3 Material und Methoden

3.1 Zellkultivierung

Für die in-vitro-Untersuchungen wurden Zellen der humanen Leukämie-Zellinie HL60 (DSMZ Nr. ACC 3) und der humanen Burkitt-Lymphom-Zellinie BL70 (DSMZ Nr. ACC 233) verwendet. Die Zellen wurden in 50 ml-Zellkulturflaschen mit Gasaustauschkappen (Falcon, Becton Dickinson Nr. 353108) in einem Begasungsbrutschrank (Heraeus/Kendro BB6220) in Luft in Gegenwart von 5 % CO₂ unter Verwendung der folgenden Medien kultiviert (Tabelle 2).

Tabelle 2: Zellkulturmedien

HL60-Zellen						
500 ml	RPMI 1640 mit 2 g/l NaHCO ₃ und 0,532 g/l N-Acetyl-L- alanyl-L-glutamin	Seromed, Nr. FG 1215				
50 ml	Fötales Kälberserum (30 min bei 56 °C inaktiviert)	Seromed, Nr. S 0115				
10 ml	Penicillin/Streptomycin 10.000 U / 10.000 μg / ml	Seromed, Nr. A 2210				
5 ml	HEPES-Puffer 1M (pH 7,2)	Seromed, Nr. L 1613				
BL70-Zell	BL70-Zellen					
500 ml	RPMI 1640 mit 25 mM HEPES	Gibco, Nr. 42 401-018				
50 ml	Fötales Kälberserum (30 min bei 56 °C inaktiviert)	Seromed, Nr. S 0115				
10 ml	Penicillin/Streptomycin 10.000 U / 10.000 μg / ml	Seromed, Nr. A 2210				
5 ml	Na-Pyruvat 1 mM	Seromed, Nr. L 0473				
5 ml	L-Glutamin 2 mM	Seromed, Nr. U 0280				
Molarität/Konzentration bezogen auf die Stammlösung						

Die Zellpassagen erfolgten alle 3-4 Tage unter einer sterilen Werkbank (Nunc-Mikroflow). Vor der Zellpassage wurde die Zellkultur mikroskopisch hinsichtlich der Morphologie beurteilt. Anschließend erfolgte der Zusatz von frischem Medium im Verhältnis 1:3. Die Zellen wurden wöchentlich 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert (Megafuge 2.0 R, Heraeus), das alte Medium abpipettiert und in frisches Medium überführt.

Alle 8 Wochen oder bei Bedarf wurde zum Ausschluß einer Mykoplasmenkontamination der Mycoplasma-Detection-Kit (Roche Applied Science 1296744) durchgeführt, der die häufigsten Mycoplasmen erfaßt.

Für die Versuche wurden Zellsuspensionen gleicher Zelldichte hergestellt (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zelldichte

HL60-Zellen	BL70-Zellen
40.000 Zellen/ml Suspension	50.000 Zellen/ml Suspension

Dazu wurde die Zellzahl der HL60- bzw. BL70-Zellsuspensionen lichtmikroskopisch in einer Neubauer–Zählkammer bestimmt.

Von den so erhaltenen Zellsuspensionen wurden dann jeweils 4 ml auf die einzelnen für den Versuch benötigten Röhrchen (14 ml Polystyrol-Rundbodenröhrchen, Falcon, Becton Dickinson Nr. 352057) verteilt, so daß einschließlich des pH-Wertes identische Ausgangsbedingungen für alle verwendeten Zellsuspensionen vorlagen und jedes Röhrchen ca. 160.000 HL-60- bzw. 200.000 BL70-Zellen enthielt.

Die Zellen wurden insgesamt 72 Stunden im Röhrchen kultiviert. Bei der Expositionszeit von 72 Stunden erfolgte die Exposition also über die gesamte Kultivierungsdauer, bei der Expositionszeit von 48 Stunden wurden die Zellen zunächst 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank vorinkubiert, bei der Expositionszeit von 24 Stunden entsprechend 48 Stunden und anschließend befeldet.

Ein Teil der Zellkulturen wurde mit 0,01 µmol TPA behandelt. Dazu wurde eine 1 mM Stammlösung aus TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat [Sigma, Kat.Nr. P 8139]) in DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma, Kat.Nr. D 2650) hergestellt und die Zellsuspensionen mit der entsprechenden Menge Stammlösung versetzt (1 µl auf 100 ml Suspension).

3.2 Verdopplungszeit

Die Verdopplungszeit (Generationszeit) ist die Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Teilungen einer Zelle bzw. die Zeit, die für eine Verdopplung der Zellzahl benötigt wird. Sie wird wie folgt berechnet (76):

Verdopplungszeit = $\log 2 * \text{Kulturdauer [h]} / \log N - \log N_0$

wobei: N = Zellzahl nach Kulturdauer

 $N_0 = Zahl der Zellen zum Zeitpunkt 0 ist.$

Die Zellzahl N_0 wurde, wie oben beschrieben, bestimmt. Die Ermittlung der Zellzahl nach Kulturdauer erfolgte ebenfalls lichtmikroskopisch in der Neubauer–Zählkammer.

3.3 Bestimmung der Thymidinkinase-Aktivität

Zur Gewinnung der Zellüberstände für die Bestimmung der extrazellulären Thymidinkinase-Aktivitäten wurden die Zellsuspensionen schonend 5 Minuten bei einer relativen Zentrifugalbeschleunigung von 200 g zentrifugiert und der Überstand abpipettiert.

1000 ml NP 40-Lysispuffer enthalten: 4,5 ml NP 40 (Nonylphenyl-Fluka, Nr. 74385 polyethylenglykol) 4,5 ml Tween 20 Merck, Nr. 822184 2 g Gelatine Merck, Nr. 104078 10 ml 1 M Tris-HCl pH 4,2 Merck, Nr. 108219 50 ml 1 M KCl Merck, Nr. 104933 1 ml 0,154 M NaN₃ Merck, Nr. 106688

Tabelle 4: Zusammensetzung des NP 40-Lysispuffer

Für die Ermittlung der intrazellulären Thymidinkinase-Aktivitäten wurden die Zellen zunächst nach Zentrifugation (5 Minuten bei 200 g) und Dekantierung des Überstandes mit PBS-Puffer dreimal gewaschen und anschließend mit NP 40-Lysispuffer lysiert (Tabelle4).

Die Zellzahl wurde mit Lysepuffer auf 200.000 Zellen pro ml eingestellt, indem die Menge an Lysispuffer entsprechend der vor der Zentrifugation ermittelten Zellzahl gewählt wurde. Sowohl die Zellüberstände als auch die Lysate wurden bei –20° C bis zur Thymidinkinase-Bestimmung konserviert.

Zur Ermittlung der Thymidinkinase-Aktivität in den Zellkultur-Überständen wurde ein Radio-Enzym-Assay ("Prolifigen TK-REA") der Firma Byk-Sanctec Diagnostica GmbH (Nr. 9324 250) verwendet.

3.3.1 Prinzip des Radio-Enzym-Assays

Der Radio-Enzym-Assay erfaßte die Thymidinkinase-Aktivität direkt, während der sonst verwendete Thymidin Labelling Index über den Einbau radioaktiv markiertem Thymidins (¹⁴C- oder ³H-Thymidin) in die DNS proliferierender Zellen zur Bestimmung der Teilungsrate einer Zellpopulation eine indirekte Erfassung darstellt.

Der Test erfaßte alle Isoenzyme der Thymidinkinase, sowohl die Zellzyklus-abhängige TK 1, die in den Mitochondrien enthaltene TK 2 (die nur in niedriger Konzentration vorhanden ist), als auch die virusinduzierte TK 3, die nur in virusinfizierten Zellen vorkommt.

Als Substrat wurde ¹²⁵Jod-markiertes Desoxyuridin eingesetzt, das von der Thymidinkinase in der Probe bei Anwesenheit von Adenosintriphosphat zu ¹²⁵Jod-markiertem Desoxyuridin-Monophosphat umgewandelt und an eine Trennmittel-Tablette gebunden wurde. Das restliche radioaktiv markierte Substrat wurde durch mehrere Waschschritte entfernt. Die verbleibende Radioaktivität wurde gemessen und die Enzymaktivität mittels einer mitgeführten Standardkurve berechnet. Dabei war die gemessene Radioaktivität der Thymidinkinase-Aktivität direkt proportional (77).

3.3.2 Durchführung des Radio-Enzym-Assays

- 1. Testvorbereitung
 - Die lyophilisierten Reagenzien (Assaypuffer, Diluent, Standard, Kontrollen) wurden nach Vorschrift vorsichtig mit destilliertem Wasser rekonstituiert und die Waschlösung verdünnt.
 - Das radioaktive Substrat wurde entsprechend mit dem Assaypuffer verdünnt.
 - Alle Testreagenzien wurden auf Raumtemperatur gebracht und gemischt.
- 2. Testablauf:
 - 20 µl Standard oder Kontrolle oder Probe wurden auf den Boden des Polystyrol-Röhrchens pipettiert
 - Zugabe von 500 μl¹²⁵J-Substrat
 - Mischung auf dem Vortexmischer / 4 Stunden Inkubation im Wasserbad bei 37 °C
 - Zugabe der Separator-Tablette
 - 15 Minuten Mischung auf dem Vortexmischer
 - Zugabe von 1,5 ml der Waschlösung, Mischung auf dem Vortexmischer
 - nach einer Minute vorsichtiges Absaugen des Überstandes
 - dreimalige Wiederholung des Waschschrittes
- 3. Messung und Auswertung:
 - im Gammaszintillationszähler (LKB 1260 Multigamma II)



Thymidinkinase-Aktivität [U/l]

Abbildung 2: Beispiel einer Standardkurve (CPM: Counts per minute, radioaktive Zerfälle pro Minute korr. CPM: korrigierte CPM, nach Abzug der Rack-Leerwerte)

3.3.3 Qualitätskontrolle des Radio-Enzym-Assays

Zur Überprüfung des Radio-Enzym-Assay wurden im Assay mitgelieferte Kontrollen verwendet, die in jedem Ansatz mitgeführt wurden. Nach Wechsel der Herstellungscharge wurde aus den Kontroll-Einzelmeßwerten der zum Assay gehörenden Kontrollen die Präzision von Analysenserie zu Analysenserie und die Richtigkeit berechnet.

Die Präzision wurde von der Bundesärztekammer definiert als "Ausmaß der Übereinstimmung zwischen den unter festgesetzten Bedingungen erhaltenen unabhängigen Meßergebnissen. Das Ausmaß der Präzision wird üblicherweise durch die statistischen Maße der Unpräzision von Messungen wie Standardabweichung und relativer Standardabweichung (Variationskoeffizient) angegeben, die in umgekehrter Beziehung zur Präzision stehen." Die Richtigkeit wird folgendermaßen definiert: "Ausmaß der Übereinstimmung zwischen dem aus einer großen Serie von Meßergebnissen erhaltenen Durchschnitt und einem wahren Wert. Sie wird üblicherweise numerisch durch die systematische Meßabweichung ausgedrückt, die in umgekehrter Beziehung zur Richtigkeit steht." (78)

Die Variationskoeffizienten lagen in zwei verschiedenen Meßbereichen von ca. 5 und 18 U/l zwischen 5,13 und 13,26 %, die Richtigkeit (prozentuale Abweichung des Mittelwertes vom Sollwert) lag im Bereich von -3,03 bis 7,86 % (Tabelle 5).

Tabelle 5: Kontrolldaten der Thymidinkinase-Aktivitäts-Bestimmung

	Präzision und Richtigkeit Thymidinkinase					
Charge	EB 526	EB 527	EJ 569	EJ 570	EF 893	EF 894
SW [U/1]	5,0	17,3	5,1	18,7	5,2	18,9
Anzahl	15	15	6	6	28	28
Mittelwert [U/l]	5,11	18,66	5,03	18,13	5,38	19,85
S	0,61	1,69	0,30	0,93	0,71	1,99
VK [%]	12,04	9,06	5,98	5,13	13,26	10,05
R [%]	2,13	7,86	-1,31	-3,03	3,37	5,03

(Charge: Chargennummer der Kontrolle , SW: Sollwert der Kontrolle S: Standardabweichung, VK=Variationskoeffizient, R: Richtigkeit)

3.4 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde der Student´s t-Test für unabhängige Stichproben mit zweiseitiger Fragestellung und 5 % Signifikanzniveau, sowie der Vorzeichentest angewendet (79).

3.5 Technische Versuchseinrichtung

Die technische Einrichtung für die Untersuchungen wurde vom Forschungsverbund Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, Schleinitzstraße 23, 38092 Braunschweig zur Verfügung gestellt und technisch betreut.

3.5.1 Versuchsaufbau

Für die Exposition der Zellkulturen wurde eine Gigahertz-Transversal-Elektro-Magnetische Zelle (GTEM-Zelle) verwendet (siehe Abbildung 3).

In die GTEM-Zelle, [4)] wurden über eine Ansteuerung [1)] mit nachgeschaltetem Dämpfungsglied [2)] die bei 2,45 GHz erzeugten elektromagnetischen Wellen eingespeist. Die Ansteuerung wurde aus den Komponenten einer handelsüblichen Mikrowelle entwickelt, sie bestand aus einem Magnetron (2M107A-411, Hitachi), zwei Hochspannungskondensatoren und einer Hochspannungsdiode.

Das Magnetron speiste in einen Hohlleiter ein, an dessen hinterem Ende die elektromagnetische Welle über einen angepaßten Koppelstift in eine Koaxleitung eingekoppelt wurde. Die Ausgangsleistung des Magnetron wurde durch die anliegende Hochspannung bestimmt, die durch den Kondensator C geregelt wurde. In der Übertragungsstrecke traten Verluste auf, so daß die tatsächlich eingespeiste Leistung in die GTEM-Zelle mit Hilfe eines Leistungsmeßgerätes (NRVS, Fa. Rohde & Schwarz) bestimmt wurde. Das eingespeiste Signal breitete sich als Welle in der GTEM-Zelle, in der sich ein Probenhalter für sechs Röhrchen [5a)] befand, aus.

Der Probenhalter wurde auf einem Styroporständer schräg im Winkel von 45° gelagert. Im Probenhalter wurden die Probenröhrchen von temperiertem Weißöl umströmt, um die Zellen auf einer konstanten Temperatur von $37^{\circ} \pm 0,1^{\circ}$ C zu halten. Diese Temperaturkonstanz war erforderlich, um thermische Effekte auszuschließen. Als Temperiermittel wurde Weißöl gewählt, da Wasser zu einer erheblichen Verminderung der elektrischen Feldstärke im Probenhalter führen würde.



Abbildung 3: Versuchsaufbau

- 1) Ansteuerung
- 2) Dämpfungsglied
- 3) Öffnung zum Einbringen des Probenhalters
- 4) GTEM-Zelle
- 5a) Probenhalter in der GTEM-Zelle
- 5b) Probenhalter in der Abschirmbox
- 6a), 6b) Wärmebäder
- 7) Gegenkühlung
- 8) Analog-Digital (AD)-Wandler
- 9) Rechner
- 10) HF-Detektor

Um einen möglichen Einfluß des 50-Hz-Feldes auf die Proben gering zu halten, wurden die für die Signalerzeugung, Temperierung und Protokollierung benötigten Geräte in einem Abstand von ca. 2 m von den Probenhaltern aufgestellt. Die für die Temperierung benötigten Wärmebä-

der (Haake Umwältzthermostat F3-S 6a) und 6b)) wurden mit den Probenhaltern über wärmeisolierte Schläuche verbunden. Die Temperaturregelung erfolgte über einen externen Temperatursensor (Haake Pt 100), der sich im Weißölkreislauf kurz vor den Proben befand. Um das Driftverhalten der Temperaturregelung klein zu halten, wurde über einen zweiten, geschlossenen Wasserkreislauf ständig für Gegenkühlung [7)] der Bäder gesorgt. Ein zweiter, baugleicher Probenhalter [5b)] mit Kontrollröhrchen, ebenfalls auf einem Styroporständer schräg im Winkel von 45° gelagert, wurde in einem Hochfrequenz (HF)-dichten Behälter (modifizierter Rittal-Schaltschrank) aufgestellt. Auf diese Weise konnten Umgebungseinflüsse auf die Kontrollzellen ausgeschlossen werden.

Um sicherzustellen, daß die Zellen auch wirklich mit der gewünschten Leistung exponiert wurden, wurden während der gesamten Versuchsdauer die in die GTEM-Zelle eingespeiste Leistung überwacht. Hierfür wurde in der GTEM-Zelle ein Monopolsensor eingebaut, der sich über dem Probenhalter befand. An den Sensor wurde ein HF-Detektor (Suhner 1001.01A 10)) angeschlossen, der ein der Feldstärke entsprechendes Spannungssignal an einen Analog-Digital (AD)-Wandler [8)] weitergab. Neben dem HF-Detektorsignal wurden auch die von den beiden Temperatursensoren gelieferten Daten alle zwei Sekunden von einem Rechner [9)] aufgezeichnet. Aus den so gewonnen Daten wurde nach jeder Minute der jeweilige Mittelwert gebildet und gespeichert. Die aufgezeichneten Daten garantierten, daß für die zur Auswertung kommenden Proben die für den Versuch relevanten Parameter über die gesamte Versuchsdauer eingehalten wurden. Unter identischen Versuchsbedingungen wurde somit zeitgleich der eine Teil der Zellkulturen einem Hochfrequenzfeld ausgesetzt und der andere nicht.

3.5.2 Ermittlung der Spezifischen Absorptionsrate (SAR)

Die Ermittlung und Berechnung der SAR-Werte wurde den Mitarbeitern des Forschungsverbunds Elektromagnetische Verträglichkeit biologischer Systeme, Schleinitzstraße 23, 38092 Braunschweig durchgeführt.

Die spezifische Absorptionsrate als Basisgrenzwert wurde bereits erläutert. Die bei den Expositionsversuchen erzielten SAR-Werte sollten unterhalb des derzeit gültigen Teilkörper-SAR- Wertes von 2000 mW/kg nach der 26. BImSchV liegen. Deshalb war es erforderlich, die in den Zellkulturen erreichten Werte zu ermitteln. Da wegen der geringen Größe der Kulturröhrchen und der Leitfähigkeit des flüssigen Mediums die Feldstärken in den Zellkulturen nicht zu messen waren, mußten die Expositionswerte rechnerisch ermittelt werden. Dazu diente ein kommerziell erhältliches Rechenprogramm (80).

Grundlage für die Berechnung waren die elektrischen Materialeigenschaften der in der GTEM-Zelle verwendeten Materialien: Acrylglas (Probenhalter), Weißöl als Temperiermittel und das Nährmedium (Tabelle 6).

	Relative Dielektri-	Leitfähigkeit	relative	Permea-
	zitätszahl e _r	κ [S/m]	bilität (µ _r)	
Acrylglas	2,6	0,0039	1	
Weißöl	1,98	0,0014	1	
Nährmedium	73,39	2,57	1	

Tabelle 6: Verwendete elektrische Materialparameter

Die relative Permeabilität (μ_r) dieser Materialien ist 1. Die relative Dielektrizitätszahl (e_r) und die Leitfähigkeit (κ) von Acrylglas wurde aus (80) übernommen, die Parameter von Weißöl und Nährmedium wurden durch Messung ermittelt. Aus den mit diesen Parametern berechneten Feldstärken konnten die Jouleschen Verluste P_J (Verlust an Leistung) bestimmt werden.



Abb. 4:Draufsicht Probenhalter mit sechs Röhrchen
(Z: Wellenausbreitungsrichtung)

Für die sechs Röhrchen, die der Probenhalter aufnehmen konnte (Abbildung 4), ergaben sich aus der Computersimulation bei einer simulierten Eingangsleistung von $P_{ein} = 1$ W die in der Tabelle 7 wiedergegebenen Jouleschen Verluste in dem Volumen, das von den 4 ml Zellsuspension im Röhrchen eingenommen wurde. Eine Umrechnung auf andere Speiseleistungen war aufgrund der vorausgesetzten Linearität der Anordnung zulässig. (80)

Tabelle 7:

Schwankung der Jouleschen Verluste in den sechs Röhrchen

Röhrchen	1	2+6	3 + 5	4
Leistung [µW]	563	460	562	542

Aus diesen Werten ergab sich eine mittlere Verlustleistung von $P_J = 524.8 \mu W$ pro Röhrchen. Dies entsprach einem auf das Zellsuspensions-Volumen von 4 ml bezogenen mittleren $\overline{s_{AR}}$ -Wert von 131,2 mW/kg. Aufgrund der vom Magnetron erzeugten Signalform war der nur während der 4 ms dauernden Burst-Zeit vorliegende SAR-Wert bei einer Wiederholfrequenz von 15 ms um den Faktor 3,75 größer: $\overline{s_{AR}}$ Burst = 492 mW/kg. Mit der durch Messungen bestimmten elektrischen Leitfähigkeit $\kappa = 2,525$ S/m und der Dichte r = 10³ kg/m³ ließen sich über

1)
$$\overline{\text{SAR}} = \frac{1}{2} \hat{\text{E}}_{\text{Med}}^2 \cdot \frac{\kappa}{\rho}$$
 und 2) $\hat{\text{B}}_{\text{Med}} = \mu_0 \hat{\text{E}}_{\text{Med}} \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{\mu_0}}$

die mittlere elektrische Feldstärke im Medium \hat{E}_{Med} und die mittlere magnetische Flußdichte \hat{B}_{Med} im Medium ableiten (81).

Mit dem Leistungsmesser NRVS wurde die über die Zeit gemittelte in die GTEM-Zelle eingespeiste Leistung bestimmt. Unter Verwendung des berechneten $\overline{_{SAR}}$ -Wertes und den Gleichungen 1) und 2) wurden die Expositionswerte in Tabelle 8 berechnet, mit denen die Versuche durchgeführt wurden. Durch die Übernahme von Materialparametern, die Berechnung und die Messung der Eingangsleistung war ein Fehler von maximal 10% möglich.

Gemessene Eingangsleistung	Werte über die Zeit gemittelt			Werte während der Burstzeit		
P [W]	SAR	\hat{E}_{Med}	\hat{B}_{Med}	SAR Burst	Ê _{Burst}	\hat{B}_{Burst}
	[mW/kg]	[V/m]	[µT]	[mW/kg]	[V/m]	[µT]
4,7	617	22,1	0,6	2314	42,8	1,2
8,5	1114	29,7	0,8	4178	57,5	1,6
10,2	1336	32,5	0,9	5010	63,0	1,7

Tabelle 8: Expositionswerte

3.6 Expositionsbedingungen

Die Exposition der HL60- und der BL70-Zellen erfolgte bei 2450 MHz mit unterschiedlicher Expositionsdauer (24,48 und 72 Stunden) und verschiedenen Leistungsstärken unterhalb des derzeit gültigen Teilkörper-SAR-Wertes für die Bevölkerung von 2000 mW/kg nach der 26. BImSchV. Auch die während der Burstzeit auftretenden SAR-Werte lagen unter den für die berufliche Exposition zulässigen Grenzwerten von 10.000 mW/kg (52).

Eine Übersicht zu den durchgeführten Versuchsreihen wurde in Tabelle 9 aufgeführt.

Tabelle 9:Zusammenfassung der durchgeführten Versuche.

Die Verdopplungszeit wurde in allen Versuchsreihen bestimmt.

Versuchs-	Zellinie	TPA-Zusatz	TK-	SAR	Expositions-
anordnung			Messung	[mW/kg]	Zeit [h]
1	HL60	ohne	extrazellulär	617	24
2	HL60	ohne	intrazellulär	617	48
3	HL60	ohne	intrazellulär	617	72
4	HL60	ohne	intrazellulär	1336	24
5	HL60	ohne	intrazellulär	1114	24
6	HL60	ohne/mit	intrazellulär	1114	24
7	BL70	ohne/mit	intrazellulär	1114	24