

Abschlussbericht zu dem Projekt:
***„Untersuchung zu Mechanismen an Zellen unter Exposition
mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der
Mobilfunktechnologie“***

Fördernde Institution: Bundesamt für Strahlenschutz

Forschungsnehmer: Universität Rostock

Projektleitung: Prof. Dr. Jan Gimsa
Lehrstuhl für Biophysik
am Institut für Biowissenschaften

Laufzeit: 01.07. 2003 – 15.09. 2006

Verlängerung: 01.01. 2007 – 30.06. 2007

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

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	3
2	Zielstellungen	5
3	Material und Methoden	7
3.1	Exposition von Neurochips.....	7
3.2	Modellbildung.....	16
3.3	GHz-Elektrorotation	16
3.4	Exposition von Zellsuspensionen	19
4	Ergebnisse.....	24
4.1	Bekannte und mögliche Wirkmechanismen	24
4.2	Untersuchungen an neuronalen Netzwerken.....	24
4.3	Zytoplasmamodell.....	28
4.4	Membran- und Zellmodell.....	28
4.5	GHz-Elektrorotation - „Bound Water“	30
4.6	Modell „humaner Erythrozyt“, Vergleich zu Hühnererythrozyten.....	31
4.7	Exposition humaner Erythrozyten.....	32
5	Zusammenfassung	35
6	Ausblick	39
7	Literatur.....	44
8	Abkürzungen	46

1 Einleitung

Zur Aufklärung möglicher biologischer Wirkungen elektro-magnetischer Felder (EMF) gibt es eine Reihe verschiedener Ansätze am Menschen: epidemiologische Erhebungen verschiedenster Art, z.B. Case-Control-Studien in der Nähe von TV-, Rundfunk-, Radar- und Mobilfunkbasisstationen. Beispielhaft seien auch andere *in vivo* Studien am Menschen, wie Schlafuntersuchungen, Untersuchungen der Reaktionszeiten, des Verhaltens, der Gedächtnisleistung oder der subjektiven Befindlichkeit (z.B. Kopfschmerz) genannt. Daneben gibt es zahlreiche Ansätze im Tiermodell sowie zellphysiologische Untersuchungen (Mikrokernfrequenz, Mutationsraten, neuronales Wachstum usw.). Alle diese Zugänge können zwar Aussagen zu möglichen Wirkungen, jedoch nicht über die zugrundeliegenden Mechanismen liefern. Es wurden **zwei unabhängige Zugänge** gewählt **um mögliche Mechanismen** zu untersuchen und kausale Aussagen zu treffen. **Zum einen** sollte die subzelluläre elektrische Feldverteilung unter besonderer Berücksichtigung der molekularen Struktur an und in der Zellmembran modelliert und über Einzelzellspektroskopie experimentell überprüft werden, um die subzelluläre Verteilung der spezifischen Absorptionsrate (SAR), Energieflüsse und das Zeitverhalten der Energiedissipation abzuschätzen. **Zum anderen** sollte die funktionelle Bedeutung von EMF für Vorgänge an neuronalen Membranen als der am empfindlichsten angesehenen Struktur des Zentralnervensystems aufgedeckt werden. Elektrophysiologische Patch- Clamp- Untersuchungen einzelner Ionenströme an lebenden murinen Hirnschnitten sollten Aussagen über funktionelle Auswirkungen möglicher Membraneffekte auf die interneuronale Kommunikation liefern.

Im Zuge des Aufbaus der Expositionseinrichtung sowie durch den Kontakt zu Arbeitsgruppen, die Patch- Clamp- Untersuchungen in sehr ähnlichen Aufbauten, jedoch anderen Frequenzbereichen bereits vornahmen, wurde deutlich, dass die am Lehrstuhl für Biophysik entwickelten Neurosensorchips (NCs) mit elektrisch aktiven neuronalen Netzwerken zur Untersuchung der Fragestellung besser geeignet sein werden (<http://www.biologie.uni-rostock.de/biophysik/>). Neben der gleichzeitigen Erfassung der elektrischen Aktivität einer Vielzahl von Neuronen auf einem NC sind durch diesen neuen Ansatz auch Messungen während der Feldexposition möglich. Neuronale Membranen spielen für die Generierung und Leitung der elektrischen Aktivität die entscheidende Rolle. Sollte ein möglicher EMF-Wirkmechanismus, z.B. über die Beeinflussung der Bound-Water- oder Protein-Struktur, der synaptischen

Transmission oder über einen transmembranalen Temperaturgradienten, an diesen Membranen angesiedelt sein, sollte er experimentell in NCs beobachtet werden können.

Biologische Objekte, wie Zellen, besitzen aufgrund ihrer molekularen Struktur eine feine elektrische Strukturierung, die elektrisch nicht direkt messbar ist. Zusätzlich erschwert wird die modellhafte Beschreibung durch die Komplexität der physikochemischen Eigenschaften der biologischen Moleküle. Elektrische Messungen liefern immer integrale Daten und erfassen z. B. bei Messungen an Proteinsuspensionen immer gleichzeitig die Eigenschaften des Moleküls, seiner Bound-Water-Hülle und der elektrischen Doppelschicht. Messungen an Lipidmembranen liefern Daten über elektrischen Eigenschaften von Fettsäureketten, Lipidkopfgruppen und Bound-Water. Wären neben der Geometrie alle elektrischen Eigenschaften sowie deren Dispersionen bekannt, wäre im Prinzip die Vorhersage der Feldverteilung in den einzelnen subzellulären Kompartimenten für jede Frequenz möglich. Messungen des Spektrums in einem möglichst weiten Frequenzbereich erfassen elektrische Eigenschaften des gesamten Objekts für bestimmte Frequenzen sowie alle Dispersionen, erlauben aber auf Grund der großen Anzahl freier Parameter (geometrische Struktur, Permittivitäten, Leitfähigkeiten und Dispersionsfrequenzen aller Moleküle und Kompartimente) nur eine teilweise Zuordnung der zugrundeliegenden Prozesse.

Eine Klärung dieser Situation kann nur gelingen, wenn Daten zur molekularen Geometrie und elektrischen Molekülstruktur, Diffusionskoeffizienten, elastischen Moleküleigenschaften usw. zunächst an einfachen Modellsystemen bestätigt werden, um dann zum Gesamtbild einer biologischen Zelle und später zu Zellaggregaten oder zum biologischen Gewebe verwoben zu werden. Ausgehend von vereinfachten elektrischen Modellen mit subzellulärer Auflösung sollte die elektrische Feldverteilung im interessierenden Frequenzbereich, SAR-Werte, und das Zeitverhalten der Energie-dissipation abgeschätzt und evtl. Demodulationsprozesse beschrieben werden.

Schwerpunkt der Untersuchungen waren Zellmembranen. Mit ihren stark anisotropen Eigenschaften sind sie möglicher Wirkort spezifischer, nichtthermischer Effekte der Mobilfunkfelder. Voraussetzung für die Abschätzung und Untersuchung von Feldeffekten war zunächst die genaue Beschreibung der passiven Membraneigenschaften. Das elektrische Membranmodell musste die Kompartimente Bound-Water-Schichten, Lipidkopfgruppenbereich, Fettsäureketten und Proteinanteile berücksichtigen. Für die Feldverteilung in der Membran sind jedoch auch die Zellgeometrie und

die frequenzabhängigen elektrischen Eigenschaften der umgebenden Medien von entscheidender Bedeutung.

Für Einzelzellen ist die Grenze exakter analytischer Lösungen bereits für die nichtellipsoiden Formen erreicht. Andererseits stoßen numerische Lösungen an die Grenzen der Kontinuumsbeschreibung dielektrischer Medieneigenschaften und erfordern neue Überlegungen, wie die Einführung anisotroper dielektrischer Eigenschaften für den Membrankopfgruppenbereich. Ein neuentwickelter Ansatz führt zu einfacheren Lösungen der Feldverteilungen und SAR-Werte in ellipsoiden Einzelzellmodellen, wobei komplexe Medieneigenschaften, wie die Membrananisotropie oder frequenzabhängige Moleküleigenschaften betrachtet werden können. Somit kann das entwickelte Modell bei subzellulärer Auflösung für die theoretische Abschätzung der Wirkung unmodulierter aber auch gepulster Felder unter Berücksichtigung solcher neuer, komplexer Medieneigenschaften dienen.

2 Zielstellungen

Entsprechend der in der Einleitung vorgestellten Zugänge war es Ziel, in den Vorhaben folgende Fragestellungen zu beantworten:

1. Besteht in einem Zellmodell, das die molekulare Zell- und Membranstruktur berücksichtigt, **die Möglichkeit der Demodulation hochfrequenter elektromagnetischer Felder des Mobilfunks?** Folgende Arbeitspunkte wurden aufgestellt:

- a) Zusammenstellung der Ausgangsdaten unter Verwendung von Literaturdaten der elektrischen Moleküleigenschaften sowie eigener Messungen an Molekülen, molekularen Suspensionen und einfachen Modellsystemen;
- b) Entwicklung und experimentelle Testung eines elektrischen Einzelzellmodells mit subzellulärer Auflösung (Ausgehend vom Modellsystem des humanen Erythrozyten) wobei elektrische Zytoplasma- und Membraneigenschaften auf der Basis ihres molekularen Aufbaus betrachtet werden;
- c) Berechnung der frequenzabhängigen subzellulären elektrischen Feldverteilung im interessierenden Frequenzbereich, Bestimmung subzellulärer SAR-Werte, Energieflüsse und des Zeitverhaltens der Energiedissipation;
- d) Suche nach Demodulationseffekten an einem neuartigen, geschichteten Membranmodell. Lassen sich im Bereich der für die Mobilfunktechnologie benutzten

Frequenzen und Modulationen besonders wirksame Frequenzen oder Modulationen vorhersagen? Gibt es resonante Absorptionseffekte?

e) Übertragung der Ergebnisse auf komplexer gebaute Einzelzellen und Zellaggregate.

2. Haben EMF direkte oder indirekte Wirkungen auf einzelne Neuronen oder intakte physiologische **neuronale Netze** und sind diese Effekte ursächlich mit den zu untersuchenden EMF-Membranwirkungen in Zusammenhang zu bringen? Hierzu waren folgende Schritte notwendig:

a) Aufbau eines Hohlleitersystems für die Exposition von NCs mit CW-EMF bei 2 GHz bzw. mit UMTS-EMF bei simultaner Ableitung neuronaler Signale;

b) Testung der evtl. vorhergesagten Fenster für besonders wirksame Frequenzen und/oder Modulationen;

c) Evaluierung der Wirkungen der in der Mobilfunktechnologie üblichen Frequenzen und Modulationsarten (insbesondere Signale des Universal Mobile Telecommunication System, UMTS).

3. Gibt es experimentelle Hinweise für eine unterschiedliche Wirkung der thermischen Effekte bei Feldabsorption im Vergleich zur äußeren Wärmezufuhr auf neuronale Netzwerke bzw. auf Zellsuspensionen aus humanen Erythrozyten? Dazu waren geplant:

a) Untersuchung des feldinduzierten Ionenverlusts an Erythrozyten in einer speziell entwickelten Expositionskammer;

b) Quantifizierung kritischer Dosen für die Exposition von Continuous Wave (CW)- und UMTS-EMF an ausgewählten Zellsuspensionen;

c) Vergleichende Experimente zur Exposition muriner neuronaler Netzwerke und von Suspensionen durch Zufuhr von Wärme;

d) Stimulation der neuronalen Aktivität durch das spezielle UMTS-EMF bzw. durch modulierte CW-EMF mit 2 GHz-Trägerwelle im Bereich möglicher Eigenfrequenzen der neuronalen Aktivität.

3 Material und Methoden

3.1 Exposition von Neurochips

Einsatz von NCs

Um eine mögliche EMF-Wirkung auf die elektrischen Eigenschaften von Neuronen und die synaptische Transmission zwischen ihnen zu untersuchen, kamen die am Lehrstuhl für Biophysik entwickelten und von Micronas (www.micronas.com) gefertigten Silizium-NCs zum Einsatz (Abb. 3.1.1 und 3.1.4). Diese NCs verfügen unter anderem über ein Micro-Elektrode-Array (MEA) mit 58 passiven Metallschichtelektroden auf einer Fläche von 1 mm². So können die meisten aktiven Neuronen über dem MEA mit ihren Signalspuren gleichzeitig registriert werden. Die neuronalen Netzwerke wurden aus murinen Primärzellen gebildet.

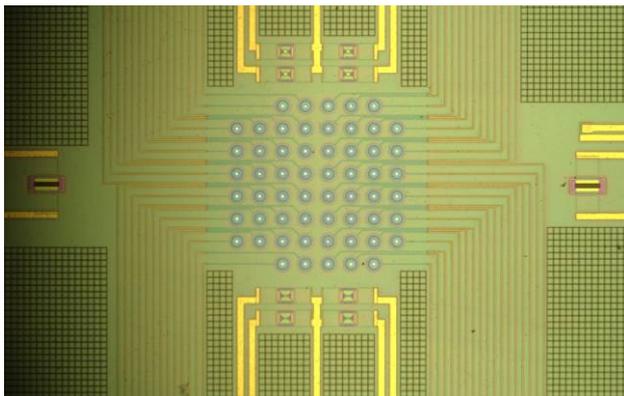


Abb. 3.1.1a: Silizium-NC vor der Zellaussaat. Zu sehen sind: das MEA im Zentrum, Nord und Süd je vier Feldeffekttransistoren zur Zellpotentialmessung sowie Ost und West ein ionensensitiver Feldeffekttransistor.

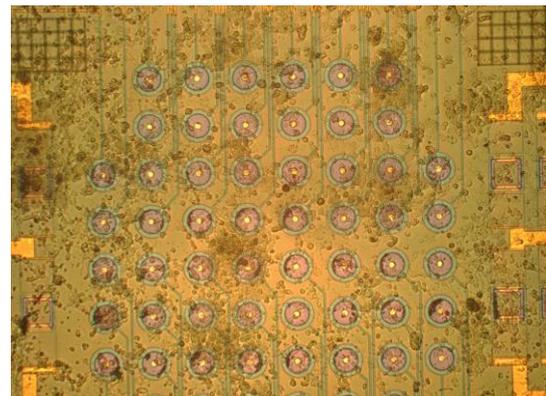


Abb. 3.1.1b: Silizium-NC nach der Zellaussaat. Das MEA im Zentrum ist vergrößert dargestellt.

An dieser Stelle sei bemerkt, dass Voraussetzungen für belastbare Resultate aus den Signalableitungen ein erfolgreiches Kulturprotokoll für Silizium-NCs, eine hohe Fertigungsgüte dieser NCs und das Ersetzen der ursprünglich verwendeten Chip-Autoklavierung im Reinigungsprotokoll sind. Die Exposition von NCs mit amplitudenmodulierten CW- und UMTS-EMF erfolgte in einem modifizierten Nachbau des Rechteckhohlleiters, welcher durch den Lehrstuhl, im Rahmen einer wissenschaftli-

chen Kooperation mit Prof. Hansen und Dr. Streckert von der Universität Wuppertal sowie mit Dr. Friedrich von der Forschungsgemeinschaft Funk e.V. eingeworben wurde.

Optimierung des Kultivierungsprotokolls, Verbesserung der Signalausbeute

Für die neuronale Primärzellkultur wurde ein erfolgreiches Protokoll für die Kultur der empfindlichen primären Neuronen aus Mäuseembryonen auf NCs entwickelt und als Standard eingesetzt. Als Ergebnis zeigen nunmehr etwa 85 % der funktionstüchtigen NCs elektrische Aktivität, etwa 20 % verfügen über bis zu 10 aktive Signalelektroden und etwa 5 % über mehr als 30 Signalelektroden. In einigen Fällen werden an derselben Elektrode Aktionspotentiale unterschiedlicher Form registriert, die auf Grund ihrer Charakteristika über die Plexon-Software klassifiziert und so bis zu 4 verschiedenen Neuronen zugeordnet werden können. Das Signal einer solchen Klasse entspricht einer Unit. Im besten Falle konnten an einem NC 76 Units beobachtet werden.

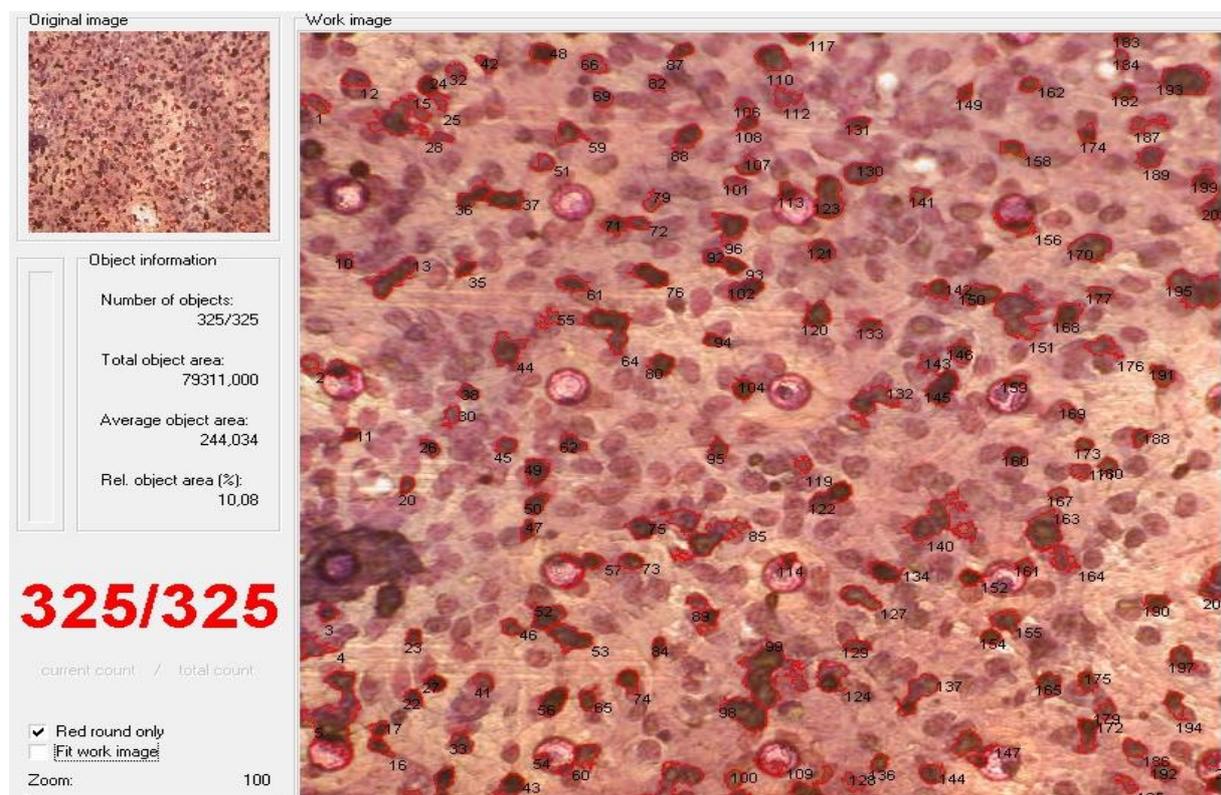


Abb. 3.1.2: Verbesserte Ausbeute nach Entwicklung eines erfolgreichen Protokolls zur neuronalen, murinen Primärzellkultur. Beispielaufnahme eines neuronalen Netzwerks auf der Oberfläche des MEAs. Von etwa 665 Zellen nach der Aussaat überlebten nach 6 Wochen etwa 325. Bei diesem NC wurden 37 Units registriert.

Wesentliche Einflussfaktoren für die erfolgreiche Präparation sind: kurze Präparationsdauer; Beschichtung der Siliziumnitridoberfläche mit Poly-L-Lysin, Laminin, Fibronectin, Gelatine, Aminosilanen (3 Arten) in richtiger Konzentration und Einwirkzeit für optimale Zellanhaftung; geeignete Zellanzahldichte in der Suspension bei der Aussaat für die optimale Vernetzung der Neuronen (0,5 – 5 Mio. Zellen / ml); geeignete Mediumwahl (DMEM, F12, Neurobasalmedium); Wechselintervalle des Mediums zwischen 1 d und 3 d; die Verwendung von Proliferationshemmern, um die Vermehrung der Glia-Zellen zu stoppen (FDU, ARA-C, Fluorocitrat) sowie Supplemente (L-Glutamin, Glutamax, 2-Mercaptoethanol, MK-801, Aminoguanidine) zur Verbesserung der Zellviabilität.

Konstatiert werden muss, dass es trotz der Präparationserfolge zunächst unerwartet hohe Ausfallraten bei den MEA-Elektroden gab, verursacht durch die starke thermische Beanspruchung während der Autoklavierung aber auch durch die schwankende Fertigungsgüte. Ab 2006 gelang es schonende Alternativen zur Chipreinigung zu entwickeln und einzusetzen. Die Bondqualität zwischen Signalelektroden und Chipkontakten war bei den von Micronas gefertigten NCs jedoch weiterhin unzureichend.

NC-Expositionseinrichtung

Ausgehend von einem CW-Generator (Marconi 2024) bzw. dem generischen UMTS-Generator (GUS 6960 S) gelangt das Signal über verlustarme Hochfrequenz-Koaxialkabel und ein Dämpfungsstück zunächst auf einen Mikrowellen-Leistungsverstärker MWA AM81 (MA-Ltd., Bristol, GB) und anschließend auf einen Rechteckwellenleiter, an dessen Ausgang sich wahlweise ein 50 Ohm-Abschlusswiderstand (10 W) oder ein geeignetes zusätzliches Leitungsstück befindet, und in dessen Bodenplatte ein NC von unten einsetzbar ist (Abb. 3.1.3, KSB07). Auf diese Weise kann ein NC mit einem CW-Feld bei 2 GHz als Laufwelle oder als Stehwelle (bis zur annähernd doppelten Feldleistung) exponiert werden. Während sich der Hohlleiter im Wärmeschränk mit Konstantregelung auf 37 °C befindet, ist der Abschlusswiderstand außerhalb angeordnet. Wärme, welche bei der Exposition im Stehwellenmode entsteht, kann über den Ventilator schnell an das Reservoir des Wärmeschrancks abgegeben werden. Die on-line Temperaturmessung erfolgt zur Verringerung der Feldverzerrung über den Glasfasersensor (Opsens, Quebec, Canada), der direkt im Kulturtrog des NCs integriert ist (Abb. 3.1.4). Der Glasfasersensor verfügt über eine relative Messgenauigkeit von $\pm 0,1$ °C. NC-Expositionen mit dem generischen UMTS-Feld können aus Grün-

den der Wellenausbreitung nur im Laufwellenmode erfolgen. Die Leistungsverluste durch die Leitungselemente und das Dämpfungsstück sowie die Verstärkung durch den MWA AM81 wurden bei 2 GHz mittels Spektrumanalysator HP 8594E, das Übertragungsverhalten des Hohlleiters zwischen 1,75 GHz und 2,25 GHz über einen Netzwerkanalysator HP 4396A bestimmt.

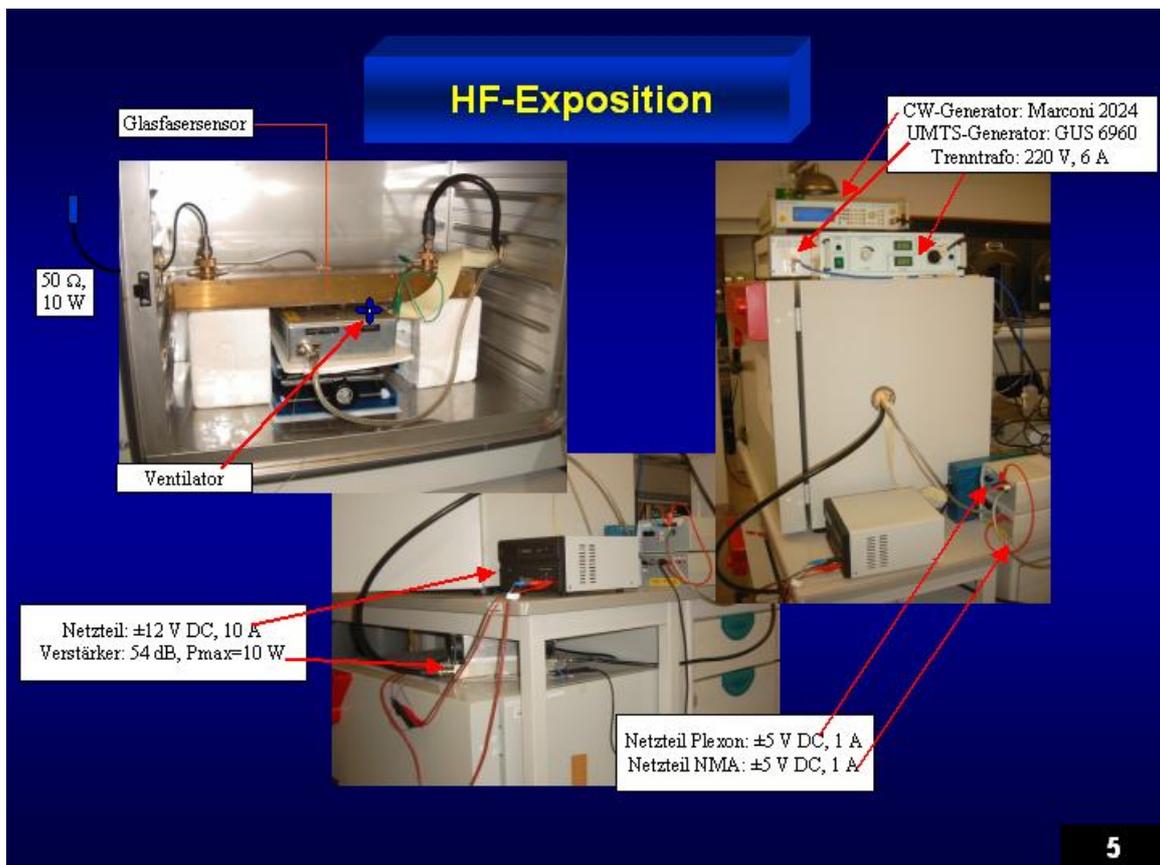


Abb. 3.1.3: Wesentliche Komponenten zur NC-Exposition mit CW-EMF (Marconi 2024) bei 2 GHz sowie mit generischem UMTS-Feld (GUS 6960 S) im Rechteckhohlleiter. Der UMTS-Generator wurde durch den Lehrstuhl im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation mit Prof. Hansen und Dr. Streckert von der Universität Wuppertal sowie mit Dr. Friedrich von der Forschungsgemeinschaft Funk e.V. eingeworben.

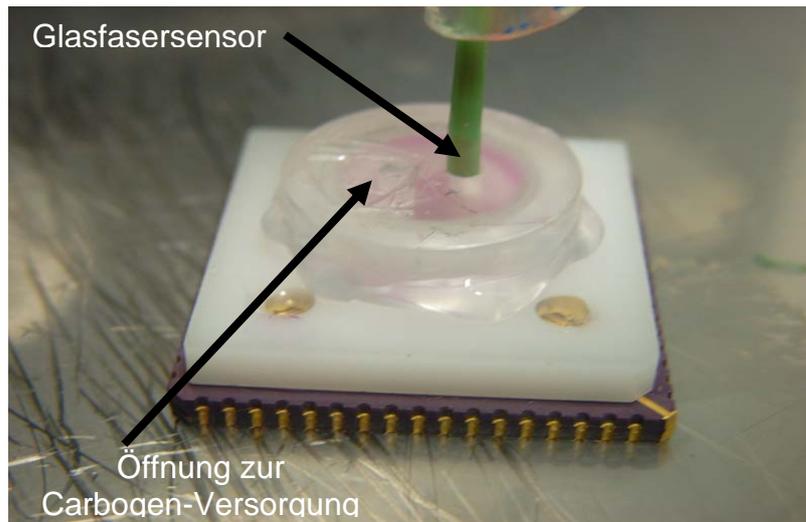


Abb. 3.1.4: NC (25 mm Kantenlänge) mit aufgesteckter Verschlusskappe aus Plexiglas und eingelassenen Öffnungen. Siliconfett dichtet die untere Kante ab. Die linke Öffnung ist mit einer semipermeablen Membran abgedeckt, durch welche eine $\text{CO}_2\text{-O}_2$ Versorgung ermöglicht jedoch die Verdunstung des Mediums verhindert wird. Die rechte Öffnung mit einem Durchmesser von 1.9 mm nimmt den Glasfasersensor auf, um den Absolutwert der Temperatur im Medium auch während der Exposition mit EMF zu registrieren.

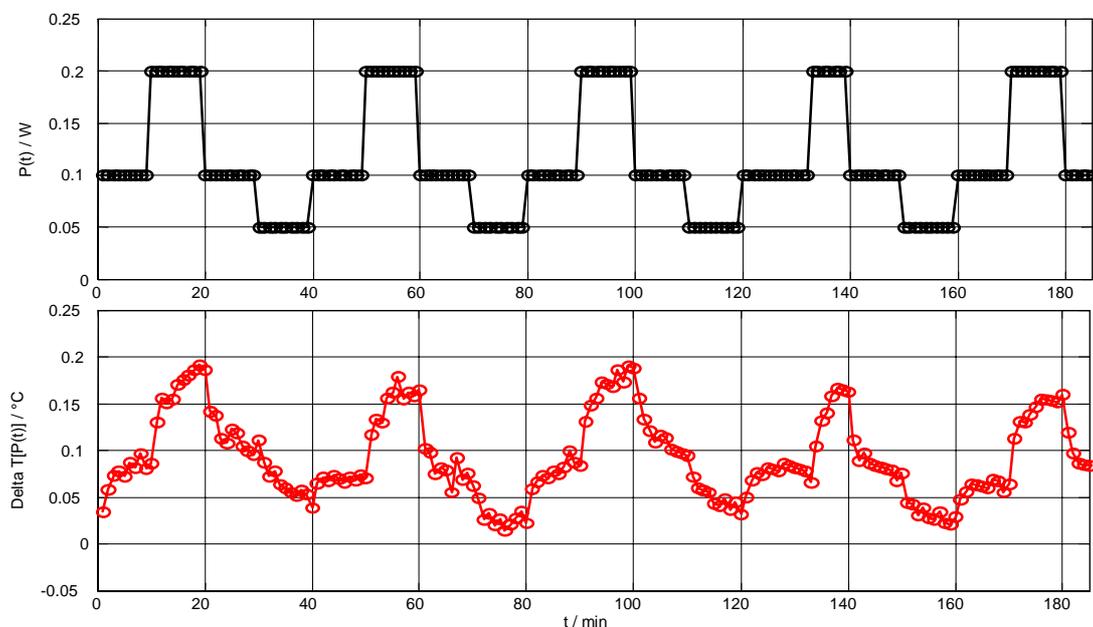
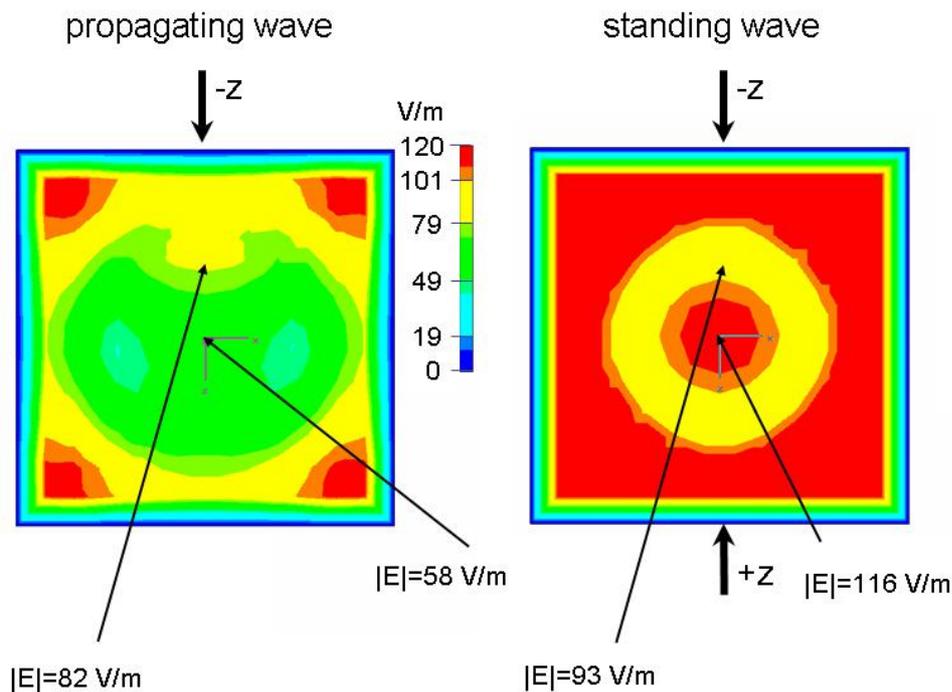


Abb. 3.1.5: Verlauf der Temperaturänderung des Mediums (unterer Verlauf, registriert vom Glasfasersensor, Abb. 3.1.4) in Abhängigkeit von der effektiven Leistung (oberer Verlauf) bei der Exposition von NCs mit CW-EMF als Laufwelle im Hohlleiter. Die Temperatur ohne Feld liegt bei $36,8\text{ }^\circ\text{C}$.



$$\epsilon_r = 70, \sigma = 1.82 \text{ S/m}, f = 2 \text{ GHz}, P_{\text{inc}} = 1 \text{ W}$$

Abb. 3.1.6: FIT-Modell der Feldverteilung über dem Boden des mit Medium gefüllten Fluidbehälters des NCs bei CW-Exposition als Laufwelle (links) bzw. Stehwelle (rechts). Die Feldparameter sind 2 GHz Frequenz und 1 W Leistung. Die Permittivität des Mediums beträgt 70, die Leitfähigkeit 1,82 s/m.

Numerische Simulationen mit FIT-Programmen (MW- und EM-Studio der Fima CST Darmstadt) im FDTD-Modus, welche in Kooperation mit dem Institut für Elektrotechnik durch Herrn Dr. Hans-Walter Glock erstellt wurden, lieferten als Ergebnis, dass bei der CW-Exposition mit Laufwelle durch den Feldgradienten in der Probe ein Temperaturgradient zu erwarten ist (Abb. 3.1.6). Die der Laufrichtung der Welle zugewandte Seite des Fluidbehälters zeigt eine deutlich höhere Feldstärke gegenüber der abgewandten Seite. Da die Energieabsorption in der Probe sich proportional zum Quadrat der Feldstärke verhält, bildet sich ein entsprechendes Temperaturfeld im Fluidbehälter aus. Für die EMF-Exposition als Stehwelle stellt sich ein nahezu gradientenfreier Feldverlauf innerhalb des Mediums ein (Abb. 3.1.6).

Vorstrukturierung neuronaler Netzwerke

Seit Anfang 2007 nutzen wir die zellmanipulatorische Vorstrukturierung neuronaler Netzwerke auf NCs mittels Dielektrophorese (Hei03). Auf gereinigten NCs, welche mit einer Adhäsionsschicht versehen sind, werden Primärzellen in einer geeigneten Pufferlösung niedriger Leitfähigkeit ausgesät. Die MEA-Elektroden werden mit niedriger Spannung im MHz-Bereich so angesteuert, dass die Elektrodenzwischenräume von Zellen systematisch „leergeräumt“ werden (Abb. 3.1.7). Frequenz, Spannung, und Leitfähigkeit des Suspensionsfluids wurden entsprechend der verwendeten Primärzellen optimiert. Das genaue Protokoll wird mit den Ergebnissen der Exposition von NCs unter anderem im Rahmen der Promotion von Herrn Dipl.-Biol. Philipp Köster veröffentlicht werden (Manuskript in Planung). Nach der Adhäsion der Zellen erfolgt die schonende Zugabe des eigentlichen Kulturmediums.

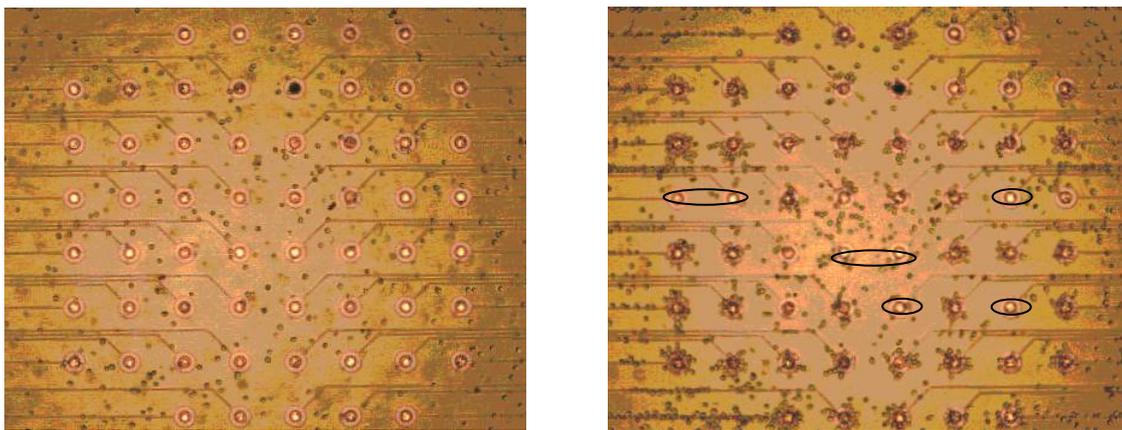


Abb. 3.1.7: Dielektrophoretische Zellpositionierung auf NCs. Links: statistische Verteilung abgesunkener Primärzellen ohne Positionierung, rechts: Primärzellenverteilung nach Positionierung mittels Dielektrophorese und erfolgreichem Anwachsen. Die schwarz umrandeten Elektroden waren defekt und deshalb nicht ansteuerbar. Die Ausfallrate konnte seit 2007 unter 10 % gesenkt werden.

Mit der dielektrophoretischen Allokation der Zellen auf den MEA-Elektroden wurde die Signalausbeute deutlich erhöht. Mit vermindertem Abstand zwischen Neuronen und Elektrode wachsen sowohl die Amplitude der neuronalen Signale als auch die Wahrscheinlichkeit, dass mehrere Units pro MEA-Elektrode detektiert werden. Aussagen zur möglichen Änderung der Signalform durch EMF werden somit stärker belastbar. Eine weitere Optimierung des Protokolls bezüglich der Zelldichte während der Aussaat ist wegen der erhöhten Konzentration um die MEA-Elektroden denkbar.

Versuche zur Material-Zell-Wechselwirkung und die Verbesserung des Zell-Oberflächenkontaktes können in der Zukunft für die weitere Verbesserung des Zell-Elektroden-Kopplung von Bedeutung sein (GIF07, GKI06).

Auswertestrategie

Gemessen wurden NCs mit 50 und mehr Units über mehrere Stunden bis zu Tagen wobei die Exposition für 160 bis 200 min erfolgte. NCs mit weniger als 50 Units wurden für Testläufe verwendet, NCs mit weniger als 6 Units verworfen.

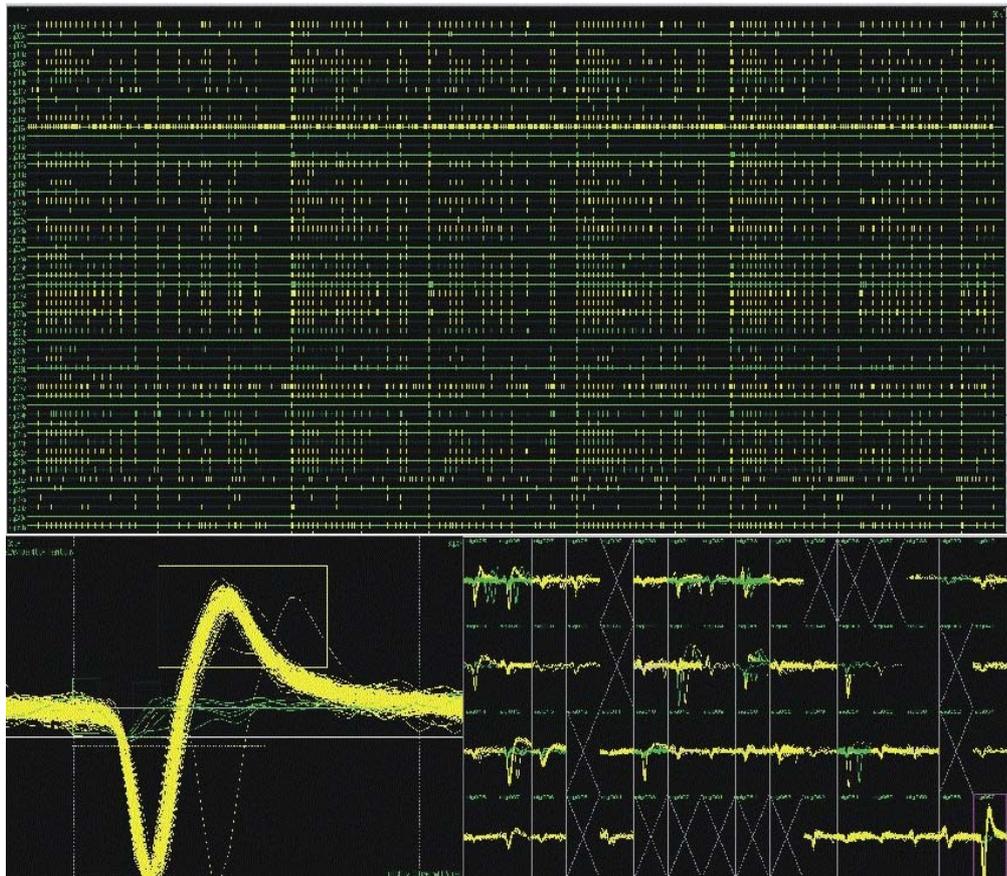


Abb. 3.1.8: Erfolgreiche Signalaufnahme von 57 Units auf 58 Elektroden. Oben: Aufnahme der Spikefolge innerhalb von 80 s. Unten Links: Waveform einer Unit. Unten rechts: Waveforms aller Units. Grüne Signale entsprechen einer zweiten Unit auf der jeweiligen Elektrode. Die Amplitudenhöhe entspricht der Stärke sowie der räumlichen Nähe der aktiven Neuronen zu den Messelektroden. Gekreuzte Boxen stehen für signalfreie Elektroden. Software: MEA Server (Plexon Inc., Dallas, TX, USA).

Ein CW-EMF mit einer Frequenz von 2 GHz entspricht etwa der hochfrequenten Trägerwelle des UMTS-Signals. Um eine mögliche Feldwirkung auf die elektrische Akti-

vität der Neuronen zu testen, wurde die Feldleistung stufenförmig (50 mW, 100 mW, 200 mW, 100 mW, 50 mW,...), mit einem Zyklus von etwa 40 min geändert und die an den MEA-Elektroden registrierten Units (Abb. 3.1.8) als Zeitverlauf der Spikezahl pro Minute betrachtet (Abb. 3.1.9, oben). Nach der Exportierung der Daten erfolgte die Gegenüberstellung der Zeitverläufe für die neuronale Aktivität ohne EMF (native Aktivität $AP_0(t)$), unter EMF ($AP(t)$) und für die effektive Feldleistung $P(t)$. Eine Exposition dauerte 160 bis 200 min. Für die Frequenzanalyse wurden alle Zeitverläufe $h(t)$ harmonisiert („Oszillieren“ um den Mittelwert über der gesamten Versuchsdauer sowie Normierung auf vergleichbare Oszillationsstärke) und die spektralen Leistungsdichten $PSD(h(t))$ (Abb. 3.1.9) berechnet.

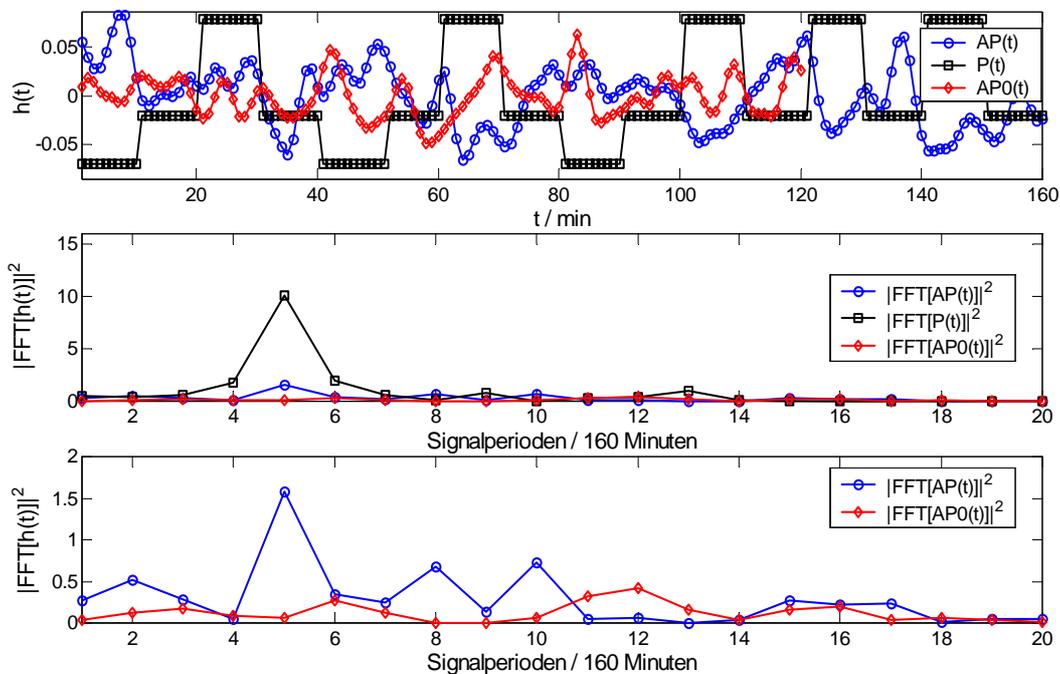


Abb. 3.1.9: Beispielhafte Darstellung der harmonisierten Zeitverläufe $h(t)$ im oberen Diagramm: $AP_0(t)$ ist die mittlere neuronale Aktivität einer Unit pro Minute vor der Exposition, $AP(t)$ die mittlere neuronale Aktivität derselben Unit pro Minute unter Exposition. $P(t)$ ist die harmonisierte effektive Leistung pro Minute (vergl. schwarze Kurve in Abb. 3.1.5). Das mittlere Diagramm zeigt die zugehörigen Amplitudenspektren der spektralen Leistungsdichten $PSD(h(t))$. Im unteren Diagramm sind die Amplitudenspektren der neuronalen Aktivität ohne und unter EMF-Exposition vergrößert dargestellt. Das Maximum liegt bei $5/(160 \text{ Minuten}) = 0,52 \text{ mHz}$ (vergl. Abb. 4.2.1).

Zum Schluss wurden die Amplitudenspektren der Leistungsdichte für die Units des jeweiligen NC mit jenem der effektiven Feldleistung verglichen und bewertet, ob eine Korrelation zur extern geregelten Leistung des EMF vorlag. Zu beantworten waren folgende Fragen: Weisen etwa die Amplitudenspektren der nativen Aktivität der Units ohne EMF, Eigenfrequenzen auf? Prägen sich unter Exposition neue Frequenzen in das Amplitudenspektrum ein, welche der EMF-Wirkung zuzuschreiben sind?

3.2 Modellbildung

Numerische Modelle: Bedingt durch den Umzug der Gruppe von Berlin nach Rostock wurden die numerischen Modellierungen nicht in Kooperation mit Prof. P. Wust (Charité, Berlin), sondern mit Prof. van Rienen, Lehrstuhl für Theoretische Elektrotechnik, durchgeführt. Neben den Zellmodellen (SiG05, SiG06) wurden Modellierungen zur neuronalen Stimulation über Elektroden durchgeführt (RFS05, GSH06). Es zeigt sich, dass für die Feldeinkopplung das Elektrodenverhalten und die elektrischen Doppelschichten von essentieller Bedeutung sind (GHS05, BGK05). Im Zuge der Zusammenarbeit ist am Lehrstuhl für Theoretische Elektrotechnik im Rahmen der Promotionsarbeit von Jürgen Flehr (Fle05) das numerische Modell eines zylinderförmigen Axons entstanden. Nach dem Weggang von Dr. Flehr mußten weiterführende Untersuchungen, wie die Einführung von Absorptions- und Wärmeleitvorgängen in das Modell jedoch aufgegeben werden.

Analytische Modelle: Die Ableitung analytischer Einzelzellmodelle (Lösung der Laplace-Gleichung) für konfokale dielektrische Schichten ist auch für anisotrope Schichteigenschaften, wie sie insbesondere in den Kopfgruppenregionen der Lipide auftreten, möglich. Der auf Basis der neuen Modelle mögliche Vergleich von analytischen und numerischen Lösungen erlaubte neue Aussagen zur Meßbarkeit subzellularer dielektrischer Eigenschaften (siehe SiG05, SiG06).

3.3 GHz-Elektrorotation

Zur Erfassung dielektrischer Eigenschaften auf subzellulärem Niveau sind Dielektrophorese und Elektrorotation als einander ergänzende Methoden der Einzelspektroskopie hervorragend geeignet. Aus diesem Grund wurden speziell für Frequenzen im GHz-Bereich ausgelegte Elektrorotationskammern entwickelt, welche aus halbleitertechnologisch gefertigten Mikrostrukturkammern und entsprechenden Chipträgern bestehen. Bei der Mikrostrukturkammer handelt es sich um einen neu

entwickelten und bei der Firma GeSiM (www.gesim.de) in Auftrag gegebenen Glas-Chip (Abb. 3.3.1). Vier, sich paarweise gegenüberstehende Platin-Elektroden sind auf einem quadratischen Glasträger von 7 mm Kantenlänge und 0,5 mm Stärke aufgebracht. Über den 300 μm breiten und 200 nm dicken Elektroden begrenzt ein 0,25 mm starkes Fotoresistplättchen mit einer 1,8 mm großen ringförmigen Öffnung das Meßvolumen. Die konkrete Anordnung und Dimensionierung der Elektroden ist Resultat einer gründlichen Optimierung anhand von Simulationen zum Verlauf des Rotationsfeldes (MHG06, MHG07). Zusätzlich verfügt der Glas-Chip über integrierte Temperaturfühler, mit welchen Wärmeeinträge durch Absorption von Feldenergie im Medium oder durch die Abschlußwiderstände erfaßt werden können. Die nach Eichung der Temperaturfühler mögliche Messung der Temperatur nahe dem Meßvolumen ermöglicht neben der temperaturabhängigen Spektroskopie auch eine Abschätzung von Viskositätsänderungen des Fluidmediums. Die Beeinflussung der dielektrischen Einzelzellspektren durch Änderungen in der Viskosität des Fluidmediums kann nun in der Auswertung berücksichtigt werden (SWS 06, SWG07).

Dieser Aufbau ist prinzipiell auch geeignet, um Charakteristika von Dielektrophorese-Spektren über die mikroskopische Beobachtung feldinduzierter Translationen der Untersuchungsobjekte zu erfassen.

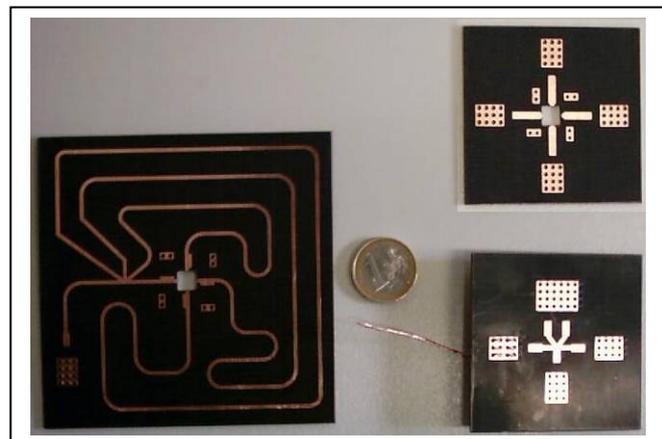
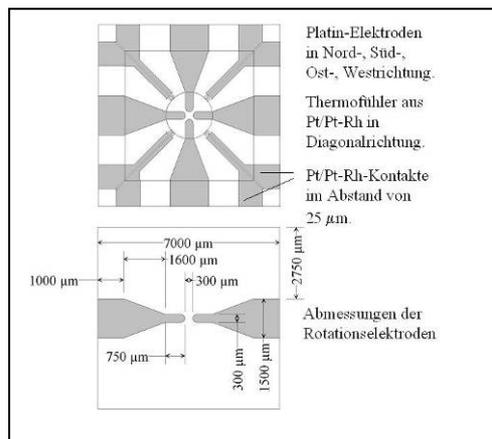


Abb. 3.3.1: Glas-Chip mit Platin-Elektroden und vier Temperaturfühlern in Draufsicht (obere Grafik). Die untere Grafik enthält genaue Maße der Elektroden.

Abb. 3.3.2: Chipträger mit gefrästen Streifenleitungen (links) und für Koaxialleitungen (rechts oben). Rechts unten ist der Verteilungspunkt für die Koaxialaufzeitleitungen auf einer Platine realisiert.

In Kooperation mit Dr. H.-W. Glock vom Lehrstuhl für Theoretische Elektrotechnik wurde im Rahmen einer Diplomarbeit (Fis06) der Frequenzbereich der Elektrotationsmessungen bis auf 2,2 GHz erweitert. Dazu wurden wie geplant Mikrochipträger mit Verzögerungsleitungen mit Streifen- und Koaxialleitern angefertigt, die jeweils auf bestimmte Messfrequenzen abgestimmt sind. Abb. 3.3.2 zeigt links den Chipträger mit Streifenleitungen. Zentral befindet sich die 7 mm x 7 mm große quadratische Öffnung, welche den in der Abb. 3.3.1 dargestellten Glas-Chip aufnimmt. Von der zentralen Öffnung aus nach links verläuft die kürzeste Leitung über den Verteilungspunkt zum Speisepunkt. Von dort aus führen die Streifenleitungen mit unterschiedlicher Weglänge zu den vier Anschlusspunkten des Chips. Entsprechend der Grundfrequenz von 0,4 GHz realisieren Wegunterschiede zwischen Streifenleitungen, die zu benachbarten Abschlusspunkten führen, einen Phasenwinkel von 90° für das eintreffende elektromagnetische Signal. Die Breite der Streifenleitungen auf dem Chipträger beträgt 1,5 mm. Um Kopplungen zu vermeiden, liegen aneinandergrenzende Leitungsabschnitte mindestens 5 mm voneinander entfernt.

Auf der rechten Seite der Abb. 3.3.2 sind zwei Platinen für eine alternative Anordnung zur Rotationsfelderzeugung mittels Koaxialleitungen zu sehen. Das vom Generator erzeugte Signal wird über den Verteilungspunkt der unteren Platine wiederum auf vier Koaxialleitungen gegeben, deren Länge zueinander, entsprechend der angestrebten Grundfrequenz von 0,4 GHz, so abgestimmt ist, dass im Idealfall das Signal an benachbarten Abschlusspunkten der oberen Platine um 90° phasenverschoben eintrifft. Eine Vermessung des tatsächlichen Drehfeldes erfolgte durch Bestimmung des Frequenzgangs von Betrag und Phasenwinkel der Signalspannung an den Abschlusspunkten mit dem Spectrum Network Analyzer HP 4396A des Instituts für Elektrotechnik der Universität Rostock. Die Auswertung ergab für die Elektrotationsanordnung in Streifenleitertechnik ein Optimum bei 0,41 GHz, für jene mit Koaxialleitungen eines bei 0,49 GHz. Entsprechend der optimalen Frequenz f_0 wurden weitere Frequenzpunkte $f_j = (2n+1) f_0$, mit $n = 0, 1, \dots, 4$ vermessen, an denen die Elektrotation von Einzelzellen bestimmbar ist. 2006 wurde die Anordnung mit Koaxialleitungen modifiziert, um Spektren mit höherer Messpunktedichte zu erzeugen. Für die zusätzlich angestrebte Grundfrequenz von 0,15 GHz wurden ein Wert von $f_0 = 0,17$ GHz gemessen. Die methodische Beschreibung der GHz-Elektrotation mit Verzögerungsleitungen und die experimentelle Ermittlung der Spektren von Hefezel-

len in Lösungen unterschiedlicher Leitfähigkeit bis 2,2 GHz sind als Manuskriptentwurf vorliegend.

3.4 Exposition von Zellsuspensionen

Transportabler Versuchsaufbau

Ein unabhängiger Ansatz zur Untersuchung der EMF Wirkung, welcher in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Theoretische Elektrotechnik umgesetzt wurde, ist die Exposition von Zellsuspensionen. Ziel war die Erfassung möglicher feldinduzierter Ionenverluste über die Zellmembran.

Die hierfür gemeinsam entwickelte Expositions-kammer ist gerade für geringe Fluidmengen geeignet (150 μ l). Ihre technische Realisierung erfolgte als spezieller Endstecker eines Koaxialkabels, welcher gleichzeitig als Proben-, Expositions- und Messkammer dient. Der zwischen Innen- und Außenleiter des koaxialen Endsteckers gebildete Hohlzylinder nimmt die Zellsuspension auf (Abb. 3.4.2). Bei angelegtem EMF wirkt der Endstecker als Zylinderkondensator und die Zellsuspension in ihm als parallelgeschaltetes verlustbehaftetes Dielektrikum. Da die Probenkammer klein gegen die Wellenlänge des EMF ist, verhält sie sich wie ein kompakter Abschlusswiderstand, an welchem ein bestimmter Feldanteil reflektiert wird. Ausgangspunkt ist Leitwert $\mathbf{Y} = \mathbf{G} + j\omega\mathbf{C}$, mit \mathbf{G} als ohmschem Leitwert der Suspension, $j\omega\mathbf{C}$ als Leitwert des Zylinderkondensators und $\mathbf{f}^2 = -1$. Die Impedanz \mathbf{Z} des Gesamtsystems wird mit Betrag $|\mathbf{Z}|$ und Phasenwinkel φ gemessen, so dass sich der Reflexionsfaktor r bestimmen lässt (Gleichungen (1) bis (3)). Aus den Gleichungen ist ersichtlich, dass r sowohl von der Geometrie der Befeldungskammer (Radius des Innenleiters r_i und des Außenleiters r_a , Länge der Befeldungskammer l) als auch von den zu ermittelnden dielektrischen Eigenschaften der Zellsuspension (Leitfähigkeit $\sigma(\omega)$ und Permittivität $\varepsilon_r(\omega)$) abhängt. Nach Optimierung der Geometriefaktoren lassen sich die dielektrischen Größen der Zellsuspension frequenzabhängig und für das Suspensionsfluid im niederfrequenten Bereich bestimmen. Die Messung des Reflexionsfaktors erfolgte mit einem Netzwerkanalysator HP 4396A des Instituts für Allgemeine Elektrotechnik der Universität Rostock bis maximal 1,8 GHz, welcher jedoch nur zweimal für kurze Zeit ausgeliehen werden konnte.

$$Y = G + j\omega C = \frac{1}{R(r_a, r_i, l, \sigma(\omega))} + j\omega C(r_a, r_i, l, \varepsilon_r(\omega))$$

$$= \frac{\pi(r_a^2 - r_i^2) \sigma(\omega)}{l} + j\omega \frac{2\pi\varepsilon_0\varepsilon_r(\omega) l}{\ln\left\{\frac{r_a}{r_i}\right\}} \quad (1)$$

$$Z = |Z| e^{i\varphi} = \frac{G}{|Y|^2} - j\omega \frac{C}{|Y|^2} = (G - j\omega C) |Z|^2 \quad (2)$$

$$r = \frac{Z - Z_0}{Z + Z_0}, \quad Z_0 = 50 \Omega \quad (3)$$

Mit der Reflexionsfaktormessung an Suspensionen in der Expositions- und Impedanzkammer sollte die Kinetik eines möglichen Ionenverlusts unter Einfluss von EMF bei 2 GHz beobachtet werden. Ursache hierfür wäre neben dem „physiologischen“ Leakflux in Lösungen niedriger Ionenstärke ein zusätzlich feldinduzierter „Auslaufprozess“ der Zellen, welcher die Ionenkonzentration im Fluidmedium messbar verändern würde (GDG89). Dies sollte zu Änderungen der Gleichstromwerte (σ_{DC} , ε_{DC}) über der Zeit führen, die sich aus dem Reflexionsfaktor ermitteln lassen.

Weiterhin interessierten auch die dielektrischen Dispersionen der Impedanz der Suspensionen. Auch hierzu diente der vom Institut für Allgemeine Elektrotechnik geliehene Netzwerkanalysator HP 4396A, mit welchem ein Messsignal über ein Spektrum zwischen 100 kHz bis 1,8 GHz in die Fluidkammer gesendet und das Spektrum des reflektierten Signalanteils registriert wurde. Aus dem gemessenen komplexen Reflexionsfaktor wurden die Spektren der passiven elektrischen Eigenschaften (Leitfähigkeit und Permittivität) der Suspensionen berechnet.

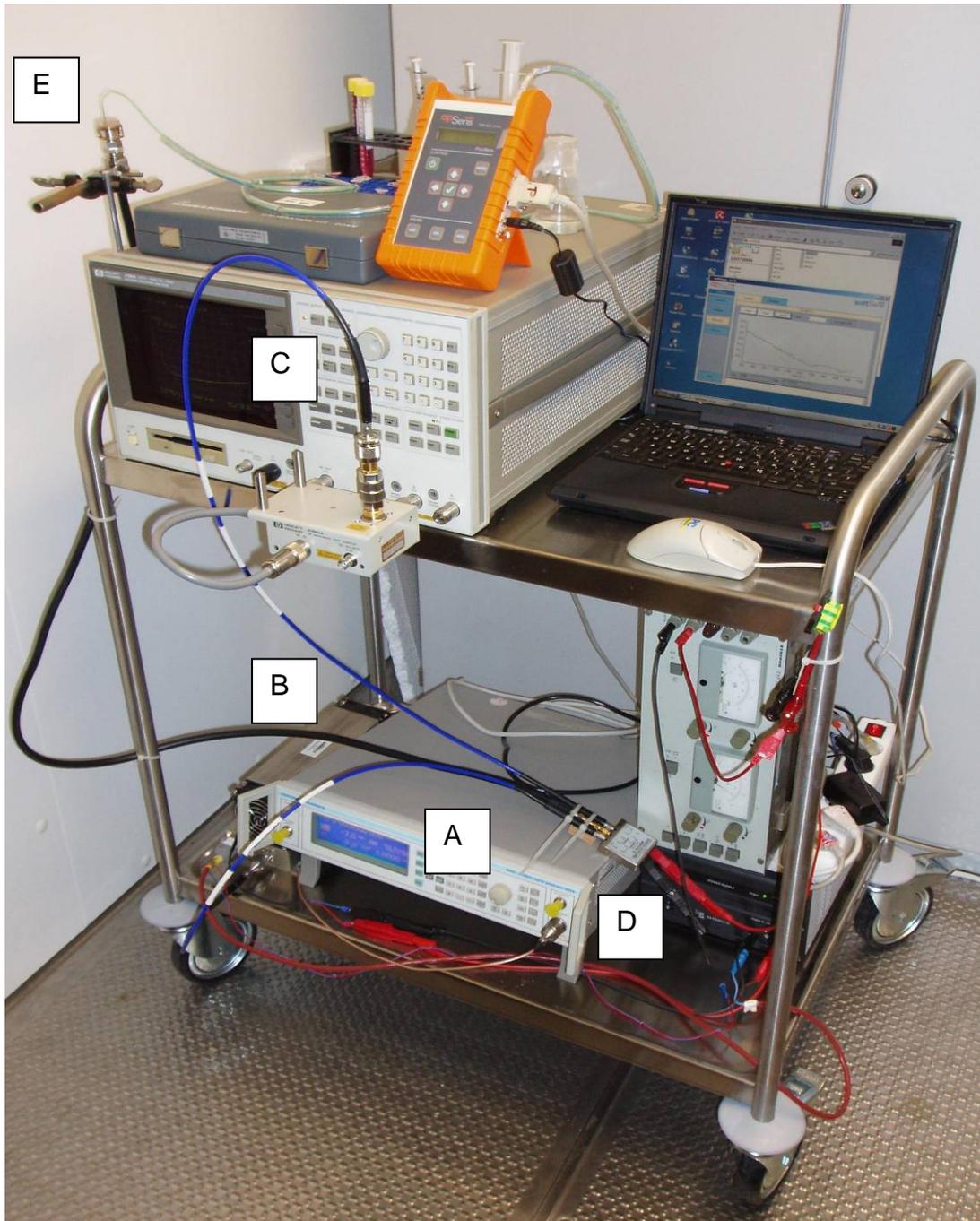


Abb. 3.4.1: Transportabler Aufbau zur Exposition von Zellsuspensionen mit EMF bei 2 GHz und Messung ihrer dielektrischen Eigenschaften. Zu erkennen sind: der Expositionsweig mit CW-Generator Marconi 2024 (A) und Mikrowellenverstärker MWA AM81 (B) sowie der Messzweig mit Netzwerkanalysator HP 4396A (C). Zwischen beiden Zweigen wurde wahlweise über eine Hochfrequenzweiche MSP2TA-18 (D) auf die koaxiale Fluidkammer (E) geschaltet. Während der Exposition und der Reflexionsfaktormessung wurde die Temperatur im Suspensionsfluid On-line registriert.

Integration des Temperatursensors in den Versuchsaufbau

Für den definierten Abschluss der Fluidkammer und reproduzierbare Flüssigkeitsstände sorgte eine Kappe aus Plexiglas mit planer Kontaktfläche. Eine Bohrung von 1.9 mm Durchmesser, im Bereich zwischen Innen- und Außenleiter der Koaxialkammer, nimmt den Glasfasersensor auf (Abb. 3.4.2).

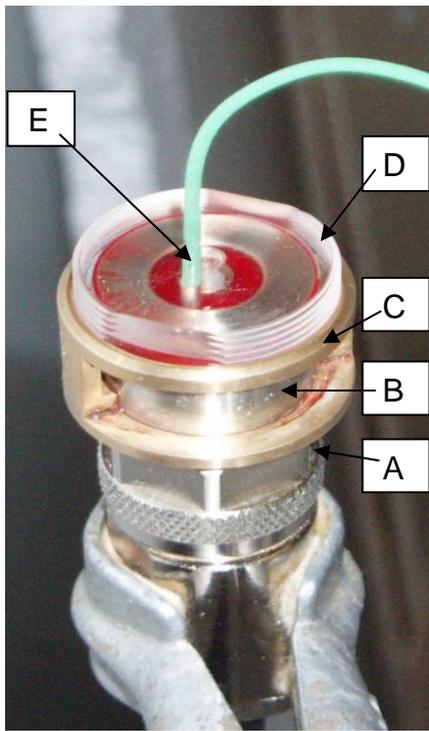


Abb. 3.4.2. Koaxiale Fluidkammer zur Exposition von Zellsuspensionen mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern (HF-EMF) und Messung ihrer dielektrischen Eigenschaften bis etwa 1,8 GHz. Zu erkennen sind: das koaxiale Leitungsende (A), welches dem Kalibrationsbezug und dem Ort der Messung des Reflexionsfaktors entspricht; das koaxiale Zwischenstück (B); die Verschlussmanschette (C) sowie der Deckel mit Außengewinde (D) zum definierten Abschluss der Fluidkammer und zur Integration des Glasfasersensors (E und siehe Abb. 3.1.4).

Verbessertes Leitungsmodell des koaxialen Zwischenstücks im Aufbau

Das koaxiale Zwischenstück, welches als notwendiger Adapter zwischen kalibrierter Leitungsstrecke und eigentlicher Fluidkammer fungiert, ist als vollständiger elektrischer Fehlervierpol mittels erweiterter Kalibration bis ca. 1,8 GHz charakterisiert worden. Modellrechnungen und Programmierungen zur Datenauswertung erfolgten im Rahmen der Diplomarbeit von Herrn Dipl.-Ing. Robert Fischer (Fis06).

Exposition humaner Erythrozyten

Die Experimente an Erythrozyten wurden im Kühlraum mit dem Aufbau entsprechend Abb. 3.4.1 durchgeführt. Dreiergruppen von Proben wurden aus frischen Konserven vorbereitet, von denen jeweils eine mit CW-EMF bei 2 GHz exponiert und zwei als Referenzproben mitgeführt, die nicht exponiert, sonst aber gleich behandelt wurden. In Versuchen von jeweils 960 s Gesamtdauer wurden zunächst 160 s als Einstellzeit abgewartet und danach in Zyklen das CW-EMF mit 2 GHz und einer Effektivleistung von 200 mW für 160 s ein- und danach für 160 s ausgeschaltet. In diesem Takt er-

folgte das Umschalten zwischen Expositions- und Messzweig der Versuchsanordnung mittels einer Hochfrequenzweiche MSP2TA-18.

Im Expositionszweig diente ein Marconi 2024 als CW-Signalquelle und ein MWA AM81 (MA-LTD, Bristol, GB) als Verstärker. Im Messzweig registrierte ein Netzwerkanalysator HP 4396A das Spektrum des Reflexionsfaktors bzw. seinen Wert bei 100 kHz (Abb. 3.4.1). Während der gesamten Versuchsdauer erfasste der integrierte Glasfasersensor (Opsens, Quebec, Canada) die Temperatur der Suspension (Abb. 3.4.3).

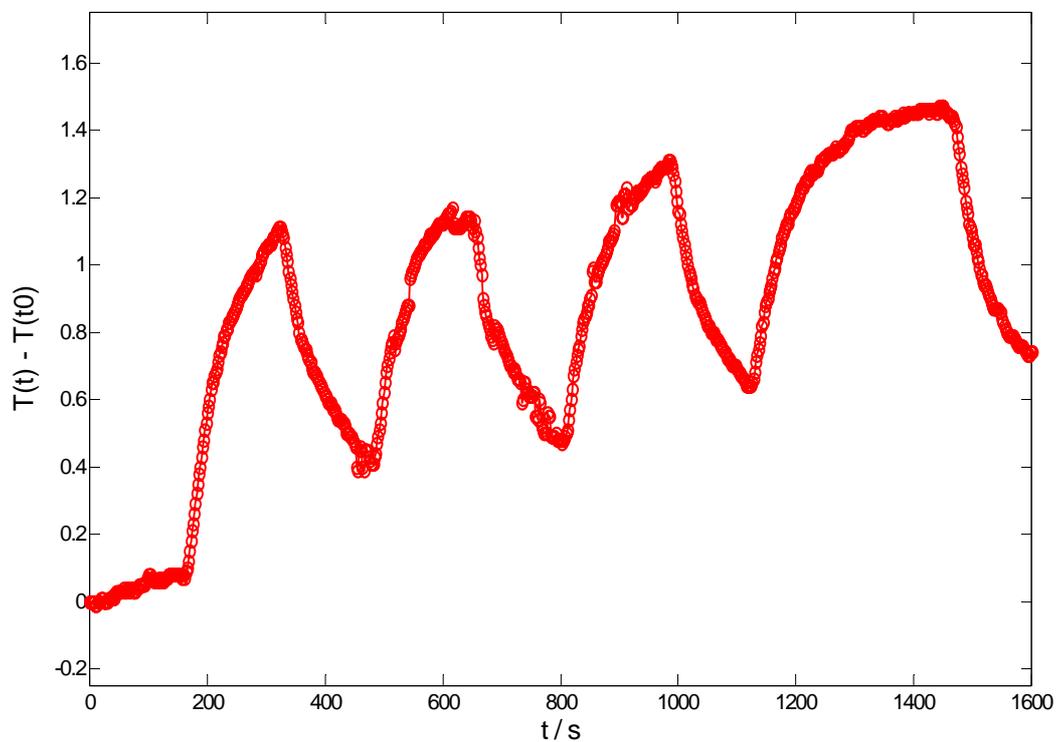


Abb. 3.4.3: Beispielhafter Verlauf der Temperaturänderung, registriert durch den Glasfasersensor, während der Versuche an humanen Erythrozyten in der koaxialen Expositions- und Impedanzkammer. Exponentieller Anstieg während der Exposition mit 2 GHz CW-EMF bei 200 mW, exponentieller Abfall während der Reflexionsfaktormessung ohne EMF.

4 Ergebnisse

4.1 Bekannte und mögliche Wirkmechanismen

Die für den ersten Jahreszwischenbericht erarbeitete Literaturstudie war Ausgangspunkt eines Buchmanuskripts (GSW06) und eines Buchbeitrags (GiH05), welche beide erschienen sind.

In einem bei der Forschungsgemeinschaft Funk e.V. veröffentlichten Artikel (Gim03a) wurden mögliche Wirkungen von EMF in direkte thermische Effekte, in nichtthermische und in thermisch getriebene nichtthermische Effekte klassifiziert. Für den dritten Fall wurde ein ausgewähltes Modellsystem diskutiert, in welchem ein an DNS kovalent gebundenes Goldkügelchen als molekulare Hochfrequenzantenne fungiert, EMF-Energie absorbiert, an die DNS weitergibt und dort biologisch aktive Schwingungsmodi anregt (Gim03a). Das betrachtete System ist jedoch sehr artifiziell und wird in physiologischen Systemen als nichtexistent angesehen.

4.2 Untersuchungen an neuronalen Netzwerken

Vorbemerkung

Bei neuronalen Netzwerken handelt es sich um schwingende Systeme, deren Aktivität auch ohne äußere Einflüsse zyklisch variieren kann. In nichtexponierten Netzwerken wurden solche Zyklen bei 6 und 60 min Länge beobachtet (SBB02). Davon ausgehend wurden CW- und UMTS-Expositionen in einer Hohlleiterstrecke durchgeführt und eine externe Regelung der effektiven EMF-Leistung mit einer Zykluslänge von 40 min gewählt. Durch diese Stimulation mit einer Zykluslänge zwischen den nativen Aktivitätszyklen sollte die EMF-Stimulierbarkeit und Synchronisierbarkeit der elektrischen Netzwerkaktivität getestet werden. Durch die relativ langsame Änderung der Leistung im 40 Minuten-Zyklus ist es gleichzeitig möglich, die elektrische Aktivität (Spikerate) für jede Leistung zu erfassen um verschiedenen SAR-Werte zu testen und mögliche Schwellenwerte abzuschätzen. Es wurden NCs mit murinen neuronalen Netzwerken aus statistisch verteilten Zellen verwendet. Zu dieser Zeit war die dielektrophoretische Positionierung der Zellen (Abb. 3.1.7) noch nicht möglich. Neben der gleichzeitigen Erfassung der elektrischen Aktivität einer Vielzahl von Neuronen auf dem MEA sind durch diesen neuen Ansatz vor allem Messungen **während** der Feldexposition möglich.

CW-EMF Exposition

Es wurde mit einer externen, stufenförmigen (10 min pro Stufe) Leistungsregelung für das EMF (Laufwelle bei 2 GHz) in einem 40 Minuten-Zyklus gearbeitet (Schema in Abb. 3.1.9, schwarze Kurve im oberen Bild). Der Effektivwert der eingestellten Leistung variierte zwischen 50 mW und 200 mW (Abb. 3.1.5). Dies ergab SAR-Werte zwischen ca. 0,51 W/kg und ca. 2,03 W/kg für das verwendete Medium (D10/10) am Ort des MEAs. Der an den Elektroden des MEAs registrierte Zeitverlauf der Spikerate jeder Unit pro Minute wurde dem entsprechenden Wert der effektiven Feldleistung gegenübergestellt. Der Zyklus der effektiven Feldleistung erzeugte in der $PSD(P(t))$ bei 0,52 mHz eine spektrale Linie, welche ebenfalls im Amplitudenspektrum $PSD(AP(t))$ von etwa 40 % aller Units auftrat (beispielhaft blaue Kurve in Abb. 3.1.9 und Abb. 4.2.1). Die Anregung im Spektrum der Units trat zwar mit deutlich kleinerer Amplitude auf, zeigt aber, dass eine messbare Korrelation zur effektiven Leistung des CW-EMF existiert. Die Eigenfrequenzen im mittleren Amplitudenspektrum derselben Units ohne Exposition zeigen dagegen keinerlei Übereinstimmung mit den Anregungslinien des CW-EMF (rote Kurve in Abb. 3.1.9 und Abb. 4.2.1). Die breiten, sehr flachen Maxima bei 0,7 mHz, 1,2 mHz und 1,6 mHz sind nicht aussagefähig. Mit nur geringer zeitlicher Verzögerung (ca. 4 min) zum Zyklus der effektiven Feldleistung erwärmte sich das Medium um maximal 0,18 °C (rote Kurve in Abb. 3.1.5). Der Effekt der Einkopplung der stufenförmigen Regelung der Feldleistung in die mittlere neuronale Aktivität des Netzwerks trat hingegen bei allen erfolgreichen Expositionen mit etwa 10 min zeitlicher Verzögerung auf. Da die durch Spektralanalyse ermittelten charakteristischen Frequenzen für die vorgenommene externe Leistungsregelung, die neuronale Aktivität sowie die Erwärmung des Systems mit 0,52 mHz übereinstimmten (Abb. 4.2.1 und respektive Übereinstimmung der einhüllenden Verläufe in Abb. 3.1.5), interpretieren wir diesen Effekt als zeitlich nachlaufende thermische Stimulation.

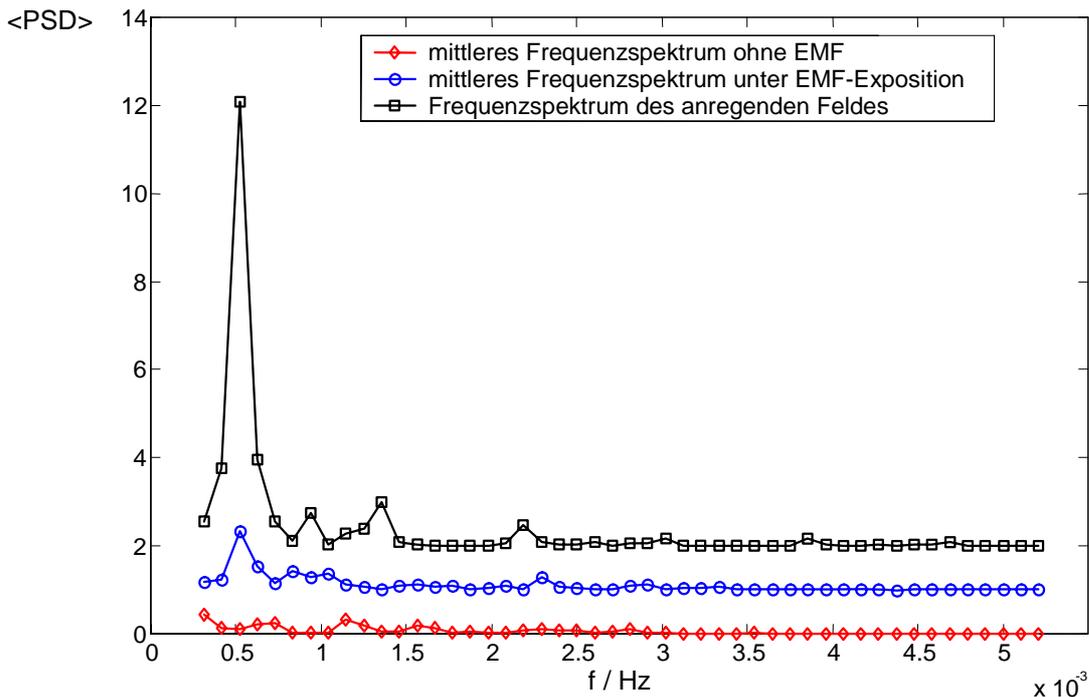


Abb. 4.2.1: Mittleres Amplitudenspektrum der sechs am stärksten mit der effektiven EMF-Leistung korrelierten Units während der Exposition (blaue Kreise) sowie mittleres Amplitudenspektrum dieser Units vor der Exposition (rote Rhomben) im Vergleich mit dem Amplitudenspektrum des einprägenden EMF (schwarze Quadrate). Der Übersicht halber sind die drei Kurven um eine Ordinateneinheit zueinander verschoben.

UMTS Exposition

Für die unter UMTS Exposition abgeleiteten elektrischen Signale der neuronalen Netzwerke wurde bisher, analog zur CW-EMF Exposition, die neuronale Aktivität als Zeitverläufe der Spikeraten pro Minute betrachtet. In fünf Versuchen wurde zur internen Leistungsregelung zusätzlich die externe, stufenförmige Leistungsregelung im 10 Minuten-Takt vorgegeben. In neueren Versuchen konnten durch verbesserte Signalausbeuten bei den neuronalen Signalen diese von der schnellen Leistungsregelung des UMTS-Signals diskriminiert werden. Ein Beispiel ist in Abb. 4.2.2 dargestellt. Auch hier erhärtete sich der Eindruck, dass bei UMTS-Expositionen mit vergleichbarer effektiver Feldleistung wie im CW-Fall (ca. 200 mW), Korrelationen zwischen den Spektren der mittleren neuronalen Aktivität und der Feldleistung im mHz-Bereich existieren (Abb. 4.2.2) und eine zeitlich nachlaufende thermische Stimulation vorliegt. Allerdings könnten auch die spektralen Anteile der „schnellen Leistungsregelung“ im UMTS-Signal (SMH01), welche bei 1.5 kHz liegen und durch die Elektronik der Sig-

nalableitung noch registriert werden, für die Neuronen ebenfalls wirksam sein. Für diese Untersuchungen ist eine zeitaufgelöste Signalauswertung mit Frequenzanalyse notwendig. Eine entsprechende Konzeption und erste Auswerteprogramme wurden entwickelt und sind im Punkt 6 „Ausblick“ dargestellt.

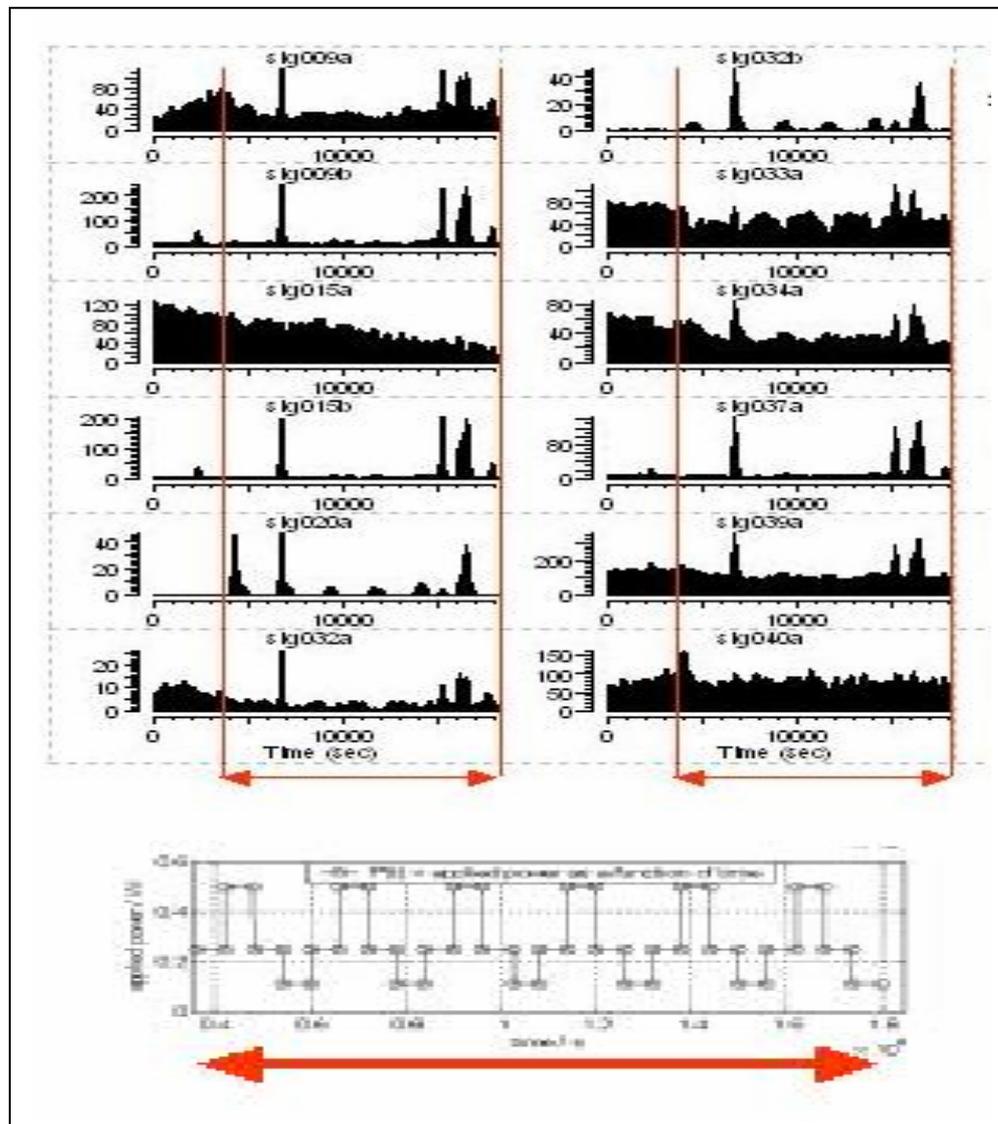


Abb. 4.2.2: Zeitverlauf der neuronalen Aktivität der Units als Spikerate pro Minute während der Exposition mit generischem UMTS-Feld. Der rote Doppelpfeil markiert den Zeitbereich der Exposition, das untere Diagramm zeigt die zyklische Leistungsregelung. Ein Zyklus dauerte 40 min und erzeugte im Amplitudenspektrum der neuronalen Aktivität der Units 15b, 20a, 32b und 33a wie im CW-Fall eine messbare Anregung bei 0.42 mHz. Die Leistungsregelung durch den UMTS-Generator (Maximal- und Fadingmode, schnelle Leistungsregelung) sei aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Offene Probleme

CW-EMF-Expositionen wurden vor allem im Laufwellenmodus durchgeführt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu den 5 auswertbaren UMTS- Expositionen (die naturgemäß im Laufwellenmodus durchgeführt werden müssen; s.o.) zu gewährleisten. Aus der Vielzahl aller mikrosystem-, experimentell-technischen Einflussfaktoren sowie den Unwägbarkeiten der Zellkultur ergab sich, dass alle drei auswertbaren CW-EMF-Expositionen im Laufwellenmodus erfolgten. Zu beachten ist weiterhin, dass die Relation des Zeitaufwands von Signalauswertung zu Messzeit größer als 10:1 ist, so dass gegenwärtig noch an den für den Verlängerungszeitraum vorgesehenen UMTS-Feldversuchen und den Expositionen mit 217 Hz amplitudenmodulierten CW-EMF gearbeitet wird (geplante Veröffentlichung und Promotion von Herrn Ph. Köster). Eine weitere Schwierigkeit sind die hohen Ausfallraten der NCs, die den Ankauf neuer Chips notwendig machte, jedoch erst nach Ablauf der Projektlaufzeit finanziert werden konnte. Dadurch können die Ergebnisse erst jetzt auf Reproduzierbarkeit getestet werden, um zu endgültigen Aussagen zu kommen. Nach der Beschreibung des Versuchsaufbaus (KSB07) sollen die Resultate in einem zweiten Manuskript (in Vorbereitung) veröffentlicht werden.

4.3 Zytoplasmamodell

Hierfür wurde das Modellsystem "menschlicher Erythrozyt" genutzt. Auf Basis der vorhandenen Veröffentlichungen (WSG02, SWG02) wurden Arbeiten zur Verbesserung der Auflösung der elektrischen Zellparameter durchgeführt. Die Eigenschaften des Zytoplasmas (WSG02) von Erythrozyten erwiesen sich in neuen Experimenten bis 250 MHz und in Modellrechnungen als belastbar (SWG07). Das vorhandene analytische Zellmodell wurde entsprechend angepaßt (Manuskript in Vorbereitung). Interessant ist, dass Variationen im Zellvolumen, die durch Medienwechsel oder Temperaturänderung hervorgerufen werden, einen sehr starken Einfluß auf die Innenleitfähigkeit haben (Volumenänderung um 50% kann einer Innenleitfähigkeitsänderung um den Faktor 10 entsprechen.).

4.4 Membran- und Zellmodell

Molekulare Membraneigenschaften mit dem Schwerpunkt "Lipideigenschaften" wurden zusammengestellt (GSW06) und flossen in ein neues Membranmodell ein (SiG05). Das Modell ist durch elektrisch anisotrope Eigenschaften der Kopfgruppenregion der Membran gekennzeichnet, die zu einer bisher nicht beschriebenen unge-

wöhnlichen Feldverteilung in der Membran und einer um bis zum Faktor 10 erhöhten lokalen Feldabsorption führen (SiG06). Ein zweiter Faktor, welcher zu dieser erhöhten Absorption beiträgt, ist die durch uns eingeführte Mittlung über die Absorption in den einzelnen Schichten des Modells (SiG06) im Gegensatz zu der bisher üblichen Mittlung über die Membraneigenschaften vor der Absorptionsbestimmung (siehe Diskussion in SiG06).

Für anisotrope Zell- und Membranmodelle konnten wir zeigen, dass eine Laplace-Lösung auch für geschichtete (mehrschalige) Membranmodelle existiert, die mit unseren numerischen Ergebnissen übereinstimmt. In den numerischen Rechnungen haben wir eine ungewöhnliche Feldverteilung in den anisotropen Regionen des Modells gefunden. Sie ist durch geschichtete konzentrische Potentialflächen gekennzeichnet, die zueinander Phasendrehungen um 180° aufweisen, d. h. alternierende Vorzeichen besitzen. Die Anzahl der Flächen hängt von den Medieneigenschaften, der betrachteten Feldfrequenz sowie der Dicke der anisotropen Region ab. Offenbar trägt diese ungewöhnliche Feldverteilung zu einer erhöhten Energiespeicherung während jeder Halbwelle und somit zu der erhöhten lokalen Feldabsorption bei. Interessant ist, dass selbst in Einzelzellmessungen derartige Eigenschaften von außen nicht direkt messbar sein werden, sondern sich in einer Frequenzabhängigkeit der Zell- oder Objekteigenschaften ausdrücken. Sie ist derjenigen sehr ähnlich, welche durch frequenzabhängige molekulare Eigenschaften hervorgerufen wird (Der theoretische Hintergrund hierfür basiert auf den Restriktionen, die sich aus der Laplace-Gleichung für Maxwellsche Äquivalentkörper ergeben.). Dieses Ergebnis stellt eine neue Erkenntnis bezüglich der Auflösbarkeit dielektrischer Zell- und Teilcheneigenschaften dar.

Darüber hinaus zeigte sich, dass in einem 5-lagigen Membranmodell (Fettsäurekettenkernbereich beidseitig mit Schichten für die Lipidkopfgruppen- und die Bound-Water-Bereiche) die Absorption hauptsächlich in den Lipidkopfgruppen- und den Bound-Water-Schichten erfolgt, wobei sie in den äußeren Schichten um einige Prozent über die Absorption in den entsprechenden inneren Schichten hinausgeht. Frequenzabhängige Dispersion von Anisotropien in der Permittivitätsverteilung sollten zu Anisotropien in der Leitfähigkeitsverteilung führen, durch die dann sehr ähnliche Feldverteilungsanomalien – wie oben beschrieben - hervorgerufen werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass alle diese Anisotropien in den elektrischen Eigen-

schaften bei Mobilfunkfrequenzen um oder oberhalb von 1 GHz weitgehend dispergiert und somit nur noch in Resten vorhanden oder verschwunden sind.

4.5 GHz-Elektrotation - „Bound Water“

Die Untersuchungen zeigten GHz-Elektrotationseffekte bei Zellen mit Zellwand (z. B. Hefen), jedoch keine bei Erythrozyten oder Latexteilchen (Manuskript in Vorbereitung). Bei den Latexteilchen handelte es sich um 15 μm große Styrenpartikeln (SERVA, Heidelberg). Wir ordnen diese Unterschiede dem Vorhandensein eines größeren Bound-Water-Volumens innerhalb der Zellwand-Polymerstruktur zu. Da der Elektrotationseffekt ausschließlich proportional zum Außer-Phase-Anteil der induzierten Polarisation ist, ist er direkt proportional zur Absorption, d.h. die Zellwand-Polymerstruktur führt bei Hefezellen zu einer deutlich erhöhten Absorption im GHz-Bereich.

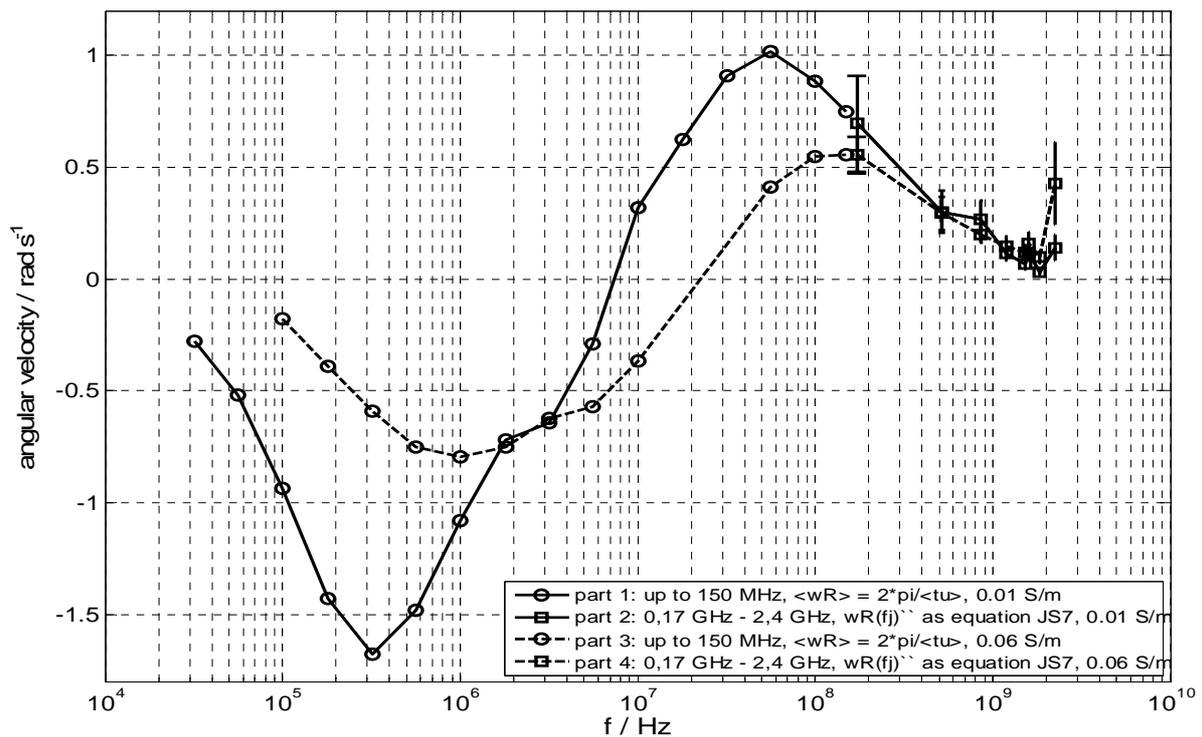


Abb. 4.5.1: Zusammengesetztes Spektrum der Winkelgeschwindigkeit für Hefezellen mit 7.5 μm Längsausdehnung in Lösungen der Leitfähigkeit 0.01 S/m (Volllinie) und 0.06 S/m (Strichlinie). Teilbereich 1 (herkömmliche Messung) von 100 kHz bis 150 MHz, Teilbereich 2 (neuentwickeltes System) von 170 MHz bis 2,2 GHz.

Genauere Abschätzungen erfordern weitere Messungen mit der erst seit kurzem zur Verfügung stehenden Technik. Entsprechende Untersuchungen werden gegenwärtig über Haushaltsmittel des Lehrstuhls finanziert. Die Resultate sollen im Rahmen von Diplom- bzw. Promotionsarbeiten veröffentlicht werden. Der aktuelle Stand der Arbeiten erbrachte den eindeutigen Nachweis, dass die Methode der Elektrorotation zur Zellcharakterisierung im GHz-Bereich geeignet und sensitiv für Polymerschichten, wie Zellmembranen ist (Abb. 4.5.1).

4.6 Modell „humaner Erythrozyt“, Vergleich zu Hühnererythrozyten

Mit einem der experimentellen Überprüfung zugänglichen elektrischen Einzelzellmodell (GiW99) wurden Änderungen der elektrischen Zelleigenschaften beschrieben, die durch Suspensionsmediums- und Temperaturänderungen induziert wurden (SWS06, SWG07). Das Modell ist weitgehend schlüssig, lässt jedoch einige Fragen offen. So wurde bei 15 °C eine höhere Polarisierbarkeit der Zellen gefunden, die bei anderen Temperaturen auch durch DIDS, einen spezifischen Hemmstoff des Bande-3-Transportproteins, erzeugt werden konnte. Darüber hinaus wurde eine starke Temperatur-Spreizung der ersten charakteristischen Frequenz der Elektrorotation (Membrandispersionsfrequenz) gefunden. Sie ist mit Standardannahmen für die Temperaturabhängigkeit der zellulären Medien nicht erklärbar. Die Annahme entsprechender Änderungen der Membrankapazität auf der Basis von Molekülstrukturänderungen in der Lipidphase schließen wir aus, da sie unrealistische Änderungen der molekularen Membranstruktur erfordern würde. Obwohl eine schlüssige Erklärung fehlt, vermuten wir, dass Membranproteine eine Rolle spielen. Membranproteinareale besitzen eine höhere spezifische Kapazität (ca. 4.2 F/m²) als Lipidareale (ca. 0.74 F/m²; siehe: [Gim00]). Der dramatische Anstieg der Membrandispersionsfrequenz oberhalb von 3 MHz, der bei Medienleitfähigkeiten von 3 S/m und besonders bei Temperaturen über 30 °C gefunden wurde, spricht für die Dispersion des Membranproteinbeitrags zur Membrankapazität. Ein Manuskript mit einer genaueren Untersuchung der Temperaturabhängigkeit ist in Vorbereitung.

Weitere Probleme ergaben sich aus der schnellen Ionenzustandsänderung der Zellen vor und während der Messungen. Darüber hinaus haben wir Hinweise der Gruppe um Feldmann auf die Abhängigkeit der spezifischen Membrankapazität vom Glukosegehalt der Lösung sowie von Vorbereitung und Lagerung der Ausgangssuspension (LCF07). Unsere Untersuchungen legen jedoch den Schluss nahe, dass die

Ergebnisse durch ein methodisches Problem, zumindest stark beeinflusst sind. Die dazu jetzt geplanten Untersuchungen gehen über den Rahmen des BfS-Projektes hinaus. Ergebnisse werden voraussichtlich 2008 vorliegen.

Bei den hier dargestellten Ergebnissen ist zu beachten, dass sie auf Frequenzen bis 250 MHz begrenzt waren, so dass auf den GHz-Bereich extrapoliert werden müßte. Dies wäre auf Grund der Interpretationsschwierigkeiten gegenwärtig jedoch spekulativ. Direkte Meßmöglichkeiten im GHz-Gebiet wurden erst erarbeitet, konnten aber nicht temperaturabhängig durchgeführt werden.

Untersuchungen zur Abhängigkeit der feldinduzierten Membranporation von der Membrankrümmung wurden an Hühnererythrozyten als experimentellem Modellsystem für dreiaxiale ellipsoide Zellen durchgeführt (Manuskript in Vorbereitung). Mikroskopisch wurde die Propidiumjodid-Permeabilisierung der verschiedenen orientierter Zellen nach Feldpulsen bestimmter Feldstärke (bis 250 kV/m), Dauer (1 ms bis 200 ms) und Frequenz (100 Hz bis 150 kHz) erfasst. Es zeigte sich, dass die kritische Feldstärke zwar mit der Länge einer Halbachse abnimmt, die Sensibilität der Membran gegenüber dem induzierten Transmembranpotential jedoch entlang der kürzeren Halbachsen höher ist (MWW07). Die Daten zeigen, dass die Feldwirkung auf ein senkrecht zum Feld orientiertes Membranareal von dessen Krümmung abhängt, d. h. Membranbereiche mit geringerer Krümmung sind deutlich sensibler gegenüber einer Feldbeeinflussung. Obwohl diese Versuche unterhalb von 1 MHz erfolgten, ist aus der Literatur bekannt, dass die Mechanismen der Membranstrukturbeeinflussung durch elektrische Feldpulse sich nicht grundsätzlich von denen im mittleren GHz-Bereich unterscheiden.

4.7 Exposition humaner Erythrozyten

Mit dem entwickelten transportablen Gesamtaufbau (Abb. 3.4.1) wurden Expositionen an Erythrozytensuspensionen im Kühlraum bei Umgebungstemperaturen von 12 °C bis 18 °C durchgeführt. Es wurde geprüft, ob die EMF-Absorption zu Änderungen der Membranpermeabilität und erhöhtem zytoplasmatischen Ionenverlust führt.

Nach der Exposition wurden für die exponierten und je zwei Referenzproben die Hämatokritwerte bestimmt (Abb. 4.7.1, Zentrifugation bei 14000 U/min für drei Minuten). Exponierte Proben wiesen eine deutliche Färbung ihres Überstandes auf, was für eine Schädigung der Zellmembranen spricht.

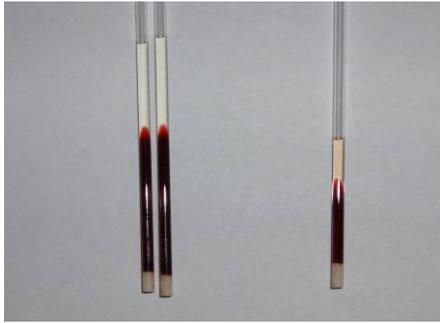


Abb. 4.7.1: Vergleich des Überstandes (Zentrifugation 3 min bei 14000 U/min) einer vorher exponierten Probe (innerhalb von 16 min drei Intervalle von 160 s EMF-Exposition mit 200 mW effektiver Leistung bei 2 GHz) mit zwei nicht exponierten Referenzproben.

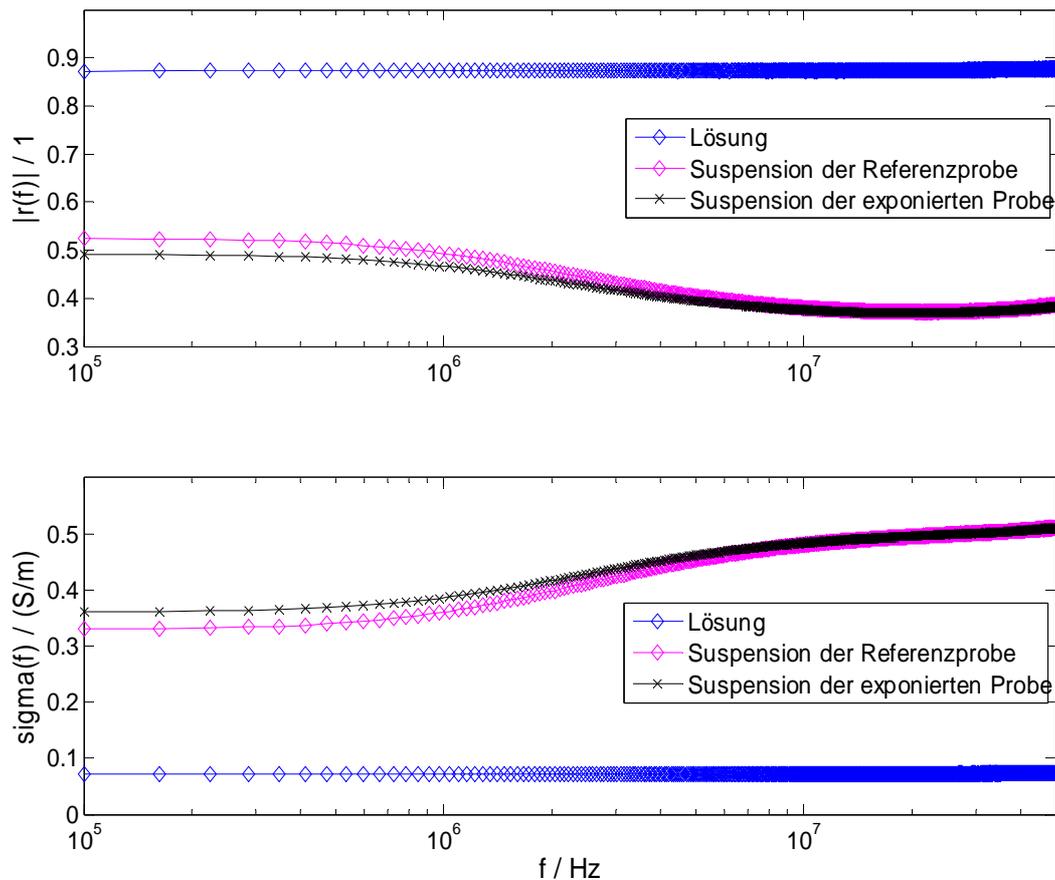


Abb. 4.7.2: Vergleich der Dispersionskurven von Suspensionen humaner Erythrozyten in einer Natriumchlorid-Saccharose -Lösung (Leitfähigkeit ca. 0,07 S/m, pH 6,8).

Anschließend wurden für Impedanzmessungen im Bereich 100 kHz - 50 MHz aus exponierten und Referenzproben Suspensionen vergleichbarer Zusammensetzung hergestellt (Hämatokrit 50 %). Exponierte Suspensionen zeigten eine abgeflachte Dispersion und eine höhere Leitfähigkeit ihres Suspensionsfluids bei 100 kHz (Abb. 4.7.2).

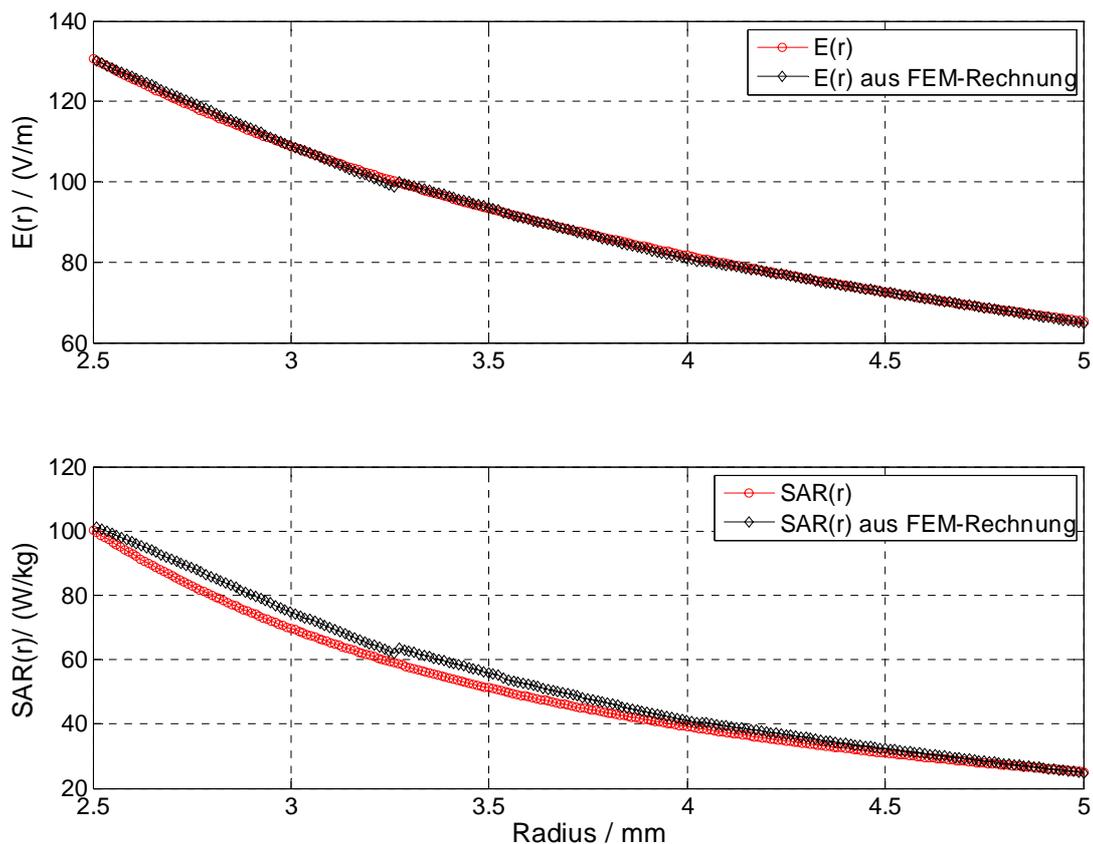


Abb. 4.7.3: Radialer Verlauf der effektiven Feldstärke und der SAR in der Koaxialkammer bei der Exposition von 150 μ l humaner Erythrozyten (Hämatokrit ca. 0,6) mit 2 GHz CW-EMF und 200 mW.

Im Vergleich mit nicht exponierten Zellen lassen die Ergebnisse einen feldinduzierten Ionenverlust und eine Abnahme der Zellpolarisierbarkeit vermuten. Beide Effekte sprechen zwar für eine Zellschädigung, allerdings konnten wir Fehlerquellen nicht ausschließen:

1. Für die Expositionen mit 2 GHz CW-EMF und 200 mW Leistung wurden die radialen Verteilungen für Feldstärke und SAR der mit Erythrozyten gefüllten Messkammer analytisch berechnet und mit FEM-Lab 3.3 modelliert (Abb. 4.7.3). Entscheidend für beide Betrachtungen ist die genaue Bestimmung des Reflexionsfaktors bei 2 GHz. Dieser konnte jedoch nur bis 1,8 GHz gemessen werden und zeigte zudem oberhalb von 1,4 GHz Oszillationen, die eine zusätzliche Unsicherheit verursachen. Es ist somit nicht auszuschließen, dass die SAR-Werte viel höher anzusetzen sind. Hier ist Messtechnik einzuwerben, die über 2 GHz hinausgeht. Unberücksichtigt blieben auch die starken Kanteneffekte am Innenleiter der Messkammer. Dort liegen

deutlich höhere Feldstärken vor, die zu Zellschädigungen führen können. Erst Untersuchungen an verbesserten Kammern mit abgerundeten Elektroden schließen diesen Effekt aus.

2. Weitere Untersuchungen, in denen nun systematisch Feldleistung und Expositionszeit der CW-Exposition reduziert werden sollten, bis obige Effekte im Fehlerband der Messung verschwinden, müssen nachgeholt werden. Hauptprobleme waren die begrenzte Zeit, in welcher der geliehene Netzwerkanalysator des Instituts für Elektrotechnik zur Verfügung stand, die Alterung der Messkammer und Schwierigkeiten bei der blasenfreien Befüllung der Messkammer. Aus Zeitgründen konnten auch die Expositionen mit UMTS und vergleichende Experimente mit Wärmestrahlung, um die im Zellmodell beschriebene lokal erhöhte Absorption an der Membran zu stützen, nicht mehr durchgeführt werden.

3. Zur besseren Abschätzung des relativen Ionenverlusts hätten Kontrollmessungen mit Triton X100 durchgeführt werden müssen, diese Untersuchungen werden nachgeholt.

4. Möglich wären auch Gleichspannungseffekte über der Meßkammer durch die fehlende galvanische Trennung der elektronischen Komponenten wie sie an unserem Rotationsfeldgeneratoren HP 8130A und 8131A beobachtet wurden.

5 Zusammenfassung / Summary

Zusammenfassung

Von den im folgenden zusammengefaßten wesentlichen Projektergebnissen wurden die meisten bereits in Fachzeitschriften publiziert (siehe Punkt 7, „Literatur“) bzw. liegen als Veröffentlichungsmanuskripte vor.

Zu Beginn der Projektlaufzeit wurde eine neue Klassifizierung für Feldeffekte eingeführt, nämlich eine Unterscheidung zwischen thermischen, nichtthermischen und thermisch induzierten nichtthermischen Effekten und an Beispielen diskutiert.

Zur theoretischen Beschreibung von Polarisations- und Absorptionseffekten in Zellen wurden existierende Laplace-Zellmodelle durch vereinfachte analytische Ansätze erweitert, die für die Beschreibung von Zellen in ihrer Genauigkeit den Laplace-Modellen unter bestimmten Bedingungen überlegen sind. Dadurch ist es jetzt möglich komplexe Medieneigenschaften, wie Frequenzabhängigkeiten von Leitfähigkeit und Permittivität, sowie anisotrope Eigenschaften, z. B. der Membran, in einem Mo-

dell zusammenzufassen. Weiterhin erlaubt das neue Modell beliebige Orientierungen von dreiachsigen ellipsoiden Zellen im Feld zu beschreiben. Dabei werden im Gegensatz zu den bisherigen Modellen entlang jeder Hauptachse gleichzeitig korrekte Membraneigenschaften angenommen.

Molekulare Eigenschaften beeinflussen die Absorption sowohl im Zytoplasma und verschiedenen Zellkompartimenten, insbesondere aber auch in der Membran stark. Die theoretische Einbeziehung der Bound-Water-Schichten und von anisotropen Eigenschaften für die Lipidkopfguppenregion ergibt höhere lokale Ströme, die zu einer höheren Energiedissipation führen.

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass der Einfluss von Anisotropieeffekten auf die Zelldaten bisher in der Literatur sehr wahrscheinlich unterschätzt wird. Die Ursache ist, dass anormale Potentialverteilungen in der Membran oder im Volumen der betrachteten Objekte sich scheinbar als frequenzabhängige Leitfähigkeiten und Permittivitäten äußern und dem normalerweise beobachteten Relaxationsverhalten sehr stark ähneln. Dies wird zu fehlerhaften Zellparametern führen.

Untersuchungen zur Abhängigkeit der elektrischen Membranporation von der Membrankrümmung wurden an Hühnererythrozyten als experimentellem Modellsystem für dreiachsige ellipsoide Zellen durchgeführt. Es zeigte sich, dass die Sensibilität der Zellen gegenüber dem Feld zwar für kürzere Halbachsen abnimmt, die Sensibilität der Membran gegenüber dem induzierten Transmembranpotential jedoch zunimmt. Diese Daten zeigen, dass die Feldwirkung auf ein senkrecht zum Feld orientiertes Membranareal von dessen Krümmung abhängt, d. h. Membranbereiche mit geringerer Krümmung sind deutlich sensibler gegenüber einer Feldbeeinflussung.

Als neuartiger experimenteller Ansatz zur Erfassung von EMF-Effekten wurden NCs in einem Hohlleitersystem eingesetzt. Die Vorteile des Systems gegenüber den bisherigen Ansätzen mit Patch-Clamp-Messungen im Hohlleitersystem liegen darin, dass zum einen gleichzeitig die Aktivität vieler Neuronen erfasst wird und zum anderen eine Messung auch während der EMF-Exposition möglich ist. Die Spektralanalyse der neuronalen Signale zeigt, dass es eine EMF-Wirkung gibt, nämlich eine Abhängigkeit zwischen der mittleren Spikerate pro Minute und der in dieser Zeit applizierten effektiven Feldleistung. Entsprechend der externen Leistungsregelung variierte die effektive Feldleistung zwischen 50 mW und 200 mW, was SAR-Werten zwischen 0,51 W/kg und 2,03 W/kg entspricht. Da die charakteristischen Frequenzen für die vorgenommene externe Leistungsregelung, die neuronale Aktivität und die Er-

wärmung des Systems (0,18 °C) übereinstimmen (0,52 mHz), interpretieren wir dies als thermischen Effekt. Ein entsprechendes Manuskript befindet sich im Entwurfsstadium. Der experimentelle Ansatz ist geeignet, die Untersuchungen von EMF-Effekten auf NCs in den Hz- und kHz-Bereich auszudehnen. Hierzu geleistete Vorarbeiten sind im Ausblick dargestellt.

Ein ergänzender experimenteller Ansatz waren Untersuchungen des Ionenverlusts humaner Erythrozyten in Lösungen niedriger Ionenstärke unter Verwendung einer speziell entwickelten koaxialen Expositionskammer. Der Ionenverlust wurde durch die Messung der Außenleitfähigkeitszunahme über Impedanzmessungen erfasst. Aufgrund der radialsymmetrischen Geometrie ergaben Rechnungen zur Feldverteilung in der Kammer einen Feldgradienten. Die ursprünglichen Rechnungen haben jedoch den Anteil der Zellen in unmittelbarer Nähe der unteren und oberen, ringförmigen Kanten der zentralen Feldelektrode unberücksichtigt gelassen. Diese Kanten entstehen als Grenzlinien dort wo Elektrode, Dielektrikum und Suspension (bzw. Elektrode, Deckel und Suspension) zusammenstoßen. Hier sind die Zellen wesentlich höheren Feldstärken ausgesetzt. In der Folge wurde bei Messungen mit signifikanter Zunahme der Außenleitfähigkeit oft auch Hämolyse beobachtet. Eine Weiterführung der Messungen würde aus unserer Sicht die Entwicklung einer neuen Messkammer mit anderer Elektrodengeometrie, z.B. abgerundeten Kanten erfordern.

Summary

Most of the project's results, which are summarized below, are presented in manuscripts or have already been published in international journals (see point 7, "literature").

After starting the project a new classification of field effects has been developed, i.e. the differentiation between thermal, non-thermal and thermally induced non-thermal effects. Examples are discussed.

Existing electric cell models were extended to the theoretical description of polarization and absorption effects at certain sites in and around cells. The precision of the new approach is superior to Laplace-models under certain conditions.

It allows us to join complex media properties in the same model, such as frequency-dependent conductivities and permittivities, as well as anisotropic media properties, e.g. for the membrane. The new model further allows for the description of arbitrary orientations of three-axial ellipsoidal cells in an electric field. The advantage of the

new model is the assumption of exact membrane properties along each semiaxis. Molecular properties influence the absorption in the cytoplasm as well as in the stratified compartments of the membrane. The introduction of bound-water-layers and anisotropic properties for the lipid headgroups results in higher local currents and a higher energy dissipation.

Our theoretical results suggest that the influence of anisotropy-effects in cell-data interpretation is most probably underestimated in the literature. The reason is that the unusual potential distribution in the membrane or in the volume of the considered objects appears as frequency-dependent conductivities and permittivities in the standard models. The resulting frequency-dependent cell properties are very similar to relaxation properties usually described for cells. Clearly, neglecting anisotropic properties will result in erroneous cell parameters and estimates for the subcellular absorption.

Investigations on the dependence of the electric membrane poration on membrane curvature were conducted with chicken erythrocytes as a model system for three-axial ellipsoidal cells. We found that the sensitivity of the cells for the field increases with the length of a semi-axis. Nevertheless, the sensitivity for the induced trans-membrane potential decreases. We interpret these data as a field effect depending on membrane curvature in areas that are oriented perpendicularly to the field, i.e. membrane areas with lower curvature are significantly more sensitive to field effects.

A new experimental approach has been developed for the registration of EMF-effects based on neuro-sensor chips (NCs) in an EMF-wave guide. The synchronous detection of the electric activity of many neurones and the measurement while the EMF-field is applied are advantages of the approach in comparison to the traditional Patch-Clamp measurements in wave-guides. The effective field-power has been varied by the external power control from 50 mW to 200 mW, i.e. from SAR-values of 0.51 W/kg to 2.03 W/kg. The spectral analysis of the neuronal signals showed an EMF-effect, i.e. a correlation of the mean spike rate per minute and the applied effective field-power. We interpret this finding as a thermal effect since the frequency of the external power control (0.52 mHz) corresponds to alterations in the neuronal activity and temperature changes in the system (0.18 °C). A detailed manuscript is in preparation. Our new experimental approach allows for the extension of the investi-

gations of EMF-effects in NCs to the Hz- und kHz-ranges. For first results of these investigations, see outlook ("Ausblick").

Investigations on the ion loss of human erythrocytes in solutions of low ionic strength were conducted as an additional experimental approach. A coaxial chamber and a GHz-switch connector were developed for these experiments. The ion loss was detected by measuring the increase of the external conductivity by impedance measurements on human erythrocyte suspensions. Nevertheless, the radial symmetry of the chamber leads to strong field gradients at the upper and lower ring-shaped edges of the central electrodes. These edges are formed at the interfaces of electrode, dielectric insulator and cell suspension at the bottom, or of electrode, coverlid and suspension at the top. The cells are exposed to increased field strengths at these sites. As a result, hemolysis has been observed in measurements with a significant increase of the external medium. Further experiments will require the development of a new chamber with improved electrode geometry, e.g. rounded edges.

6 Ausblick

Aus den Untersuchungen zur EMF-Wirkung an neuronalen Netzwerken auf NCs ergibt sich ein möglicher neuer Ansatz, dessen Bearbeitung über die abgeschlossenen Vorhaben hinausgeht.

Es soll geklärt werden, ob in **dielektrophoretisch vorstrukturierten** neuronalen *in vitro* Netzwerken **charakteristische Eigenfrequenzen** der neuronalen Aktivität im mHz- und Hz-Bereich existieren und ob sich diese mittels HF-CW Feldern, welche in der Nähe der neuronalen Eigenfrequenzen amplitudenmoduliert sind, anregen lassen. Ziel ist die Induktion von Synchronisations- bzw. Triggerungseffekten. Hierfür soll ebenfalls das generische UMTS-Signal des von der Universität Wuppertal und der Forschungsgemeinschaft Funk e.V. eingeworbenen UMTS-Generators (GUS 6960 S) eingesetzt werden.

Als Vorarbeiten zur Umsetzung beider Aufgabenstellungen wurde das UMTS-Signal charakterisiert sowie eine Konzeption zur zeitaufgelösten Signalauswertung durch Frequenzanalyse ausgearbeitet.

Frequenzcharakterisierung des UMTS-Signals bis 45 Hz

Bei der Exposition von NCs wurde die ursprüngliche Temperaturmessung von der on-Chip Diode auf den Glasfasersensor (Abb. 3.1.4 und Abb. 3.4.2) umgestellt.

Grund dafür ist die festgestellte Verfälschung der Diodenspannung, welche durch feldinduzierte Ladungsträgerströme aus der Halbleitergrenzschicht entstand. Die Feldstärke des UMTS-Signals kann nun über die on-Chip Diode als induzierte Spannung mit 90 Hz Tastfrequenz registriert werden. Unter der Annahme, dass die Feldwirkung auf die mikrostrukturierte Diode gering ist (Kleinsignalbereich) und ein linearer Zusammenhang zwischen Feldleistung und Quadrat der induzierten Spannung vorliegt, wurden Zeitverlauf und Frequenzspektrum des UMTS-Signals modelliert (blaue Kurve in Abb. 6.1).

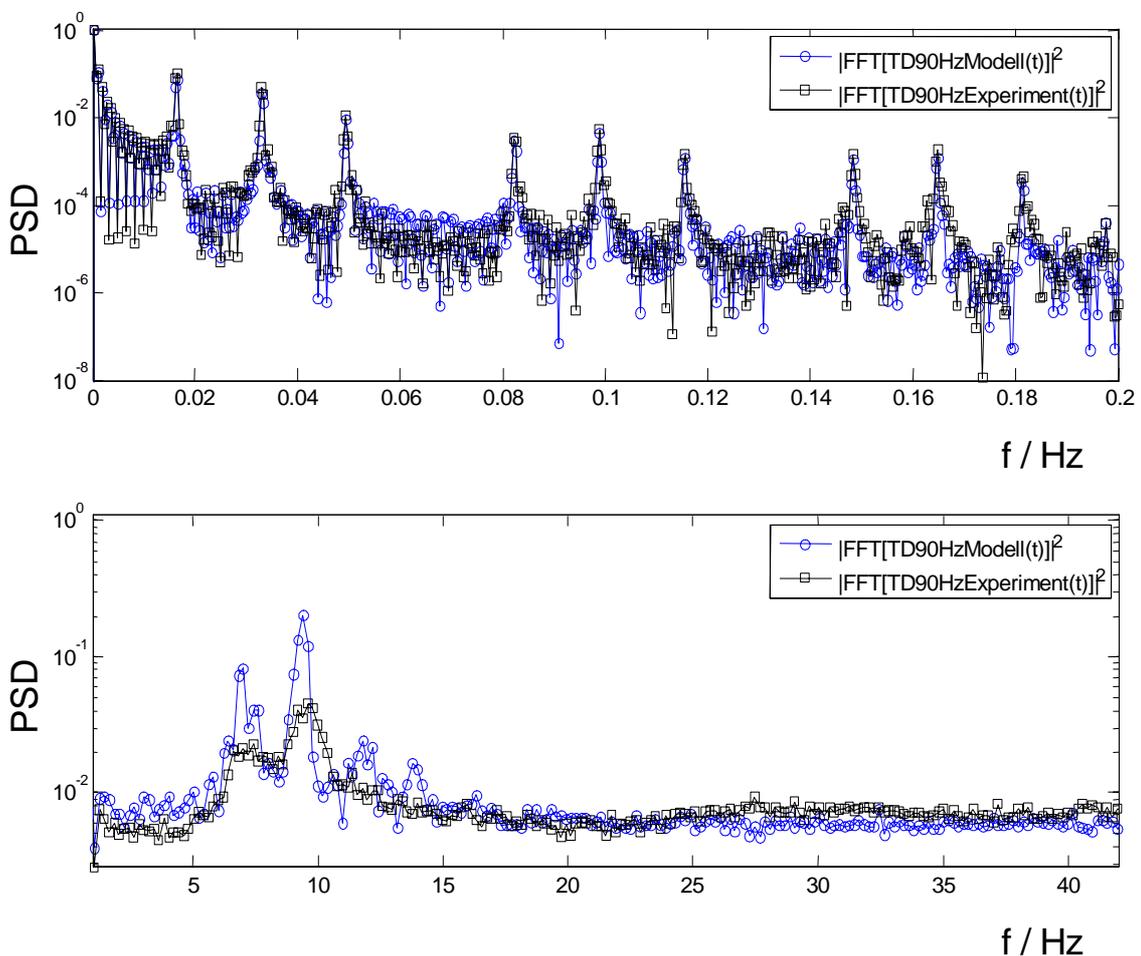


Abb. 6.1: Eigenfrequenzen im niederfrequenten Teil des Amplitudenspektrums der PSD des generischen UMTS-Signals, welches für 10 min bei 200 mW Feldleistung an der on-Chip Diode registriert wurde. Im oberen Bild ist eine charakteristische Frequenz $f_0 = 16,7$ mHz (Pfeil) mit ihren Obertönen dargestellt, wobei die $f_i = 4n f_0$, mit $n \in \mathbb{N}$ ausgelöscht sind. Das untere Bild zeigt zwei weitere charakteristische Frequenzen bei 7 Hz und 9 Hz.

Im Amplitudenspektrum der PSD treten unterhalb von 45 Hz Eigenfrequenzen bei 16,7 mHz sowie insbesondere bei 7 Hz und 9 Hz auf (Abb. 6.1). Diese Frequenzen sind den internen Leistungsregelungen des Mobilfunksignals zuzuordnen. In einem sich wiederholenden Zyklus von 60 s wird zuerst für 45 s die effektive Leistung der Trägerwelle von 1,966 GHz auf dem maximalen Pegel gehalten und danach für 15 s in den „Fading“-Mode gewechselt, in welchem etwa 10 mal pro Sekunde die Feldleistung vom Maximalwert um -30 dB absinkt (SMH01). De facto entsteht für die Feldleistung innerhalb des 60 Sekunden-Zyklus ein Tastverhältnis von 3:1 und führt dazu, dass für die charakteristische Frequenz $f_0 = 1/(60 \text{ s}) = 16,7 \text{ mHz}$ jeder vierte Oberton ausgelöscht wird (oberes Bild in Abb. 6.1). Die Spektralanalyse der Diodenspannung zeigt, dass innerhalb des Fading-Intervalls die Leistung hauptsächlich mit 9 Hz und 7 Hz geregelt wird (Abb. 6.1, unten).

Konzeption der zeitaufgelösten Signalauswertung mit Frequenzanalyse

Für NCs mit vorstrukturierten Netzwerken und solche mit Netzwerken aus statistisch verteilten Neuronen sollte der Zeitverlauf der neuronalen Aktivität über mehrere Stunden registriert und auf mögliche Eigenfrequenzen von mHz bis zu EEG-Frequenzen von 25 Hz untersucht werden. Die Messungen sollten zum Zwecke der Vergleichbarkeit in dem für HF-EMF vorgesehenen Rechteckwellenleiter (Abb. 3.1.3, links oben), jedoch ohne Feld durchgeführt werden. In der Datenanalyse erfolgt dann die:

- Klassifikation und Partitionierung der an den MEA-Elektroden gemessenen Zeitverläufe der neuronalen Aktivität.
- Berechnung der *PSD* aller neuronalen Signale.
- Darstellung der *PSD*'s für alle neuronalen Signale über alle Zeitintervalle.
- Interpretation und der Vergleich der *PSD*'s für den einzelnen NC und der mittleren *PSD* für verschiedene NCs (vorstrukturierte Netzwerke und Netzwerke aus statistisch verteilten Neuronen).
- Ermittlung möglicher charakteristischer Frequenzen für beide Typen von NCs (als Bsp. Abb. 6.2, schwarze Kurve).

Bestätigt sich die Hypothese, dass es im Frequenzbereich von mHz bis 25 Hz generelle Eigenfrequenzen der neuronalen Aktivität von *in vitro*-Netzwerken gibt, sollte die Exposition von NCs beider Sorten mit speziell amplitudenmoduliertem HF-CW-EMF vorgenommen und verglichen werden. Dabei sollte die Trägerfrequenz 2 GHz sein

und die Amplitudenmodulation „leicht verstimmt“, jedoch innerhalb der Halbwertsbreiten zu den jeweils festgestellten Eigenfrequenzen erfolgen. Die Gesamtleistung und die Stärke der Modulation sollten variiert und die neuronale Aktivität durch Frequenzanalyse untersucht werden. Mit einer Modulationsfrequenz nahe der Eigenfrequenz der neuronalen Aktivität ist es am wahrscheinlichsten, eine Beeinflussung zu provozieren. Denkbar sind Synchronisations- und Triggereffekte, die in der *PSD* sichtbar werden würden. Bei Synchronisation würde sich der Eigenfrequenzsignalanteil der neuronalen Aktivität auf die anregende Modulationsfrequenz verschieben. Bei Triggereffekten würde zusätzlich zum Eigenfrequenzsignalanteil der neuronalen Aktivität ein Signalanteil bei der Modulationsfrequenz auftauchen.

Vorarbeiten zu möglichen Eigenfrequenzen

Im Falle der Exposition mit dem generischen UMTS-Signal, soll ebenfalls eine mögliche Wirkung des vorgegebenen und charakterisierten Spektrums (Abb. 6.2, blaue Kurve) hinsichtlich Synchronisations- und Triggereffekten auf die neuronale Aktivität (Abb. 6.2, schwarze Kurve) untersucht werden. Es zeigt sich, dass die UMTS-Hauptlinie im Aktivitätsbereich des betrachteten Neurons liegt. Existieren nun Synchronisations- und Triggereffekte bei CW-EMF, müsste man diese ebenfalls bei UMTS erwarten.

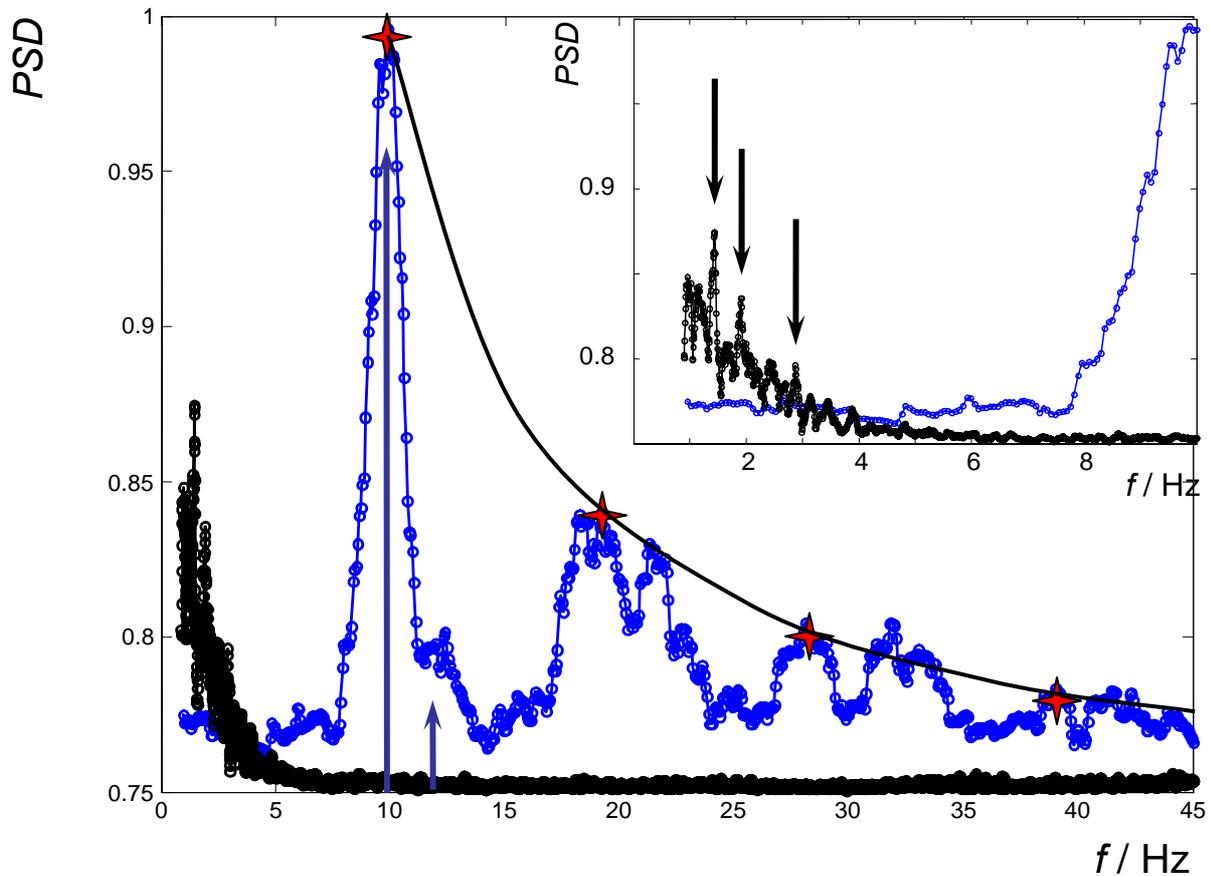


Abb. 6.2: Die blaue Kurve zeigt die *PSD* des UMTS-Signals, welches 15 s im Fading-Mode registriert wurde. Das Signal weist im alpha-Band der EEG-Frequenzen eine scharfe Linie bei 9,5 Hz und eine breitere, flachere bei 12 Hz (blaue Pfeile). In den folgenden Maxima ist ein Oberton-Schema der Hauptlinie enthalten (rote Sterne mit Verbindungslinie). Die schwarze Kurve zeigt die *PSD* der neuronalen Aktivität ohne Exposition, welche 170 s registriert wurde. Aufgezeichnet wurde die elektrische Aktivität eines Neurons aus einem Netzwerk aus statistisch verteilten Zellen. Geklärt werden soll, ob es sich bei den Linien unterhalb von 5 Hz (schwarze Pfeile im delta-Band der EEG-Frequenzen), um möglicherweise charakteristische Frequenzen handelt.

7 Literatur

Die im folgenden **fett** gedruckten Arbeiten entstanden im Rahmen der Bearbeitung des vorliegenden Projekts.

- BGK05:** Bohinc, K., J. Gimsa, V. Kralj-Iglic, T. Slivnik, A. Iglic. 2005. Excluded volume driven counterion condensation in a concave electric double layer model. *Bioelectrochemistry*. 67:91-99.
- Fis06:** Fischer R. 2006. Entwicklung und Test von Hochfrequenz-Expositionseinrichtungen im GHz-Bereich. Diplomarbeit am Institut für Allgemeine Elektrotechnik und am Lehrstuhl für Biophysik an der Universität Rostock.
- Fle05: Flehr, J. 2005. Potentialberechnung zum Mechanismus der Ankopplung der Aktionspotentiale der Nervenzellen an Sensorelektroden. Ph.D. thesis, Rostock University.
- GDG89: Georgiewa, R., E. Donath, J. Gimsa, U. Löwe, R. Glaser. 1989. AC-field-induced KCl leakage from human red cells at low ionic strengths – Implications for electro-rotation measurements. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 22:255-270.
- GHS05:** Gimsa, J., B. Habel, U. Schreiber, U. van Rienen, U. Strauss, U. Gimsa. 2005. Choosing electrodes for deep brain stimulation experiments – electrochemical considerations. *J. Neurosci. Meth.* 142:251-265.
- GIF07:** Gimsa, U., A. Iglic, S. Fiedler, M. Zwanzig, V. Kralj-Iglic, L. Jonas, J. Gimsa. 2007. Actin is not required for nanotubular protrusions of primary astrocytes grown on metal nano-lawn. *Mol. Mem. Biol.* 24:243-255.
- GiH05:** Gimsa, J., L. Haberland. 2005. Electric and magnetic fields in cells and tissues. in: F. Bassani, J. Liedl, P. Wyder (eds.) *Encyclopedia of Condensed Matter Physics*. Elsevier Ltd. Vol. Biophysics. Vol. 2:6-14.
- Gim00: Gimsa, J. 2000. Mechanisms of energy absorption at the cellular level: A first approach, Proceedings of the COST 244 BIS Conference on “Biomedical Effects of Electromagnetic Fields, Technical Univ., Munich, pp. 101–114, <http://www.cost281.org/download.php?fid=231>.
- Gim01: Gimsa, J. 2001. A comprehensive approach to electro-orientation, electro-deformation, dielectrophoresis, and electrorotation of ellipsoidal particles and biological cells. *Bioelectrochemistry*. 54:23-31.
- Gim03a:** Gimsa, J. 2003. Klassifizierung möglicher Wirkmechanismen von EMF – Ein Beitrag zu molekularen Hochfrequenzantennen. *FGF News letter* 4:50-52.
- Gim03b:** Gimsa, J., 2003. Wechselfeldinduzierte Zell- und Teilchenbewegungen in Mikrokammern: Prinzipien, Anwendungen und Theorie. *Chemie Ingenieur Technik*. 75:391-396.
- GiW01: Gimsa, J., D. Wachner. 2001. Analytical description of the transmembrane voltage induced on arbitrarily oriented ellipsoidal and cylindrical cells. *Biophys. J.* 81:1888-1896.
- GiW99: Gimsa, J., D. Wachner. 1999. A polarization model overcoming the geometric restrictions of Laplace's solution for spheroidal cells: Obtaining new equations for field induced forces and transmembrane potential. *Biophys. J.* 77:1316-1326.
- GKI06:** Gimsa, U., V. Kralj-Iglic, A. Iglic, S. Fiedler, M. Zwanzig, L. Jonas, J. Gimsa. 2006. Basic cell-cell and cell-surface interactions in liposome and cellular systems. in: A. Leitmannova Liu (ed.) *Advances in planar lipid bilayers and liposomes*. Elsevier. Vol. 5:229-251.

- GSH06:** Gimsa, U., U. Schreiber, B. Habel, J. Flehr, U. van Rienen, J. Gimsa. 2006. Matching geometry and stimulation parameters of electrodes for deep brain stimulation experiments – Numerical considerations. *J. Neurosci. Meth.* 150:212-227.
- GSW06:** Gimsa, U., A. Scheunemann, D. Wachner, J. Sakowski, P. Köster, J. Gimsa. 2006. Effekte hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf zellulärer Ebene - eine Literaturstudie. Shaker Verlag. Aachen. ISBN-10:3-8322-5251-7.
- Hei03: Heida, T. 2003. Electric field induced effects on neuronal cells biology accompanying dielectrophoretic trapping. *Adv. Anat. Embryol. Cell Biol.*, 173:1–77.
- KSB07:** Köster, P., J. Sakowski, W. H. Baumann, H.-W. Glock, Gimsa, J. 2007. A new exposure system for the *in-vitro* detection of GHz field effects on neuronal networks. *Bioelectrochemistry* 70:104-114.
- LCF07: Lifshits, L., A. Caduff, M. S. Talary, Y. Feldmann, 2007. Dielectric response of biconcave erythrocyte membranes to D- and L-glucose. *Journal of Physics D: Appl. Phys.* 40:15-19.
- MHG06:** Maswiwat, K., M. Holtappels, J. Gimsa. 2006. On the field distribution in electrorotation chambers – Influence of electrode shape. *Electrochimica Acta* 51:5215-5220.
- MHG07:** Maswiwat, K., M. Holtappels, J. Gimsa. 2007. Optimizing the electrode shape for electrorotation chambers. *Journal of Applied Membrane Science and Technology Science Asia* 33:61-67.
- MWW07:** Maswiwat, K., D. Wachner, R. Warnke, J. Gimsa. 2007. Simplified equations for the transmembrane potential induced in ellipsoidal cells of rotational symmetry. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 40:914-923.
- RFS05:** van Rienen, U., J. Flehr, U. Schreiber, S. Schulze, U. Gimsa, W. H. Baumann, D. G. Weiss, J. Gimsa, R. Benecke, H.-W. Pau. 2005. Electro-Quasistatic Simulations in Bio-Systems Engineering and Medical Engineering. *Advances in Radio Science. Vol. 3:39–49.*
- SBB02: Segev, R., M. Benveniste, E. Hulata, N. Cohen, A. Palevski, E. Kapon, Y. Shapira, E. Ben-Jacob. 2002 Long Term Behavior of Lithographically Prepared *In Vitro* Neuronal Networks. *Physical Review Letters*, 88 (11):118102-(4).
- SiG05:** Simeonova, M., J. Gimsa. 2005. Dielectric anisotropy, volume potential anomalies and the persistent Maxwellian equivalent body *J. Phys.: Condens. Matter* 17:7817-7831.
- SiG06:** Simeonova, M., J. Gimsa. 2006. The influence of the molecular structure of lipid membranes on the electric field distribution and energy absorption. *Bioelectromagnetics* 27(8):652-666. doi:10.1002/bem.20259.
- SMH01: Streckert, J., N. Mbonjo Mbonjo, A. Bitz, V. Hansen. 2001. Ein UMTS-Testsignal für bio-elektromagnetische Experimente. *FGF News letter* 3:11-17.
- SWG02: Simeonova, M., D. Wachner, J. Gimsa. 2002. Cellular absorption of electric field energy: The influence of molecular properties. *Bioelectrochemistry.* 56:215-218.
- SWG07:** Sudsiri, J., D. Wachner, J. Gimsa. 2007. On the temperature dependence of the dielectric membrane properties of human red blood cells. *Bioelectrochemistry* 70:134-140.
- SWS06:** Sudsiri, J., D. Wachner, M. Simeonova, J. Donath, J. Gimsa. 2006. Effect of temperature on the electrorotation behavior of human red blood cells. *Jurnal Teknologi (Malaysia)* 44(F):1-12.

WSG02: Wachner, D., M. Simeonova, J. Gimsa. 2002. Estimating the subcellular absorption of electric field energy: Equations for an ellipsoidal single shell model. Bioelectrochemistry. 56:211-213.

8 Abkürzungen

$AP(t)$:	Zeitverlauf der neuronalen Aktivität einer Unit unter EMF-Exposition als Spikerate pro Minute
$AP_0(t)$:	Zeitverlauf der neuronalen Aktivität einer Unit ohne EMF als Spikerate pro Minute
CW:	Continuous Wave
EMF:	elektro-magnetische Felder
f :	Frequenz
GHz:	10^9 Hz
$h(t)$:	Zeitverläufe ($AP_0(t)$, $AP(t)$ und $P(t)$), über 60 s gemittelt
HF:	Hochfrequenz/hochfrequent
Hz:	Hertz = 1/s, Einheit der Frequenz
MEA:	Micro-Electrode-Array
mHz:	10^{-3} Hz
MHz:	10^6 Hz
NC:	Neurosensorchip
$P(t)$:	Zeitverlauf der effektiven Feldleistung, mit identischer Abtastrate $(60 \text{ s})^{-1}$
$PSD(h(t))$:	spektrale Leistungsdichte der zugehörigen Zeitverläufe, $PSD(P(t))$, $PSD(AP(t))$ und $PSD(AP_0(t))$. Amplitudenspektrum als Betragsquadrat des fouriertransformierten Zeitverlaufs $PSD(h(t))= FFT[h(t)] ^2$.
SAR:	spezifische Absorptionsrate
UMTS:	Universal Mobile Telecommunication System
Unit:	registriertes neuronales Signal gleicher Waveform an einer MEA-Elektrode