

Abschlußbericht des Teilprojektes:

# **Die Wirkung von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern auf menschliche kultivierte T-Lymphozyten (Jurkat)**

Physiologisches Institut  
der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Wilhelmstr. 31  
53111 Bonn

Mitarbeiter:

Dr. Rainer Meyer, Dr. Frank Gollnick, Dipl. Phys. Stephan Wolke, Gabi Conrad, Hanne Bock

Korrespondenzadresse:

Arbeitsgruppe Priv. Doz. Dr. Rainer Meyer, Physiologisches Institut der Universität Bonn,  
Wilhelmstr. 31, 53111 Bonn,  
Tel.: 0228/2872311  
Fax: 0228/2872313  
E-Mail: [meyer@snphysio2.wilhelm.uni-bonn.de](mailto:meyer@snphysio2.wilhelm.uni-bonn.de)

## **Inhaltsverzeichnis:**

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	2
<b>2.</b>	<b>Einleitung</b>	4
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden</b>	6
3.1.	Die Kultivierung der T-Jurkat-Zellen	7
3.2.	Die Messung der $[Ca^{2+}]_i$	8
3.2.1	Die Beladung der Zellen mit Fura-2	11
3.2.2	Die Vorgehensweise bei der Messung der $[Ca^{2+}]_i$	11
3.3.	Der Versuchsaufbau	13
3.3.1	Die für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ erforderlichen Komponenten des Versuchsaufbaues	13
3.3.2	Die für die Erzeugung des hochfrequenten elektromagnetischen Feldes erforderlichen Komponenten des Versuchsaufbaues	15
3.4	Das Design der Experimente	20
3.4.1	Das Meßprogramm	21
3.4.2	Die Auswertung	24
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	26
4.1	Die Ergebnisse zur Spontanaktivität	26
4.2		
4.2.1	Variation der Trägerfrequenz	35
4.2.2	Variation der Modulationsfrequenz	36
<b>5.</b>	<b>Diskussion und Bewertung der Versuche</b>	39
<b>6.</b>	<b>Literatur</b>	41

# Die Wirkung von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern auf menschliche kultivierte T-Lymphozyten (Jurkat)

## 1. Zusammenfassung

Das Vorhaben beschäftigt sich mit den Auswirkungen elektromagnetischer Felder in einem für Telekommunikationszwecke relevanten Bereich (900 MHz und 1800 MHz) auf die intrazelluläre Calciumkonzentration,  $[Ca^{2+}]_i$ , von kultivierten entarteten T-Lymphozyten der Zelllinie Jurkat. Zur Ausführung dieser Untersuchung wurde eine Hochfrequenz - Applikationsapparatur eingesetzt, die die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung einzelner Zellen bei gleichzeitiger Einwirkung definierter hochfrequenter elektromagnetischer Felder erlaubt. Dabei kam es auf die athermische Wirkung dieser Felder an. Die Applikationsapparatur besteht aus einem Leistungsmeßsender mit der Möglichkeit zur externen Modulation, einem Modulator und einer Zelle zur Erzeugung eines hochfrequenten elektromagnetischen Feldes mit homogener transversaler elektrischer und magnetischer Feldkomponente, der TEM-Zelle. Die TEM-Zelle enthält eine Versuchskammer zur Aufnahme des biologischen Materials. Der Boden der Versuchskammer wird durch ein Deckglas und ein Metallgitter gebildet, wodurch bei bestmöglicher Abdichtung für elektromagnetische Felder der optische Einblick mit dem Mikroskopobjektiv gewährleistet wird. Allerdings bewirkt das Metallgitter lokale Feldinhomogenitäten in der Ebene der Zellen. Sowohl für 900 MHz Trägerfrequenz und 217 Hz Pulsfrequenz als auch für 1800 MHz Trägerfrequenz und 217 Hz Pulsfrequenz wurden SAR-Werte bestimmt. Die zeitlich und räumlich gemittelten Werte betragen für 900 MHz 15,4 mW/kg und für 1800 MHz 13,5 mW/kg.

Mit Hilfe des fluoreszierenden Calciumindikatorfarbstoffes Fura-2 wurde die  $[Ca^{2+}]_i$  in den kultivierten menschlichen T-Lymphozyten gemessen. Die Messung erfolgte durch Bestimmung von Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe der quantitativen computergestützten Bildanalyse.

Die Versuche wurden in der Regel nach folgendem Muster durchgeführt: Die erste Phase des Experiments bildete ein Vorlauf ohne Feldapplikation von 500 s, in einer zweiten Phase wurde für 500 s das hochfrequente Feld angewendet, in einer dritten Phase wurde das Feld wieder abgeschaltet und ein chemischer Stimulus in Form von Antikörpern gegen das CD3-Antigen als Teil des T-Zellrezeptors appliziert, der zu einem Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  führen sollte. Der chemische Stimulus sollte zeigen, daß die Zellen aktivierbar sind und ein Fehlen einer Antwort auf das Feld nicht auf mangelnde Aktivierbarkeit der Zellen zurückzuführen ist. Abwechselnd

mit den Experimenten in denen Zellen im Feld exponiert wurden, wurden Kontrollexperimente ausgeführt, in denen Zellen scheinexponiert wurden. Die Auswertung erfolgte auf zwei Arten: Einerseits wurde die Zahl der Zellen, die in den verschiedenen Phasen der Experimente  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen zeigten, ausgewertet, und andererseits wurde der zeitliche Verlauf der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration für jede Gruppe über alle Zellen gemittelt und verfolgt. In der vorliegenden Versuchsreihe wurden 1272 Zellen untersucht. Die Zellen zeigten Versuchskammer das gleiche Verhalten wie außerhalb, d.h. 74% entwickelten spontane  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen. 67% der Lymphozyten reagierten auf die chemische Stimulation. Bei 900 MHz wurden 449 Zellen exponiert und mit 384 Zellen aus Kontrollexperimenten verglichen, bei 1800 MHz wurden 237 exponierte Zellen mit 202 scheinexponierten Zellen verglichen. Eine vergleichende Auswertung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen in den unterschiedlichen Gruppen zeigte keine auffälligen Unterschiede bei den Experimenten mit 900 MHz. Bei den Experimenten mit 1800 MHz entwickelten während der Exposition 17,7%  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen während es bei den scheinexponierten nur 10,9% waren. Die Exposition könnte also zu einer höheren Aktivität führen. Bei einer Darstellung des gemittelten zeitlichen Verlaufes der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  zeigte sich bei beiden Gruppen eine kleine transiente Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kurz nach dem Einschalten des Feldes, die bei den scheinexponierten Zellen nicht auftrat. Inwieweit es sich bei dieser Verschiebung um ein zufälliges Ereignis, ein Artefakt des Versuchsaufbaus oder einen wirklichen Einfluß des Feldes handelt, läßt sich an Hand der vorliegenden Daten noch nicht abschließend beantworten. Ähnliche Effekte haben wir schon bei Experimenten mit 50 Hz magnetischen Felder beobachtet, sie ließen sich allerdings bei einer Wiederholung der Experimente nicht reproduzieren. Daraus folgt, daß ein ursächlicher Zusammenhang zwischen Feld und dem kleinen transienten Anstieg in der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nicht mit Sicherheit hergestellt werden kann.

## 2 Einleitung

Die intrazelluläre Calciumkonzentration spielt bei der Kontrolle zellulärer Abläufe eine zentrale Rolle (Berridge, 1993; Carafoli, 1987; Clapham, 1995). Viele zelluläre Vorgänge werden durch die intrazelluläre Calciumkonzentration,  $[Ca^{2+}]_i$ , direkt gesteuert, z.B. die Zellkontraktion, die zelluläre Bewegung oder die synaptische Übertragung zwischen Nervenzellen, andere wie z.B. die Zellteilung hängen zumindestens indirekt von der  $[Ca^{2+}]_i$  ab. Auch schon bevor man die  $[Ca^{2+}]_i$  direkt messen konnte hat man daher versucht, ihre mögliche Beeinflussung durch Felder meßtechnisch zu erfassen. Hochfrequente elektromagnetische Felder wurden in ihrem Einfluß auf den Aus- bzw. Einstrom von radioaktiv markiertem Calcium,  $^{45}Ca^{2+}$ , in sogenannten Flux-Messungen untersucht (Bawin et al., 1975). Auf diese Arbeit an Gehirngewebe des Huhnes folgten eine ganze Reihe von  $^{45}Ca^{2+}$ -Flux-Messungen an dem gleichen Präparat (Übersicht in: Blackman et al., 1991), an Herzgewebe (Schwartz et al., 1990; Schwartz und Mealing, 1993), aber auch an menschlichen Neuroblastoma-Zellen (Dutta et al. 1984; 1989). Veränderungen im  $^{45}Ca^{2+}$ -Flux durch die Zellmembran wurden bei den Untersuchungen an Hirngewebe dann gefunden, wenn hochfrequente Wellen niederfrequent z.B. bei 16 Hz amplitudenmoduliert wurden, also im Frequenzbereich der EEG-Wellen (Elektroencephalogramm). Unter Feldern, die für Kernspintomographie mittels magnetischer Resonanz verwendet werden, wurde auch die  $[Ca^{2+}]_i$  in HL60-Zellen, dies sind Zellen des Immunsystems, bestimmt. Die kombinierten Felder für die Kernspintomographie führten zu einem signifikanten Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  in diesen Zellen, während der hochfrequente Anteil der Felder allein keine Auswirkung hatte (Carson et al., 1990). Diese Ergebnisse konnten allerdings von der gleichen Arbeitsgruppe in einer erneuten Untersuchung nicht reproduziert werden, wie sie auf der Tagung der Bioelectromagnetics Society in Boston 1995 berichteten. Ein mögliches Ziel der Einwirkung elektromagnetischer Felder ist damit die Immunantwort von Lymphozyten. Eine Reihe von Untersuchungen hatten den Einfluß extrem niedrigfrequenter (ELF) magnetischer Felder auf die Vermehrung und die Auslösung der Immunantwort von Lymphozyten zum Thema (Übersichtsartikel: Wallececk, 1992). Es ist daher naheliegend, solche Einflüsse auch bei niedrigfrequent gepulsten hochfrequenten Signalen anzunehmen. Dieser Hypothese wurde schon in einem vorhergehenden Projekt "Der Einfluß hochfrequenter elektromagnetischer Felder des Mobilfunks auf die Calcium-Homöostase von Herzmuskelzellen und Lymphozyten" nachgegangen. Bei den Untersuchungen an isolierten Herzmuskelzellen des Meerschweinchens ließen sich eindeutige

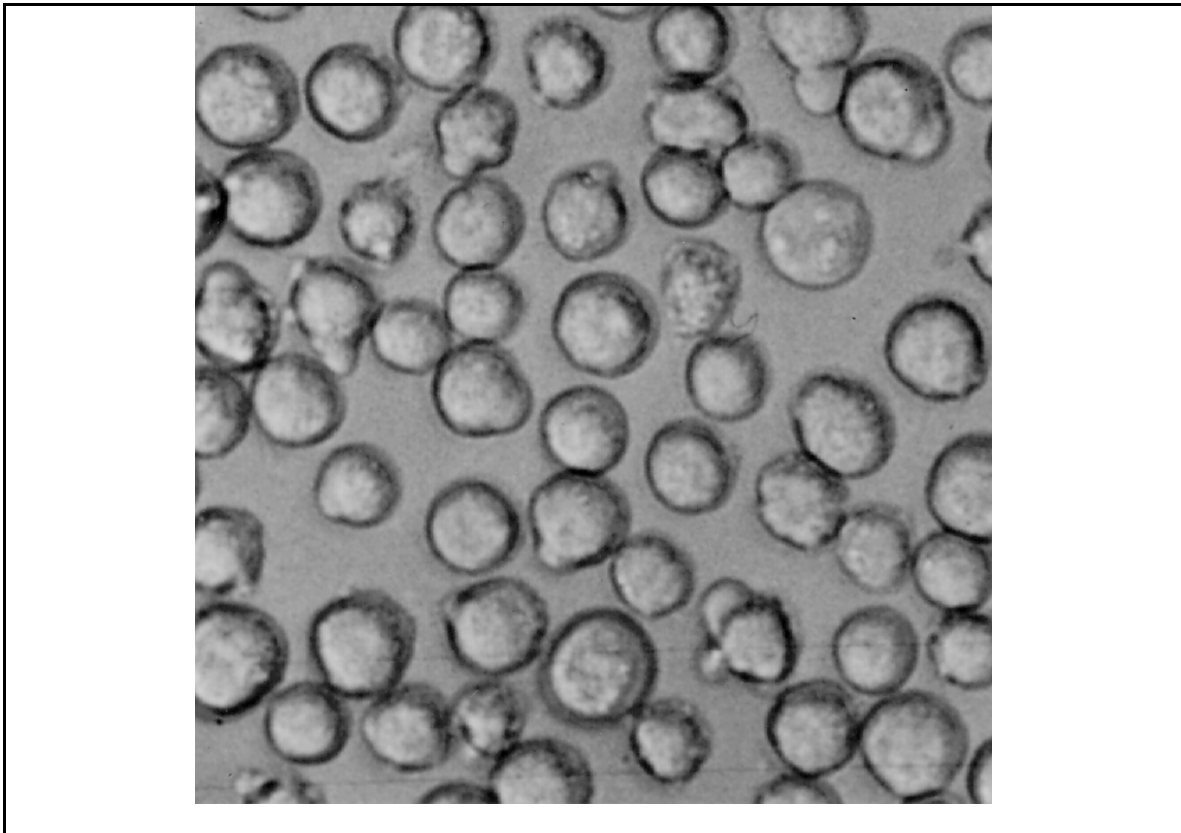
Resultate erzielen, es war kein Einfluß der hochfrequenten elektromagnetischen Felder auf die intrazelluläre Calciumkonzentration der Herzmuskelzellen nachzuweisen (Wolke et al., im Druck). Bei den Experimenten an T-Lymphozyten der Zelllinie Jurkat konnte zwar auch keine Veränderung der  $[Ca^{2+}]_i$  durch den Einfluß der hochfrequenten elektromagnetischen Felder nachgewiesen werden, allerdings zeigten die Zellen auch bei dem Versuch einer chemischen Stimulation mit dem Anti-CD3 Antikörper keine Reaktion. Dieser mangelnde Erfolg einer Positivkontrolle ließ auch die eigentlichen Untersuchungen als nicht aussagekräftig erscheinen. Darüberhinaus entwickelten die Zellen in der Meßapparatur, einer TEM-Zelle, deutlich seltener spontane  $Ca^{2+}$ -Oszillationen als außerhalb. Daher erschien es sinnvoll, ein Folgeprojekt zu entwerfen, welches die noch offenen Fragen beantwortet. Aus dem ersten Projekt ergaben sich im wesentlichen zwei noch offene Fragenkomplexe:

1. Die verhältnismäßig schwache chemische Stimulierbarkeit unserer Zellen könnte auf die Meßbedingungen, die Vitalität der Zellen oder die für die Stimulation eingesetzten Substanzen zurückzuführen sein.
2. Die eingesetzte Auswertetechnik ließ einige Parameter des Zellverhaltens wie Dauer und Amplitude der  $Ca^{2+}$ -Oszillationen unberücksichtigt. Daher sollte eine automatisierte Auswertungstechnik, die z.B. eine Mittelung aller Signale enthält, entwickelt werden. Das experimentelle Design sollte so verändert werden, daß diese Auswertung möglich ist.

An Zellen mit verbesserter Sensitivität und mit einer verfeinerten Meßtechnik sollten die athermischen Wirkungen der hochfrequenten Felder des Mobilfunks auf die  $[Ca^{2+}]_i$  untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1. Die Kultivierung der T-Jurkat-Zellen



Die T-Jurkat Zellen (Klon E6-1, Weiss et al., 1984) wurden von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Die Kultur der T-Jurkat Zellen erfolgt in Suspension in Zellkulturflaschen (Fa. Costar) mit einer Wachstumsfläche von 75 cm<sup>2</sup> und einem Gesamtvolumen von 300 ml. Die Zellen werden in einem speziell für die Suspensionskultur menschlicher Lymphozyten entwickelten Medium (RPMI 1640, nach Moore et al., 1967, bezogen von GIBCO) kultiviert. Das Medium wird mit foetalem Kälberserum (FCS, bezogen von Seromed) versetzt. Der FCS-Anteil wurde zwischen 5 und 10% variiert. Mit dem FCS-Anteil wird die Wachstumsgeschwindigkeit eingestellt. In Abhängigkeit von der FCS-Konzentration finden der Medienwechsel und das Umsetzen der Zellen in einem Rhythmus von 2 bis 4 Tagen statt. Hierzu werden bei einem Gesamtvolumen von 30 ml Zellsuspension je Kulturflasche 20 bis 28 ml entnommen, die verbleibenden 2 bis 10 ml werden anschließend mit entsprechender Menge Medium aufgefüllt. Die Zellen werden bei 37°C in einem CO<sub>2</sub>-begasteten Inkubator kultiviert. Die Zellen erscheinen im mikroskopischen Hellfeldbild rund und ohne besondere Kennzeichen (Abb. 1). Alle Experimente mit den T-Jurkat Lymphozyten

wurde in Krebs-Ringer-Lösung durchgeführt (in mM: 120 NaCl; 4,7 KCl; 1,2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,2 MgSO<sub>4</sub>, 1 CaCl<sub>2</sub>, 20 HEPES pH 7,3; 10 Glucose; 1 mg/ml BSA).

### **3.2. Die Messung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>**

Der Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 (Grynkiewicz et al., 1985) diente bei den hier dargestellten Messungen als Ca<sup>2+</sup>-Indikator. Er arbeitet nach dem Prinzip der Zwei-Wellenlängen-Anregungs-Fluorochrome. Auf eine genaue Beschreibung der Wirkungsweise soll hier verzichtet werden, da sie im Abschlußbericht des Projektes "Der Einfluß hochfrequenter elektromagnetischer Felder des Mobilfunks auf die Calcium-Homöostase von Herzmuskelzellen und Lymphozyten" enthalten ist und da in der Literatur schon vielfach beschrieben wurde (Übersichtsartikel: Thomas und Delaville, 1991)

#### **3.2.1 Die Beladung der Zellen mit Fura-2**

Zur Messung der [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> haben wir die Zellen mit dem Ca<sup>2+</sup>-Indikatorfarbstoff Fura-2 beladen. Er ist in zwei chemischen Varianten erhältlich, zum einen als membranimpermeables Salz und zum anderen in der membrangängigen Variante als Acetoxymethylester (Fura-2/AM). Werden die Zellen in einer Lösung, die Fura-2/AM enthält inkubiert, dann gelangt der Farbstoff in das Zytoplasma der Zellen. Dort wird durch die Aktivität der zelleigenen Esterasen die Acetoxymethylgruppe abgespalten, und er wird in die membranimpermeable Variante umgewandelt. Er bleibt also im Zytoplasma "gefangen" und reichert sich unter unseren Versuchsbedingungen zu einer Konzentration zwischen 50 und 100 nM an. Lymphozyten wurden für 30-60 min bei 37°C in Krebs-Ringer-Lösung mit 2 - 4 µM Fura-2/AM inkubiert.

### 3.2.2 Die Vorgehensweise bei der Messung der $[Ca^{2+}]_i$

Die Messung erfolgte mittels computergestützter Bildanalyse. Die einzelnen Schritte der Messung und Auswertung sind in dem Einsatzfenster nebenstehend aufgelistet. Im vorliegenden Fall wurden Fluoreszenzbilder, die durch alternierende Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 340 und 380 nm erzeugt wurden, digitalisiert. Pixel für Pixel wird das Verhältnis 340/380 nm errechnet und das Bild neu zusammengesetzt. Dieses Verhältnis ist ein Maß für die Calcium-Konzentration. Es wird farbcodiert (Falschfarbdarstellung) und dann als  $Ca^{2+}$ -Verteilung innerhalb der Zellen dargestellt (Beispielbilder in Abb. 7). Für die Aufnahme der Bilder wurde das Hamamatsu Programm ICMS (Intracellular Ion Measurement System), Ver. 4.1 verwendet. Die Auswertung wurde mit Hilfe eines selbstentwickelten Bildverarbeitungs-Programmes vorgenommen. Während eines Experimentes wurden die Bildpaare jeweils in einem Abstand von 10 s aufgenommen. Die gesamte Beobachtungszeit betrug immer 1500 s. Durch die Beschränkung auf 150 Belichtungen läßt sich bei der gewählten Bildfrequenz das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs weitgehend vermeiden.

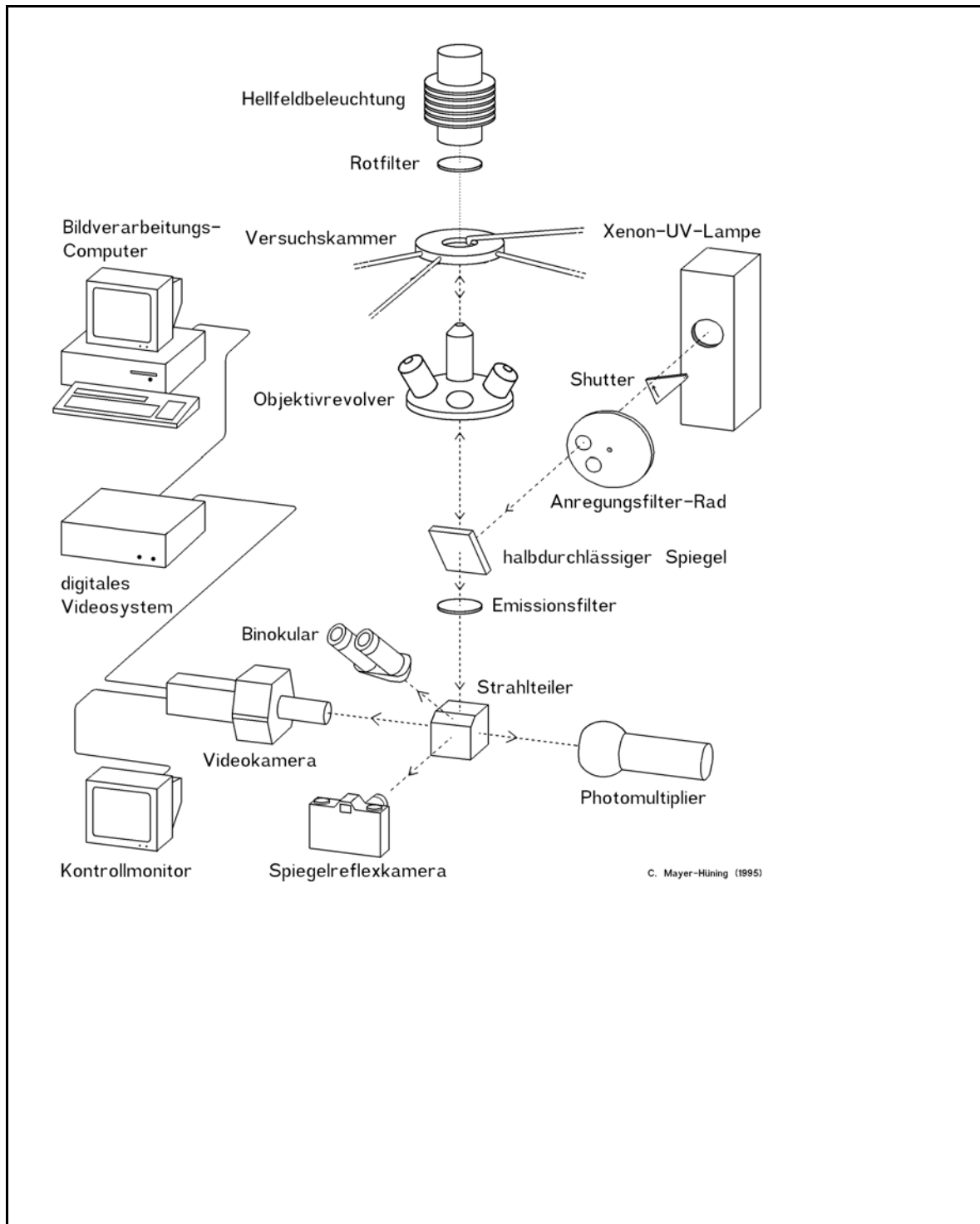
Um zu ermitteln, wie die  $[Ca^{2+}]_i$  sich in einer Zelle während eines Experimentes ändert, wird diese Zelle mit einem Meßfenster versehen. In diesem Meßfenster wird die  $[Ca^{2+}]_i$  in jedem Bild gemessen und anschließend gegen die Zeit aufgetragen. In Abbildung 5 sind die Meßfenster eines Experimentes in die entsprechenden Zellen eingetragen, um das Verfahren zu verdeutlichen.

Zur Aufnahme dieser Bilder muß der Versuchsstand eine Reihe von speziellen Komponenten aufweisen, die im folgenden Kapitel näher beschrieben werden sollen.

#### Ablauf einer Messung und ihre Auswertung

1. Beladung der Zellen mit Farbstoff
2. Messung des Dunkelstromes der Kamera
3. Aufnahme eines Background-Wertes für die 340 und 380 nm Bilder
4. Aufnahme einer Bildserie, jeweils Bildpaare 340-380
5. Korrektur der Originalhelligkeiten um Dunkelstrom und Background
6. Quotientenbildung (pixelweise) für jedes Bildpaar
7. Grauwertspreizung und Darstellung in Falschfarben
8. Projektion eines Meßfensters auf jede Zelle
9. Verfolgen der  $[Ca^{2+}]_i$  in dem Meßfenster während des Ablaufes des Experimentes
10. Normieren der Meßwerte
11. Mittelung der Meßwerte aller Zellen über die Zeit.

### 3.3 Der Versuchsaufbau



Der Versuchsstand besteht aus zwei Funktionseinheiten: Eine dient der Messung der  $[Ca^{2+}]_i$ , die zweite der Erzeugung und Applikation der hochfrequenten elektromagnetischen Felder. Beide sollen hier getrennt beschrieben werden.

### **3.3.1 Die für die Messung der $[Ca^{2+}]_i$ erforderlichen Komponenten des Versuchsaufbaus**

Im Prinzip besteht der Versuchsaufbau aus einem inversen Mikroskop, welches auf einem schwingungsgedämpften Tisch aufgebaut ist. Abbildung 2 gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau. Das Mikroskop ist mit einer Auflichtfluoreszenzeinrichtung aus einer Xenon-Lampe, einem computergesteuerten Anregungsfilterwechsler und einem Verschuß (shutter), sowie auf der abbildenden Seite einer restlichtverstärkenden Videokamera, einem Bildverarbeitungssystem für "online"-Digitalisierung und mit einer temperierten Versuchskammer für die Zellen ausgerüstet. Die Versuchskammer wird permanent mit Krebs-Ringer-Lösung perfundiert und auf  $37^\circ C \pm 0,5^\circ C$  geheizt. Der Filterwechsler enthält je einen Bandpaßfilter für die Anregungswellenlänge 340 und 380 nm. Der Filterwechsler und der Verschuß erhalten Steuersignale von einem eigenen Rechner, der die Steuersignale des Bildverarbeitungssystems entsprechend umsetzt. Das Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten des Mikroskopes, die zum Teil Eigenentwicklungen sind, ist aus dem Schema in Abb. 2 ersichtlich. Der Versuchsstand entspricht den Kriterien eines Versuchsstandes für Bildverarbeitung nach dem Prinzip der Zweiwellenlängen-Anregungs-Fluorochrome (Tsien und Harootunian, 1990).

### **3.3.2 Die für die Erzeugung des hochfrequenten elektromagnetischen Feldes erforderlichen Komponenten des Versuchsaufbaues**

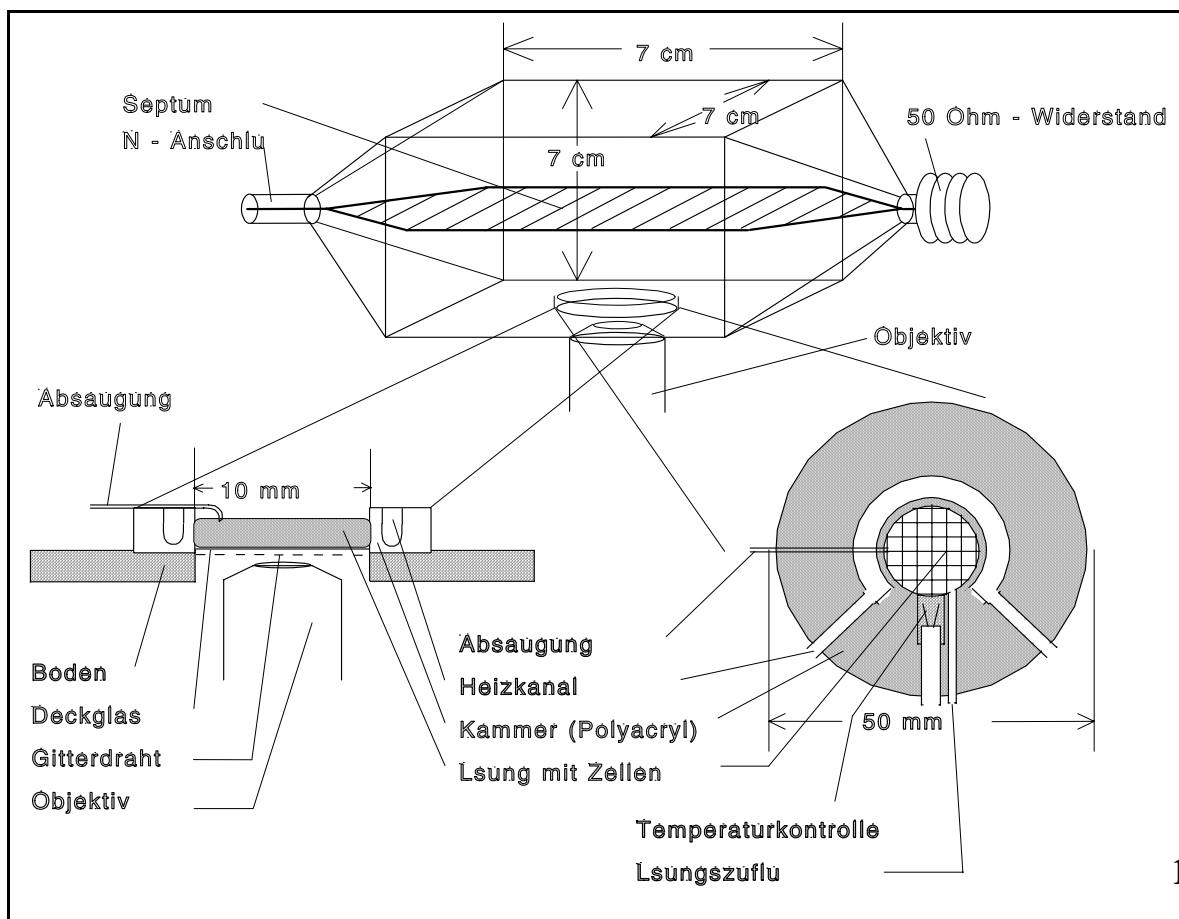
Zur Erzeugung eines gepulsten hochfrequenten elektromagnetischen Feldes mit homogener transversaler elektrischer Feldkomponente sind die folgenden Komponenten notwendig: Ein HF - Sender, ein Modulator und ein aufgeweitetes Leitungsstück (TEM - Zelle). Zur Erzeugung der Hochfrequenz im Bereich 900 MHz bis 1,8 GHz wurde ein Leistungsmeßsender (Rohde & Schwarz, SLRD, BN 41004/50) eingesetzt. Der Sender ist über ein Koaxialkabel (2m RG 213/U, Fa. Suhner) an die TEM-Zelle angeschlossen. Die TEM-Zelle ist mit einem 50  $\Omega$ -Widerstand abgeschlossen (vgl. Abb. 3). Der Sender wurde nachträglich mit einer Möglichkeit zur externen Modulation ausgerüstet. Der Modulator (Rechteckgenerator) erlaubt eine kontinuierliche Variation der Frequenz von 200 Hz bis 30 kHz und die kontinuierliche Variation des Impuls-/Pauseverhältnisses im Bereich von 0,15 bis 0,8.

Die TEM-Zelle wurde entsprechend den Anforderungen als Aufsatz auf das inverse Mikroskop konzipiert (vgl. Abb. 3). Die technische Lösung zur Entwicklung einer TEM-Zelle als Aufsatz auf ein Mikroskop wurde in Zusammenarbeit zwischen dieser Arbeitsgruppe und der Arbeitsgruppe von Prof. Elsner am Institut für Nachrichtentechnik in Braunschweig gefunden. Die notwendigen Berechnungen zur Entwicklung des Designs der Zelle wurden im wesentlichen im Institut für Nachrichtentechnik in Braunschweig durchgeführt und sind daher an dieser Stelle des Berichtes nicht erläutert. Eine genaue Beschreibung findet sich in dem Abschlußbericht zu dem Verbundvorhaben: "Biologische Wirkungen hochfrequenter elektromagnetischer Felder", Teilbericht: "Expositionseinrichtungen", der von der Braunschweiger Arbeitsgruppe erstellt wurde. Die TEM-Zelle besteht aus zwei Teilen, die voneinander getrennt werden können, dem Oberteil mit Septum (die eigentliche TEM-Zelle) und der rechteckigen Bodenplatte, welche die Versuchskammer mit allen für das biologische Material notwendigen Einrichtungen enthält (vgl. Abb. 4). Bodenplatte und Versuchskammer wurden in Bonn konzipiert und hergestellt. Die Versuchskammer soll daher hier genauer beschrieben werden.

Dem Boden der TEM - Zelle kommen eine Reihe von Aufgaben neben der reinen HF-Abschirmung zu: Das Probenvolumen (200  $\mu$ l Perfusionsflüssigkeit sowie die Zellen) befindet sich in einem Polyacrylglasbehälter (s. Abb. 3). Zum Austausch der auf 37°C vortemperierten Flüssigkeit verfügt dieser über einen Zulauf am Boden sowie einen doppelten Ablauf an der Flüssigkeitsoberfläche. Weiterhin läuft Heizflüssigkeit in einem Ringkanal um das

Probenvolumen herum, um Wärmeverluste zu vermeiden. Ein Temperaturfühler mißt die Flüssigkeitstemperatur im Probenvolumen (Genauigkeit  $\pm 0,2^\circ \text{C}$ ). Seine Tauglichkeit unter HF - Applikation wurde in Vorversuchen sichergestellt. Es wurden Lösungen bekannter Temperatur in Anwesenheit und Abwesenheit der hochfrequenten Felder mit dem Meßsystem gemessen. Um evtl. Störungen des hochfrequenten Feldes auszuschließen wurden die ausgewerteten Versuche in einer Kammer ohne Temperaturfühler durchgeführt. Zur Beobachtung der Zellen durch das Deckglas am Kammerboden verfügt die TEM - Zelle über eine Öffnung von 1 cm Durchmesser, die jedoch zur HF - Abschirmung mit einem dünnmaschigen Metallgitter (Fa. Rhodius, Weissenburg) abgedeckt ist, welches bezüglich der Maschenweite ( $\approx 1 \text{ mm}$ ) einen Kompromiß zwischen Lichtdurchlässigkeit und HF - Abschirmung darstellt. Während der Experimente wird also durch das Metallgitter hindurch mikroskopiert, wobei das Objektiv keinen direkten Kontakt zum Gitter hat.

Sämtliche Schläuche sind quetschsicher durch Bohrungen nach außen geführt. Der obere Teil der TEM - Zelle wird jeweils zum Einfüllen der Zellen (und zum Reinigen) entfernt. Der gesamte Aufbau befindet sich auf dem Gleittisch eines invertierten Mikroskopes (Zeiss IM 35). Die Verwendung des extrem dünnen Metallgitters (Drahtstärke 0,05mm) und der dünnsten verfügbaren Deckgläser (Dicke  $0,1 \pm 0,02 \text{ mm}$ ) erlaubt die Verwendung der unterschiedlichsten



Objektive bis 100 x mit sehr geringem Arbeitsabstand.

Der bei dieser Geometrie des Aufbaus erzielte SAR-Wert ("specific absorption rate") wurde in Zusammenarbeit mit dem Institut für Nachrichtentechnik in Braunschweig ermittelt (Kombination aus Messungen und Berechnungen). Genaueres dazu findet sich in dem Bericht der dortigen Arbeitsgruppe zum Verbundvorhaben "biologische Wirkungen hochfrequenter elektromagnetischer Felder", Teilbericht: "Expositionseinrichtungen"

Die Vorgehensweise soll hier nur in Umrissen erläutert werden, wobei die in Bonn durchgeführten Arbeiten unter den Punkten 5. und 6. zusammengefaßt sind:

1. Bestimmung von  $\mu_r$ ,  $\epsilon_r$  und  $\kappa$  (Leitfähigkeit) der Lösung (Tyrode) und des Polyacrylglases, welches die Versuchskammer bildet.
2. Erstellung eines Rechenmodelles für den Innenraum der TEM-Zelle mit dem Programmpaket "MAFIA".
3. Errechnen der Feldverteilung für eine Leistung von 1 W (unmoduliert).
4. Errechnen der im Probenvolumen absorbierten Leistung bei 1 W (unmoduliert) und Umrechnung in den SAR-Wert.

5. Messung der vom Sender an die TEM-Zelle abgegebenen Leistung unter Berücksichtigung der Kabeldämpfung mit einem Bolometer, alle angewendeten Trägerfrequenz- und Pulsmuster wurden einzeln vermessen. Zusätzlich wurden

carrier /MHz	mod. /Hz	% pulse	SAR mean	SAR peak
900	217	14	15.4	123.2
1800	217	14	13.5	96.3

Kontrollmessungen mit einem Spectrumanalyzer und einem Millivoltmeter durchgeführt.

6. Berechnung der tatsächlichen SAR-Werte für die Trägerfrequenzen 900 und 1800 MHz mit ihren unterschiedlichen Pulsmustern.

Die aufgrund dieser Betrachtungen errechneten SAR-Werte (vgl. obige Tabelle) stellen nur räumliche Mittelwerte dar. Bedingt durch das Metallgitter, welches unter der Versuchskammer den Außenleiter der TEM-Zelle bildet, ergeben sich Inhomogenitäten des Feldes in der Ebene der Zellen, denn die Feldlinien konvergieren auf die Drähte des Gitters. Bezieht man dies in die Betrachtungen mit ein, dann zeigt sich, daß das Feld direkt über den Drähten stärker und in der Mitte der Gitterfelder schwächer als die errechneten Werte ist.

Von Prof. Dr. V. Hansen und seiner Arbeitsgruppe am Institut für Theoretische Elektrodynamik an der Universität Wuppertal wurden hierzu Berechnungen durchgeführt, die ergaben, daß das Feldstärke um einen Faktor drei schwankt und die SAR-Werte damit um

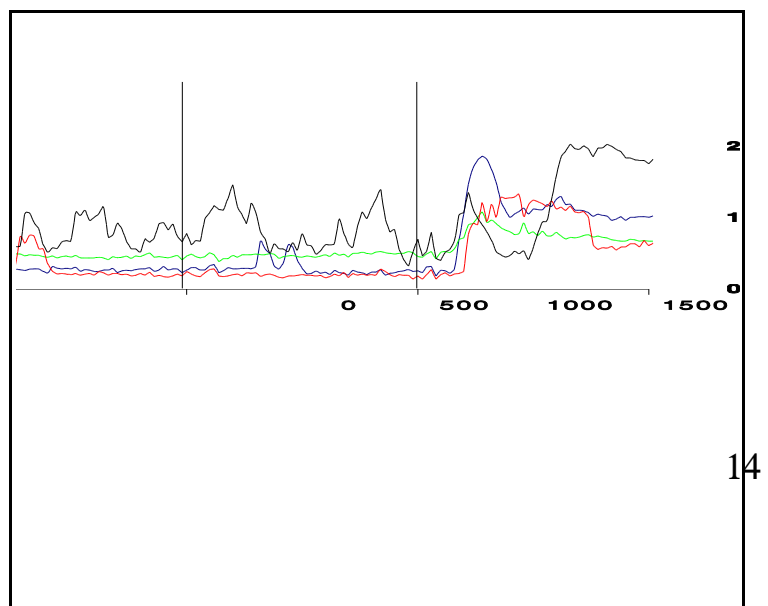
einen Faktor neun.

Die erzielten SAR-Werte liegen über den meisten in früheren Arbeiten eingesetzten Werten (neuronales Gewebe bei 50 MHz, 147 MHz, 450 MHz, 0,5 mW/kg, 0,6 mW/kg, 1,3 mW/kg; Adey, 1980; Blackmann et al., 1980 a, b; die genannten Werte wurden aus Schwartz et al., 1990 entnommen; Herzmuskel bei 240 MHz 0,15 mW/kg und 0,3 mW/kg; Schwartz et al. 1990). Zellen, die in der Nähe der Drähte liegen werden, nehmen ungefähr soviel Energie auf wie bei Dutta et al. (1984; 50 mW/kg) oder Grundler et al. (1992; 40 mW/kg, 0,04 mW/kg und 0,2  $\mu$ W/kg).

In den Versuchen wurden die zwei für den Mobilfunk relevanten Trägerfrequenzen und Pulsationsmuster untersucht, nämlich 900 und 1800 MHz als Trägerfrequenzen mit Rechteckmodulation (Modulationshub 100%). Die Modulation hatte ein Impuls/Pauseverhältnis von 14% bei 217 Hz Modulationsfrequenz entsprechend dem GSM-Standard.

Die an der TEM - Zelle anliegende Leistung betrug bei den Experimenten mit 900 MHz  $p = 5$  W, bei den Experimenten mit 1800 MHz  $p = 2,8$  W, was der maximalen Leistung des eingesetzten Senders entsprach. Der SAR - Wert und die Leistungsflußdichte  $s_m$  für 5 W und 2,8 W wurden weiter oben bereits genannt.

### 3.4 Das Design der Experimente



Alle Experimente wurden nach dem gleichen feststehenden Muster ausgeführt. Jeder Versuchslauf war in drei Phasen von je 500 s eingeteilt: Während der ersten Phase wurden die Zellen ohne Feldeinwirkung beobachtet, während der zweiten Phase wurde das hochfrequente elektromagnetische Feld angewendet oder es erfolgte zur Kontrolle eine Scheinexposition. Die Experimente mit Exposition bzw. Scheinexposition wurden alternierend ausgeführt. In einer dritten Phase wurde das Feld ausgeschaltet und dem Perfusionsmedium (Krebs-Ringerlösung) der Anti CD3 Antikörper in einer Konzentration von 0,5 µg/ml (speziell für Lymphozyten selektierter AK Leu-4, Fa. Becton Dickinson) als chemischer Stimulus zugesetzt, um so eine Antwort der Zellen zu provozieren. Diese Antwort konnte als Positivkontrolle angesehen werden. Theoretisch sollten nach Herstellerangaben 65 - 80% der T-Lymphozyten auf den Antikörper reagieren. Der Ablauf eines Experimentes ist am Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  in vier Zellen in Abb. 4 exemplarisch dargestellt. Das so gewählte experimentelle Design erlaubte eine teilweise automatisierte Auswertung wie in der Einleitung als Ziel erwähnt.

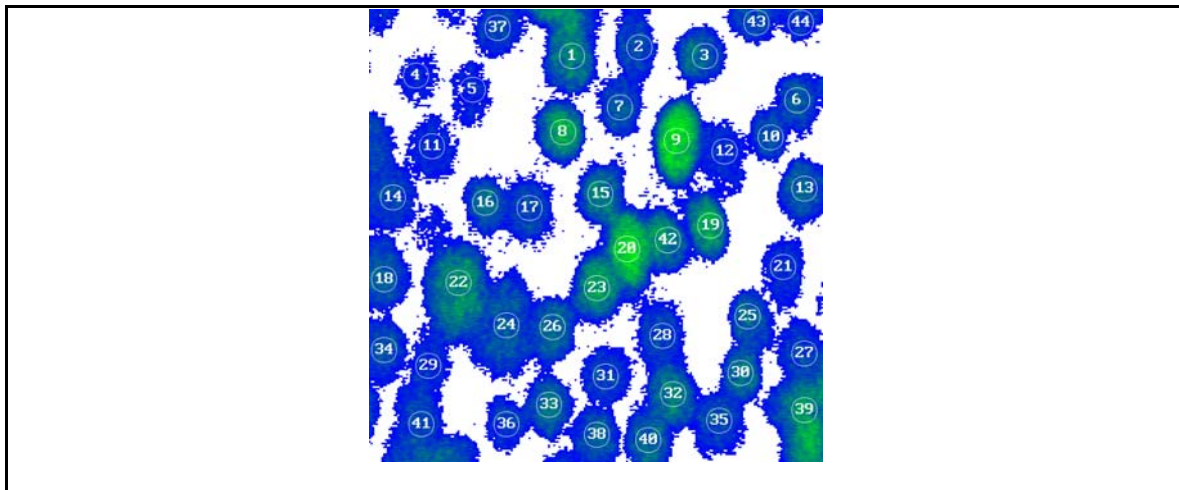
### 3.5. Die Auswertung

Um das Verhalten der Zellen unter dem Einfluß des hochfrequenten elektromagnetischen Feldes beziehungsweise der chemischen Stimulation beurteilen zu können, wurde eine spezielle Technik der Auswertung entwickelt (vgl. Ablaufdiagramm in Kap. 3.2.2). Wie in Kap. 3.2.2 schon erwähnt, wurde auf jede Zelle im ratio-Bild ein Meßfenster projiziert (Abb. 5). In diesem Meßfenster wurde die  $[Ca^{2+}]_i$  während des Experimentes verfolgt. Nachdem jede Zelle einzeln ausgewertet war, d.h. 150 Meßwerte der  $[Ca^{2+}]_i$  im Zeitverlauf als Verhältniswerte (ratio-Werte) vorlagen, wurden diese Werte normiert, um eine unterschiedlich starke Beladung der Zellen mit Fura-2 zu korrigieren. Normiert wurde auf das Mittel der ersten drei Meßwerte, welches gleich 100% gesetzt wurde. Man erhielt so den zeitlichen Verlauf der normierten  $[Ca^{2+}]_i$  für die Zelle. Die normierten Meßwerte jeder Zelle wurden anschließend in eine Daten-Matrix geladen. Man konnte dann die zu identischen Zeitpunkten aufgenommenen Meßwerte jeweils mitteln und erhielt so den mittleren Verlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  über alle Zellen eines einheitlichen Experimenttyps. Die für diese Art der Auswertung notwendige "software" wurde während der Vertragslaufzeit erstellt. Die Entwicklung dieser Auswertemöglichkeiten war eine der wesentlichen Voraussetzungen für die Beantwortung der Fragestellung.

Neben dieser Auswertung wurde das Material noch nach den folgenden Kriterien von Hand

ausgewertet:

1. Es wurden die auf die chemische Stimulation reagierenden Zellen (CD3-positiv) von denen getrennt, die nicht auf die Stimulation reagierten (CD3-negativ).
2. Die Gruppen wurden getrennt dargestellt, um zu ermitteln, ob die CD3-positiven Zellen eventuell anders auf das Feld reagierten als die, die keine Reaktion auf die chemische Stimulation zeigten.
3. Zusätzlich wurden alle Zellen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen zeigten, quantifiziert, und zwar in Abhängigkeit von der jeweiligen Versuchsphase, also Vorlauf, Feldexposition oder Scheinexposition. Dies ermöglicht eine differenzierte Darstellung der Aktivität und erlaubt auch die Wahrnehmung kleiner Verschiebungen in der Aktivität, die auf die Einwirkung des Feldes zurückzuführen sein könnten.



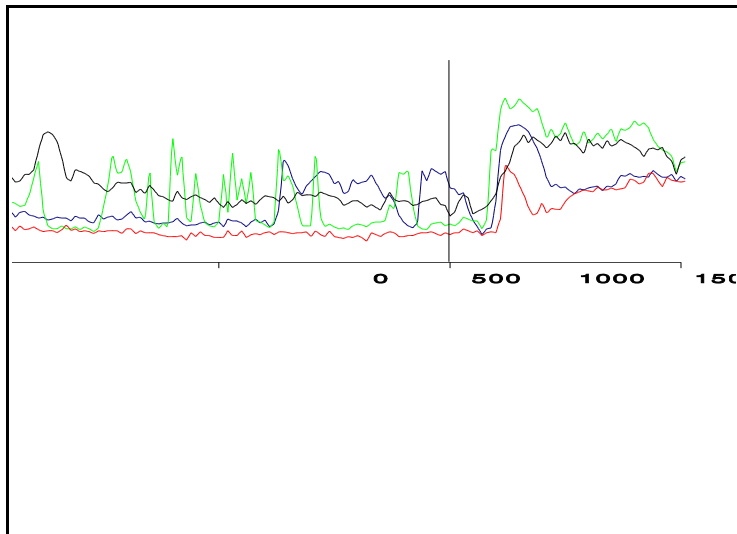
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Die Ergebnisse zur Spontanaktivität

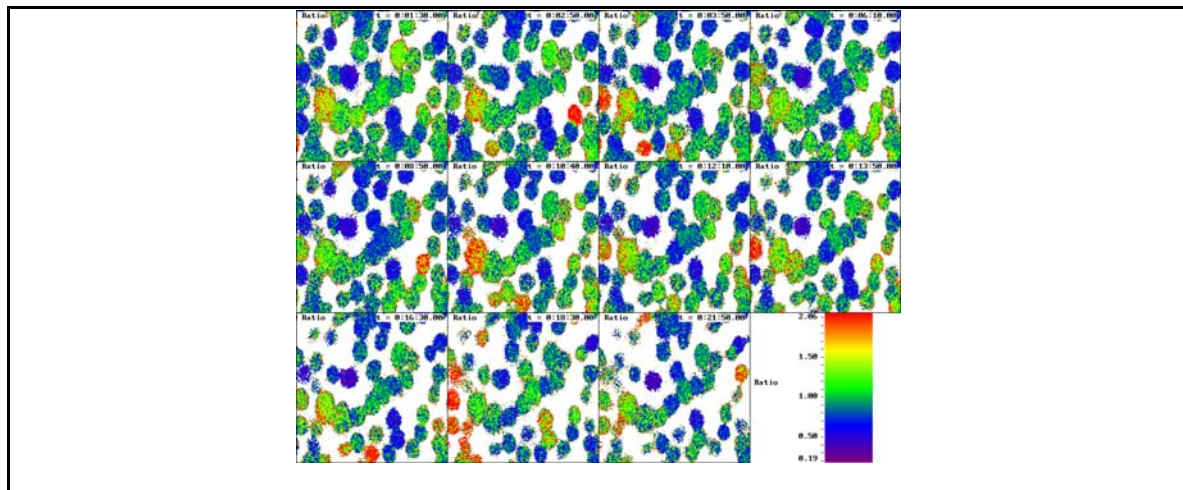
Im Laufe dieser Studie wurden Messungen an insgesamt 1272 T-Jurkat Lymphozyten in 51 Experimenten durchgeführt. Es wurde versucht, durch eine Reihe von Veränderungen in der Behandlung der Zellen und im Versuchsdesign einen besonders schonenden Versuchsablauf zu entwickeln. Dazu haben sich die folgenden Maßnahmen bewährt:

1. Die T-Jurkat Zellen wurden erst unmittelbar vor dem Versuch aus den Kulturflaschen entnommen. Damit konnten die Zellen möglichst lange in ihrer optimalen Umgebung frei flotieren.
2. Nach der Entnahme wurden die Zellen nicht zur Reinigung und Anreicherung zentrifugiert, sondern konnten frei sedimentieren. Auf das früher notwendige Aufzentrifugieren der Zellen auf Glasobjektträger zur Verbesserung der Anheftung konnte verzichtet werden.
3. Die Zellen wurden mit dem Indikatorfarbstoff in einem 1:1 Übergangsgemisch aus Kulturlösung und Versuchslösung, die den Farbstoff enthielt schonend inkubiert; erst danach erfolgte die Übertragung der Zellen in reine Versuchslösung.
4. Die Inkubation mit dem Indikatorfarbstoff Fura-2/AM wurde in flachen Behältern ohne Verdichtung der Zellen durchgeführt, um eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung während dieser Zeit zu erzielen und um eine gleichmäßigere Anfärbung der Zellen zu erhalten.
5. Der Einsatz eines neuen Mikroskopes mit verbesserten optischen Komponenten ermöglichte eine Verminderung der Farbstoffkonzentration. Dies führt zu einem höheren Auflösungsvermögen der  $Ca^{2+}$ -Konzentrationsmessung, denn in höheren Konzentrationen kann der Farbstoff kleine intrazelluläre Calciumausschüttungen abpuffern und damit unsichtbar machen.
6. Auch auf die Anheftung der Zellen mit Poly-L-Lysin an die Glasunterlage, um ein Abspülen durch die Perfusion zu verhindern, konnte verzichtet werden. Bei entsprechend eingestellter Zelldichte und sorgfältiger Konstanthaltung der Temperatur bei ausgeschalteter Perfusion konnten die Zellen nur durch Sedimentation unter konstanter Beobachtung direkt an den Kammerboden angeheftet werden.
7. Eine Verlängerung der Vorlaufzeit in der TEM-Zelle bei laufender Perfusion bis zum Start des Versuchs wurde als "Eingewöhnungsphase" dem Experiment vorangestellt.

Alle diese Maßnahmen haben den experimentellen Ablauf wesentlich komplizierter gemacht und verlängert, dafür haben sie auch zu erheblich vitaleren Zellen geführt, wie an der Zahl spontaner  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen abzulesen ist. Früher zeigten in Versuchen außerhalb der TEM-



Zelle ca. 10% der Zellen spontan  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, in der TEM-Zelle waren es weniger als



3%. Dies hat sich erheblich geändert, denn in der hier präsentierten Serie zeigten von 1272 insgesamt untersuchten Zellen 943  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Oszillationen; dies entspricht 74%. Diese Oszillationen wurden in der TEM-Zelle registriert. Sie traten auch in Abwesenheit eines Feldes in der TEM-Zelle auf (Abb. 6).

Auch aus den Farbbildern eines Originalexperimentes wird die Spontanaktivität während der An- und der Abwesenheit eines hochfrequenten Feldes ersichtlich (Abb. 7).

#### 4.2 Einfluß des Feldes mit einer Trägerfrequenz von 900 MHz

Unter der Einwirkung eines 900 MHz Feldes gepulst mit 217 Hz wurden insgesamt 449 Zellen untersucht. Neben den exponierten Zellen wurden alternierend auch 384 nicht exponierte

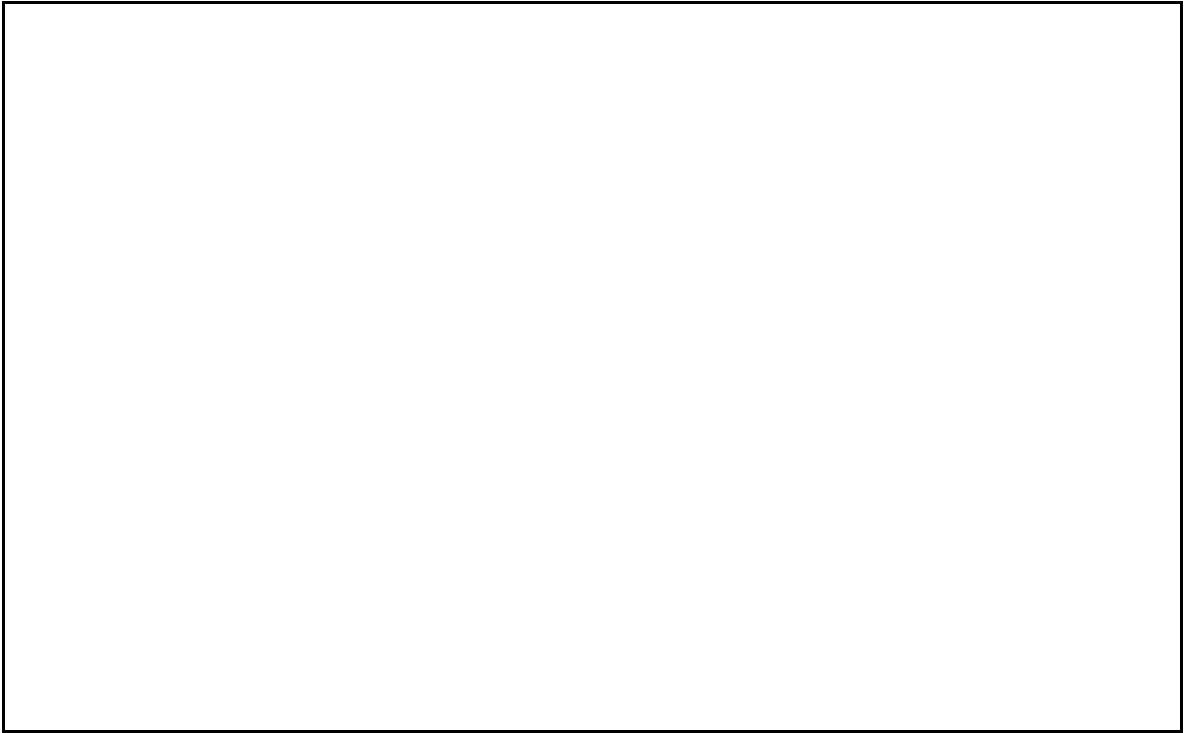
Zellen gemessen. Die Zellen wurden je nach dem, ob sie  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen entwickelten oder nicht und je nach dem, ob sie exponiert waren oder nicht unterschiedlichen Gruppen zugeordnet. Die Ergebnisse sind in der unten folgenden Tabelle dargestellt.

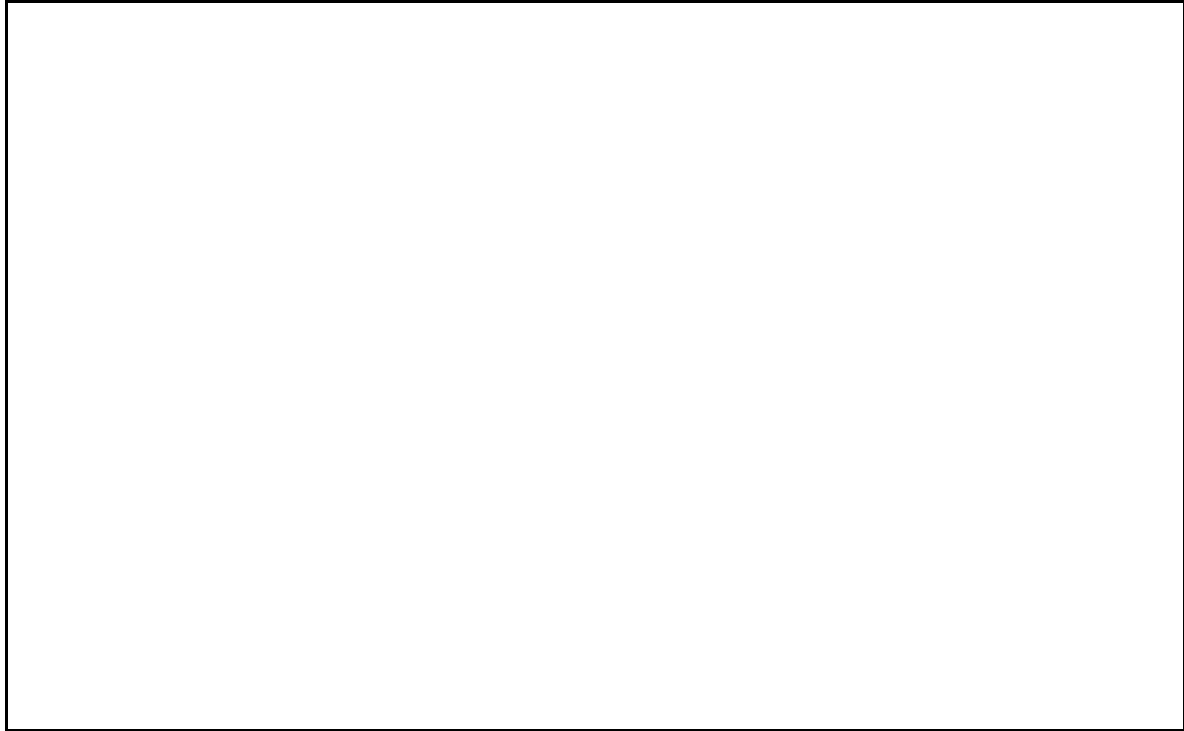
<b>900 MHz, 217 Hz, <math>\approx</math> 5W</b>			
	Zellgesamtheit	CD3-positiv	CD3-negativ
alle Zellen	449 $\triangle$ 100 %	299 $\triangle$ 67,0 %	150 $\triangle$ 33,0 %
1. alle aktiven	345 $\triangle$ 76,8 %	248 $\triangle$ 82,9 %	97 $\triangle$ 64,7 %
2. ständig aktiv	204 $\triangle$ 45,4 %	137 $\triangle$ 45,8 %	67 $\triangle$ 44,7 %
3. nur im Feld	125 $\triangle$ 27,8 %	99 $\triangle$ 33 %	26 $\triangle$ 17 %
4. nur im Vorlauf	16 $\triangle$ 3,6 %	12 $\triangle$ 4 %	4 $\triangle$ 2,7 %

<b>Kontrollen</b>			
	Zellgesamtheit	CD3-positiv	CD3-negativ
alle Zellen	384 $\triangle$ 100 %	278 $\triangle$ 72,0 %	106 $\triangle$ 28,0 %
1. alle aktiven	282 $\triangle$ 73,4 %	221 $\triangle$ 79,5 %	61 $\triangle$ 57,5 %
2. ständig aktiv	167 $\triangle$ 43,5 %	127 $\triangle$ 45,7 %	40 $\triangle$ 37,7 %
3. nur Scheinexp.	100 $\triangle$ 26 %	85 $\triangle$ 30,6 %	15 $\triangle$ 14,1 %
4. nur im Vorlauf	15 $\triangle$ 3,9 %	9 $\triangle$ 3,2 %	6 $\triangle$ 5,7 %

In der Tabelle sind die Zellen, die in einer oder mehreren Phasen des Experimentes aktiv sind, aufgelistet. Es wurde ausgerechnet wieviele Zellen auf die chemische Stimulation reagierten und wieviele nicht; weiterhin wurde errechnet wieviele Zellen dieser beiden Gruppen in den einzelnen Phasen der Experimente  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen zeigten, Dabei bedeutet "nur" in der Tabelle "nur oder überwiegend". Die Ergebnisse an den CD3-negativen Zellen, also jenen, die auf die Stimulation nicht reagiert haben, sind von denen, die auf die Stimulation reagiert haben (CD3-positiv), getrennt aufgeführt. Einige Tendenzen, die von der Einwirkung des hochfrequenten elektromagnetischen Feldes unabhängig sind, sollen zuerst erläutert werden. Sowohl die exponierten wie die scheinexponierten Zellen reagierten zu ca. 70% auf die Stimulation mit Anti CD3 Antikörper - Feldgruppe mit 67% und die Kontrollgruppe mit 72%. Die Zellen sprachen also gut auf die chemische Stimulation an. Betrachtet man die Gesamtheit

der Zellen, die während einer der beiden ersten Phasen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen zeigen, dann erkennt man in beiden Gruppen, daß die CD3-negativen Zellen etwas weniger aktiv sind als die CD3-positiven Zellen - 82,9% der CD3-positiven Zellen, die im Feld waren, und 79,5% der CD3-positiven Kontrollen entwickelten während des Experimentes  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen; bei den CD3-negativen Zellen waren es 64,7% bzw. 57,5%. Von besonderem Interesse für das Projekt ist natürlich der Vergleich der Ergebnisse aus der Phase zwei des Experimentes. Die entsprechenden Auswertungen finden sich unter Punkt 3. der jeweiligen Tabelle. Bezogen auf alle Zellen waren während der Anwesenheit des hochfrequenten Feldes 27,8% der Zellen ausschließlich oder überwiegend aktiv, während zum gleichen Zeitraum in den Kontrollexperimenten 26% der Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen zeigten. Bei den CD3-positiven Zellen waren 33% der Zellen während der Feldeinwirkung aktiv und 30,6% während der Scheinexposition. Bei den CD3-negativen Zellen oszillierte die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  während der Feldanwendung bei 17% und während der Scheinexposition bei 14,1%. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind also in allen Fällen klein, wobei die Zellgruppe, die dem Feld ausgesetzt war, etwas aktiver zu sein scheint. Allerdings gilt dies auch für die Gruppe von Zellen, die ständig aktiv sind, also sowohl während des Vorlaufes als auch während der Exposition oder der Scheinexposition. Ständig aktiv waren aus der Gruppe der exponierten 45,4% und aus der Gruppe der nichtexponierten Zellen 43,5%. Also war die Gruppe der exponierten Zellen mö glicherweise von vornherein etwas aktiver.

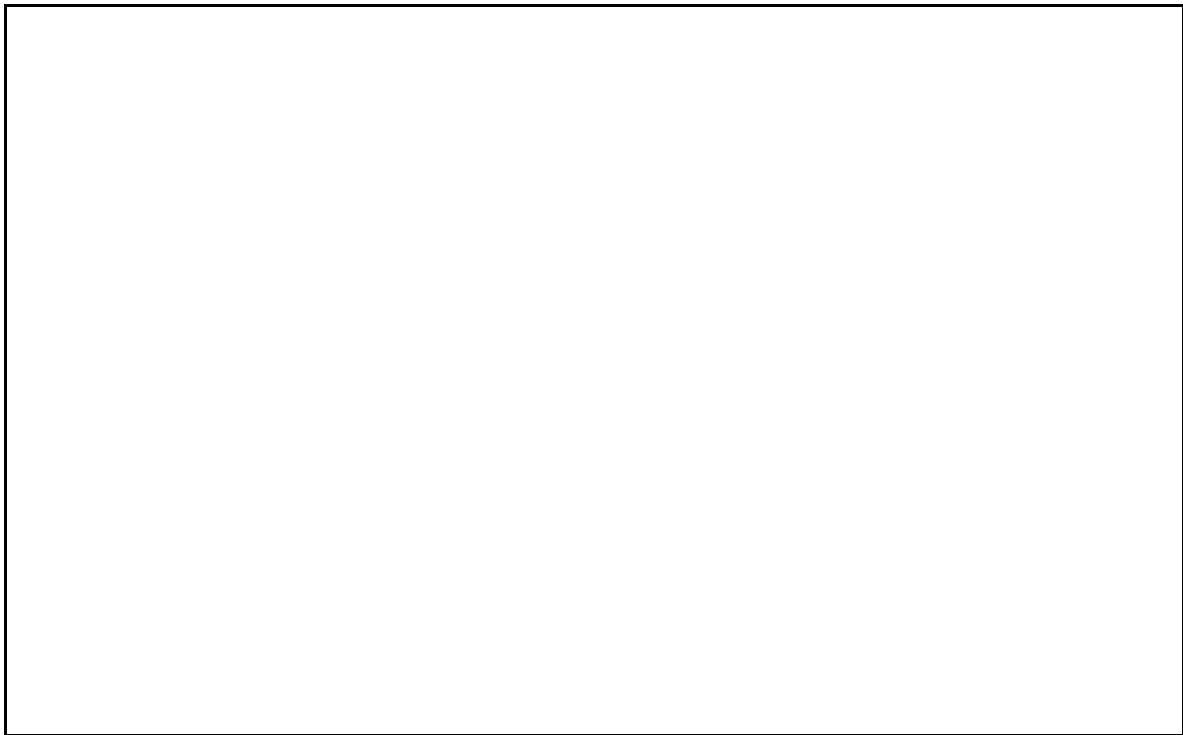




Bei dieser Art der Auswertung geht die Information über die Amplitude oder die Frequenz der  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen nicht mit ein. Um diese Information mit zu erfassen, haben wir die in Kap. 3.4.2 beschriebene Methode angewendet. Dabei wurden alle Messungen normiert und gemittelt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 8-11 dargestellt. Dabei wurden wie in den Tabellen wieder drei Gruppen von Zellen gebildet. In einer befinden sich alle Zellen (Abb. 8), in der zweiten alle, die auf die chemische Stimulation positiv reagieren (Abb. 9) und in der dritten die, die nicht auf die chemische Stimulation reagieren (Abb. 10). Da die Mehrzahl der Zellen auf die chemische Stimulation reagiert, ähneln sich die Abbildungen 8 und 9. Alle vier Registrierungen zeigen am Anfang der ersten Phase des Experimentes einen deutlichen Abfall der gemessenen Werte. Dieser Abfall tritt regelmäßig am Anfang eines Experiments auf. Er stellt einen nicht artefiziellen Abfall der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bei einer Anzahl von Zellen dar. Wir vermuten, daß die Zellen entweder durch das Einbringen in die Versuchskammer oder durch die erste Belichtung mit dem UV-Anregungslicht ihre  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erhöhen, und man beobachtet dann am Beginn des Experimentes eventuell die abfallende Flanke der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Nach ca. 200 s hat sich die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  stabilisiert, und die Standardabweichung hat ebenfalls eine weitgehend gleichbleibende Größe angenommen. Als Antwort auf die chemische Stimulation mit dem Anti CD3 Antikörper ist ein deutlicher Anstieg der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sichtbar. Auch die Standardabweichung nimmt während dieser Phase des Experimentes stark zu. Dies liegt an der heterogenen Antwort der Zellen auf den Stimulus. In Abbildung 9 tritt der Effekt der chemischen Stimulation

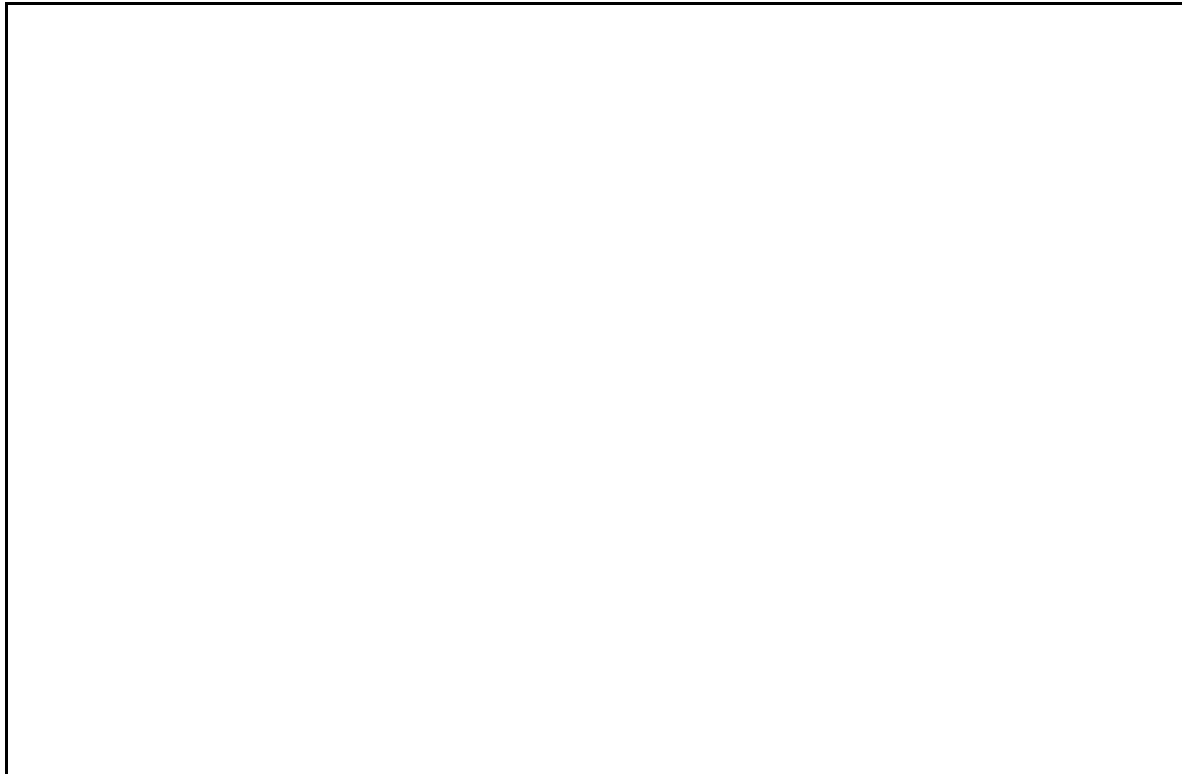
natürlich stärker hervor, da hier nur die reagierenden Zellen in der Auswertung berücksichtigt wurden.

Vergleicht man die Regressionsgerade, die die Werte im Vorlauf annähert (grün) mit der, die die Werte während der Exposition im Feld annähert (rot), dann sieht man in Abbildung 8 und stärker noch in Abbildung 9 einen kleinen Anstieg der Meßwerte beim Einschalten des Feldes



bzw eine Abstufung der Regressionsgeraden. Dieser Effekt ist bei den Zellen, die nicht auf die chemische Stimulation reagieren (Abbildung 10) nicht erkennbar. Ein Vergleich der Ergebnisse an den exponierten Zellen mit denen, die nur scheinexponiert wurden erscheint hier notwendig. In Abbildung 11 sind die entsprechenden Ergebnisse dargestellt. Vergleicht man Abbildung 9 mit Abbildung 11, dann fallen zwei Unterschiede sofort ins Auge:

1. Das Ergebnis der chemischen Stimulation ist bei den Kontrollen ein zweiphasiger Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ .



2. Die Regressionsgeraden zwischen 200 und 1000 s, die die Werte während des Vorlaufes und während der Scheinexposition annähern sind praktisch identisch, bei den exponierten Zellen unterscheiden sie sich dagegen etwas.

Die Zweiphasigkeit der Antwort auf die chemische Stimulation ist eher durch kleine Unterschiede in der Zugabe des Antikö rpers zu erklären als durch die Einwirkung des Feldes vorher. Genaueres dazu wird in der Diskussion aufgeführt werden. Etwas anders stellt sich die Situation bei der kleinen Abweichung nach dem Einschalten des Feldes dar. Dies kö nnte ein zufälliger Einfluß sein, solche zufallsbedingten Effekte haben wir schon mehrfach beobachtet. Sie traten bei einer Reproduktion der Versuche bzw. bei einer Vergrö ßerung der Stichprobe nicht mehr auf. Bemerkenswert ist allerdings, daß der gleiche Einfluß sich auch bei den Experimenten mit 1800 MHz zeigt. Ein tatsächlicher Einfluß des Feldes ist also bislang nicht auszuschließen.

#### **4.3 Einfluß des Feldes mit einer Trägerfrequenz von 1800 MHz**

Die Untersuchungen mit 1800 MHz Trägerfrequenz wurden nach dem gleichen Schema ausgeführt wie die bei 900 MHz Trägerfrequenz, allerdings zeitlich vor den Untersuchungen bei 900 MHz. Es fällt auf, daß die Stichprobenumfänge deutlich geringer sind als bei

900 MHz. Dies ist darauf zurückzuführen, daß Prof. Hansen uns bei der Zwischenpräsentation geraten hat, keine Versuche mit 1800 MHz in der TEM-Zelle durchzuführen, daher haben wir die entsprechenden Versuche hier nicht mit der gleichen Intensität weitergeführt wie die bei 900 MHz.

<b>1800 MHz, 217 Hz, ≈ 2,8 W</b>			
	Zellgesamtheit	CD3-positiv	CD3-negativ
alle Zellen	237 $\triangle$ 100 %	170 $\triangle$ 72,0 %	67 $\triangle$ 28,0 %
1. alle aktiven	178 $\triangle$ 75,0 %	136 $\triangle$ 80,0 %	42 $\triangle$ 62,7 %
2. ständig aktiv	120 $\triangle$ 50,6 %	88 $\triangle$ 51,8 %	32 $\triangle$ 47,8 %
3. nur im Feld	42 $\triangle$ 17,7 %	36 $\triangle$ 21,2 %	6 $\triangle$ 9,0 %
4. nur im Vorlauf	16 $\triangle$ 6,8 %	12 $\triangle$ 7,0 %	4 $\triangle$ 6,0 %

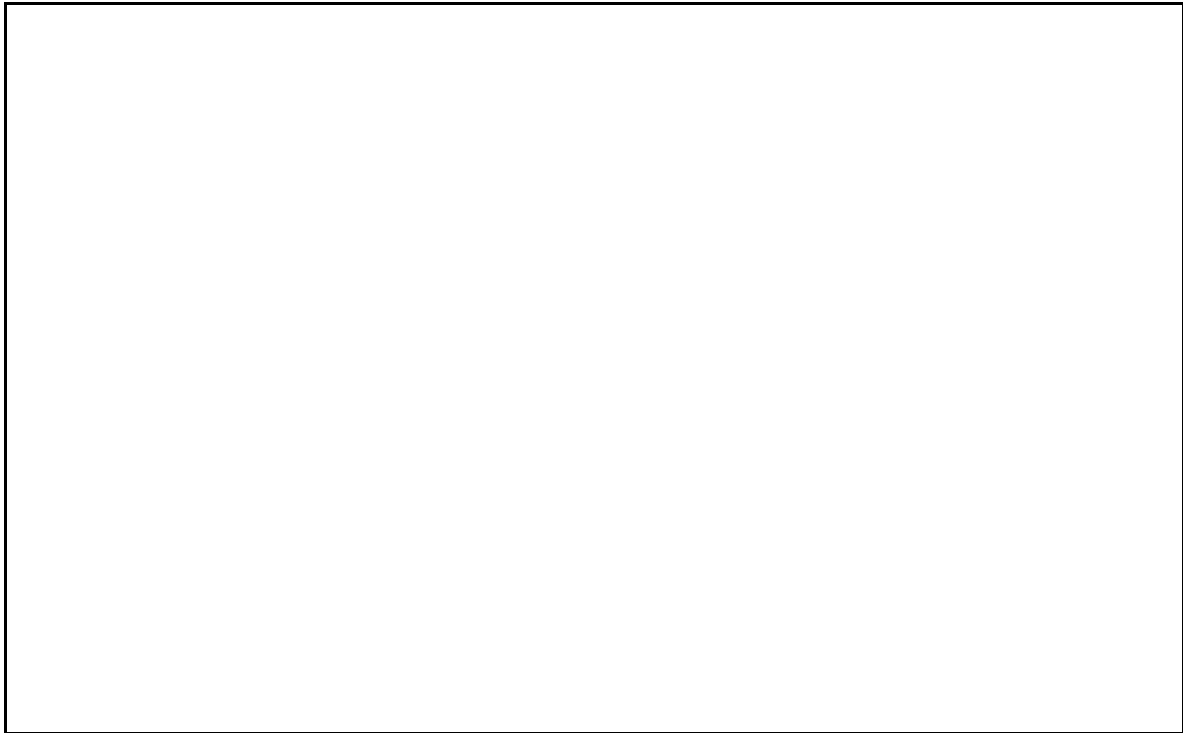
  

<b>Kontrollen</b>			
	Zellgesamtheit	CD3-positiv	CD3-negativ
alle Zellen	202 $\triangle$ 100 %	108 $\triangle$ 53,0 %	94 $\triangle$ 47,0 %
1. alle aktiven	138 $\triangle$ 68,0 %	86 $\triangle$ 79,6 %	52 $\triangle$ 55,3 %
2. ständig aktiv	107 $\triangle$ 53,0 %	67 $\triangle$ 62,0 %	40 $\triangle$ 42,6 %
3. nur Scheinexp.	22 $\triangle$ 10,9 %	14 $\triangle$ 13,0 %	8 $\triangle$ 8,5 %
4. nur im Vorlauf	9 $\triangle$ 4,5 %	5 $\triangle$ 4,6 %	4 $\triangle$ 4,3 %

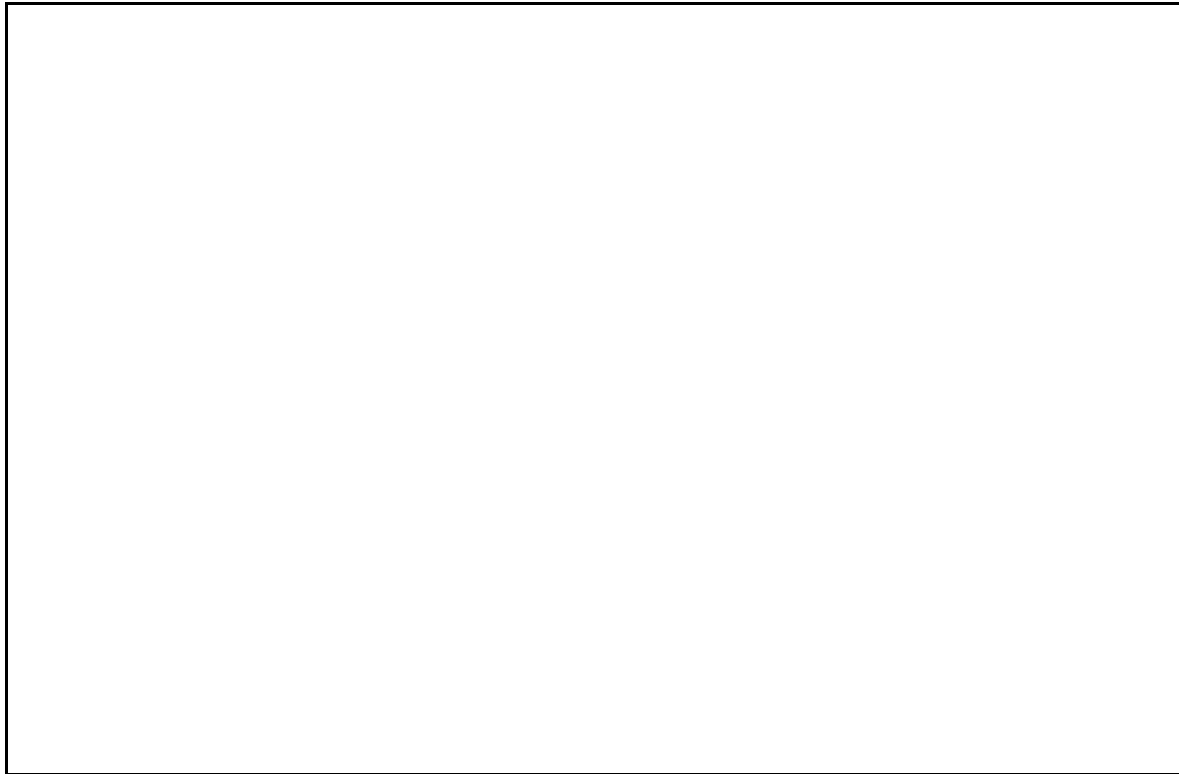
Die Zahl der Zellen, die Ca<sup>2+</sup>-Oszillationen entwickelten wurde genauso ausgewertet und in Tabellen zusammengefaßt wie bei den in Kapitel 4.2 beschriebenen Experimenten. Insgesamt

wurden 439 Zellen untersucht, 237 unter Feld und 202 scheinexponiert. In der Gruppe der Feldexponierten reagierten 72% auf die chemische Stimulation mit Anti CD3 Antikörper, in der Kontrollgruppe 53%. Die Positivreaktion in der Kontrollgruppe liegt damit deutlich unter denen in allen anderen Gruppen. Dies ist wahrscheinlich auf die relativ kleine Stichprobe zurückzuführen. Wie bei den Experimenten mit 900 MHz waren auch hier die CD3-negativen Zellen etwas weniger aktiv als die CD3-positiven Zellen - 80% der CD3-positiven exponierten Zellen und 79,6% der CD3-positiven Kontrollen entwickelten während des Experimentes  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, bei den CD3-negativen Zellen waren es 62,7% bzw. 55,3%. Von besonderem Interesse für das Projekt ist natürlich der Vergleich der Ergebnisse aus der Phase zwei des Experimentes. Die entsprechenden Auswertungen finden sich unter Punkt 3. der jeweiligen Tabelle. Bezogen auf alle Zellen waren während der Anwesenheit des hochfrequenten Feldes 17,7% der Zellen ausschließlich oder überwiegend aktiv, während zum gleichen Zeitraum in den Kontrollexperimenten 10,9% der Zellen  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen zeigten. Bei den CD3-positiven Zellen waren 21,2% der Zellen während der Feldeinwirkung aktiv und 13% während der Scheinexposition. Bei den CD3-negativen Zellen oszillierte die  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  während der Feldanwendung bei 9% und während der Scheinexposition bei 8,5%. Bei diesen Experimenten waren also die Zellen während der Feldexposition wesentlich aktiver als während der Scheinexposition. Es ist natürlich eine wichtige Frage, ob dieser Einfluß des Feldes nur durch die geringe Stichprobe vorgetäuscht wird, oder ob er ein Ergebnis der Feldexposition ist. Besonders die großen Unterschiede zwischen beiden Gruppen auch bezüglich der chemischen Stimulation lassen eher ein Artefakt als einen Einfluß des Feldes vermuten. Die Gruppe der exponierten Zellen war spontan aktiver, so daß die Unterschiede vielleicht auch darauf zurückzuführen sind.

Wie die Experimente unter 900 MHz Trägerfrequenz wurden die Experimente unter 1800 MHz ebenfalls gemittelt dargestellt. Die Gesamtdarstellung aller Zellen in Abbildung 12 zeigt, daß die chemische Stimulation bei diesen Experimenten nicht so stark gewirkt hat wie bei denen mit 900 MHz. Die Höhe der Amplitude ist in dieser Gesamtdarstellung deutlich geringer als bei den davor dargestellten Experimenten. Da der Prozentsatz an Zellen, die auf die Stimulation



reagiert haben hier mit 72% sogar etwas höher ist als bei den Experimenten mit 900 MHz (67%) muß die einzelne Zelle hier wesentlich schwächer reagiert haben.



Bemerkenswert ist, daß die Zellen auch in den Experimenten mit 1800 MHz beim Einschalten des Feldes eine deutliche Reaktion zeigten. Die mittlere  $[Ca^{2+}]_i$  steigt sichtbar an. Dies kommt auch in dem Verlauf der Regressionsgeraden zum Ausdruck. Die Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_i$  beim Einschalten des Feldes zeigt sich noch deutlicher bei den Zellen, die auf die chemische Stimulation reagierten (Abb. 13). Bei den Zellen, die nicht auf die chemische Stimulation reagiert haben ist dieser Effekt praktisch nicht vorhanden (Abb. 14). Vergleicht man die Daten in Abbildung 13, also die Experimente mit exponierten Zellen, die auf die chemische Stimulation reagierten, mit den zugehörigen Kontrollen, die in Abbildung 15 dargestellt sind, dann fällt auf, daß auch bei diesen Kontrollen die Antwort auf die chemische Stimulation relativ niedrig ausfällt. Allerdings erkennt man auch, daß die  $[Ca^{2+}]_i$  zwar stetig ein wenig absinkt, jedoch sind die Abweichungen der Meßpunkte von den Regressionsgeraden gering, und die beiden Regressionsgeraden unterschieden sich nur wenig. Eine so starke Abweichung, wie sie sich in Abbildung 13 kurz nach dem Einschalten des Feldes ergibt, kommt hier nicht vor.

## **5 Diskussion und Bewertung der Versuche**

Vergleicht man die Ergebnisse des Projektes mit den Zielsetzungen, dann muß man feststellen, daß der größte Teil der methodischen Probleme, die die Zellen betreffen, überwunden ist. Die

Zellen zeigten in den hier vorgestellten Versuchen in der TEM-Zelle eine vergleichbare Spontanaktivität wie außerhalb der TEM-Zelle. Durch die schonende Behandlung der Zellen entwickelten sie sogar sehr häufig "spontane"  $\text{Ca}^{2+}$ -Oszillationen, die in der Literatur als Normalverhalten von Lymphozyten beschrieben sind. Durch die schonende Behandlung der Zellen und durch die Wahl speziell selektierter Antikörper wurde im Gegensatz zu den früheren Versuchen eine erfolgreiche chemische Stimulation ermöglicht. Die Zugabe des Antikörpers in der TEM-Zelle zur chemischen Stimulation der Zellen stellt nach wie vor ein kleines Problem dar. Der Zeitpunkt der Zugabe läßt sich nicht so gut festlegen, wie beim Einspritzen in eine offene Versuchskammer, daher kam es zu unterschiedlichen Reaktionen, wie die zweiphasige Antwort in Abbildung 11. Allerdings wurden derartige Antworten auch schon in der Literatur beschrieben. Es ist also möglich, Experimente von reproduzierbarer Qualität mit den Jurkat T-Lymphozyten unter dem Einfluß eines hochfrequenten elektromagnetischen Feldes durchzuführen.

Die Entwicklung eines neuen Auswerteprogrammes, welches speziell auf diese Versuche zugeschnitten ist, erlaubt eine wesentlich differenziertere Analyse der Versuche als früher. Besonders die Darstellung der normierten gemittelten zeitlichen Verläufe der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  macht auch kleine Veränderungen in der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sichtbar. Darüberhinaus wird auf einen Blick ein Eindruck von der Signifikanz der beobachteten Effekte vermittelt.

Zusätzliche methodische Probleme haben sich allerdings bei der Applikationsapparatur ergeben. Innerhalb der Laufzeit des Projektes wurden durch Modellrechnungen am Institut für Theoretische Elektrodynamik der Universität Wuppertal Feldinhomogenitäten in der Versuchskammer klar. Diese Feldinhomogenitäten treten durch das unter dem Boden der Versuchskammer angebrachte Gitter auf. Sie lassen eine genaue Bestimmung des SAR-Wertes für jede einzelne Zelle nicht zu. Darüberhinaus sind die Feldverhältnisse bei 1800 MHz möglicherweise nicht so homogen. Dies hatte zur Konsequenz, daß die Versuche bei 1800 MHz Trägerfrequenz nicht mit der gleichen Intensität weitergeführt wurden, wie die bei 900 MHz.

Da die Zellen während der Versuche ein "normales" Verhalten zeigten und während der Exposition ein Feld im Bereich von mehr als 4 mW/kg mit Sicherheit anwesend war, erscheint eine Diskussion der Ergebnisse in jedem Fall sinnvoll. In den vorliegenden Versuchen hat sich beim Einschalten des Feldes eine kleine transiente Zunahme der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gezeigt. Damit erhebt sich die Frage, ob es sich hier um ein zufälliges Ereignis, ein Artefakt durch das

experimentelle Design oder um einen wirklichen Einfluß des Feldes handelt. Der Anstieg in der  $[Ca^{2+}]_i$  trat bei beiden Trägerfrequenzen auf. Dies macht ein zufälliges Auftreten eher unwahrscheinlich. Trotzdem läßt es sich nicht ausschließen. Ein Artefakt, welches durch das Einschalten des Feldes in der TEM-Zelle auftreten könnte, ist uns nicht bekannt. Dies bedeutet, daß dieser transiente Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  zunächst als abhängig vom Feld einklassifiziert werden muß.

Trotzdem wäre es verfrüht, ihn eindeutig auf die Einwirkung des Feldes ursächlich zurückzuführen; denn in unseren aktuellen Experimenten mit 50 Hz magnetischen Feldern haben wir in einer Zellpopulation mit mehr als 500 Jurkat T-Zellen einen noch deutlicheren Effekt auf die  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet als hier. Dieser Effekt ließ sich allerdings bei einer Wiederholung der Versuche nicht reproduzieren und mußte daher als Artefakt klassifiziert werden. Inwieweit der vorliegende Befund von Bedeutung ist, ließe sich nur durch eine weitere Versuchsserie sicherstellen. Die Hohlleiter für 1800 und 900 MHz, die zur Zeit in Zusammenarbeit mit dem Institut für Theoretische Elektrodynamik der Universität Wuppertal entwickelt werden, sind so ausgelegt, daß sie für eine solche Wiederholung geeignet wären. Bei der Betrachtung der Ergebnisse sollte man bedenken, daß die untersuchte Lymphozyten-Zelllinie von uns ausgewählt wurde, weil sie einerseits in Bezug auf die mögliche Promotion von Leukämie durch elektromagnetische Felder von Interesse ist, und andererseits Studien einer schwedischen Arbeitsgruppe (Lindström et al., 1993; 1994; 1995; Korzh-Sleptsova, 1994) zeigen, daß diese Zellen auf 50 Hz-Magnetfelder mit  $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen reagieren. Wir haben versucht, diese Studien nachzuvollziehen, was ist uns in zweijährigen sehr intensiven Untersuchungen nicht gelang (Gollnick et al., 1994; 1995). Daher müssen wir die Ergebnisse der schwedischen Arbeitsgruppe in Zweifel ziehen. Dennoch würde die in diesem Bericht festgestellte eventuelle Beeinflussung dieser Zellen durch die hochfrequenten Felder mit der These ihrer besonderen Sensitivität für elektromagnetische Felder übereinstimmen.

## 6 Literatur

Adey WR (1980) Frequency and power windowing in tissue interactions with weak electromagnetic fields. *Proc IEEE* 69, 119-125

Bawin SM, Kaczmarek LK, Adey WR (1975) Effects of modulated VHF fields on the central nervous system. *Ann NY Acad Sci* 247, 74-81

Berridge MJ (1993): Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361, 315-325

Blackman CF, Benane SG, Elder JA, House DE, Lampe JA, Faulk JM (1980a): Induction of calcium-ion efflux from brain tissue by radiofrequency radiation: Effect of sample number and modulation frequency on the power density-window. *Bioelectromagnetics* 1, 35-43

Blackman CF, Benane SG, Joines WT, Hollis MA, House DE (1980b): Calcium-ion efflux from brain tissue: Power-density vs. internal field-intensity dependencies at 50-MHz RF radiation. *Bioelectromagnetics* 1, 277-283

Blackman CF, Benane SG, House DE (1991) The influence of temperature during electric- and magnetic-field-induced alteration of calcium-ion release from in vitro brain tissue. *Bioelectromagnetics* 12, 173-182

Carafoli E (1987): Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 56: 395-433

Carson JJ, Prato FS, Drost DJ, Diesbourg LD, Dixon SJ (1990) Time-varying magnetic fields increase cytosolic free  $\text{Ca}^{2+}$  in HL-60 cells. *Am J Physiol* 259, C687-C692

Clapham DE (1995): Calcium signaling. *Cell* 80, 259-268

Dutta SK, Subramoniam A, Ghosh B, Parshad R (1984) Microwave radiation-induced calcium ion efflux from human neuroblastoma cells in culture. *Bioelectromagnetics* 5, 71-78

Dutta SK, Ghosh B, Blackman CF (1989) Radiofrequency radiation-induced calcium ion efflux enhancement from human and other neuroblastoma cells in culture. *Bioelectromagnetics* 10, 197-202

Gollnick F (1992) Aufbau eines Messplatzes und fluorometrische Untersuchungen mit Fura-2 zur Verteilung und regulatorischen Funktion von Calciumionen in lebenden Amöben. Dissertation Mat.-Nat. Fak., Bonn

Gollnick F, Meyer R, Stockem W (1991) Visualization and measurement of calcium transients in Amoeba proteus by fura-2 fluorescence. *Europ J Cell Biol* 55, 262-271

Gollnick F, Pohl U, Conrad G, Bock H, Meyer R (1994) Calcium imaging in freshly isolated human peripheral blood lymphocytes and in a human T-cell line under exposure to 50 Hz magnetic fields. *Abstract Book 16th BEMS-Meeting Copenhagen* 75

Gollnick F, Conrad G, Bock H, Meyer R (1995) Single cell calcium imaging in Jurkat T-Lymphocytes during application of 50 Hz magnetic fields. *Abstract Book 17th BEMS-Meeting, Boston*, 58

Grundler W, Kaiser F, Keilmann F, Walleczek J (1992) Mechanisms of electromagnetic interaction with cellular systems. *Naturwissenschaften* 79, 551-559

Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of  $Ca^{2+}$ -indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260, 3440-3450

Korzh-Sleptsova, Lindström E, Mild KH, Lindström P, Lundgren E (1994) Immediate effect of low frequency magnetic field (50 Hz) on signal transduction in T-lymphocytes in vitro. *Abstract Book 16th BEMS-Meeting, Kopenhagen*, 81

Lindström E, Berglund A, Mild KH, Lindström P, Lundgren E (1994) CD45 Phosphatase activity in Jurkat cells is necessary for intracellular calcium increase as a response to an applied MF. *Abstract Book 16th BEMS-Meeting, Kopenhagen*, 81

Lindström E, Lindström P, Berglund A, Mild KH, Lundgren E (1993) Intracellular calcium oscillations induced in a T-cell line by a weak 50 Hz magnetic field. *J Cell Physiol* 156, 395-398

Lindström E, Lindström P, Berglund A, Mild KH (1995) Intracellular calcium oscillations in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities. *Bioelectromagnetics* 16, 41-47

Meyer R, Hüning C, Pohl U, Wang SY (1994) Die Calcium-Homöostase isolierter Herzmuskelzellen unter der Einwirkung magnetischer Felder. In: Berufsgenossenschaft der Feinmechanik und Elektrotechnik (ed.) Tagungsband - Wirkung niederfrequenter Magnetfelder auf den Organismus. Eigenverlag Berufsgenossenschaft, Köln, 31-38

Meyer R, Hüning C, Pohl U, Gollnick F (1995) Die Auswirkung magnetischer 50-Hz-Felder auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration von erregbaren und nicht erregbaren Zellen. In: K Brinkmann, HC Kärner, H Schaefer (Hrsgb.) Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, Band 4, Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme in schwachen 50-Hz-Magnetfeldern. VDE-Verlag Berlin, Offenbach, 90-109

Moore GE, Gerner RE, Franklin HA (1967) Culture of normal human leucocytes. *J A M A* 199, 519-524

Schwartz JI, House DE, Mealing GA (1990): Exposure of frog hearts to CW or amplitude-modulated VHF fields: selective efflux of calcium ions at 16 Hz. *Bioelectromagnetics* 11, 349-358

Schwartz JI, Mealing GA (1993): Calcium-ion movements and contractility in atrial strips of frog heart are not affected by low-frequency-modulated, 1 GHz electromagnetic radiation. *Bioelectromagnetics* 14, 521-533

Thomas AP, Delaville F (1991) The use of fluorescent indicators for measurements of

cytosolic-free calcium concentration in cell populations and single cells. In McCormack JG, Cobbold PH (eds.) Cellular Calcium- A practical approach. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, New York, Tokyo, 1-54

Tsien RY, Harootunian AT (1990) Practical design criteria for dynamic ratio imaging systems. Cell Calcium 11, 93-110

Walleczek J (1992) Electromagnetic field effects on cells of the immune system: the role of calcium signaling. FASEB J 6, 3177-3185

Weiss A, Wiskocil RL, Stobo JD (1984) The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: A two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level. J Immunol 133, 123-128

Wolke S, Neibig U, Elsner R, Gollnick F, Meyer R (1994) A setup for measurement of intracellular calcium during high frequency application. Abstract Book 16th BEMS-Meeting, Copenhagen, 11

Wolke S, Neibig U, Elsner R, Gollnick F, Meyer R (1995) Intracellular calcium in heart muscle cells is not changed by pulsed high-frequency electromagnetic fields. Abstract Book 17th BEMS-Meeting, Boston, 165

Wolke S, Neibig U, Elsner R, Gollnick F, Meyer R (im Druck) Calcium homeostasis of isolated heart muscle cells exposed to pulsed high-frequency electromagnetic fields. Bioelectromagnetics