mengde cellekultur i rørene skulle ikke overstige 3 ml. Dette for å hindre blodceller i å sedimentere utenfor kulturdyrkningsrørenes vekstflate. Oppsett av kulturer ble gjort innen fire timer etter bloduttak. Blodkulturene ble lagret og transportert ved romtemperatur før inkubasjon morgenen etter.

### 3.7 Eksponering for radiofrekvente felt

Eksponeringen ble bestemt ut fra hva som forventes å bli benyttet i fremtidige kommunikasjonssystemer og hva som benyttes innen slike systemer i dag. På grunn av redusert tilgang på utstyr for generering av frekvenser opp mot 40 GHz (som er forventet tatt i bruk for LMDS) ble 16,5 GHz valgt. 2,3 GHz representerer frekvensen for tredje generasjons mobilsystemer (UMTS) og trådløse datanett (WLAN).

Eksponeringene ble gjennomført i et ekkofritt rom, som kan karakteriseres ved at de elektromagnetiske signalene ikke reflekteres fra vegger og tak. Rommets flater var dekket med et absorberende materiale i en bestemt form, av en bestemt sammensetning og var spesielt tilpasset absorpsjon av frekvenser større enn 100 MHz. Hele det ekkofrie rommet ble varmet opp og brukt som inkubator. Temperaturen ble kontinuerlig målt ved bruk av flere temperaturprober. Temperaturdata ble logget via PC. Manuelle termometer ble også benyttet. Temperaturprobene var plassert i hvert sitt kulturdyrkningsrør tilsatt en vannmengde lik total kulturmengde på 3 ml. Temperaturfølerne ble lagt så nært testmaterialet som mulig (både kontroller og eksponerte kulturer), men ikke inn i RF- feltets stråle. Temperaturen inne i kulturene skulle ligge innenfor intervallet  $37 \pm 0,5$  °C. Panelovner tilkoblet en programmert temperaturkontroller sørget for oppvarmingen. Vifter sirkulerte luften i rommet. Tabell 3.2 viser hvor stabil temperaturen i inkubatorene var for de ulike seriene i undersøkelsen.

**Tabell 3.2 Eksponeringsoversikt med målt temperatur (°C) i inkubatorene fremstilt som aritmetisk gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik**

Serie nr.	Frekvens	Person	Kulturtype	Gjennomsnittstemperatur $\pm$ standardavvik	
				Kontroll	RF- felt
1	2,3 GHz	A+B	I	37,06 $\pm$ 0,13	36,66 $\pm$ 0,24 <sup>1)</sup>
2	2,3 GHz	C+D	I	37,06 $\pm$ 0,12	37,16 $\pm$ 0,13 <sup>1)</sup>
3	2,3 GHz	E+F	I	37,02 $\pm$ 0,13	37,12 $\pm$ 0,13 <sup>1)</sup>
4	2,3 GHz	E+F	K	36,93 $\pm$ 0,11	37,06 $\pm$ 0,12 <sup>1)</sup>
5 + 6	16,5 GHz	A+B	I, K	37,30 $\pm$ 0,12	37,07 $\pm$ 0,25 <sup>1)</sup>
7 + 8	16,5 GHz	E+F	I, K	37,21 $\pm$ 0,10	37,25 $\pm$ 0,15 <sup>1)</sup>
9 + 10	16,5 GHz	C+D	I, K	37,25 $\pm$ 0,22	36,06 $\pm$ 0,12 <sup>2)</sup>
11 + 12	16,5 GHz	E+F	I, K	37,21 $\pm$ 0,22	36,14 $\pm$ 0,14 <sup>2)</sup>
13 + 14	16,5 GHz	A+B og E+F	M	37,27 $\pm$ 0,18	36,15 $\pm$ 0,13 <sup>2)</sup>

*Notat for tabell 3.2:* Forkortelsene er: I= inhibert kultur; K= konvensjonell kultur; M= mikrokjernerkultur;

<sup>1)</sup> Økt temperatur i RF- eksponerte kulturer; <sup>2)</sup> Regulert temperatur for RF- eksponerte kulturer, hvor kontrollkulturer ble inkubert i eget klimaskap

Egenskapene til antenner, felt og det ekkofrie rommet gjorde at kontroller og eksponerte kulturer ble satt inn i samme rom. Det ble gjennomført målinger av 50 Hz magnetfelt generert av panelovner og strømførende kabler. Bakgrunnsstråling fra RF-eksponeringen ble kontrollert ved kontrollkulturene. Tabell 3.3 viser bakgrunnsnivåene for 50 Hz magnetfelt ved kontrollpunktene.

**Tabell 3.3 Målinger, i mikrottesla ( $\mu\text{T}$ ), av magnetfelt (50 Hz) i omgivelsene ved eksponerte kulturer, kontroll kulturer og styreboks for panelovner**

	Eksponert kultur	Kontroll kultur	Styreboks
Panelovner av	0,016 $\mu\text{T}$	0,017 $\mu\text{T}$	57 $\mu\text{T}$
Panelovner på	0,025 $\mu\text{T}$	0,030 $\mu\text{T}$	82 $\mu\text{T}$
Inkubasjonskap	-	0,037 $\mu\text{T}$	-

Det ble oppdaget en temperaturøkning i testkulturer eksponert for RF-felt. Testkulturene hadde samme innhold som kulturer kjørt i eksperimentet. Temperaturstigningen i de RF-eksponerte kulturene førte til at kontrollkulturene for deler av eksperimentet ved 16,5 GHz ble inkubert i eget klimaskap. For å ta hånd om temperaturøkningen i de RF-eksponerte rørene, ble temperaturen i det ekkofrie rommet senket tilsvarende økningen som oppstod på grunn av feltet. Hvilke serier og kulturtyper som ble inkubert ved økt og regulert temperatur fremgår av eksponeringsoversikten i tabell 3.2. Etter temperatur regulering ble nye kontrollmålinger gjennomført for å sjekke om ønsket temperatur var oppnådd. Temperaturen i klimaskapet ble logget som for det ekkofrie rommet. 50 Hz magnetfelt ble kontrollmålt i klimaskapet (tabell 3.3).

Signalnivåene ble fastsatt ut fra CENELEC (1995) "Human exposure to electromagnetic fields – High frequency (10 kHz to 300 GHz)" [60], med verdier for General Public.

Retningslinjene fra CENELEC (1995) samsvarer med retningslinjene fra ICNIRP (1998) [16] ved disse signalnivåene. Tabell 3.4 viser egenskapene til de benyttede signalnivåene.

Modulasjonen er valgt slik at den representerer den modulasjon som er aktuell i et reelt telekommunikasjonssystem. Figur 3.1 viser prinsipielt oppsett for teknisk utstyr ved 16,5



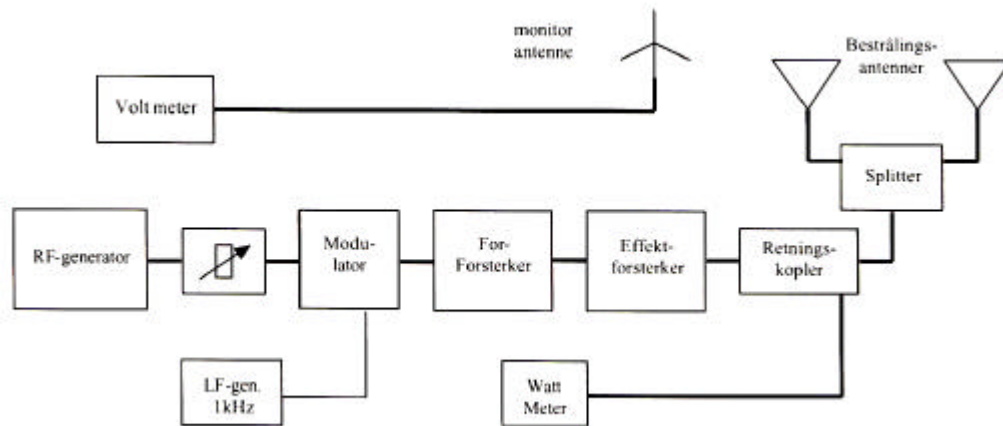
GHz, hvor det ble eksponert to serier ved hver kjøring. For 2,3 GHz var oppsettet prinsipielt det samme, men det ble kun eksponert en serie ved hver kjøring.

**Tabell 3.4 Signalnivå og modulasjon for benyttede signal ved RF-eksponering**

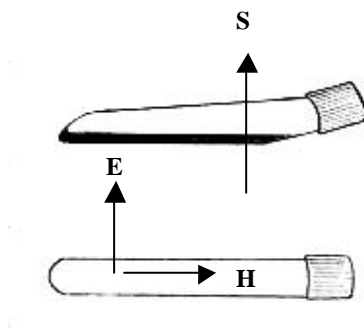
	2,3 GHz	16,5 GHz
Signalnivå (gjennomsnitt)	10 W/m <sup>2</sup>	10 W/m <sup>2</sup>
Modulasjon	200 Hz puls	1000 Hz puls
Pulsvarighet	50 %	50 %

Ved plassering i inkubator ble kulturrørene randomisert. Det vil si blandet og tilfeldig lagt ut. Etter tilsetting av reagenser ble alle kulturene randomisert på nytt. Kulturene ble lagt på en horisontal plate innenfor et område (eksponeringsareal) på 30 x 30 cm. Antennen ble rettet opp mot kulturene fra undersiden. På denne måten bevegte feltet seg opp gjennom kulturene. Feltet ble kalibrert slik at det holdt nominell verdi i eksponeringsfeltets randsoner. Nominelt påtrykt felt var lik minimumsnivået i eksponeringsarealet. Maksimalt nivå lå 1,5 dB over det nominelle nivået for 2,3 GHz, og 3 dB over nominelt nivå for 16,5 GHz. Maksimalt nivå ble registrert i eksponeringsarealets senter. Som det fremgår av tabell 3.4 hadde signalnivået en gjennomsnittlig effekt på 10 W/m<sup>2</sup>. Dette var ved kanten av eksponeringsarealet. Signalene var pulset med en varighet på 50 %. Signalnivået i selve pulsen var på 20 W/m<sup>2</sup>.

Orienteringen av kulturrørene i forhold til RF- feltet ble gjort slik at det elektriske feltet (E) var orientert på tvers av rørenes lengdeakse, og magnetfeltet (H) var orientert i rørenes lengderetning (figur 3.2). Avstanden til antennen var slik at RF- feltet var tilnærmet transversalt. Det vil si at E- og H- feltet var koblet tilnærmet vinkelrett på hverandre.



Figur 3.1 Prinsipiell skisse over instrumentoppsett benyttet ved 16,5 GHz. Ved 2,3 GHz ble det benyttet en antenne, men prinsippet er det samme.



Figur 3.2 De bestrålte kulturer ligger vannrett og feltet beveger seg opp gjennom disse som angitt av vektoren **S**. Det elektriske feltet (**E**) ligger på tvers av rørenes lengderetning og magnetfeltet (**H**) i rørenes lengderetning.

### 3.8 Behandling av lymfocyttkulturer under eksponering

#### 3.8.1 Inhiberte og konvensjonelle kulturer

Inhiberte og konvensjonelle kulturer hadde begge en total inkubasjonstid på 53 timer. Oppstart ble regnet fra det tidspunkt kulturene ble satt inn i inkubatoren. Til positive kontroller (for inhiberte og konvensjonelle kulturer) ble det tilsatt 25 µl MMC med en konsentrasjon på 10 ng/µl, 30 timer etter oppstart. MMC er et kjemisk mutagen og fremkaller en økt frekvens av skader [61].

Inhiberte kulturer ble tilsatt en blanding av 150 µl forvarmet (ca. 37 °C) løsning av hydroxyurea og caffeine sammen med 25 µl colcemid B, 50 timer etter oppstart. Hydroxyurea og caffeine i løsning hemmer reparasjon av DNA [62], mens colcemid B ”arresterer” cellene i metafase [43,61]. Konvensjonelle kulturer ble, 50 timer etter oppstart, tilsatt 25 µl colcemid B. For beskrivelse av løsninger se appendiks A. Oppsett og behandling av inhiberte og konvensjonelle kulturer ble gjennomført i henhold til IAEA (1986) [43].

#### 3.8.2 Mikrokjernekulturer

Total kulturtid for mikrokjernekulturer var 72 timer. Oppstart ble definert som beskrevet over. MMC ble tilsatt 24 timer etter oppstart i samme mengde og konsentrasjon som for inhiberte og konvensjonelle kulturer. Cytochalasin B i en mengde på 30 µl og en konsentrasjon 600 µg/ml løsning, ble tilsatt 44 timer etter kulturstart. Dette tilsvarer 18 µg cytochalasin B i 3 ml kulturer (6 µg/ml). Cytochalasin B hindrer deling av cytoplasma etter at kjernen har delt seg [51]. Se appendiks A for tillaging av løsninger. Behandling av mikrokjernekulturer ble gjennomført etter mest vanlige prosedyre i 25 laboratorium fra 16 land, kartlagt av Bonassi et al. (2001) [52].

Alle kulturene ble blandet godt før og etter tilsetning reagenser. Kulturer som ikke fikk tilsatt reagenser ble blandet på samme måte for å sikre lik behandling.

### 3.9 Fiksering, tillaging av utstryk og farging av lymfocyttkulturer

For inhiberte og konvensjonelle kulturer ble samme fikserings- og fargeteknikk benyttet.

Fikseringsteknikk for mikrokjerner ble prøvd ut og etablert. Samme fargeteknikk ble brukt for mikrokjernekulturer som for inhiberte og konvensjonelle kulturer.

I denne undersøkelsen ble det som beskrevet i pkt. 3.5, kjørt fire replikater av både RF-eksponerte kulturer og kontrollkulturer med respektive positive kontroller tilsatt MMC.

Parallellene i hver gruppe var merket 1, 2, 3 og 4. Ved høsting av kulturene ble kulturør merket med oddetall tatt ut til fiksering 52 ½ timer etter oppstart. Partallskulturer ble tatt ut etter 53 ½ timer. For mikrokjernekulturer ble oddetallskulturene tatt ut 71 ½ timer etter oppstart, og partallskulturene ble tatt ut etter 72 ½ timer. Kulturene ble delt på denne måten for å gjøre fikseringsarbeidet så likt som mulig for alle kulturene. Fiksering, tillaging av utstryk og farging av inhiberte og konvensjonelle kulturer ble utført etter de retningslinjer som er beskrevet i IAEA (1986) [43], samt etablert praksis ved Genetisk seksjon, Sykehuset Telemark HF. For detaljert beskrivelse av fremgangsmåte se appendiks E. Ved fiksering, tillaging av utstryk og farging av mikrokjernekulturer, ble prosedyre ved Genetisk seksjon, Sykehuset Telemark HF, fulgt. Disse samsvarer med generelt aksepterte metoder kartlagt av Bonassi et al. (2001) [52], og er listet opp i appendiks F.

### 3.10 Cytogenetisk analyse

#### 3.10.1 Cytogenetisk analyse av inhiberte og konvensjonelle kulturer

Standard prosedyre for kromosomaberrasjonsanalyse etter IAEA (1986) [43] ble gjennomført.

For å sikre en blind analyse og for å unngå "bias" under scoringen, ble alle preparatene kodet.

Analysen ble gjennomført ved konvensjonell mikroskopi, og preparatet ble systematisk skannet ved lav forstørrelse (100x). Skanningen startet i preparatets øvre venstre del.

Startkoordinatene ble notert. De metafasecellene som dukket opp i synsfeltet, og som var av en slik kvalitet at analyse for antall kromosomer og aberrasjoner kunne gjennomføres, ble studert ved høyere forstørrelse (1000x). Ved "bunnen" av preparatet ble det flyttet ett synsfelt til høyre før skanning på samme måte motsatt vei. Slik ble hele preparatet undersøkt metodisk, og hele dets område dekket. For inhiberte kulturer ble 50 fargede metafase celler (mitoser) telt for hver av parallellene i en serie. For konvensjonelle kulturer ble det på samme

måte, telt 100 fargede metafase celler. Kriteriene for scoring av kromosomaberrasjonsanalyser er beskrevet i pkt. 3.10.3.

### *3.10.2 Cytogenetisk analyse av mikrokjernekulturer*

Cytogenetisk analyse av mikrokjernekulturer ble ikke gjennomført i denne oppgaven. Under følger en beskrivelse av metoden for gjennomføring av analysen. Preparatene kodes som for inhiberte og konvensjonelle kulturer. Analysen gjennomføres ved hjelp av mikroskop ved 1000x forstørrelse [65,66]. Det er vanlig å bruke to mål for mikrokjernefrekvens. Enten kan mikrokjernefrekvensen uttrykkes som antall mikrokjerner pr. 1000 binukleære celler eller som frekvensen av binukleære celler med mikrokjerner pr. 1000 binukleære celler [52]. En kombinasjon av disse vil gi mer informasjon enn hver enkelt uttrykksform. Derfor kan det være hensiktsmessig å registrere antall mikrokjerner i 1000 binukleære celler, samt antall celler med 1, 2, 3 og flere mikrokjerner [67]. Kriterier for scoringer av mikrokjerner er beskrevet i pkt. 3.10.4.

### *3.10.3 Kriterier for scoring av kromosomaberrasjoner*

Kromosomaberrasjoner deles gjerne inn i kromosomtype- og kromatidetype aberrasjoner. Førstnevnte involverer skade i begge kromatidene i et kromosom, mens den andre typen omfatter skade i kromosomets ene kromatide [43]. I denne studien ble det registrert ulike typer kromosomtype- og kromatidetype aberrasjoner. Under følger en kort beskrivelse av scoringskriteriene for ulike aberrasjoner. Figurer er hentet fra Buckton og Evans (1973) [68].

*Kromosomtype aberrasjoner*

Normalt metasentrisk kromosom (midtstilt centromer).



Kromosombrudd. Kromosom med asentrisk fragment (uten centromer).



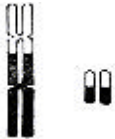
Ring og fragment. Sentriske ringer er parede kromatider som danner en ring med centromer. Asentriske ringer er parede kromatider som danner ring, men mangler centromer.



Perisentrisk inversjon hvor en del av kromosomet er delt og snudd 180 ° rundt centromeren.



Symmetrisk utbytte mellom to kromosomer.



Disentrisk kromosom med tilhørende fragment.



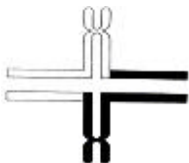
Isokromatidegap/kromosom gap. Involverer begge kromatidene ved samme locus. Gapets størrelse er mindre enn diameteren til en til to kromatider. Varianter av isokromatidebrudd kan være at de brutte endene slår seg sammen og danner en løkke under centromeren.

*Kromatidtype aberrasjoner*

Kromatidegap. Omfatter den ene kromatiden. Gapet er mindre enn bredden til ett til to kromatider.



Kromatidebrudd/kromatidefragment. Fragmentet kan ligge som vist her, eller som en forlengelse av kromatiden med en åpning større enn diameteren til to kromatider.



Utbytte mellom kromosomer kan gi symmetriske (som vist her) eller asymmetriske figurer.

#### 3.10.4 Kriterier for scoring av mikrokjerner

Ved denne analysemetoden må man identifisere binukleære celler og score mikrokjerner i disse cellene. Under oppsummeres de vanligste identifikasjons- og scoringskriteriene kartlagt av Bonassi et al. (2001) [52].

##### *Identifisering av binukleære celler*

1. Den binukleære cellen må ha to runde/ovale kjerner.
2. De to kjernene må være ved samme kondensasjonstrinn.
3. Kjernene må ha lik størrelse.
4. Kjernene kan berøre eller overlappe hverandre.
5. Den cytoplasmiske forbindelsen mellom delene i den binukleære cellen må være inntakt og synlig.
6. De to kjernene kan være heftet sammen av en tynn kjerneplasmisk bro.
7. Kjernene må ikke være i et tidlig stadium av apoptose (celledød).

##### *Scoring av mikrokjerner i binukleære celler*

1. Mikrokjernen er morforlogisk lik, men mindre enn hovedkjernen.
2. Mikrokjernen er rund eller oval i fasong.
3. Diameter til mikrokjernen er mellom 1/3 og 1/6 av hovedkjernen.
4. Mikrokjernen er "nonrefractile".
5. Mikrokjernen skal ikke være i fysisk sammenheng med hovedkjernen.
6. Den kan overlappe eller berøre hovedkjernen.
7. Mikrokjernen skal ha samme farge og fargeintensitet som hovedkjernen.

### **3.11 Utprøving til flow cytometri**

Opprinnelig ble flow cytometri etablert som en automatisk metode for å måle optiske eller fluoriserende karakteristikk til celler eller partikler i en løsning [63]. Cellenes størrelse og indre kompleksitet bestemmer deres egenskaper til å spre lys. Fluorescens kan indueres ved tilføring av fluoriserende stoffer som binder seg til cellekomponentene. Prinsippet for flow cytometri er å føre cellene gjennom en lyskilde (laserstråle), hvor celler med forskjellige egenskaper absorberer og reflekterer ulike frekvenser. De reflekterte lyssignalene samles,

sendes gjennom en serie filter hvor ulike signaler av interesse registreres, digitaliseres og lastes inn i en datamaskin [63]. Slik kan cellene/partiklene sorteres etter bestemte, definerte egenskaper. Flow cytometri regnes i dag som et raskt, sensitivt og reproduktivt verktøy med anvendelighet innen klinisk diagnostikk [63].

I denne studien var det ønskelig å bruke flow cytometri for å gjennomføre analyse av cellenes status i cellesyklus. På denne måten skulle det fremskaffes et mål på om eksponering for RF-felt virket inn på celleproliferasjon. Egne kulturdyrkningsrør skulle settes opp for flow cytometri sammen med kulturer til CA- analyse. Flow cytometri analyse som beskrevet over, avhenger av frie celler i løsning [64]. Store aggregater av celler kan derfor ikke brukes, og det ble gjennomført en utprøving av flere metoder for fiksering av kulturer til flow cytometri. Cellekulturer som til analyse av kromosomaberrasjoner, ble brukt.

#### *Metode 1: Fiksering med 100 % ren metanol*

1. Sentrifugerte kulturene ved 1800 o/min. i fem minutter. Sugde av supernatanten. Blandet opp pelleten i røret på vortexmikser.
2. Fikserte med iskald, 100 % ren metanol. Satte cellesuspensjonen i fryser frem til analyse av suspensjonen skulle finne sted.

#### *Metode 2: Lysering med 1x lysisbuffer og fiksering med iskald 100 % ren metanol*

1. Sentrifugerte kulturene ved 1800 o/min. i fem minutter. Sugde av supernatanten.
2. Tilsatte 5–6 ml 1x lysisbuffer og lot stå i 15 minutter i isvann.
3. Som pkt. 1.
4. Tilsatte 1x lysisbuffer og lot stå til alle de røde blodcellene var lysert og løsningen ikke lengre var blakket.



*Metode 3: Hypotonbehandling og to ganger fiksering med iskald 100 % ren metanol*

1. Sentrifugerte kulturene ved 1800 o/min. i fem minutter. Sugde av supernatanten.
2. Tilsatte KCl hypoton og lot stå i ti minutter i romtemperatur.
3. Som pkt. 1.
4. Fikserte med iskald, 100 % ren metanol, og sentrifugerte ned som i pkt. 1 med det samme.
5. Sugde av væsken over pelleten. Gjentok pkt. 4.
6. Sugde av væsken over pelleten.

*Metode 4: To ganger hypotonbehandling og fiksering med iskald 100 % ren metanol*

Metoden er som i metode 2, men det ble hypotonert to ganger og fiksert en gang med iskald, 100 % ren metanol.

*Metode 5: Forsøk 1 på separering av hvite blodceller etter inkubasjon*

1. Etter inkubasjon ble cellekulturene forsiktig blandet og overført til rør for separering av blodceller og blodplasma (vacutainer<sup>®</sup> cpt<sup>™</sup> tube). Rørene ble sentrifugert ved 3200 o/min. i 30 minutter.
2. Mediet og de hvite blodcellene som ble separert ut over gelèbufferen i røret ble fjernet og overført til vanlige kulturdyrkningsrør og sentrifugert ved 1800 o/min. i fem minutter.
3. Supernatanten ble fjernet.
4. Fikserte med iskald, 100 % ren metanol.

*Metode 6: Forsøk 2 på separering av hvite blodceller etter inkubasjon*

1. Etter inkubasjon ble cellekulturene forsiktig blandet og overført til rør for separering av blodceller og blodplasma (vacutainer<sup>®</sup> cpt<sup>™</sup> tube). Rørene ble sentrifugert ved 3200 o/min. i 30 minutter.
2. Halvparten av mediet som ble separert ut over gelèbufferen i røret ble fjernet. Den resterende halvparten ble brukt til å virvle opp de hvite blodcellene, før suspensjonen ble tatt ut og overført til et vanlig kulturdyrkningsrør.
3. Fikserte denne cellesuspensjonen med iskald, 100 % ren metanol.

*Metode 7: Forsøk 3 på separering av hvite blodceller etter inkubasjon*

1. Etter inkubasjon ble cellekulturene forsiktig blandet og overført til rør for separering av blodceller og blodplasma (vacutainer<sup>®</sup> cpt<sup>™</sup> tube). Rørene ble sentrifugert ved 3200 o/min. i 30 minutter.
2. Halvparten av mediet som ble separert ut over gelèbufferen i røret ble fjernet. Den resterende halvparten ble brukt til å virvle opp de hvite blodcellene, før suspensjonen ble tatt ut og overført til et vanlig kulturdyrkningsrør.
3. Vasket cellene i RPMI - 1640 medium før sentrifugering ved 1800 o/min. i fem minutter.
4. Overflødig medium ble fjernet før fiksering med iskald, 100 % ren metanol.

Resultatet av utprøvingen til flow cytometri er beskrevet i pkt. 4.5.

**3.12 Statistisk bearbeiding**

All statistisk bearbeiding av data ble gjennomført ved hjelp av Minitab<sup>®</sup> versjon 11.21, Minitab inc., 1996. For sammenligning mellom to grupper ble det på grunn av at dataene ikke var normalfordelt, benyttet en ikke parametriske Mann-Whitney U- test. Forskjeller mellom gruppene ble vurdert som signifikante når  $P < 0,05$ .  $P$ - verdien oppgis i teksten i de tilfeller hvor signifikante forskjeller ble funnet. Deskriptiv (beskrivende) statistikk presenteres som aritmetisk gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik for scoringsvariablene.

## 4 Resultater

### 4.1 Generelt

Humane perifere blodlymfocytter (PBL) eksponert for tobakksrøyk *in vivo*, ble eksponert for RF- felter *in vitro*. Eksponeringen *in vitro* ble gjennomført både med og uten tilleggseksponering for et kjemisk mutagen, mitomycin C (MMC). På grunn av tidsmessige begrensninger på et omfattende materiale, presenteres preliminnære resultater av kromosomaberrasjons- (CA) analyser for en del av studien ved 16,5 GHz. Analysene er gjennomført for person E og F ved to inhiberte serier (7 og 11) og for en konvensjonell serie (8).

### 4.2 Temperatur

Utprøving med testkulturer viste temperaturstigning inne i kulturmediet i de RF- eksponerte kulturene. Som følge av påtrykt RF- felt steg temperaturen ca. 0,5 °C for 2,3 GHz, og 0,8 °C for 16,5 GHz. På grunn av dette ble temperaturen i inkubatoren senket slik at temperaturen inne i rørene ikke oversteg  $37 \pm 0,5$  °C for serie 9-14 ved 16,5 GHz. Temperaturen i inkubatoren ble senket med ca. 1 °C for å oppnå riktig temperatur (se tabell 3.2).

Kontrollkulturene for serie 9-14 ble derfor inkubert i eget inkubasjonskap ved  $37 \pm 0,5$  °C. De seriene hvor det oppstod økt temperatur som følge av RF- eksponeringen betegnes videre med "RF>37 °C". Øvrige serier inkubert innenfor det fastsatte temperaturkravet, betegnes "~37 °C".

### 4.3 Magnetfelt - 50 Hz

Nivået på magnetfelt som oppstod fra strømførende kabler koblet til panelovner ble målt. Kontrollmålingene viste svært lave verdier fra magnetfeltene i de områdene hvor kulturdyrkningsrørene (RF- eksponerte og kontroller) var plassert. Det indikerer at de høye magnetfeltverdiene som oppstod i umiddelbar nærhet til styreboksen for panelovnene, trolig ikke hadde innvirkning på celled materialet i kulturdyrkningsrørene.

#### 4.4 Kromosomaberrasjonsanalyser

Tabell 4.1 viser resultater fra CA- analyser for inhiberte PBL- kulturer fra helblod, hvor RF- eksponerte kulturer ble inkubert ved for høye temperaturer (RF>37 °C) og kontrollkulturene ble inkubert innenfor temperaturkravet. Kulturene ble ikke tilsatt MMC. Tabell 4.2 viser resultatene fra inhiberte PBL- kulturer inkubert ved regulert temperatur (~37 °C), og ikke tilsatt MMC. Utfallene fra CA- analyser for konvensjonelle kulturer uten MMC, med temperaturer over kravet hos RF- eksponerte kulturer (RF>37 °C), fremkommer fra tabell 4.3. Tabell 4.4, 4.5 og 4.6 viser resultatene av henholdsvis inhiberte og konvensjonelle kulturer, hvor PBL- kulturene i tillegg til eksponering som beskrevet over, ble eksponert for MMC ([10 mg/ml]) *in vitro*.

Resultatene fra tabell 4.1–4.6 viser for kromatideaberrasjoner (kg og kb) en høyere skadefrekvens for kulturer tilsatt MMC enn for kulturer uten. For kromosomaberrasjoner (Kg og Kb) er ikke en slik sammenheng like påfallende. Tabellene viser også at tilsetning av MMC øker utslaget av kromatideutbyttefigurer (ku). Dette gjelder både for inhiberte og konvensjonelle kulturer. Frekvensen av multiaberrante celler (mu) er høyere i inhiberte kulturer med MMC enn i konvensjonelle kulturer tilsatt kjemikaliet.

Oppsummering av aberrasjonsdata fra serie 7, 8 og 11 er vist i tabell 4.7 og 4.8. Tabellene viser et høyere antall skadde celler, celler med gap og celler med brudd i kulturer tilsatt MMC enn i kulturer uten. Dette gjelder både inhiberte og konvensjonelle kulturer.

**Tabell 4.1** Aberrasjonsdata (aritmetisk gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik) for inhiberte kulturer uten tilsetning av mitomycin C. Serie 7 (RF>37 °C)

Person	Eksponering	Aberrasjonstype (pr. 50 celler)				
		kg	Kg	kb	Kb	ku
E	K	11,3 $\pm$ 5,0	1,0 $\pm$ 1,4	4,0 $\pm$ 2,9	2,3 $\pm$ 1,7	0,3 $\pm$ 0,5
	RF	11,0 $\pm$ 1,6	1,8 $\pm$ 1,0	3,8 $\pm$ 1,7	1,0 $\pm$ 0,8	0
F	K	6,0 $\pm$ 2,6	1,0 $\pm$ 0,8	3,8 $\pm$ 2,2	1,0 $\pm$ 1,2	0
	RF	10,0 $\pm$ 1,8	2,0 $\pm$ 1,8	3,8 $\pm$ 1,0	3,3 $\pm$ 2,2	0,5 $\pm$ 0,6

		Aberrasjonstype (pr. 50 celler)			
		r	d	m	mu
E	K	0	0	0	0
	RF	0	0	0	0
F	K	0	0	0	0
	RF	0	0	0	0,3 $\pm$ 0,5

*Notat for tabell 4.1:* Data ovenfor representerer resultater for fire parallelle kulturer for hver av eksponeringstypene (K og RF), totalt 200 celler (50 celler fra hver av de fire parallellene). Forkortelsene er: K= kontrollkulturer; RF= RF- eksponerte kulturer; kg= kromatidegap; Kg= kromosomgap; kb= kromatidebrudd; Kb= kromosombrudd; ku= kromatideutbytte; r= ring; d= dicentrisk; m= marker; mu= multiaberrante celler.

**Tabell 4.2** Aberrasjonsdata (aritmetisk gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik) for inhiberte kulturer uten tilsetning av mitomycin C. Serie 11 (~37 °C)

Person	Eksponering	Aberrasjonstype (pr. 50 celler)				
		kg	Kg	kb	Kb	ku
E	K	6,3 $\pm$ 4,4	3,3 $\pm$ 3,3	2,8 $\pm$ 3,0	0,5 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 1,0
	RF	12,5 $\pm$ 6,4	2,0 $\pm$ 0,8	4,8 $\pm$ 3,5	1,5 $\pm$ 1,0	1,0 $\pm$ 1,2
F	K	7,5 $\pm$ 3,9	2,5 $\pm$ 2,4	3,8 $\pm$ 2,2	0,3 $\pm$ 0,5	0
	RF	11,0 $\pm$ 5,2	2,0 $\pm$ 0,8	4,8 $\pm$ 2,5	2,3 $\pm$ 1,0	0,3 $\pm$ 0,5

		Aberrasjonstype (pr. 50 celler)			
		r	d	m	mu
E	K	0	0	0	0,3 $\pm$ 0,5
	RF	0	0	0	0
F	K	0	0	0	0
	RF	0	0,3 $\pm$ 0,5	0	0

*Notat for tabell 4.2:* Data ovenfor representerer resultater for fire parallelle kulturer for hver av eksponeringstypene (K og RF), totalt 200 celler (50 celler fra hver av de fire parallellene). Forkortelsene er: K= kontrollkulturer; RF= RF- eksponerte kulturer; kg= kromatidegap; Kg= kromosomgap; kb= kromatidebrudd; Kb= kromosombrudd; ku= kromatideutbytte; r= ring; d= dicentrisk; m= marker; mu= multiaberrante celler.

**Tabell 4.3 Aberrasjonsdata (aritmetisk gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik) for konvensjonelle kulturer uten tilsetning av mitomycin C. Serie 8 (RF>37 °C)**

Person	Eksponering	Aberrasjonstype (pr. 100 celler)				
		kg	Kg	kb	Kb	ku
E	K	0,8 $\pm$ 1,0	0,3 $\pm$ 0,5	0,3 $\pm$ 0,5	0	0
	RF	1,5 $\pm$ 1,9	0	1,0 $\pm$ 1,2	0,3 $\pm$ 0,5	0
F	K	2,3 $\pm$ 1,5	0,5 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 1,0	0	0
	RF	2,3 $\pm$ 1,5	0	1,3 $\pm$ 2,5	2,8 $\pm$ 1,7	0

		Aberrasjonstype (pr. 100 celler)			
		r	d	m	mu
E	K	0	0	0	0
	RF	0	0	0	0
F	K	0	0	0	0
	RF	0	0	0	0

*Notat for tabell 4.3:* Data ovenfor representerer resultater for fire parallelle kulturer for hver av eksponeringstypene (K og RF), totalt 400 celler (100 celler fra hver av de fire parallellene). Forkortelsene er: K= kontrollkulturer; RF= RF- eksponerte kulturer; kg= kromatidegap; Kg= kromosomgap; kb= kromatidebrudd; Kb= kromosombrudd; ku= kromatideutbytte; r= ring; d= dicentrisk; m= marker; mu= multiaberrante celler.

**Tabell 4.4 Aberrasjonsdata (aritmetisk gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik) for inhiberte kulturer med tilsetning av mitomycin C. Serie 7 (RF>37 °C)**

Person	Eksponering	Aberrasjonstype (pr. 50 celler)				
		kg	Kg	kb	Kb	ku
E	K	37,0 $\pm$ 9,1	5,3 $\pm$ 3,6	33,3 $\pm$ 10,3	6,0 $\pm$ 2,2	0,5 $\pm$ 0,6
	RF	41,5 $\pm$ 6,7	5,5 $\pm$ 2,7	28,3 $\pm$ 1,7	5,8 $\pm$ 3,2	1,3 $\pm$ 1,3
F	K	37,0 $\pm$ 3,9	7,3 $\pm$ 2,5	27,0 $\pm$ 11,4	7,0 $\pm$ 3,7	1,0 $\pm$ 0,8
	RF	41,3 $\pm$ 3,9	6,0 $\pm$ 2,5	29,0 $\pm$ 8,0	5,5 $\pm$ 3,1	0,8 $\pm$ 1,0

		Aberrasjonstype (pr. 50 celler)			
		r	d	m	mu
E	K	0	0	0	5,0 $\pm$ 2,0
	RF	0	0	0	7,5 $\pm$ 3,4
F	K	0	0	0	4,0 $\pm$ 4,8
	RF	0	0,3 $\pm$ 0,5	0	3,5 $\pm$ 2,6

*Notat for tabell 4.4:* Data ovenfor representerer resultater for fire parallelle kulturer for hver av eksponeringstypene (K og RF), totalt 200 celler (50 celler fra hver av de fire parallellene). Forkortelsene er: K= kontrollkulturer; RF= RF- eksponerte kulturer; kg= kromatidegap; Kg= kromosomgap; kb= kromatidebrudd; Kb= kromosombrudd; ku= kromatideutbytte; r= ring; d= dicentrisk; m= marker; mu= multiaberrante celler.

**Tabell 4.5 Aberrasjonsdata (aritmetisk gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik) for inhiberte kulturer med tilsetning av mitomycin C. Serie 11 ( $\sim 37^{\circ}\text{C}$ )**

Person	Eksponering	Aberrasjonstype (pr. 50 celler)				
		kg	Kg	kb	Kb	ku
E	K	39,0 $\pm$ 6,1	5,3 $\pm$ 2,2	27,0 $\pm$ 7,8	7,5 $\pm$ 2,1	0,3 $\pm$ 0,5
	RF	32,3 $\pm$ 11,4	3,8 $\pm$ 1,9	23,8 $\pm$ 5,0	5,8 $\pm$ 3,0	0,8 $\pm$ 1,5
F	K	34,3 $\pm$ 7,0	8,0 $\pm$ 2,6	20,5 $\pm$ 4,7	5,3 $\pm$ 2,5	0,3 $\pm$ 0,5
	RF	41,8 $\pm$ 8,4	9,5 $\pm$ 2,4	35,0 $\pm$ 15,8	8,0 $\pm$ 8,8	0,8 $\pm$ 1,0

		Aberrasjonstype (pr. 50 celler)			
		r	D	m	mu
E	K	0	0	0	3,3 $\pm$ 1,9
	RF	0	0	0	4,3 $\pm$ 2,2
F	K	0	0	0	2,8 $\pm$ 0,5
	RF	0	0	0	4,5 $\pm$ 3,5

*Notat for tabell 4.5:* Data ovenfor representerer resultater for fire parallelle kulturer for hver av eksponeringstypene (K og RF), totalt 200 celler (50 celler fra hver av de fire parallellene). Forkortelsene er: K= kontrollkulturer; RF= RF- eksponerte kulturer; kg= kromatidegap; Kg= kromosomgap; kb= kromatidebrudd; Kb= kromosombrudd; ku= kromatideutbytte; r= ring; d= dicentrisk; m= marker; mu= multiaberrante celler.

**Tabell 4.6 Aberrasjonsdata (aritmetisk gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik) for konvensjonelle kulturer med tilsetning av mitomycin C. Serie 8 (RF  $> 37^{\circ}\text{C}$ )**

Person	Eksponering	Aberrasjonstype (pr. 100 celler)				
		kg	Kg	kb	Kb	ku
E	K	11,8 $\pm$ 1,7	2,0 $\pm$ 0,8	9,8 $\pm$ 1,5	3,3 $\pm$ 2,8	3,0 $\pm$ 2,2
	RF	19,3 $\pm$ 4,8	2,0 $\pm$ 0,8	11,8 $\pm$ 5,0	3,5 $\pm$ 2,7	4,3 $\pm$ 3,3
F	K	12,5 $\pm$ 5,5	2,5 $\pm$ 1,9	11,5 $\pm$ 3,3	2,8 $\pm$ 1,5	2,8 $\pm$ 1,5
	RF	13,3 $\pm$ 2,4	1,3 $\pm$ 1,5	10,5 $\pm$ 3,0	7,3 $\pm$ 2,1	2,5 $\pm$ 0,6

		Aberrasjonstype (pr. 100 celler)			
		r	d	m	mu
E	K	0	0	0	0
	RF	0,3 $\pm$ 0,5	0	0	0
F	K	0	0	0	0
	RF	0	0	0	0

*Notat for tabell 4.6:* Data ovenfor representerer resultater for fire parallelle kulturer for hver av eksponeringstypene (K og RF), totalt 400 celler (100 celler fra hver av de fire parallellene). Forkortelsene er: K= kontrollkulturer; RF= RF- eksponerte kulturer; kg= kromatidegap; Kg= kromosomgap; kb= kromatidebrudd; Kb= kromosombrudd; ku= kromatideutbytte; r= ring; d= dicentrisk; m= marker; mu= multiaberrante celler.

**Tabell 4.7 Oppsummering av aberrasjonsdata (aritmetisk gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik) for kulturer uten tilsetning av mitomycin C**

Serie nr.	Person	Eksposering	Oppsummering av aberrasjonsdata (pr. 50 celler)			
			inhiberte kulturer			
			Totalt ant. celler med skade	Ant. celler med gap <sup>a)</sup>	Ant. celler med brudd <sup>b)</sup>	
7	E	K	13,5 $\pm$ 4,5	9,0 $\pm$ 3,6	5,8 $\pm$ 3,1	
		RF <sup>1)</sup>	11,8 $\pm$ 2,1	10,0 $\pm$ 0,8	3,3 $\pm$ 1,0	
	F	K	8,3 $\pm$ 1,0	6,0 $\pm$ 1,4	3,8 $\pm$ 1,5	
		RF <sup>1)</sup>	11,5 $\pm$ 1,7	7,8 $\pm$ 0,5	5,5 $\pm$ 1,0	
11	E	K	8,5 $\pm$ 6,6	6,3 $\pm$ 4,3	3,5 $\pm$ 3,3	
		RF <sup>2)</sup>	13,5 $\pm$ 3,1	10,3 $\pm$ 2,4	4,5 $\pm$ 0,6	
	F	K	10,0 $\pm$ 3,5	8,0 $\pm$ 4,1	3,8 $\pm$ 1,9	
		RF <sup>2)</sup>	12,8 $\pm$ 3,6	9,3 $\pm$ 2,2	5,5 $\pm$ 2,1	
8		Oppsummering av aberrasjonsdata (pr. 100 celler)				
		konvensjonelle kulturer				
		Totalt ant. celler med skade	Ant. celler med gap <sup>a)</sup>	Ant. celler med brudd <sup>b)</sup>		
		E	K	1,3 $\pm$ 1,3	1,0 $\pm$ 0,8	0,3 $\pm$ 0,5
			RF <sup>1)</sup>	2,8 $\pm$ 2,8	1,5 $\pm$ 1,9	1,3 $\pm$ 1,0
		F	K	3,3 $\pm$ 2,6	2,8 $\pm$ 1,7	0,5 $\pm$ 1,0
RF <sup>1)</sup>	4,8 $\pm$ 3,0		2,3 $\pm$ 1,5	2,8 $\pm$ 2,2		

*Notat for tabell 4.7:* Data ovenfor representerer resultater for fire parallelle kulturer for hver av eksponeringstypene (K og RF), totalt 200 celler (50 celler fra hver av de fire parallellene) for inhiberte kulturer, og totalt 400 celler (100 celler fra hver av de fire parallellene) for konvensjonelle kulturer. Forkortelseneer: K= kontrollkulturer; RF= RF- eksponerte kulturer; <sup>1)</sup>RF>37 °C; <sup>2)</sup>~37 °C;

<sup>a)</sup> kromatidegap + kromosomgap; <sup>b)</sup> kromatidebrudd + kromosombrudd.



**Tabell 4.8 Oppsummering av aberrasjonsdata (aritmetisk gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik) for kulturer med tilsetning av mitomycin C**

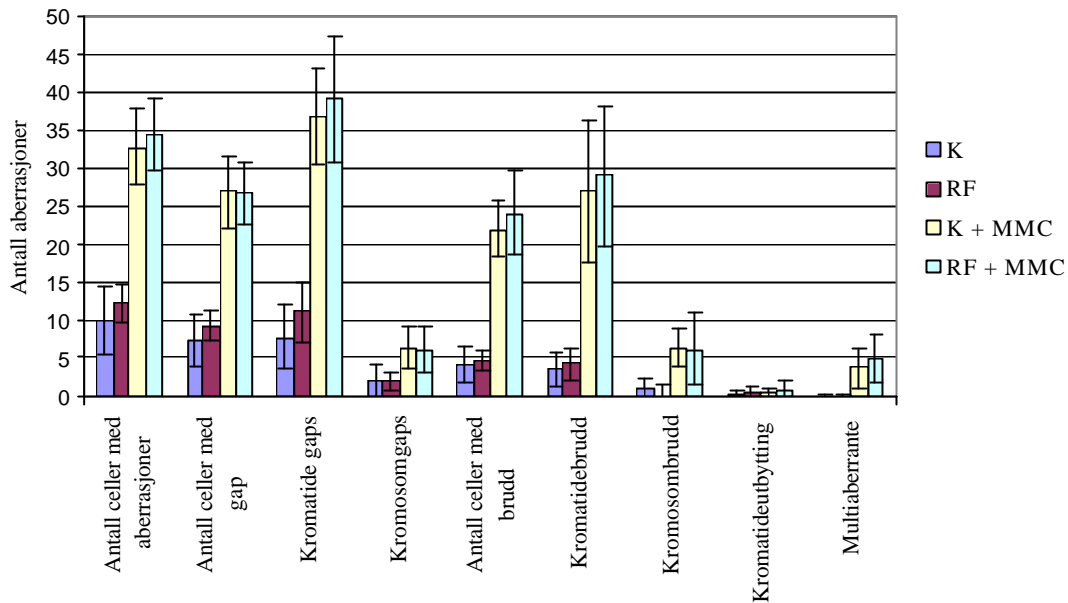
Serie nr.	Person	Eksposering	Oppsummering av aberrasjonsdata (pr. 50 celler)		
			inhiberte kulturer		
			Totalt ant. celler med skade	Ant. celler med gap <sup>a)</sup>	Ant. celler med brudd <sup>b)</sup>
7	E	K	34,8 $\pm$ 4,0	26,8 $\pm$ 5,7	25,0 $\pm$ 3,0
		RF <sup>1)</sup>	36,3 $\pm$ 3,0	29,5 $\pm$ 3,9	24,0 $\pm$ 3,4
	F	K	35,0 $\pm$ 6,7	29,3 $\pm$ 5,2	20,5 $\pm$ 4,7
		RF <sup>1)</sup>	34,0 $\pm$ 4,2	25,3 $\pm$ 3,9	21,8 $\pm$ 1,0
11	E	K	32,5 $\pm$ 4,8	28,3 $\pm$ 3,4	23,0 $\pm$ 3,8
		RF <sup>2)</sup>	31,3 $\pm$ 2,6	24,0 $\pm$ 2,5	22,8 $\pm$ 2,4
	F	K	28,8 $\pm$ 2,1	23,5 $\pm$ 3,9	19,8 $\pm$ 2,4
		RF <sup>2)</sup>	36,3 $\pm$ 7,7	28,3 $\pm$ 4,7	27,8 $\pm$ 10,2
			Oppsummering av aberrasjonsdata (pr. 100 celler)		
			konvensjonelle kulturer		
			Totalt ant. celler med skade	Ant. celler med gap <sup>a)</sup>	Ant. celler med brudd <sup>b)</sup>
8	E	K	22,3 $\pm$ 1,7	12,5 $\pm$ 1,3	11,0 $\pm$ 2,6
		RF <sup>1)</sup>	28,8 $\pm$ 8,0	18,8 $\pm$ 4,2	13,5 $\pm$ 5,0
	F	K	23,5 $\pm$ 4,8	14,3 $\pm$ 6,8	12,3 $\pm$ 2,5
		RF <sup>1)</sup>	27,8 $\pm$ 4,4	12,5 $\pm$ 1,0	16,5 $\pm$ 5,0

*Notat for tabell 4.8:* Data ovenfor representerer resultater for fire parallelle kulturer for hver av eksponeringstypene (K og RF), totalt 200 celler (50 celler fra hver av de fire parallellene) for inhiberte kulturer, og totalt 400 celler (100 celler fra hver av de fire parallellene) for konvensjonelle kulturer. Forkortelsene er: K= kontrollkulturer; RF= RF- eksponerte kulturer; <sup>1)</sup>RF>37 °C; <sup>2)</sup>~37 °C;

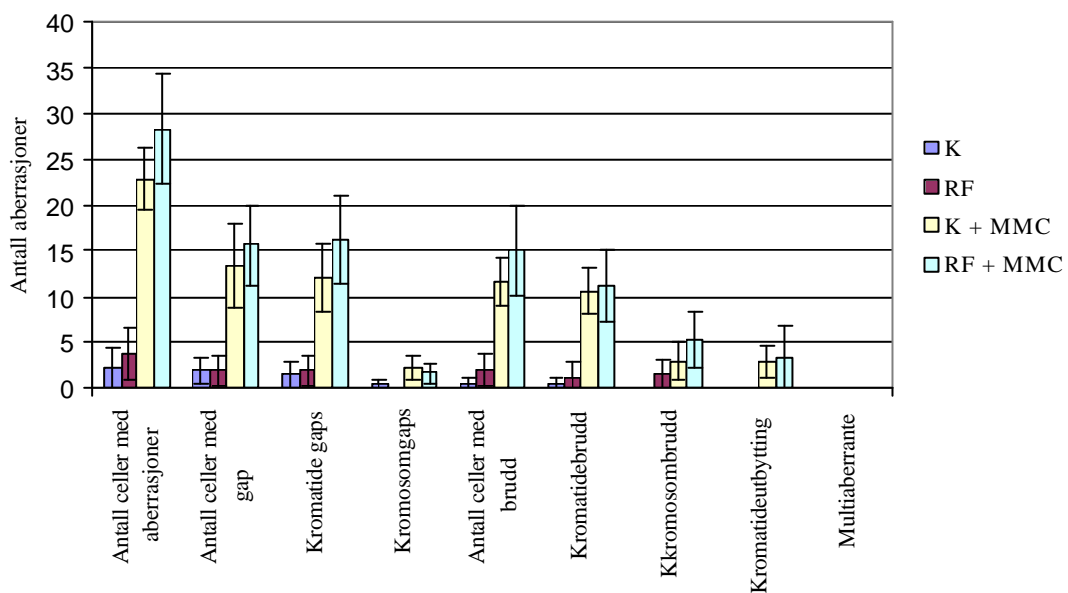
<sup>a)</sup> kromatidegap + kromosomgap; <sup>b)</sup> kromatidebrudd + kromosombrudd.

Figur 4.1 visualiserer gjennomsnittlig antall aberrasjoner med standardavvik for de forskjellige eksponeringene av inhiberte serier (serie 7 og 11). Data for person E og F i begge seriene er slått sammen. På samme måte viser figur 4.2 de parede data for personene i den konvensjonelle serien (serie 8).

Figurene samler og synliggjør de allerede omtalte resultatene fra tabell 4.1–4.8.



**Figur 4.1** Hver stolpe i histogrammet viser aritmetisk gjennomsnitt av 16 kulturer med standardavvik for inhiberte kulturer (fire kulturer fra henholdsvis person E og F i serie 7, og fire kulturer fra henholdsvis person E og F i serie 11).



**Figur 4.2** Hver stolpe i histogrammet viser aritmetisk gjennomsnitt av åtte kulturer med standardavvik for konvensjonelle kulturer (fire kulturer fra person E og F i serie 8).

Det ble gjennomført en sammenligning av medianverdier fra resultatene av CA- analysene ved hjelp av en Mann-Whitney U- test. Hensikten var å avdekke eventuelle signifikante forskjeller i <sup>1)</sup> totalt antall celler med aberrasjoner, <sup>2)</sup> antall kromatidegap, <sup>3)</sup> antall kromosomgap, <sup>4)</sup> antall kromatidebrudd og <sup>5)</sup> antall kromosombrudd. Følgende grupper ble testet mot hverandre for personene E og F for hver serie (7, 8 og 11):

- RF- eksponerte kulturer og tilhørende kontrollkulturer.
- RF- eksponerte kulturer tilsatt MMC og kontrollkulturer tilsatt MMC.
- Kulturer tilsatt MMC (både RF- eksponerte kulturer og kontrollkulturer) og deres respektive kulturer uten MMC.

I tillegg ble det gjennomført analyser for å se om det var signifikante forskjeller mellom personene. En sammenligning av RF- kulturer dyrket ved temperaturforholdene RF>37 °C og ~37 °C, ble gjennomført for inhiberte serier for å kartlegge eventuelle effekter av inkubasjonstemperaturen. Kontrollkulturene for de samme seriene ble sammenlignet for eventuelt å avdekke forskjeller mellom inkubasjonskammer og det benyttede klimaskapet.

For person E (tabell 4.9) ble ingen signifikante forskjeller mellom RF- eksponerte kulturer og kontroller funnet ( $P > 0,05$ ), for de beskrevne parameterne i serie 7 og 11. I serie 8 var det signifikante forskjeller ( $P = 0,03$ ) mellom kontrollkulturer tilsatt MMC og RF- eksponerte kulturer tilsatt MMC for kategorien kromatidegap (kg). Resultatene for positive kontroller (RF- eksponerte kulturer og kontroller tilsatt MMC) viser i stor grad signifikant forskjell fra sine respektive kulturer uten MMC for de cytogenetiske parameterne. For kategorien kromosomgap (Kg) ble det imidlertid ikke avdekket de samme tendensene som for de øvrige tre parameterne.

Tabell 4.9 P- verdier fra Mann- Whitney U- test ved sammenligning av skadefrekvens for person E

Serie nr.	Test kriterium	P- verdi for scoringsvariabel				
		Tot. ant. celler med aberrasjoner	kg	Kg	kb	Kb
7	K <sub>vs.</sub> RF*	0,38	0,47	0,39	1,00	0,31
7	K+ <sub>vs.</sub> RF+*	0,88	0,89	1,00	0,31	1,00
7	K <sub>vs.</sub> K+	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	0,19	<b>0,03</b>	0,08
7	RF* <sub>vs.</sub> RF+*	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>
11	K <sub>vs.</sub> RF	0,38	0,19	1,00	0,19	0,19
11	K+ <sub>vs.</sub> RF+	1,00	0,25	0,56	0,56	0,39
11	K <sub>vs.</sub> K+	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	0,47	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>
11	RF <sub>vs.</sub> RF+	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	0,25	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>
8	K <sub>vs.</sub> RF*	0,56	0,77	1,00	0,47	1,00
8	K+ <sub>vs.</sub> RF+*	0,25	<b>0,03</b>	1,00	1,00	1,00
8	K <sub>vs.</sub> K+	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>	<b>0,03</b>	1,00
8	RF* <sub>vs.</sub> RF+*	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	1,00	<b>0,03</b>	0,15

Notat for tabell 4.9: Forkortelsene er: K= kontrollkultur; RF= RF- eksponert; K+= kontrollkultur med MMC; RF+= RF- eksponert kultur med MMC; kg= kromatidegap; Kg= kromosomgap; kb= kromatidebrudd; Kb= kromosombrudd; \*= RF>37 °C.

Tabell 4.10 P- verdier fra Mann- Whitney U- test ved sammenligning av grupper for person F

Serie nr.	Test kriterium	P- verdi for scoringsvariabel				
		Tot. ant. celler med aberrasjoner	kg	Kg	kb	Kb
7	K <sub>vs.</sub> RF*	<b>0,03</b>	0,08	0,56	0,67	0,19
7	K+ <sub>vs.</sub> RF+*	0,88	0,19	0,67	0,77	0,88
7	K <sub>vs.</sub> K+	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>
7	RF* <sub>vs.</sub> RF+*	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	0,06	<b>0,03</b>	0,31
11	K <sub>vs.</sub> RF	0,19	0,39	0,89	0,77	<b>0,04</b>
11	K+ <sub>vs.</sub> RF+	0,11	0,31	0,56	0,08	1,00
11	K <sub>vs.</sub> K+	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	0,06	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>
11	RF <sub>vs.</sub> RF+	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	0,66
8	K <sub>vs.</sub> RF*	0,38	1,00	1,00	1,00	1,00
8	K+ <sub>vs.</sub> RF+*	0,38	0,89	0,39	0,89	<b>0,03</b>
8	K <sub>vs.</sub> K+	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	0,11	<b>0,03</b>	1,00
8	RF* <sub>vs.</sub> RF+*	<b>0,03</b>	<b>0,03</b>	1,00	<b>0,03</b>	<b>0,04</b>

Notat for tabell 4.10: Forkortelsene er: K= kontrollkultur; RF= RF- eksponert; K+= kontrollkultur med MMC; RF+= RF- eksponert kultur med MMC; kg= kromatidegap; Kg= kromosomgap; kb= kromatidebrudd; Kb= kromosombrudd; \*= RF>37 °C.

For person F (tabell 4.10) ble det avdekket en forskjell ( $P = 0,03$ ) i antall celler med skade mellom RF- eksponerte kulturer og de respektive kontrollkulturene i serie 7. For de øvrige parametrene, ble ingen signifikante forskjeller mellom RF- eksponerte kulturer og kontroller avdekket i denne serien. I serie 8 ble det funnet en ulikhet ( $P = 0,03$ ) mellom kontroller tilsatt MMC og RF- eksponerte kulturer tilsatt MMC for antall kromosombrudd (Kb). For den samme effektparameteren (Kb) ble det oppdaget en forskjell ( $P = 0,04$ ) mellom kontroller og RF- eksponerte kulturer i serie 11. Positive kontroller ga de samme tendensene for person F som for person E, hvor MMC ikke ga betydelige utslag for parameteren kromosomgap (Kg). Antall Kb viste samme tendens som Kg for person F.

**Tabell 4.11** *P*- verdier fra Mann- Whitney U- test av forskjeller mellom person E og person F

Serie nr.	Test kriterium	<i>P</i> - verdi for scoringsvariabel				
		Tot. Ant. celler med aberrasjoner	kg	Kg	kb	Kb
7	K vs. K	0,24	0,19	0,88	0,88	0,31
7	K+ vs. K+	0,77	0,67	1,00	0,47	1,00
7	RF* vs. RF*	1,00	0,47	1,00	1,00	0,15
7	RF+* vs. RF+*	0,38	0,89	0,77	0,39	0,77
11	K vs. K	1,00	0,89	1,00	0,67	0,67
11	K+ vs. K+	0,71	0,67	0,19	0,31	0,31
11	RF vs. RF	0,79	0,77	1,00	0,89	0,39
11	RF+ vs. RF+	0,75	0,25	<b>0,03</b>	0,39	0,89
8	K vs. K	0,25	0,19	0,67	1,00	1,00
8	K+ vs. K+	0,56	1,00	1,00	0,47	0,77
8	RF* vs. RF*	0,47	0,67	1,00	0,89	<b>0,04</b>
8	RF+* vs. RF+*	1,00	0,06	0,56	0,89	0,08

*Notat for tabell 4.11:* Forkortelsene er: K= kontrollkultur; RF= RF- eksponert; K+= kontrollkultur med MMC; RF+= RF- eksponert kultur med MMC; kg= kromatidegap; Kg= kromosomgap; kb= kromatidebrudd; Kb= kromosombrudd; \*= RF>37 °C.

For analyser hvor det ble sett på forskjellene mellom personene E og F, er resultatene gitt i tabell 4.11. Ingen statistisk signifikant forskjell mellom personene ble funnet for noen av de cytogenetiske parameterne i serie 7. I serie 11 ble det registrert en forskjell ( $P = 0,03$ ) mellom personene for RF- eksponerte kulturer tilsatt MMC. Dette gjaldt kategorien kromosomgap (Kg). For serie 8 ble det avdekket en forskjell ( $P = 0,04$ ) i antall kromosombrudd (Kb) ved sammenligning av personenes RF- eksponerte kulturer uten tilsetning av MMC.

På grunn av temperaturstigning som følge av påtrykt RF- felt i serie 7 og 8, ble RF- eksponerte kulturer (med og uten MMC) fra serie 7 ( $RF > 37^{\circ}\text{C}$ ) og 11 ( $\sim 37^{\circ}\text{C}$ ) sammenlignet for å se om temperaturhevingen hadde ført til økt skadefrekvens (tabell 4.12). Sammenligning mellom kontrollkulturene i de samme seriene ble også gjennomført. Slik kunne ukontrollerbare forskjeller mellom de to benyttede inkubatorene (to ulike inkubatorer for kontrollkulturer ved 16,5 GHz) avdekkes. Resultatene fremgår av tabell 4.12. Ingen signifikant økning i skadefrekvens på grunn av økt inkubasjonstemperatur, og som følge av ukontrollerte forskjeller mellom inkubatorene, ble registrert.

**Tabell 4.12 P- verdier fra Mann-Whitney U- test av skadefrekvens som følge av økt temperatur i RF-eksponerte kulturer i serie 7 ( $RF > 37^{\circ}\text{C}$ ) i forhold til RF-eksponerte kulturer i serie 11 ( $\sim 37^{\circ}\text{C}$ ), samt kontrollkulturer i de samme seriene inkubert i ulike inkubatorer**

Serie nr. og Person	Test kriterium	P- verdi for scoringsvariabel				
		Tot. Ant. celler med aberrasjoner	kg	Kg	kb	Kb
7 E og 11 E	K vs. K	0,38	0,19	0,38	0,77	0,19
7 E og 11 E	RF vs. RF	0,38	0,47	0,77	1,00	0,67
7 E og 11 E	K+ vs. K+	0,66	0,89	0,89	0,25	0,47
7 E og 11 E	RF+ vs. RF+	0,08	0,19	0,56	0,15	0,89
7 F og 11 F	K vs. K	0,56	0,67	0,39	1,00	0,47
7 F og 11 F	RF vs. RF	0,77	1,00	1,00	0,67	0,67
7 F og 11 F	K+ vs. K+	0,11	0,67	0,77	0,47	0,56
7 F og 11 F	RF+ vs. RF+	1,00	0,89	0,15	0,67	0,77

Notat for tabell 4.12: Forkortelsene er: K= kontrollkultur; RF= RF-eksponert; K+= kontrollkultur med MMC; RF+= RF-eksponert kultur med MMC; kg= kromatidegap; Kg= kromosomgap; kb= kromatidebrudd; Kb= kromosombrudd.

#### 4.5 Utprøving til flow cytometri

Flere metoder for fiksering av cellekulturer med helblod ble prøvd ut. Formålet var å kunne bruke flow cytometri til å analysere hvordan eksponering av RF- felt alene, eller i samspill med sigaretttrøyk og/eller MMC, påvirket celleproliferasjon. Den fikserte suspensjonen til bruk i flow cytometrianalyse må inneholde frie celler.

I alt sju fikseringsmetoder ble prøvd ut. Felles for de fleste metodene (metode 1-6) var at cellene i løsningen klumpet seg og dannet til dels gummiaktige og kompakte aggregater. Metode 5 og 6 ga aggregater av hvite blodceller. Ved bruk av separeringsrør ("vacutainer<sup>®</sup> cpt<sup>™</sup> tube") ble kulturene frie for røde blodceller. Metode 7 er en videreføring av metode 5 og 6 hvor cellene ble vasket i RPMI- 1640 medium før sentrifugering og fiksering. Mikroskopi viste for metode 7, en suspensjon av frie mononukleære celler etter fiksering. Suspensjonen ble frosset ned for senere å teste løsningen ved hjelp av flow cytometri.

## 5 Diskusjon

Vitenskapelige studier på genotoksiske og carcinogene effekter av radiofrekvente (RF) felter med relasjon til mobiltefonteknologi, er hovedsakelig gjennomført ved frekvenser fra ca. 800 til 2450 MHz. Et begrenset antall studier er designet for undersøkelse av de genotoksiske og carcinogene effektene av *in vitro* eksponering av humane perifere blodlymfocytter (PBL) for RF- stråling med frekvenser rundt 16 GHz. I denne studien er humane PBL eksponert for 2,3 og 16,5 GHz elektromagnetiske felter med gjennomsnittlig signalnivå på 10 W/m<sup>2</sup>. Det er gjennomført kromosomaberrasjons- (CA) analyser for en del av studien ved 16,5 GHz (serie 7, 8 og 11) for person E og F. Metode, eksponeringsforhold og resultatene fra disse CA-analysene ligger til grunn for den videre diskusjonen. Undersøkelsen vil bli sammenlignet med studier gjennomført ved lavere frekvenser.

Om RF- eksponering på nivåer lavere enn fastsatte grenseverdier er skadelig for arvematerialet, eller om en slik eksponering sammen med et kjent genotoksisk agens kan føre til kreft eventuelt øke faren for kreft, er omstridt. Disse spørsmålene er kontroversielle siden denne typen stråling (ikke- ioniserende stråling) ikke ødelegger molekylære bindinger direkte. Med dette som utgangspunkt mangler en teoretisk basis som fastslår at RF- stråling kan skade DNA. Det er heller ikke funnet noe klart svar på om RF- stråling fremskynder, eller hemmer andre stoffers evne til å virke toksisk på arvematerialet [1,8,49].

Et stort antall biologiske modeller med ulike "endpoints" er benyttet i studier av RF- felters virkning på biologiske systemer. De fysiske kriteriene og lengden på eksponeringen de ulike vev og celler utsettes for i eksperimentene, varierer mellom studiene. Få av undersøkelsene er replikert av uavhengige laboratorier, og det vil derfor være vanskelig å danne et helhetlig bilde av de mulige effektene av RF- stråling.



*Kromosomaberrasjoner, mikrokjerner og vitenskapelige funn*

Enhver celletype som deler seg, eller kan bli induert til å dele seg av et mitotisk stimulerende stoff, kan benyttes til å lage kromosompreparater for cytogenetiske analyser [68]. Humane PBL er lett tilgjengelig med et stort antall celler i små mengder blod, og sirkulerer stort sett i alt vev i kroppen. Lymfocytene opptrer hovedsakelig i hvilefase ( $G_0$  eller  $G_1$ - fase) [53], og går normalt ikke inn i mitose i det perifere blodet [68], men kan stimuleres til å dele seg. Disse egenskapene i kombinasjon med at cellene lar seg arrestere i mitosefasen, hvor DNA er kondensert og lar seg studere i lysmikroskop, gjør at humane PBL egner seg til *in vitro* studier.

Som biomarkør er trolig CA best validert som markør for tidlig biologisk effekt i populasjonsstudier [70], og i dag regnes en forhøyet CA- frekvens i PBL hos friske personer som en god predikator på økt kreftisiko [69]. CA- analyser er i stor utstrekning benyttet til cytogenetiske *in vitro* studier av RF- felters påvirkning på arvematerialet. Enten med RF- feltet som eneste påvirkning eller sammen med kjente kjemikalier. Tradisjonelle CA- analyser har vanskelig for å skille mellom skade fra ulike kjemikalier. Ett unntak er MMC. Dette kjemikallet inducerer en større mengde kromatideutbyttefigurer enn andre kjemikalier [71]. Et alternativ til CA- analyser er mikrokjerne- (MN) analyser. MN- analyser er en variant av førstnevnte. Metoden er en av de mest benyttede til å måle frekvensen av DNA- skade i humane populasjoner. Årsaken er at det er relativt mye lettere å score MN enn CA, og derfor mer tidsbesparende [72]. MN- analyser forutsetter at cellene som skal studeres har passert gjennom første celledyklus. Det kan føre til at allerede skadde eller ødelagte celler kan gå tapt før de kommer så langt. En av fordelene med MN- metoden er at den detekterer aneuploidi. Assosiasjonen mellom MN- frekvensen i binukleære celler og langtids biologiske konsekvenser er ennå ikke ordentlig kartlagt [71]. CA og MN er benyttet som effektparametere i flere av de studiene som er gjennomført for å undersøke hvorvidt RF elektromagnetiske felt kan gi noen form for skade på arvematerialet.

Kerbacher et al. (1990) [73] gjennomførte en studie hvor det ble testet om RF- felter over gjeldene retningslinjer, kunne indusere CA i ovarieceller fra kinesisk hamster (CHO- celler). Studiegruppen testet også hvorvidt RF- feltene førte til en økning eller senkning i CA- frekvens, dersom eksponeringen ble gitt i kombinasjon med MMC eller adriamycin (ADR). ADR er som MMC et kjent genotoksisk kjemikalie. Studien, hvor eksponering for 2450 MHz pulset signal med en spesifikk absorpsjonsrate (SAR- verdi) på 33,8 W/kg, førte til en målbar temperaturøkning på 32 °C i cellematerialet. Det ble ikke registrert økning i CA- frekvens for kulturer eksponert for RF- felt som førte til at temperaturen i kulturene ble 40 °C. Heller ikke for RF- eksponerte kulturer tilsatt MMC ble det funnet økt CA- frekvens sammenlignet med kontrollkulturer eksponert for samme konsentrasjon MMC. Kontrollkulturene ble dyrket ved 37 °C. En svak, signifikant økning ble funnet for kulturer eksponert for RF- felt og ADR.

Maes et al. (1993) eksponerte helblod fra to personer for pulsede RF- felter med frekvens på 2450 MHz. SAR- verdien ble beregnet til 75 W/kg. Bestrålingen på henholdsvis 30 og 120 minutter, ble gjennomført før dyrking av lymfocytter. CA ble benyttet som effektparameter, og en økning ble funnet. Økningen var statistisk signifikant ved 120 minutters eksponeringstid. Forskerne fant samme svar ved bruk av MN som effektparameter, men ikke for søsterkromatideutbytte (SCE) [74]. Et annet eksperiment med Maes i spissen undersøkte om RF- felter med GSM- telefonfrekvenser (935,2 MHz, 4,5 W, SAR = 0,3–0,4 W/kg, konstant felt) alene, eller i kombinasjon med MMC, ga økning av CA- frekvens i humane PBL. Blodcellene ble eksponert i to timer før dyrking i cellekultur. Ingen signifikant effekt ble funnet [75].

Det ble heller ikke avdekket noen økt CA- frekvens i en nyere studie av Maes et al. (2001) [76]. CA ble benyttet som biomarkør for å se om RF- felter på 900 MHz, med forskjellig utgangseffekt (0–50 W) og SAR- verdier (mellom 0 og 10 W/kg), ga cytogenetisk effekt. Humant helblod ble eksponert for de nevnte feltene før dyrking i kultur. Forskningsgruppen fant ingen synergistiske effekter for RF- felter i kombinasjon med MMC eller røntgenstråling (ioniserende stråling).

Tice et al. (2002) har publisert en studie hvor humane lymfocytter ble eksponert for GSM lignende signaler (ca. 840 og 1900 MHz frekvens). SAR- verdiene i dette arbeidet var på 1,5 og 10 W/kg. Resultatene indikerer at de benyttede, elektromagnetiske feltene ikke gir økning i CA- eller MN- frekvens [77]. Vijayalaxmi et al. (2001) [78] publiserte resultatene fra et

forsøk hvor humane PBL ble eksponert for et 835,62 MHz RF- felt *in vitro*. Kulturene ble eksponert før inkubasjon. Det ble benyttet et analogt signal med en kontinuerlig bølge. Feltet hadde en nominell intensitet ved senter av eksponeringsflaskene på 860 W/m<sup>2</sup>. De gjennomsnittlige SAR- verdiene var på 4,4 og 5,0 W/kg. Det ble ikke funnet bevis for at det induseres CA eller MN i humane PBL ved de anvendte eksponeringsnivåene. En annen undersøkelse av nyere dato er utført av d'Ambrosio et al. (2002). Forskningsgruppen eksponerte humane PBL for et fasemodulert og et kontinuerlig felt. Frekvensen var på 1748 MHz, og eksponeringstiden 15 minutter. Maksimal SAR- verdi var ca. 5 W/kg. Det ble ikke funnet noen økning i MN- frekvens ved eksponering for kontinuerlig felt. For det fasemodulerte feltet med like betingelser for øvrig, ble det imidlertid funnet en statistisk signifikant økning i MN- frekvens [65]. McNamee et al. (2002) [5] eksponerte humane PBL for et 1900 MHz, kontinuerlig felt. SAR- verdiene var på henholdsvis 0,0; 0,1; 0,26; 0,92; 2,4 og 10 W/kg. Temperaturen i kulturene var på  $37 \pm 0,5$  °C gjennom hele den to timer lange eksponeringen. Ingen økning i MN- frekvens ble funnet for det kontinuerlige feltet alene, eller i kombinasjon med gamma ( $\gamma$ ) stråling [5,79].

Av studier med resultater som viser sammenheng mellom RF- eksponering og genskader, har forsøkene gjennomført av Lai og Singh (1995, 1996) vakt spesiell oppmerksomhet [80,81]. Forskerne fant en signifikant økning i antall enkeltstreng- og dobbeltstrengbrudd i DNA fra *in vivo* eksponerte hjerneceller hos rotter. Metoden benyttet i studien er basert på gelelektroforese, og er kjent som "The alkaline comet assay". Eksponeringen var et 2450 MHz kontinuerlig eller pulset felt med lave SAR- verdier (0,6 og 1,2 W/kg). Lignende studier har ikke klart å detektere tilsvarende resultater. Malyapa et al. (1997, 1998) [82-84] avdekket ikke genskader i cellekulturer eller i levende rotter som følge av ulike RF- eksponeringer (840 og 2450 MHz) med lave SAR- verdier (0,6–1,9 W/kg). I forhold til de andre studiene hadde Lai og Singh et høyt bakgrunnsnivå av DNA- brudd i hjernecellene til rottene [1]. De nyere studiene til Li et al. (2001) [85] og McNamee et al. (2002) [5,79] viser negative resultater fra forsøk med henholdsvis 850 og 1900 MHz frekvens. Forsøkene ga ingen indikasjon på at RF- eksponeringen øker forekomsten av genskader. Li et al. og McNamee et al. benyttet også The alkaline comet assay.

Av undersøkelsene som er beskrevet over fremgår det at det ble benyttet varierende eksponeringsbetingelser innenfor frekvensområdet 840 til 2450 MHz. De ulike SAR-verdiene som ble brukt, om eksponeringen medførte økning i temperatur, hvilken frekvens og modulasjon som ble brukt og eksponeringstidens lengde er faktorer som ser ut til å ha hatt innflytelse på resultatene. Valg av effektparametere kan også ha vært av betydning for hvor lett eventuelle skader i arvematerialet ble detektert. For å kunne sammenligne eksponeringsbetingelsene i forskjellige studier med den som genereres fra mobiltelefoner må de ikke kunne relateres til termiske effekter [1].

#### *Eksponering for radiofrekvente felter*

I denne undersøkelsen ble det tilstrebet å generere et RF- felt etter gjeldende retningslinjer (CENELEC (1995) og ICNIRP (1998)) for den generelle befolkning. Det ble valgt å eksponere lymfocytene i oppsatte cellekulturer gjennom hele cellesyklusen. Eksponeringen ble kun avbrutt i kortere tidsrom ved tilsetning av reagenser. Studiene referert til ovenfor har eksponert cellene i kortere perioder enn det som ble gjennomført her. I andre undersøkelser har cellene blitt eksponert i helblod før oppsett i kultur, eller i ferdig oppsatte cellekulturer. Dette medfører at cellene eksponeres i ulike faser ("vinduer") av cellesyklusen. Ved å eksponere gjennom hele cellesyklus vil eventuelle faser som er mer sårbare for RF- stråling avdekkes.

Distribusjonen av det induerte, radiofrekvente feltet avhenger av en rekke fysiske kriterier. Viktige parametere er frekvens, polarisasjon, kulturflaskens størrelse og form, mengden medium og væskemerkens høyde inne i flaskene. I tillegg kommer omkringliggende faktorer som kan medføre refleksjon av stråling eller absorpsjon av energi [86]. Konsekvensene av en slik avhengighet er at det i forskjellige eksperimenter er behov for ulike eksponeringssystemer. Det er viktig å forstå koblingen mellom feltene som genereres utenfor kulturdyrkningsflaskene og de som oppstår inne i mediet. Ved å holde eksponeringsbetingelsene innenfor de nevnte retningslinjene skulle det ikke oppstå termiske nivåer for de eksponerte cellene i denne studien. Slik skulle oppvarming av cellematerialet unngås. SAR- verdiene ble ikke beregnet. I følge ICNIRP (1998) er det for RF- felt med

frekvenser høyere enn ca. 10 GHz liten penetrasjonsdybde for strålene, og derfor er ikke SAR noe godt mål for vurdering av absorbert energi ved 16,5 GHz. Ved så høyfrekvente felter er signalnivået målt i  $W/m^2$  en bedre betegnelse [16].

I utgangspunktet skulle det benyttes en flaske av typen "tc flask 25 cm<sup>2</sup>" (Nunc A/S) til dyrking av cellekulturene. Simulering av signalnivåer som oppstår inne i lignende flasker, viser at de genererte feltene i stor grad påvirkes av flaskens geometri. De fysiske egenskapene til den væsken flasken inneholder er også av betydning for signalnivået [87]. For å sikre cellene i kulturene tilnærmet lik eksponering er det viktig å skape et så homogent felt som mulig inne i flaskene [88]. Variasjoner i feltene inne i cellekulturene ble forsøkt unngått ved at kulturdyrkningsrør av typen "tc tube flat side 110 x 16 mm" (Nunc A/S) ble benyttet. Simuleringene til Guy et al. (1999) [87] sannsynliggjør at variasjonene i signalnivå i kulturene blir mindre ved valg av kulturdyrkningsrør av denne typen. Dette gjelder dersom det elektriske (E) feltet orienteres på tvers av prøverørens lengdeakse. En slik orientering av E- feltet er i henhold til de anbefalinger beskrevet i Kuster og Schönborn (2000) [88], og ble gjennomført i denne studien. Ingen målinger eller beregninger av de faktiske feltene inne i kulturdyrkningsrørene er gjennomført, men basert på de nevnte anbefalingene antas variasjonene inne i hvert rør å være små.

Egenskapene til feltet utenfor kulturene er i denne undersøkelsen først og fremst knyttet til tekniske spesifikasjoner, hvor godt man kan måle signalnivåene og hvor godt feltet overvåkes i eksponeringsperioden. RF- feltet ble kalibrert i ett referansepunkt, mens prøverørene ble lagt ut på en horisontal flate på 30 x 30 cm rundt dette punktet. Intensiteten i et tverrsnitt av feltstrålen (i flaten hvor rørene ble lagt) vil variere noe i forhold til referansepunktet. I målinger som ble gjennomført, ble det registrert en reduksjon på maksimalt 3 dB fra senter og ut til kanten av eksponeringsarealet. Det innebar en dobling av signalnivåets effekt i eksponeringsarealets senter i forhold til ved kanten. En slik variasjon vil medføre eksponeringsvariasjoner mellom kulturene, avhengig av hvor de plasseres i eksponeringsarealet. For at noen kulturer ikke systematisk skulle utsettes for de mest intensive områdene i feltet ble alle kulturrør blandet og randomisert ved plassering i eksponeringsarealet. Dette ble gjennomført ved all behandling av kulturene.

Et eksponeringssystem for undersøkelse av RF- felters virkning på kromosommateriale i PBL bør garantere at eneste forskjell mellom RF- eksponerte kulturer og kontroller er det påtrykte feltet. Rørene som eksponeres absorberer energi, og det er viktig å være oppmerksom på temperaturøkninger i mediet [89]. For kulturdyrkningsflasker av plastikk som er omgitt av luft ved eksponering for RF- felter, viser studier at koblingene mellom mediet og det kontrollerte miljøet er svake. Det kan medføre en uakseptabel temperaturstigning selv for studier med lave SAR- verdier ( $< 2 \text{ W/kg}$ ) [89]. I dette eksperimentet ble det for serie 7 og 8, registrert en temperaturøkning inne i de RF- eksponerte kulturene. Temperaturen ble derfor justert til  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  ved senere serier.

#### *Valg av donorer, samspill og genetisk følsomhet*

Det er lite sannsynlig at RF- eksponering fra mobiltelefoner opptrer som initiator i carcinogene prosesser [10]. Det trenger allikevel ikke bety at RF- eksponering ikke kan påvirke utviklingen av kreft. Genetiske endringer forekommer i både initierings og promosjonsfasen i kreftutviklingen. Epigenetiske ikke- genotoksiske carcinogener virker overveiende i promosjonsfasen. Flere av disse forbindelsene er "co- carcinogener" som påvirker dannelsen av kreft kun i kombinasjon med andre (genotoksiske) carcinogener [90]. Ikke- genotoksiske effekter kan være relevant for utviklingen av kreft gjennom indirekte påvirkningsmekanismer. Dette kan for eksempel være gjennom generering av oksidativt stress. Påvirkning av de cellulære forsvarsmekanismene mot oksidativt stress kan også føre til økt mutasjonsrate. Korrekt DNA- reparasjon er vesentlig for å unngå mutasjoner. Reaksjoner som kan påvirke reparasjonsmekanismene kan føre til økt mutasjonsfrekvens [90]. Potensielle kreftceller kan fjernes ved apoptose (programmert celledød), som er en viktig beskyttelsesmekanisme mot genotoksiske agens. Gener som for eksempel *TP53* styrer og kan initiere apoptose. På denne måten unngår man at celledøden forblir i vevet [91]. Skulle kjemiske eller fysiske agens som for eksempel RF- stråling, inhibere disse cellulære forsvarsmekanismene kan også det føre til økt mutasjonsfrekvens.

Potensielle bloddonorer ble genotypet for glutation S- transferase *GSTM1*- genet, og personer som manglet *GSTM1* ble valgt som blodgivere i denne studien. Genotype null for dette genet

kan gjøre individene mer sensible overfor de genotoksiske effektene av tobakksrøyk. Denne genotypen er hyppig forekommende i befolkningen. Interindividuelle variasjoner som skyldes dette genet, kunne på denne måten utelukkes. Allikevel kan man ikke utelukke en rekke andre genetiske forskjeller som kan ha innvirkning på biotransformasjonen av kjemiske agens, eller på reparasjon av DNA- skader. Derfor må individuelle egenskaper i avgiftningen av MMC kunne regnes med. Hos bloddonorene kan for eksempel ulik genotype for genet (*NQO1*) som koder for et fase- II enzym, NAD(P)H: quinone oksidoreduktase (DT- diaphorase), være av betydning. Enzymet deltar i avgiftningen av fremmedstoffer, og beskytter celler fra tumorigenese [92,93]. En studie gjennomført av Wang et al. (1999) viser at induksjon av DT- diaphorase kan øke den cytotoxiske aktiviteten til MMC (1,4 til 3 ganger) i humane tumorceller [92]. Etter aktivering av MMC kan metabolitten i større grad produsere DNA- skade enn før aktivering. Det vil si at selv om MMC i seg selv er genotoksisk, medfører metabolitten økt mulighet for dannelsen av DNA- skade. Hvilken genotype av *NQO1* en person har påvirker mengden aktiv metabolitt som dannes fra en MMC eksponering. Tre ulike alleler for *NQO1* er identifisert [94]. Ett funksjonelt allel som biotransformerer MMC (*NQO1\*1*), ett ikke- funksjonelt (*NQO1\*2*) og ett (*NQO1\*3*) med nedsatt evne til biotransformasjon i forhold til førstnevnte. Hos kaukasiere er det kartlagt følgende fordeling respektivt til de tre alleler; 79 %, 16 % og 5 % [94]. Dette viser at det kan være individuelle forskjeller i aktiveringen av MMC hos bloddonorene i denne undersøkelsen. Resultatene gir ingen indikasjon på at det i denne undersøkelsen er forskjell mellom person E og F med hensyn til dette (tabell 4.11).

Ovenfor er det nevnt to gener som kan ha hatt direkte eller indirekte virkning på hvordan donorene i denne studien reagerte på de ulike eksponeringene. Ulik følsomhet for miljøeksponeringer skyldes medfødte og tilegnede egenskaper. Ofte beskrives dette som genetisk følsomhet. I denne studien ble variasjoner mellom individene som det ellers ville vært vanskelig å kontrollere for, tatt hånd om ved at donorene var sin egen kontroll. Som følge av ulik behandling i laboratoriet kan det oppstå variasjon mellom prøver fra samme person. Slike variasjoner ble forsøkt unngått ved så nøyaktige og like rutiner som mulig ved gjennomføring av de forskjellige forsøksseriene.

### *Diskusjon av resultater*

I denne studien har inhiberte kulturer, hvor DNA- syntese og reparasjon var inhibert, og konvensjonelle kulturer blitt scoret med tanke på strukturelle kromosomaberrasjoner (CA). Inhiberte kulturer vil kunne gi svar på om RF- stråling, eventuelt i samspill med tobakksrøyk eller MMC, forårsaker økt skadefrekvens i cellene før DNA- reparasjon. Konvensjonelle kulturer gir svar på hvorvidt eksponeringene gir økt CA- frekvens etter reparasjon. Totalt antall celler med aberrasjoner, antall kromatidegap, antall kromosomgap, antall kromatidebrudd og antall kromosombrudd var responsvariablene som ble studert.

Resultatene viser en svak indikasjon på økt CA- frekvens som følge av RF- eksponering for noen få av de studerte responsene (tabell 4.9 og 4.10). Ut fra de resultatene som foreligger kan det ikke trekkes sikre konklusjoner om de positive utslagene skyldes samspillseffekter med MMC eller ikke. Fluktuasjonene rundt statistisk signifikans er noe uforstående. Ved testing av så mange variabler kan et signifikant resultat skyldes tilfeldigheter. Det må her tas i betraktning at resultatene som presenteres er prelimnære. Ytterligere tellinger er nødvendig for å styrke resultatene og øke deres pålitelighet. Skulle tilsvarende fluktuasjoner i de statistiske resultatene vise seg etter ytterligere analyser, kan dette vise at de genererte RF- feltene, i samspill med sigarettøyk og/eller MMC, har en liten biologisk effekt. Dersom det er tilfelle er den eventuelle effekten så ubetydelig at den ikke lar seg demonstrere av den benyttede, cytogenetiske metoden. En endelig tolkning av resultatene kan ikke gjennomføres før komplementære tellinger av skadene er utført.

Resultatene fra denne undersøkelsen kan ikke direkte sammenlignes med resultatene fra den øvrige forskningen. En grunn til dette er at de fysiske betingelsene i vesentlig grad skiller seg fra de andre eksperimentene. En annen grunn er at cellene ble eksponert gjennom hele cellesyklus. På tross av forskjellene i bestrålingens lengde og karakter, er resultatene i overensstemmelse med majoriteten av de tidligere refererte, publiserte vitenskapelige studiene [5,73,75,76,77,78]. For serier uten og med tilsetning av MMC reduseres gjennomsnittlig scoringsresultater for de nevnte responsene betraktelig for celler som har gjennomgått DNA- reparasjon (tabell 4.7 og 4.8). Selv om det er talt 100 celler for konvensjonelle kulturer, og bare halvparten for inhiberte, er det ikke forventet noen stor forandring i denne trenden



dersom man scorer ytterligere 50 celler for de inhiberte kulturene. Flere resultater viser ingen signifikant økning av kromosomgap (Kg) og kromosombrudd (Kb) i kulturene tilsatt MMC dersom disse sammenlignes med kulturer uten kjemikaliet, men med samme eksponering for øvrig (tabell 4.9 og 4.10). Årsaken til dette er at cellene ble eksponert for MMC under DNA-syntesefasen (S- fasen) i kulturene. Eksponering av genotoksiske agens i S- fasen påvirker vanligvis bare den nydannede søsterkromatiden, og gir kromatideaberrasjoner [41]. I tillegg kan antallet kromosomgap være underestimert ved scoring av cellene. Kromosomgap kan bli vurdert til å være bånd i kromosomet hvor det ikke er tilstrekkelig med farge. På den måten kan skaden bli underestimert. Dette viser en svakhet i CA- analysemetoden, hvor subjektivt skjønn er avgjørende i tvilstilfeller. Stort sett var alle preparatene som ble laget i denne undersøkelsen gode med tanke på farge og kontrast. Som nevnt er det vanskelig å skille mellom ulike skader fra forskjellige kjemikalier ved bruk av tradisjonelle CA- analyser. MMC er et unntak [71], og det ble funnet en økt frekvens av kromatideutbyttefigurer for kulturer tilsatt dette kjemikaliet.

Det ble ikke funnet noen økt CA- frekvens mellom inhiberte RF- eksponerte kulturer med for høy temperatur og RF- eksponerte kulturer med regulert temperatur (tabell 4.12). Dette tilsier at det for konvensjonelle kulturer ikke kan forventes å finne en effekt av temperaturstigningen. Siden kontrollkulturene til serie 11 ble inkubert i eget klimaskap var det også av interesse å undersøke om dette kunne virke inn på lymfocyttkulturene. Ved å sammenligne kontrollkulturene i serie 7 og 11 kunne eventuelle forskjeller mellom inkubatorene avdekkes. Ingen statistiske forskjeller ble funnet (tabell 4.12). Ukontrollerbare forhold som for eksempel mekanisk vibrasjon i klimaskap, ser ikke ut til å ha hatt innvirkning på cellekulturene.

Resultatene fra sammenligningene av skadefrekvens ved de ulike inkubasjonstemperaturene samsvarer med studier gjennomført ved lavere frekvenser [77,95]. Motstridende resultater ble imidlertid funnet i studien til Kerbacher et al. (1990) [73]. Forskerne fant svake signifikante resultater for dyrkede CHO- celler eksponert for ADR og RF- felt (2450 MHz med SAR-verdi på 33,8 W/kg) ved 40 °C. Kontrollkulturene i denne studien ble dyrket ved 37 °C. En effekt av temperatur ble også avdekket for celler dyrket ved 40 °C kun eksponert for ADR,

når de ble sammenlignet med celler dyrket ved 37 °C og eksponert for samme konsentrasjon ADR. Det ble ikke funnet tilsvarende resultat ved bruk av MMC i stedet for ADR i den samme studien.

### *Celleproliferasjon og promosjon av kreft*

Selv om den direkte effekten av RF- felter eller en eventuell kombinasjonseffekt, ikke ser ut til å gi økt skadefrekvens i DNA, kan en slik eksponering påvirke celler som allerede har ervervet mutasjoner. Dersom RF- felt eller økt temperatur som følge av de genererte feltene, virker inn på celleproliferasjon og transformasjon, kan man få verdifull innsikt i hvorvidt de fysiske feltene fra mobiltelefoner kan promotere kreft.

Inkubasjonstemperaturens betydning på proliferasjonsraten til dyrkede PBL er studert av Purrott et al. (1981) [96]. Det ble ved temperaturstigning fra 36–39 °C, funnet en lineær økning i proliferasjonsraten til dyrkede (48 timers) humane PBL. Manglende kontroll av celleproliferasjon er karakteristisk for carcinogenesen. Raskere celleproliferasjon forkorter cellesyklusen, og gir slik en mulighet til å akselerere akkumulasjon av mutasjoner [90]. Økt celledelingsrate forklarer trolig den carcinogene effekten av mange agens som ikke direkte forårsaker DNA- skade. Dette kan være en viktig faktor for effekten av genotoksiske carcinogener [97]. Virkningen av RF- felter og økning i inkubasjonstemperaturen som følge av feltene, er studert med henblikk på endring av celleproliferasjon. Ulike eksperimenter viser motstridende resultater. Flere studier [65,98,99] har ikke påvist noen effekt av RF- feltene alene, eller i samspill med kjemikalier og/eller økt temperatur. Undersøkelser på ekstremt lavfrekvente felter ser ut til å kunne akselerere cellesyklus hos dyrkede PBL [100], men disse feltene har ikke direkte relevans til strålingen fra mobiltelefoner med mindre modulasjonsfrekvensen, den frekvensen informasjonen legges til bæreølgen med, har betydning.

En eventuell sammenheng mellom eksponering for elektromagnetiske felter og økt proliferasjon, ser ut til å være avhengig av eksponeringens karakter. Som for

effektparameterne CA og MN ser det ut til at valg av frekvens, modulasjon, intensitet etc., i de forskjellige eksperimentene kan gi varierende resultater.

I dette arbeidet er det gjennomført en utprøving av metoder for fiksering av cellekulturer til bruk i flow cytometri. Ved å bruke en slik analysemetode ville eventuelle endringer i celleproliferasjon kunne måles. Flow cytometri ble ikke utført for noen kulturer i dette arbeidet. Årsaken var at metodene som ble prøvd ikke separerte lymfocytene godt nok til at de kunne brukes i flow cytometri analyser. Dersom celleproliferasjon allikevel skal undersøkes for de cellekulturene som er kjørt kan mer konvensjonelle metoder brukes på det allerede innsamlede materialet. Bestemmelse av mitotisk rate ved hjelp av mitotisk indeks (MI) kan gjøres ved konvensjonell mikroskopi av de samme slides som er preparert til CA-analyse eller MN- analyse.

### *Konklusjon*

Hypotesen for denne undersøkelsen var at eksponering for høyfrekvente elektromagnetiske felter innenfor de fastsatte, internasjonale grenseverdiene ikke gir celledskader som direkte eller indirekte, kan føre til kreft. De preliminare resultatene fra denne studien støtter hypotesen. Konklusjonen må bli, basert på disse og andre resultater, at akutt eksponering for RF- felter svakere enn fastsatte grenseverdier ikke øker kromosomaberrasjonsfrekvensen. Utvidede tellinger på det innsamlede materialet vil bli gjennomført for å styrke resultatenes pålitelighet.

Det må påpekes at denne studien ser på korttidseffekter av radiofrekvent elektromagnetisk stråling. De fleste studiene gjennomført til nå er av korttidskarakter. Undersøkelser av eksponering over lang tid må følges opp ved epidemiologiske studier, som det pr. i dag er relativt få av. Epidemiologiske undersøkelser støttet av *in vitro* og *in vivo* studier vil trolig være med å bygge opp en tilstrekkelig kunnskapsbase, slik at spørsmålet om stråling fra mobiltelefoner er helsefarlig, kan besvares. Inntil den tid anbefales det å følge ekspertenes råd og være "føre- var".

## 6 Referanser

1. IEGMP (2000). Mobile Phones and Health. Report of an Independent Expert Group on Mobile Phones. UK Minister of Public Health. National Radiological Protection Board, Chilton, Oxon: <http://www.iegmp.org.uk>, pp. 158.
2. Repacholi, M.H. (2001). Health risks from the use of mobile phones. *Toxicol Lett*, **120**, 323-31.
3. Vaage, O.F. (2002). Norsk mediebarometer 2001. Statistisk sentralbyrå, Oslo, pp. 83
4. Owen, R.D. (2000). Possible health risks of radiofrequency exposure from mobile telephones. *Epidemiology*, **11**, 99-100.
5. McNamee, J.P., Bellier, P.V., Gajda, G.B., Miller, S.M., Lemay, E.P., Lavalley, B.F., Marro, L. and Thansandote, A. (2002). DNA Damage and Micronucleus Induction in Human Leukocytes after Acute In Vitro Exposure to a 1.9 GHz Continuous-Wave Radiofrequency Field. *Radiat Res*, **158**, 523-33.
6. Brusick, D., Albertini, R., McRee, D., Peterson, D., Williams, G., Hanawalt, P. and Preston, J. (1998). Genotoxicity of radiofrequency radiation. DNA/Genetox Expert Panel. *Environ Mol Mutagen*, **32**, 1-16.
7. Verschaeve, L. and Maes, A. (1998). Genetic, carcinogenic and teratogenic effects of radiofrequency fields. *Mutat Res*, **410**, 141-65.
8. Royal Society of Canada Expert Panel Report (1999). A review of the potential health risks of radiofrequency fields from wireless telecommunication devices. An Expert Panel report prepared at the request of the Royal Society of Canada for Health Canada. Royal Society of Canada, RSC.EPR 99-1., Ottawa, pp. 149.
9. Juutilainen, J. and de Seze, R. (1998). Biological effects of amplitude-modulated radiofrequency radiation. *Scand J Work Environ Health*, **24**, 245-54.
10. Blettner, M. and Berg, G. (2000). Are mobile phones harmful? *Acta Oncol*, **39**, 927-30.
11. Vistnes, A.I. and Gjøtterud, K. (2001). Why arguments based on photon energy may be highly misleading for power line frequency electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*, **22**:200-204.
12. Elwood, J.M. (1999). A critical review of epidemiologic studies of radiofrequency exposure and human cancers. *Environ Health Perspect*, **107**, 155-68.
13. Oftedal, G. and Johnson, A. (2002). Mobiltelefoner og helseskader. *Teknologirådet*. Teknologirådets rapport, vol. 01/02: [http://www.teknologiradet.no/files/mobiltelefoner\\_og\\_helseskader\\_rapport\\_01.pdf](http://www.teknologiradet.no/files/mobiltelefoner_og_helseskader_rapport_01.pdf), pp. 33.
14. WHO (1998). Electromagnetic fields and public health. Health effects of radiofrequency fields based on: Environmental health criteria 137 "Electromagnetic Fields (300 Hz to 300 GHz), World Health Organization, Geneva, 1993, and the report of the scientific review under the auspices of the International EMF Project of the World Health Organization, Munich, Germany, November 1996. *Fact sheet*, **N183**, 1-3.
15. Juutilainen, J. and Lang, S. (1997). Genotoxic, carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields. Introduction and overview. *Mutat Res*, **387**, 165-71.

16. ICNIRP (1998). Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. *Health Phys*, **74**, 494-522.
17. Bergquist, U., Anger, G., Birke, E., Hamnerius, Y., Hillert, L., Larsson, L.E., Törnevik, C. and Zetterblad, J. (2001). Exponering för radiofrekventa fält och mobiltelefoni. SSI Rapport, Statens strålskyddsinstitut, Sweden, pp. 38.
18. Foshaug, R. and Voll, L.O. (1999). UMTS i Norge. Etablering av et regulatorisk rammeverk for UMTS i Norge. Rapport til Samferdselsdepartementet utarbeidet av Post og Teletilsynet, pp. 29.
19. EBU (2001) ETSI Technical Report 101 205 v1.1.2 (2001-07). Digital Video Broadcasting (DVB); LMDS Base Station and User Terminal Implementation Guidelines for ETSI EN 301 199. European Broadcasting Union: <http://www.etsi.org>, pp. 1-46.
20. COST 244 (1996). Design of exposure systems for *in vitro* and *in vivo* RF experiments. Position document. Raskmark P, Veyret B (eds). Brussels: European Union (DG XIII). In: Repacholi MH. 1998. Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: health effects and research needs. *Bioelectromagnetics*, **19**:1-19.
21. Repacholi, M.H. (1998). Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields: health effects and research needs. *Bioelectromagnetics*, **19**, 1-19.
22. ICNIRP (1998). Response to questions and comments on ICNIRP guidelines. *Health Phys*, **75**, 438.
23. Johansen, C., Boice, J.D., Jr., McLaughlin, J.K. and Olsen, J.H. (2002). Use of cellular telephones and risk of cancer. A Danish cohort study. *Ugeskr Laeger*, **164**, 1668-73.
24. Van Leeuwen, G.M., Lagendijk, J.J., Van Leersum, B.J., Zwamborn, A.P., Hornsleth, S.N. and Kotte, A.N. (1999). Calculation of change in brain temperatures due to exposure to a mobile phone. *Phys Med Biol*, **44**, 2367-79.
25. Wainwright, P. (2000). Thermal effects of radiation from cellular telephones. *Phys Med Biol*, **45**, 2363-72.
26. Gandhi, O.P., Li, Q.X. and Kang, G. (2001). Temperature rise for the human head for cellular telephones and for peak SARs prescribed in safety guidelines. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, **49**, 1607-1613.
27. WHO (1998). Electromagnetic fields and public health. Physical properties and effects on biological systems. *Fact sheet*, **N182**, 1-3.
28. Freude, G., Ullsperger, P., Eggert, S. and Ruppe, I. (1998). Effects of microwaves emitted by cellular phones on human slow brain potentials. *Bioelectromagnetics*, **19**, 384-7.
29. Freude, G., Ullsperger, P., Eggert, S. and Ruppe, I. (2000). Microwaves emitted by cellular telephones affect human slow brain potentials. *Eur J Appl Physiol*, **81**, 18-27.
30. Preece, A.W., Iwi, G., Davies-Smith, A., Wesnes, K., Butler, S., Lim, E. and Varey, A. (1999). Effect of a 915-MHz simulated mobile phone signal on cognitive function in man. *Int J Radiat Biol*, **75**, 447-56.
31. Koivisto, M., Revonsuo, A., Krause, C., Haarala, C., Sillanmaki, L., Laine, M. and Hamalainen, H. (2000). Effects of 902 MHz electromagnetic field emitted by cellular telephones on response times in humans. *Neuroreport*, **11**, 413-5.

32. Koivisto, M., Krause, C.M., Revonsuo, A., Laine, M. and Hamalainen, H. (2000). The effects of electromagnetic field emitted by GSM phones on working memory. *Neuroreport*, **11**, 1641-3.
33. Krause, C.M., Sillanmaki, L., Koivisto, M., Haggqvist, A., Saarela, C., Revonsuo, A., Laine, M. and Hamalainen, H. (2000). Effects of electromagnetic field emitted by cellular phones on the EEG during a memory task. *Neuroreport*, **11**, 761-4.
34. Neubauer, C., Phelan, A.M., Kues, H. and Lange, D.G. (1990). Microwave irradiation of rats at 2.45 GHz activates pinocytotic-like uptake of tracer by capillary endothelial cells of cerebral cortex. *Bioelectromagnetics*, **11**, 261-8.
35. Salford, L.G., Brun, A., Sturesson, K., Eberhardt, J.L. and Persson, B.R. (1994). Permeability of the blood-brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 16, 50, and 200 Hz. *Microsc Res Tech*, **27**, 535-42.
36. Sandstrom, M., Wilen, J., Oftedal, G. and Hansson Mild, K. (2001). Mobile phone use and subjective symptoms. Comparison of symptoms experienced by users of analogue and digital mobile phones. *Occup Med (Lond)*, **51**, 25-35.
37. Hocking, B. (1998). Preliminary report: symptoms associated with mobile phone use. *Occup Med (Lond)*, **48**, 357-60.
38. Oftedal, G., Wilen, J., Sandstrom, M. and Mild, K.H. (2000). Symptoms experienced in connection with mobile phone use. *Occup Med (Lond)*, **50**, 237-45.
39. Koivisto, M., Haarala, C., Krause, C.M., Revonsuo, A., Laine, M. and Hamalainen, H. (2001). GSM phone signal does not produce subjective symptoms. *Bioelectromagnetics*, **22**, 212-5.
40. Hietanen, M., Hamalainen, A.M. and Husman, T. (2002) Hypersensitivity symptoms associated with exposure to cellular telephones: no causal link. *Bioelectromagnetics*, **23**, 264-70.
41. Pfeiffer, P., Goedecke, W. and Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis*, **15**, 289-302.
42. Ishidate, M., Jr., Miura, K.F. and Sofuni, T. (1998). Chromosome aberration assays in genetic toxicology testing in vitro. *Mutat Res*, **404**, 167-72.
43. IAEA (1986). Biological Dosimetry: Chromosomal aberration analysis for dose assessment. International Atomic Energy Agency, Vienna. Technical Reports Series No.260, pp. 70.
44. Hagmar, L., Bonassi, S., Stromberg, U., Brogger, A., Knudsen, L.E., Norppa, H. and Reuterwall, C. (1998). Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: a report from the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res*, **58**, 4117-21.
45. Boveri, T. (1914). Zur Frage der Entstehung Maligner Tumoren. *Jena, Germany: Gustav Fisher*, 1-64. In: Bonassi, S., et al., 2000. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res.*, **60** (6): p. 1619-25.

46. Bonassi, S., Hagmar, L., Stromberg, U., Montagud, A.H., Tinnerberg, H., Forni, A., Heikkila, P., Wanders, S., Wilhardt, P., Hansteen, I.L., Knudsen, L.E. and Norppa, H. (2000) Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer independently of exposure to carcinogens. European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health. *Cancer Res*, **60**, 1619-25.
47. Bonassi, S., Neri, M. and Puntoni, R. (2001). Validation of biomarkers as early predictors of disease. *Mutat Res*, **480-481**, 349-58.
48. Hagmar, L., Brogger, A., Hansteen, I.L., Heim, S., Hogstedt, B., Knudsen, L., Lambert, B., Linnainmaa, K., Mitelman, F., Nordenson, I. and et al. (1994). Cancer risk in humans predicted by increased levels of chromosomal aberrations in lymphocytes: Nordic study group on the health risk of chromosome damage. *Cancer Res*, **54**, 2919-22.
49. ECEG (1996). Possible health effects related to the use of radiotelephones. Proposals for a research by a European Commission Expert Group. European Commission, pp. 139.
50. Meltz, M.L., Eagan, P. and Erwin, D.N. (1990). Proflavin and microwave radiation: absence of a mutagenic interaction. *Bioelectromagnetics*, **11**, 149-57.
51. Kirsch-Volders, M. and Fenech, M. (2001). Inclusion of micronuclei in non-divided mononuclear lymphocytes and necrosis/apoptosis may provide a more comprehensive cytokinesis block micronucleus assay for biomonitoring purposes. *Mutagenesis*, **16**, 51-8.
52. Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y.P., Ceppi, M., Chang, W.P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M.P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L.R., Fucic, A., Lima, O.G., Hrelia, P., Krishnaja, A.P., Lee, T.K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W.U., Odagiri, Y., Scarffi, M.R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001). HUman MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ Mol Mutagen*, **37**, 31-45.
53. Norppa, H. (1997). Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. *Environ Health Perspect*, **105 Suppl 4**, 829-35.
54. Heddle, J.A., Cimino, M.C., Hayashi, M., Romagna, F., Shelby, M.D., Tucker, J.D., Vanparys, P. and MacGregor, J.T. (1991). Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ Mol Mutagen*, **18**, 277-91. In: Norppa, H., 1997. Cytogenetic markers of susceptibility: influence of polymorphic carcinogen-metabolizing enzymes. *Environ Health Perspect.*, **105 Suppl 4**: p. 829-35.
55. Muscat, J.E., Malkin, M.G., Thompson, S., Shore, R.E., Stellman, S.D., McRee, D., Neugut, A.I. and Wynder, E.L. (2000). Handheld cellular telephone use and risk of brain cancer. *Jama*, **284**, 3001-7.
56. Auvinen, A., Hietanen, M., Luukkonen, R. and Koskela, R.S. (2002). Brain tumors and salivary gland cancers among cellular telephone users. *Epidemiology*, **13**, 356-9.
57. Hardell, L., Hallquist, A., Mild, K.H., Carlberg, M., Pahlson, A. and Lilja, A. (2002). Cellular and cordless telephones and the risk for brain tumours. *Eur J Cancer Prev*, **11**, 377-386.
58. Ryberg, D., Skaug, V., Hewer, A., Phillips, D.H., Harries, L.W., Wolf, C.R., Ogreid, D., Ulvik, A., Vu, P. and Haugen, A. (1997). Genotypes of glutathione transferase M1 and P1 and their significance for lung DNA adduct levels and cancer risk. *Carcinogenesis*, **18**, 1285-9.

59. Kristensen, V.N., Andersen, T.I., Erikstein, B., Geitvik, G., Skovlund, E., Nesland, J.M. and Borresen-Dale, A.L. (1998). Single tube multiplex polymerase chain reaction genotype analysis of GSTM1, GSTT1 and GSTP1: relation of genotypes to TP53 tumor status and clinicopathological variables in breast cancer patients. *Pharmacogenetics*, **8**, 441-7.
60. CENELEC (1995). Human exposure to electromagnetic fields: High frequency (10 kHz to 300 GHz). European Committee for Electrotechnical Standardization; European Prestandard, ENV 50166-2, Brussels, pp. 44.
61. Serrano-Garcia, L. and Montero-Montoya, R. (2001). Micronuclei and chromatid buds are the result of related genotoxic events. *Environ Mol Mutagen*, **38**, 38-45.
62. Jelmert, O., Hansteen, I.L. and Langard, S. (1992). Enhanced cytogenetic detection of previous in vivo exposure to mutagens in human lymphocytes after treatment with inhibitors of DNA synthesis and DNA repair in vitro. *Mutat Res*, **271**, 289-98.
63. Wedemeyer, N. and Potter, T. (2001). Flow cytometry: an 'old' tool for novel applications in medical genetics. *Clin Genet*, **60**, 1-8.
64. Marti, G.E., Stetler-Stevenson, M., Bleesing, J.J. and Fleisher, T.A. (2001). Introduction to flow cytometry. *Semin Hematol*, **38**, 93-9.
65. d'Ambrosio, G., Massa, R., Scarfi, M.R. and Zeni, O. (2002). Cytogenetic damage in human lymphocytes following GMSK phase modulated microwave exposure. *Bioelectromagnetics*, **23**, 7-13.
66. Surrallés, J., Xamena, N., Creus, A., Catalan, J., Norppa, H. and Marcos, R. (1995). Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*, **341**, 169-84.
67. Hansteen, I.L. (2002). Genetisk seksjon, Sykehuset Telemark HF. *Personlig meddelelse*.
68. Buckton, K.E. and Evans, H.J. (1973). Methods for the analysis of human chromosome aberrations. World Health Organization, Geneva, pp. 1-66.
69. Hagmar, L., Stromberg, U., Tinnerberg, H. and Mikoczy, Z. (2001). The usefulness of cytogenetic biomarkers as intermediate endpoints in carcinogenesis. *Int J Hyg Environ Health*, **204**, 43-7.
70. Albertini, R., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R.R., Waters, M.D. and Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International programme on chemical safety. *Mutation Research*, **463**, 111-172. In: Bonassi, S. and Au, W.W. (2002). Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat Res*, 511, 73-86.
71. Bonassi, S. and Au, W.W. (2002). Biomarkers in molecular epidemiology studies for health risk prediction. *Mutat Res*, **511**, 73-86.
72. Fenech, M. (2002). Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology*, **181-182**, 411-6.
73. Kerbacher, J.J., Meltz, M.L. and Erwin, D.N. (1990). Influence of radiofrequency radiation on chromosome aberrations in CHO cells and its interaction with DNA-damaging agents. *Radiat Res*, **123**, 311-9.



74. Maes, A., Verschaeve, L., Arroyo, A., De Wagter, C. and Vercruyssen, L. (1993). In vitro cytogenetic effects of 2450 MHz waves on human peripheral blood lymphocytes. *Bioelectromagnetics*, **14**, 495-501.
75. Maes, A., Collier, M., Van Gorp, U., Vandoninck, S. and Verschaeve, L. (1997). Cytogenetic effects of 935.2-MHz (GSM) microwaves alone and in combination with mitomycin C. *Mutat Res*, **393**, 151-6.
76. Maes, A., Collier, M. and Verschaeve, L. (2001). Cytogenetic effects of 900 MHz (GSM) microwaves on human lymphocytes. *Bioelectromagnetics*, **22**, 91-6.
77. Tice, R.R., Hook, G.G., Donner, M., McRee, D.I. and Guy, A.W. (2002). Genotoxicity of radiofrequency signals. Investigation of DNA damage and micronuclei induction in cultured human blood cells. *Bioelectromagnetics*, **23**, 113-26.
78. Vijayalaxmi, Leal, B.Z., Meltz, M.L., Pickard, W.F., Bisht, K.S., Roti Roti, J.L., Straube, W.L. and Moros, E.G. (2001). Cytogenetic Studies in Human Blood Lymphocytes Exposed In Vitro to Radiofrequency Radiation at a Cellular Telephone Frequency (835.62 MHz, FDMA). *Radiat Res*, **155**, 113-121.
79. McNamee, J.P., Bellier, P.V., Gajda, G.B., Lavallee, B.F., Lemay, E.P., Marro, L. and Thansandote, A. (2002). DNA Damage in Human Leukocytes after Acute In Vitro Exposure to a 1.9 GHz Pulse-Modulated Radiofrequency Field. *Radiat Res*, **158**, 534-7.
80. Lai, H. and Singh, N.P. (1995). Acute low-intensity microwave exposure increases DNA single-strand breaks in rat brain cells. *Bioelectromagnetics*, **16**, 207-10.
81. Lai, H. and Singh, N.P. (1996). Single- and double-strand DNA breaks in rat brain cells after acute exposure to radiofrequency electromagnetic radiation. *Int J Radiat Biol*, **69**, 513-21.
82. Malyapa, R.S., Ahern, E.W., Bi, C., Straube, W.L., LaRegina, M., Pickard, W.F. and Roti Roti, J.L. (1998). DNA damage in rat brain cells after in vivo exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation and various methods of euthanasia. *Radiat Res*, **149**, 637-45.
83. Malyapa, R.S., Ahern, E.W., Straube, W.L., Moros, E.G., Pickard, W.F. and Roti Roti, J.L. (1997). Measurement of DNA damage after exposure to electromagnetic radiation in the cellular phone communication frequency band (835.62 and 847.74 MHz). *Radiat Res*, **148**, 618-27.
84. Malyapa, R.S., Ahern, E.W., Straube, W.L., Moros, E.G., Pickard, W.F. and Roti Roti, J.L. (1997). Measurement of DNA damage after exposure to 2450 MHz electromagnetic radiation. *Radiat Res*, **148**, 608-17.
85. Li, L., Bisht, K.S., LaGroye, I., Zhang, P., Straube, W.L., Moros, E.G. and Roti Roti, J.L. (2001). Measurement of DNA damage in mammalian cells exposed in vitro to radiofrequency fields at SARs of 3-5 W/kg. *Radiat Res*, **156**, 328-32.
86. Schonborn, F., Pokovic, K., Burkhardt, M. and Kuster, N. (2001). Basis for optimization of in vitro exposure apparatus for health hazard evaluations of mobile communications. *Bioelectromagnetics*, **22**, 547-59.
87. Guy, A.W., Chou, C.K. and McDougall, J.A. (1999). A quarter century of in vitro research: a new look at exposure methods. *Bioelectromagnetics*, **Suppl 4**, 21-39.
88. Kuster, N. and Schonborn, F. (2000). Recommended minimal requirements and development guidelines for exposure setups of bio-experiments addressing the health risk concern of wireless communications. *Bioelectromagnetics*, **21**, 508-14.

- 
89. Schonborn, F., Pokovic, K., Wobus, A.M. and Kuster, N. (2000). Design, optimization, realization, and analysis of an in vitro system for the exposure of embryonic stem cells at 1.71 GHz. *Bioelectromagnetics*, **21**, 372-84.
  90. Juutilainen, J. (2002). Department of Environmental Sciences, University of Kuopio, Finland. *Personlig meddelelse*.
  91. Kure, E. (2003). Institutt for natur-, helse- og miljøvern, Høgskolen i Telemark, avd. Bø. *Personlig meddelelse*.
  92. Wang, X., Doherty, G.P., Leith, M.K., Curphey, T.J. and Begleiter, A. (1999). Enhanced cytotoxicity of mitomycin C in human tumour cells with inducers of DT-diaphorase. *Br J Cancer*, **80**, 1223-30.
  93. Harth, V., Donat, S., Ko, Y., Abel, J., Vetter, H. and Bruning, T. (2000). NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 codon 609 polymorphism and its association to colorectal cancer. *Arch Toxicol*, **73**, 528-31.
  94. Gaedigk, A., Tyndale, R.F., Jurima-Romet, M., Sellers, E.M., Grant, D.M. and Leeder, J.S. (1998). NAD(P)H:quinone oxidoreductase: polymorphisms and allele frequencies in Caucasian, Chinese and Canadian Native Indian and Inuit populations. *Pharmacogenetics*, **8**, 305-13.
  95. Meltz, M.L., Eagan, P. and Erwin, D.N. (1989). Absence of mutagenic interaction between microwaves and mitomycin C in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen*, **13**, 294-303.
  96. Purrott, R.J., Vulpis, N. and Lloyd, D.C. (1981). The influence of incubation temperature on the rate of human lymphocyte proliferation in vitro. *Experientia*, **37**, 407-8.
  97. Ames, B.N., Shigenaga, M.K. and Gold, L.S. (1993). DNA lesions, inducible DNA repair, and cell division: three key factors in mutagenesis and carcinogenesis. *Environ Health Perspect*, **101**, 35-44.
  98. Ciaravino, V., Meltz, M.L. and Erwin, D.N. (1991). Absence of a synergistic effect between moderate-power radio-frequency electromagnetic radiation and adriamycin on cell-cycle progression and sister-chromatid exchange. *Bioelectromagnetics*, **12**, 289-98.
  99. Antonopoulos, A., Eisenbrandt, H. and Obe, G. (1997). Effects of high-frequency electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro. *Mutat Res*, **395**, 209-14.
  100. Antonopoulos, A., Yang, B., Stamm, A., Heller, W.D. and Obe, G. (1995). Cytological effects of 50 Hz electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro. *Mutat Res*, **346**, 151-7. In: Antonopoulos, A., H. Eisenbrandt, and G. Obe, 1997. Effects of high-frequency electromagnetic fields on human lymphocytes in vitro. *Mutat Res.*, **395**(2-3): p. 209-14.

## Appendiks A Oversikt over kjemikalier, materialer og teknisk utstyr

**Tabell A1 Kjemikalier og materialer**

Materiale/løsning	Spesifikasjon
Caffeine	Sigma Chemical company. Lot. No. 36F-0495. No. C - 0750
Carnoy's– fikseringsløsning	3 : 1 del(er) 100 % ren metanol : iseddik
Colcemid B	Stock: 1 mg demekolcin/ml sterilt vann. Colcemid B: 100 µl Demekolcin inj. væske tilsettes 9,9 ml sterilt vann
Cytochalasin B	Sigma Chemical company. Lot. No. 119F-4004. No. C-6762 Stock: Cytochalasin B 3 mg, løses i 5 ml dimetysulphoxide (DMSO). Løs 5 mg Cytochalasin B i 8,33 ml DMSO. Dette gir en løsning på 600 µg Cytochalasin B pr. ml løsning.
Demekolcin inj. væske 1 mg/ml	S8K010. 1 ml inneholder: Demekolcin 1 mg ; Sterk sprit 53 mg; Propylenglycol 100 mg; Monoatriumfosfat 2 mg; Natriumfosfat 1,5 mg; sterilt vann.
Fargevæske til Bûrkers tellekammer	10 mg metylfiolett C. I 42535 + 14 g 5 M eddiksyre + 100 g rensset vann
Flasker til blanding av kulturmedium	Tc flask 25 cm <sup>2</sup> Nunc A/S, Danmark
Gentamicin sulfat	BioWhittaker. Lot. No. 0M0134.
Giemsa løsning	Azur–eosine–methylene–blue–solution for microscopy. Merck; KgaA, 64271 Damstadt, Germany. Lot. No. OB 034529
Hydroxyurea	Sigma Chemical company. Lot. No. 28F – 0606. No. H-8627
Hydroxyurea – caffeine løsning	Hydroxyurea 0,761 g + Caffeine 1,942 g. Løses i 100 ml ferskt RPMI 1640 medium m/L–Glutamin. Varm opp til alt er oppløst (37 °C). Lagres dypryst.
Hypotonløsning	0,075 M KCl. Kaliumklorid (KCl) (Merck Art. 4936) 5,592 g til 1000 ml destillert vann.
Kalveserum (FBS)	Premium Fetal Bovine Serum. BioWhittaker. Lot. No. 0S074E
Kulturdyrkningsrør	Tc tube flat side 110 x 16 mm, Nunc A/S, Danmark.
Mitomycin C	Fra <i>Streptomyces caespitosus</i> . Sigma Chemical company. Lot. No.49H2507.No. M-4287. Bruksløsning: 10 ng/µl. 2 mg Mitomycin C tilsettes 2 ml destillert vann. Ta ut 100 µl og fortyynn med 10 ml destillert vann.
Pertex	Monteringsmedium for lysmikroskopering. Histolab; Hulda Lindgrens Gata 6, S-421 31 Vâstra Frôlunda, Sweden. Cat. No. 00801.
Phytohemaglutinin P	Difco Bacto™. Lot. No. 147220KA
RPMI 1640 m/L– Glutamine	Lot. No. 1MB0086
Sørensens– bufferløsning	Buffer A: 9,53 g Kaliumdihydrogenfosfat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ) til 1000 ml destillert vann. Buffer B: 12,46 g di-Natriumhydrogenfosfat–dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) til 1000 ml destillert vann. Buffer A og buffer B blandes i like store volum.

*Notat for tabell:* Materiale benyttet til genotyping er ikke med i tabellen

Tabell A2 Teknisk utstyr benyttet ved eksponeringsoppsett

	Frekvens	
	2,3 GHz	16,5 GHz
HF- generator	R & S, SMHU, Lp. nr. 45452	Marconi, 6059A
LF- generator	HP, 3314A, Lp. nr. 44955	Exact, Mod. 126, UL000430
HF- forsterker	AR, 25 W, 1–4 GHz, Lp. nr. 05073	HP, 8349B, Lp. nr. 01003
Rettningskoppler	HP, 11692D	HP, 11692D, UL13492
Antenne(r)	Narda, 615, S. nr. 9211	16,5 GHz, Husets (Telenor FoU)
Wattmeter	HP, 437B, Lp. nr. 01064	HP, 437B, Lp. nr. 01064
Effektforsterker		14–18 GHz, Varian , Luftforsvaret
Splitter		Narda, 4317
Modulator		HP, 33102A, Ser. nr. 03849
Dempeledd		Sieveret lab, PM7101, UTF13192
Voltmeter	R & S, URE3, Lp. nr. 45424	R & S, URE3, Lp. nr. 45424
Feltstyrkemeter	W & G, EMR–300, Ser. nr. 2244/ 31	W & G, EMR–300, Ser. nr. 2244/ 31
Probe E- felt	W & G, Type 8,2, Ser. nr. 2244/ 90.23	W & G, Type 8,2, Ser. nr. 2244/ 90.23
Probe 50Hz felt	W & G, EFA–3, D–0065	W & G, EFA- 3, D–0065

## Appendiks B Ekstraksjon av DNA fra humant EDTA- blod

1. Sentrifuger blodprøvene ved 1800 o/min. i 15 minutter ved 4 °C.
2. Sug av supernatanten ved hjelp av steril engangspipette.
3. Overfør blodcellene til 50 ml rør. Skyll ut restene fra blodprøvene med 1x lysisbuffer for å få med restmateriale. Fyll opp til 50 ml med 1x lysisbuffer og vend på rørene slik at blandingen blir homogen.
4. La rørene stå ved 4 °C i 30–60 minutter.
5. Sentrifuger ved 1800 o/min. i 15 minutter ved 4 °C.
6. Sjekk at lyseringen av de røde blodcellene er fullstendig. Pelleten skal være hvit og tydelig, og supernatanten skal være klar. Hvis dette ikke er tilfellet: Resuspender (kan benytte vortexmikser) og la rørene stå ytterligere 30 minutter ved 4 °C før ny sentrifugering.
7. Hell av supernatanten.
8. Fyll opp til ca. 30 ml med 1 x lysisbuffer. Resuspender pelleten på vortexmikser.
9. Sentrifuger ved 1800 o/min. i 15 minutter ved 4 °C.
10. Hell av supernatanten.
11. Gjenta pkt. 8 og 9 til pelleten er ren, hvit og uten røde klumper.
12. Tilsett 10 ml 1x SE- buffer og resuspender pelleten (vortexmikser).
13. Tilsett 50 µl proteinase K og 500 µl 20 % SDS.
14. Sett rørene på rotor, 20–30 o/min., i varmeskap ved ca. 40 °C i 2,5 til 3 timer.
15. Ta rørene ut av varmeskapet. Løsningene skal nå være klare, viskøse og uten klumper.
16. Tilsett ved hjelp av engangspipette ca. 3,0 ml mettet 6 M NaCl- løsning til hvert av rørene.
17. Rist rørene kraftig (vortexmikser) i 15 sekunder. Løsningene skal nå være blakket.
18. Sentrifuger ved 5000 o/min. i 10 minutter ved 3 °C.
19. Hell supernatanten over i nye rør.
20. Tilsett 2–3 x volum absolutt etanol til rørene (ca. opp til 45 ml).
21. Vend forsiktig på rørene straks etter tilsetting av etanol. DNA felles langsomt ut.
22. Fang den utfelte DNA- tråden med en steril, avbrent Pasteur - pipette.

23. Vask DNA- pelleten i 3–5 ml 70 % etanol i et 15 ml rør.
24. Press ut etanol fra pelleten mot kanten av røret når den tas ut av røret. La den lufttørke i 1–2 minutter slik at etanolrester fordamper.
25. Overfør DNA- pelleten til et 2,0 ml rør med 200–1000  $\mu$ l TE- buffer (500  $\mu$ l er vanligvis nok ved denne metoden).
26. Sett prøvene til løsning på ristemaskin ved 800–1000 o/min. ved romtemperatur i 1–2 døgn.

## Appendiks C Oppsett av Polymerase Chain Reaction

1. Tabell C1 viser hvilke reagenser som benyttes i PCR- oppsettet.
2. Husk å holde rørene på is under hele oppsettet.
3. Lag en PCR- miks i et 0,5 ml Eppendorfrør ved å pipettere ut alle reagensene, med unntak av DNA- templat, i den rekkefølgen som fremgår av tabell C1. Mengden av de ulike reagensene må beregnes ut fra antall prøver i oppsettet. Bland til slutt PCR- miksen godt og spinn ned.
4. Fordel PCR- miksen på PCR- rørene.
5. Tilsett DNA- templat til hvert av rørene og sett på lokk.
6. Spinn ned PCR- rørene i egnet sentrifuge.
7. Start ønsket PCR- program og kjør dette. Tabell C2 viser PCR- programmet som ble benyttet.
8. De tre primerne danner PCR- produkter på 275 basepar (bp) for *GSTM1* og 175 bp. for *GSTM2*.

**Tabell C1 Reagenser benyttet i PCR- oppsett**

Reagenser/materiale	Konsentrasjon i bruksløsning	Antall $\mu$ l pr. prøve	Konsentrasjon i PCR- rx
DNA- templat	100 ng/ $\mu$ l	3,0	-
dH <sub>2</sub> O	-	15,2	-
PE- buffer	10 x	3,0	1 x
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	2,6	2,2 mM
Primer GST-1 (for <i>GSTM1</i> og <i>GSTM2</i> )	10 pmol/ $\mu$ l	1,0	0,3 pmol/ $\mu$ l
Primer GST-2 (for <i>GSTM1</i> )	10 pmol/ $\mu$ l	1,0	0,3 pmol/ $\mu$ l
Primer GST-3 (for <i>GSTM2</i> )	10 pmol/ $\mu$ l	1,0	0,3 pmol/ $\mu$ l
dNTPs (N = A, T, G, C)	2 mM	3,0	0,2 mM
DNA- polymerase	5 U/ $\mu$ l	0,2	1,0 U/ $\mu$ l
<b>Totalt</b>		<b>30,0</b>	

A, T, G, C = Adenine, Thymine, Guanine og Cytosine

Tabell C2 Oversikt over program for PCR

Reaksjon	Temperatur (°C)	Tid	Antall sykluser
Denaturering	94	30 sek.	
Denaturering	94	30 sek.	} 20
Hybridisering	68*	30 sek.	
Polymerisering	72	30 sek.	
Denaturering	94	1 min.	} 20
Hybridisering	57*	30 sek.	
Polymerisering	72	30 sek.	
Polymerisering	72	10 min.	

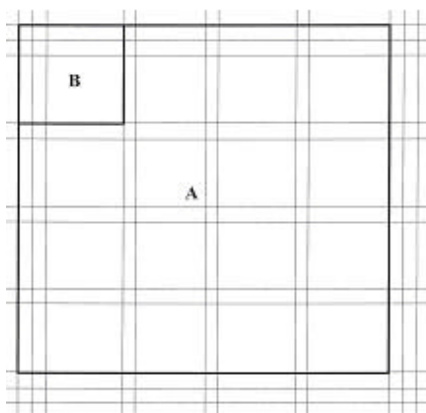
\* Temperaturen senkes med 1 °C pr. syklus i hybridiseringstrinnet



## Appendiks D Estimering av antall hvite blodceller

Telling av hvite blodceller ved hjelp av Bûrkers tellekammer gir et estimat av totalt antall hvite blodceller pr.  $\mu\text{l}$  helblod. Innholdet av hvite blodceller skulle minimum være en million celler pr. ml cellekultur.

1. Pipetterte ut 500  $\mu\text{l}$  "Fargevæske til telling av hvite blodlegemer", og overførte til et lite rør. Tilsatte 50  $\mu\text{l}$  blod og blandet godt. Lot stå i 3–5 minutter.
2. Festet dekkglass på Bûrkers tellekammer. Fylte opp med blod- farge løsning under dekkglasset ved hjelp av en liten pipette.
3. Mikroskoperte ved 10x og/eller 40x forstørrelse. Antallet celler med kjerne ble telt i 1 A rute som vist i figur D1.
4. Multipliserte antallet celler med kjerne med en faktor på 110.



Figur D1 Rutenett i Bûrkers tellekammer

## Appendiks E Fiksering, tillaging av utstryk og farging av inhiberte og konvensjonelle lymfocyttkulturer

### *Fiksering av inhiberte og konvensjonelle kulturer*

1. Kulturene ble sentrifugert ved 1800 o/min. i 5 minutter. Supernatanten fjernet.
2. 0,075 M KCl- hypoton ble tilsatt dråpevis under omrøring. Lot suspensjonen stå i 10 minutter ved romtemperatur.
3. Som pkt. 1.
4. Tilsatte kald Carnoy's fikseringsløsning, 3: 1 metanol: iseddik, dråpevis med pipette under omrøring (ca. 3–5 ml pr. rør).
5. Lot rørene stå i isbad i 15 minutter.
6. Som pkt. 1.
7. Fikserte som i pkt. 4, lot stå i isbad 10 minutter.
8. Som pkt. 1.
9. Som pkt. 4. Lot kulturene stå i kjøleskap til utstryk ble lagd.

### *Tillaging av utstryk av inhiberte og konvensjonelle kulturer*

1. Sentrifugerte ned de blanke, fikserte kulturene ved 1800 o/min. i 5 minutter.
2. Fjernet supernatanten helt ned til den gråhvite pelleten i bunnen av røret.
3. Tilsatte noen dråper kald Carnoy's fikseringsvæske ønsket celletetthet var oppnådd i suspensjonen (kontrollert ved mikroskopi).
4. Dryppet 10 µl av cellesuspensjonen på rene objektsglass med pipette. Dette ble gjort ved ca. 25 °C og 50 % relativ fuktighet.
5. Objektsglassene ble tørket under de samme betingelsene som pkt. 4 til de var tørre.
6. Preparatene ble lagt til ytterligere tørking, i minimum 10 dager ved romtemperatur, før farging.

*Farging av inhiberte og konvensjonelle kulturer*

Glassene ble farget ved konvensjonell Giemsa farging

1. Satte objektglassene i 3 % Giemsa farge i Sørensens bufferløsning.
2. Lot stå i 5 minutter.
3. Tok glassene ut av fargeløsningen og skylte de raskt under rennende kranvann.
4. Tørket glassene under føner i 10–15 sekunder.
5. Lot preparatene tørke i minst 30 minutter.
6. Festet dekkglass med egnet lim (Pertex monteringsmedium for lysmikroskopering).

## Appendiks F Fiksering, tillaging av utstryk og farging av mikrokjerne-kulturer

### *Fiksering av mikrokjerne-kulturer*

1. Sentrifugerte kulturene ved 1800 o/min. i 5 minutter. Fjernet supernatanten.
2. Tilsatte 0,075 M KCl- hypoton dråpevis under omrøring. Tilsatte straks to dråper Carnoy's fikseringsløsning, 3: 1 metanol: eddiksyre, til suspensjonen og blandet røret med kork på. Henstand i 5 minutter.
3. Som pkt. 1.
4. Fikserte en gang med Carnoy's fikseringsløsning. Sentrifugerte med det samme.
5. Lagret rørene kaldt til utstryk ble laget.

### *Utstryk av mikrokjerne-kulturer*

1. Kulturene fra pkt. 5 under fiksering av mikrokjerner ble spunnet ned ved 1800 o/min. i 5 minutter.
2. Fjernet supernatanten helt ned til den gråhvite pelleten i bunnen av røret.
3. Pipetterte kraftig i cellesuspensjonen for å løse opp klumper.
4. Dryppet 10 µl av cellesuspensjonen på rene objektglass med pipette. Dette ble gjort ved ca. 25 °C og 50 % relativ fuktighet. Noe hurtigere tørking av preparatene ble gjennomført med håndholdt hårtørker siden cellesuspensjonene var dårlig fiksert og tørket sakte.
5. Lot glassene tørke i minimum en halv time før farging samme dag.

### *Farging av mikrokjerne-kulturer*

Glassene ble farget ved konvensjonell Giemsa farging: 5–7 minutter i 10 % Giemsa farge i Sørensen's bufferløsning. Øvrig behandling er som for inhiberte og konvensjonelle kulturer (appendiks E).