

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik C, Kardiologie und Angiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt
und dem
Institut für Arterioskleroseforschung, Department Molekularkardiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Assmann, FRCP
Department-Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt

**In vitro – Untersuchungen zum Einfluss von
Magnetfeldern und Interferenzströmen
auf die Proliferation von Gefäßzellen**

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des doctor medicinae
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Berndt, Andreas
aus Göttingen

2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms-Universität Münster

Dekan:

Univ. – Prof. Dr. Heribert Jürgens

1. Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. Jürgen Sindermann

2. Berichterstatter:

Hdoz. Priv.-Doz. Dr. med. Michael Zühlsdorf

Tag der mündlichen Prüfung:

11.08.2006

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik C, Kardiologie und Angiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Günter Breithardt
und dem Institut für Arterioskleroseforschung, Department Molekularkardiologie
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Gerd Assmann, FRCP
Department-Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. Günter Breithardt

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Jürgen Sindermann
Koreferent: Hdoz. PD Dr. med. Michael Zühlsdorf

ZUSAMMENFASSUNG

In vitro – Untersuchungen zum Einfluss von Magnetfeldern und Interferenzströmen auf die Proliferation von Gefäßzellen

Berndt, Andreas

In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, dass das Wachstum von Endothel- und glatten Muskelzellen durch elektrische Ströme beziehungsweise elektromagnetische Felder induzierbar ist. Dieser Weg der induzierbaren Zellproliferation wäre u.U. für den therapeutischen Einsatz zur Induktion der Angiogenese zu evaluieren, da im Rahmen der Angiogenese Endothel- und glatte Muskelzellen schneller in den Zellzyklus wieder eintreten.

Bei den durchgeführten Versuchen wurde das Proliferationsverhalten von drei verschiedenen Zelltypen (transgene coronare glatte Muskelzellen vom Rind (bov-cSMC), aortale glatte Muskelzellen der Maus (ms-aSMC) mit induzierbarer Expression von SV 40 Tumorantigen und umbilikalvenöse Endothelzellen vom Menschen (HUVEC)) unter dem Einfluss von Magnetfeldern und Interferenzströmen untersucht. Diese Experimente zeigten, dass die Zellproliferation bei bereits teilungsaktiven Zellen durch die Exposition mit elektromagnetischen Feldern signifikant gesteigert werden konnte. Es wurden verschiedene Kombinationen aus Expositionsdauer, Inkubationszeitraum und Magnetfeldfrequenz getestet. Eine 15minütige Exposition im elektromagnetischen Feld einer Frequenz von 50 Hz erwies sich bei diesen Versuchen als besonders effektiv. Signifikante Steigerungen der Zellproliferation zeigten sich bei diesen Zellkulturexperimenten ausschließlich bei den glatten Muskelzellen. Im Gegensatz dazu führten in dieser Versuchsreihe Interferenzströme – unabhängig vom untersuchten Zelltyp – bei keinem der Experimente zu einer signifikanten Steigerung der Zellproliferation.

Als alleiniges Verfahren scheint die Anwendung elektromagnetischer Felder bzw. von Interferenzströmen begrenzt wirksam. Für die Zukunft könnte die Verknüpfung aktuell in Erprobung befindlicher gentherapeutischer Verfahren mit dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten angiogenen Potential von elektromagnetischen Feldern ein interessanter Ansatz für die patientenschonende Induktion von Angiogenese sein. Dies bedarf weiterführender Untersuchung in zusätzlichen Studien.

Tag der mündlichen Prüfung: 11.08.2006

Meinem Vater

1	Einleitung	1
2	Grundlagen	3
2.1	Grundlagen Elektromagnete	5
2.2	Bestromungskammern	12
3	Material und Methoden	14
3.1	Zellkultur	14
3.1.1	Zelltypen	14
3.1.2	Kulturmedien	14
3.1.3	Subkultivierung der Zellen	15
3.1.3.1	Glatte Muskelzellen	15
3.1.3.2	Endothelzellen	16
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl	17
3.1.5	Geräte und Verbrauchsmaterial	17
3.1.5.1	Elektromagnet	17
3.1.5.2	Bestromungsgerät	19
3.1.5.3	Strommessgerät	21
3.1.6	Standardversuch	22
3.1.6.1	Vaskuläre glatte Muskelzellen	22
3.1.6.2	Endothelzellen	22
3.2	Experimentalserien	23
3.2.1	Einfluss von Magnetfeldern auf die Zellproliferation	23
3.2.2	Einfluss von Interferenzstrom auf die Zellproliferation	24
3.3	Darstellung und Auswertung der Ergebnisse	24
4	Ergebnisse	26
4.1	Einfluss von Magnetfeldern auf die Zellproliferation	26
4.1.1	Vaskuläre glatte Muskelzellen	26
4.1.1.1	Experimente mit proliferierenden bovinen coronaren SMC	26
4.1.1.2	Experimente mit ruhenden bovinen coronaren SMC	29
4.1.1.3	Experimente mit proliferierenden murinen transgenen aortalen SMC mit Expression von SV 40 Tumorantigen	30
4.1.2	Endothelzellen	32

4.2	Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss von Magnetfeldern _____	33
4.2.1	Vergleich glatter Muskelzellen von Rind und Maus _____	34
4.2.2	Vergleich proliferierender glatter Muskelzellen mit ruhenden glatten Muskelzellen vom Rind _____	37
4.2.3	Vergleich von proliferierenden Endothel- und glatten Muskelzellen _____	38
4.3	Einfluss von Interferenzstrom auf die Zellproliferation von glatten Muskelzellen _____	40
4.3.1	Experimente mit proliferierenden bovinen coronaren SMC _____	40
4.3.2	Experimente mit ruhenden bovinen coronaren SMC _____	42
4.4	Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss von Interferenzstrom auf ruhende und proliferierende glatte Muskelzellen vom Rind _____	43
4.5	Doppelexpositionen Magnet/Magnet und Magnet/Strom _____	44
4.5.1	Magnetfeld-Doppelexposition bei proliferierenden und ruhenden glatten Muskelzellen _____	44
4.5.2	Magnetfeld-Doppelexposition im Vergleich zur Kombination Magnet- Strom bei proliferierenden bovinen coronaren SMC _____	46
5	Diskussion _____	48
5.1	Einfluss elektromagnetischer Felder _____	49
5.2	Einfluss von Interferenzstrom _____	55
6	Zusammenfassung _____	58
7	Literaturverzeichnis _____	59
	Danksagung _____	66
	Lebenslauf _____	67
8	Anhang _____	I
9	Abkürzungsverzeichnis _____	XIX

1 Einleitung

Angiogenese ist eine Grundvoraussetzung für Gefäßwachstum in allen Wirbeltierembryonen, in vielen Tumoren ebenso wie bei der Wundheilung.

Das schnelle Wachstum, das hierbei stattfindet, erfordert einen effizienten Transport und ein Zusammenspiel von vielen Stoffen im menschlichen Körper.

Man kann zunächst verschiedene Phasen der Angiogenese definieren, die auf charakteristischen Reaktionen von Endothelzellen auf einen angiogenen Stimulus beruhen. Darunter befinden sich die Produktion von Proteasen, Chemotaxis, Proliferation, Kapillarneubildung und deren vollständige Aussprossung. Die Angiogenese beginnt physiologisch mit Ausbildung von soliden endothelialen Knospen, die sekundär Lumina ausbilden und miteinander anastomosieren.

Ziel der therapeutischen Angiogenese ist die Behandlung von Störungen bei inadäquater Gewebepfusion durch das Wachstum und die Proliferation neuer Blutgefäße oder die Modulation von Endothelzellfunktionen.

Dadurch, dass die Angiogenese dem Einfluss einer Vielzahl von Faktoren unterliegt, kann dieser komplexe Vorgang an verschiedenen Stellen oder auf verschiedene Art und Weise moduliert werden.

Die koronare Herzerkrankung ist die führende Todesursache in der westlichen Welt. Der Grossteil der Morbidität und Mortalität entsteht als Konsequenz aus der Stenosierung oder dem Verschluss von Koronargefäßen durch atherosklerotische Plaques.

Traditionell wird die koronare Herzerkrankung wie auch die periphere arterielle Verschlusskrankheit durch mechanische Interventionen wie etwa der Bypass-Chirurgie oder der Angioplastie behandelt. In neueren Studien wird jedoch auch die therapeutisch induzierte Gefäßneubildung, die Arteriogenese, bzw. die Neubildung von Kollateralen aus bereits vorhandenen Gefäßen, die Angiogenese, angestrebt.

In verschiedenen grundlagenorientierten Untersuchungen konnte der Einfluss von elektrischen Feldern auf biologische Systeme in Form von beschleunigter Zellproliferation und selektiver Beeinflussung von Signaltransduktionswegen gezeigt werden. Deswegen wurden elektrische Felder bereits in der Knochenbruchheilung und zur Therapie der *Psoriasis palmaris* erfolgreich eingesetzt (54).

Die Induktion der Angiogenese wird durch angiogene Faktoren ausgelöst, die sowohl von Tumor- als auch von gesunden Wirtszellen sezerniert werden können. Entsprechend ihrer Wirkung unterscheidet man Angiogenese-Stimulatoren (z.B. Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF), Stickstoffmonoxid (NO), Tumornekrosefaktor- α) und Angiogenese-Inhibitoren (z.B. Angiostatin, Interferon- α , Heparanase), wobei beide Typen heutzutage therapeutisch zum Einsatz kommen (30).

Studien am Institut für Medizintechnik und Biophysik des Forschungszentrums Karlsruhe haben gezeigt, dass durch elektrische Ströme eine selektive Beeinflussung der cAMP-Spiegel möglich ist. Dieser *second messenger* induziert u.a. einen angiogenen Wachstumsfaktor, „Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF).

Neben der Wirksamkeit dieser zellulären angiogenen Faktoren sind signifikante biologische Effekte durch Einwirkung elektromagnetischer und elektrischer Felder auf Organe, Gewebe, Zellen und biologische Moleküle gezeigt worden (11, 33, 55). Hierbei kann natürlich ein mittelbarer Einfluss dieser Felder auf die Zytokinproduktion vermutet werden, womit auch diese Methode für eine therapeutisch induzierte Angiogenese eine Relevanz erlangen könnte.

In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, dass das Wachstum von Endothel- und glatten Muskelzellen durch elektrische Ströme beziehungsweise elektromagnetische Felder induzierbar ist und diese somit einen direkten Einfluss auf den Prozess der Angiogenese haben können.

2 Grundlagen

Elektrische Felder werden zum Beispiel zunehmend zur Unterstützung der sekundären und primären Knochenheilung eingesetzt. Der therapeutische Effekt dieser Maßnahme wird mit einer verbesserten Vaskularisierung des Knochens und primärer Osteogenese erklärt. Wenn auch die zugrundeliegenden Mechanismen ungeklärt sind, ist ausreichend belegt, dass elektrische Felder eine Energieübertragung auf wässrige Systeme (Zellen) mit konsekutiver Beeinflussung molekularer Vorgänge bewirken.

An einer Osteosarkomzelllinie konnte gezeigt werden, dass die *in vitro*-Behandlung mit elektromagnetischen Wellen die DNA-Synthese anregt (67). Osteoblasten werden durch gepulste elektromagnetische Felder zur Bildung von Zellnestern wie bei Osteogenese angeregt (14). Dabei nimmt sowohl die Zahl wie auch die Größe der Zellen zu. In beiden Studien konnte gezeigt werden, dass der Effekt direkt mit der Expositionsdauer durch die elektrischen Felder korrelierte.

In vivo-Studien haben eine verbesserte Knochenheilung nach Frakturen von Tibia, Metatarsalen und Wirbelkörpern gezeigt (35, 42). Kürzlich wurde der Einfluss von elektrischen Feldern auf das Überleben von Embryonen an einem Ischämiemodell untersucht. Embryonen wurden elektrischen Feldern von 60 Hz ausgesetzt, bevor sie in eine Anoxiekammer gegeben wurden. Die Überlebensraten der so behandelten Embryonen waren mit 69% deutlich höher als die der unbehandelten Kontrollen mit 40% (22).

Ausgehend von der allgemein akzeptierten Hypothese, wonach elektrische und magnetische Wechselfelder bis etwa 10 kHz überwiegend auf molekulare Oberflächenstrukturen der Zelle, also insbesondere auf Rezeptoren wirken, bildeten *in vitro* Untersuchungen der zellulären Signalwege einen Schwerpunkt der bisherigen Forschung (21). Am Beispiel des Botenstoffes cAMP, dessen intrazelluläre Konzentration durch solche Felder statistisch signifikant beeinflussbar ist, wurden die Gesetzmäßigkeiten der Feldwirkung systematisch untersucht. Hierzu zählten insbesondere die Abhängigkeiten von Frequenz und Stärke der Felder sowie der Einfluss eines zeitlich periodischen Amplitudenmusters (Modulation). Da das cAMP außerdem bei vielen Zelldifferenzierungsprozessen eine zentrale Rolle spielt, können sich aus diesen Untersuchungen zugleich Ansatzpunkte für therapeutische Strategien ergeben.

Magnetische Felder wurden mit einer Frequenz von 50 Hz in einem Flussdichtebereich von 0,3-16 mTesla bezüglich ihres Einflusses auf cAMP-Gehalt, Proliferation und Gap-Junction-vermittelte interzelluläre Kommunikation untersucht. Dabei zeigte sich lediglich bei 2mT eine signifikante Erhöhung des cAMP-Gehaltes, die jedoch nur in Anwesenheit von Calcium im Medium zu beobachten war (60). Die Behandlung im magnetischen Feld führte ferner zu quasi-periodischen Schwankungen in der Zellproliferation (61), was jedoch nicht durch die gleichzeitig beobachteten geringfügigen Änderungen der Zellzyklus-Verteilung erklärbar, sondern wahrscheinlich auf einen chrono-biologischen Effekt des Feldes zurückzuführen war. Schließlich erhöhten 50 Hz-Magnetfelder die interzelluläre Kommunikation (62), was in den untersuchten Zell-Sphäroiden zu charakteristischen Veränderungen des Radialprofils des zellulären cAMP-Gehaltes führte.

Während diese Studien mit elektromagnetischen Wellen durchgeführt wurden, stellt der Interferenzstrom (IFS) eine andere, besonders hautverträgliche und in der Physiotherapie verbreitete Stromform dar. IFS entsteht durch Überlagerung von zwei sinusförmigen Wechselströmen, deren Frequenzen üblicherweise bei 4000 Hz liegen, jedoch gegeneinander leicht verschoben sind. Hierdurch entsteht über die periodische Auslöschung und Verstärkung (Interferenz) der Teilströme ein Wechselstrom, der IFS, dessen Amplitude im Takt der Frequenzdifferenz zwischen Null und einem Maximalwert schwankt.

Der IFS bewirkt in Zellen ebenfalls Änderungen des cAMP-Gehaltes, jedoch nur bei charakteristischen Modulationsfrequenzen (47, 68), wobei es Frequenzen gibt, die das cAMP herauf oder herabregulieren bzw. keine statistisch signifikante Wirkung zeigen. Der Effekt stellt sich oberhalb einer Stromdichte-Schwelle von etwa $5 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ein und erfährt bei weiterer Erhöhung der Stromdichte keine weitere Steigerung, eher eine tendenzielle Abschwächung (47). Damit hängt die Feld-Zelle-Wechselwirkung nicht von der übertragenen elektrischen Energie ab, sondern vom biologischen Informationsgehalt, der in den speziellen Frequenz- bzw. Modulationsmustern steckt. Des weiteren induziert der IFS bei bestimmten Modulationen in einer pluripotenten embryonalen Karzinomzelle der Maus Differenzierungsprozesse (47). Ein aus diesen und weiteren Ergebnissen abgeleiteter IFS-Behandlungsansatz der *Psoriasis palmaris* erwies sich in einer offenen klinischen Studie als ausgezeichnet wirksam (54).

Für den Bereich der Arteriogenese/Angiogenese ist die steuerbare Beeinflussung der cAMP-Wirkung von besonderer Bedeutung, da angiogene Mitogene wie der VEGF u.a. hierüber induziert werden (1, 56).

Die zur Strombehandlung von Zellen erforderlichen Vorrichtungen wurden am Institut für Medizintechnik und Biophysik (IMB), Leiter: Prof. Dr. H. Dertinger, des Forschungszentrums Karlsruhe konzipiert und gebaut. Hierzu gehören eine elektromagnetische Spulenvorrichtung zur Behandlung von Zellkulturen mit elektromagnetischen Wellen und ein Interferenzstromgenerator zur Behandlung mit Interferenzstrom. Geräte in ähnlicher Bauart wurden zur Behandlung der Psoriasis in Zusammenarbeit mit der Universitätshautklinik Mannheim (54) erfolgreich eingesetzt.

2.1 Grundlagen Elektromagnete

Homogene Magnetfelder größeren Volumens werden meistens mit Hilfe von Luftspulen erzeugt. Die erste Anordnung von Spulen wurde um 1850 von Helmholtz konstruiert. Die nach ihm benannten Helmholtzspulen bestehen aus zwei Luftspulen, deren mittlerer Abstand gleich dem mittleren Radius der Spulen ist. Unter diesen Randbedingungen erhält man in der Mitte in einem größeren Volumen ein homogenes Magnetfeld. In der Zwischenzeit wurden andere Spulenkonfigurationen berechnet und experimentell getestet. Diese im Vergleich zu den Helmholtzspulen aufwendigeren Konstruktionen haben in der Mitte einen größeren homogenen Bereich, z.B. die Merritt-Anordnung mit drei oder vier Spulen, die Lee-Whiting-Anordnung mit vier Spulen, die Alldred & Scollar-Anordnung mit vier Spulen und die Rubens-Anordnung mit fünf Spulen. Bei gleichem Spulendurchmesser ist der homogene Bereich bei der Merritt-4-Spulen-Anordnung ungefähr doppelt so groß wie bei der einfachsten Helmholtz-Anordnung.

Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden mit der einfachsten Spulengeometrie, den kreisförmigen Helmholtzspulen, durchgeführt. Geht man von einer Homogenitätsschwelle von 5% aus, ist der homogene Bereich ungefähr gleich dem Radius (Abstand) der Spulen. Diese 5%-ige Homogenitätsschwelle ist experimentell völlig ausreichend.

Um die Wirkung der Magnete ohne Feld hinsichtlich Erwärmung und Vibrationen zu ermitteln oder um Blindversuche durchzuführen, wurden alle Magnete mit zwei unabhängigen parallelen Drahtwicklungen versehen (double-wrapped coil system).

Jede Spule hat 2x112 Wicklungen aus Kupferdraht (~46 m, 0,5 mm Durchmesser), der gemessene Widerstand der Helmholtzspule beträgt 12,4 Ω (in der Nicht-Magnetfeld-Schaltung) oder 3,1 Ω (in der Magnetfeld-Schaltung). Dies stimmt gut mit den Berechnungen überein, wenn man vom Widerstand des Kupferdrahtes ($s = 0,017 \text{ mm}^2/\text{m}^{-1}$) ausgeht. Die gemessene Induktivität der Magnete beträgt ~6 mH.

Das Magnetfeld in der Mitte einer Helmholtzspule wird mit der folgenden Formel berechnet:

$$H = 0,716 \times I \times w/r \text{ [mT; mm; A]} \quad (1)$$

I steht dabei für den Strom in Ampere, w für die Windungszahl und r für den Radius der Spule in mm. Das Streufeld der Helmholtzspulen in der Luft ist in Abbildung 1 dargestellt. Ist der Abstand der beiden Spulen zu gering, muss die Kontrollspule gegen das Streufeld der eingeschalteten Magnetspule abgeschirmt werden. Die Kontrollspule wurde bei den Versuchen dadurch realisiert, dass eine zweite Helmholtzspule verwendet wurde, deren Magnetspulen durch einen Metallrahmen voneinander getrennt waren. Dadurch erfolgt eine Reduktion der Magnetfeldstärke von 36 μT auf 1 μT .

Aus Gleichung (1) folgt, dass bei sich nicht ändernden Spulenparametern das Magnetfeld proportional zum Strom ist. Abbildung 2 zeigt eine gemessene Strom-Magnetfeld-Eichkurve für die Helmholtzspulen. Der dargestellte Zusammenhang ist linear, obwohl die Eichkurve mit verschiedenen Signalgebern gemessen wurde.

Der Zusammenhang zwischen dem induzierten Magnetfeld B bei 50 Hz und dem angelegten Strom lässt sich durch die linearen Beziehungen $B \text{ [mT]} = 1,31 \times I \text{ [A]}$ oder $I \text{ [A]} = 0,763 \times B \text{ [mT]}$ ausdrücken, d.h. man braucht nur ein Strommessgerät (siehe 3.2.3), um das induzierte Magnetfeld aus der Kurve abzulesen oder es zu berechnen.

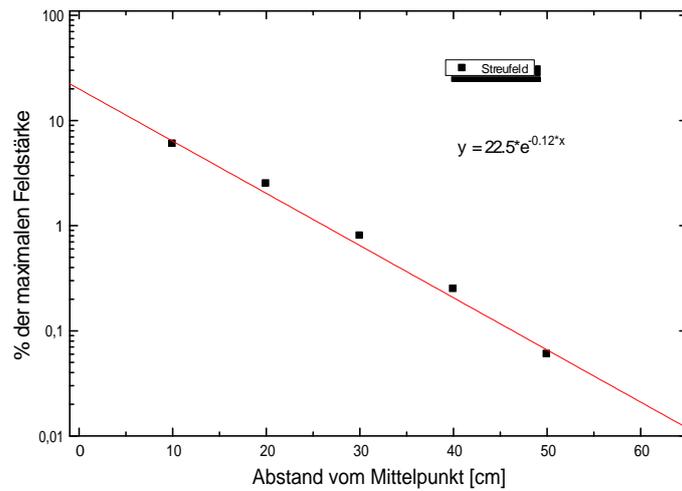


Abbildung 1: Abnahme des Streufeldes außerhalb der Magnetspule (50 Hz, 1 mT), der Abstand wird dabei vom Mittelpunkt der Erzeugerspule aus in der Ebene der Spule gemessen.

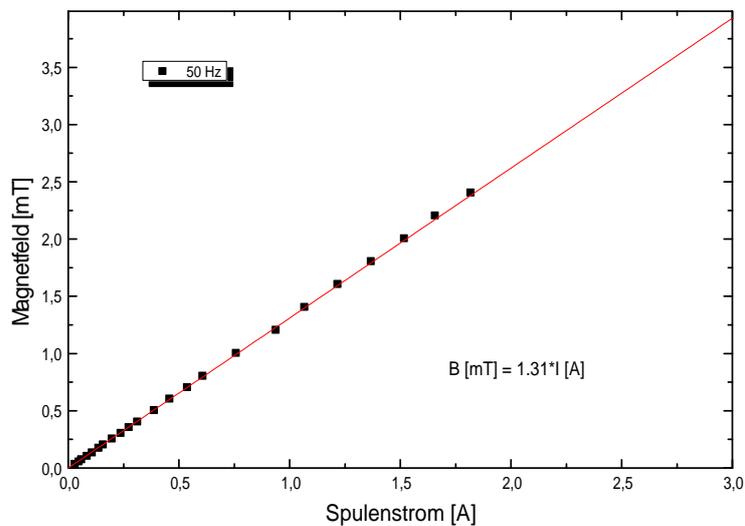


Abbildung 2: Die lineare Abhängigkeit des Magnetfeldes vom Spulenstrom gemessen bei einer Frequenz von 50Hz

Die Feldverteilung in einer Helmholtzspule lässt sich theoretisch exakt berechnen. Da dieses aber mathematisch sehr aufwendig ist, wurde die Verteilung mit einer Näherungslösung berechnet. Die Näherungslösung arbeitet in einem Zylinderkoordinatensystem, das rotationssymmetrisch zum Mittelpunkt der Feldstärke gleich ist. Wenn z der Abstand vom Mittelpunkt in Richtung der Spulen ist und r der

Kreisabstand vom Mittelpunkt parallel zu den Spulen ist, lässt sich die Feldverteilung durch die beiden Gleichungen (2a und 2b) berechnen.

$$\begin{aligned} \boxed{2a)} \quad H_z &= H_0 \left\{ 1 - \frac{1}{a^4} \left[\frac{144}{125} z^4 - \frac{432}{125} z^2 r^2 + \frac{54}{125} r^4 \right] \right\} \\ \boxed{2b)} \quad H_r &= H_0 \left\{ \frac{1}{a^4} \left[\frac{288}{125} r z^3 - \frac{216}{125} r^3 z \right] \right\} \end{aligned}$$

Die absolute Feldstärke ist dann $H_{\text{abs}} = (H_z^2 + H_r^2)^{0,5}$. Die Feldverteilung innerhalb der Helmholtzspule (Abb. 3) wurde mit einem Computerprogramm berechnet. Die Feldstärke in der Mitte der Spulen wurde auf 100 normiert, der Abstand zwischen zwei berechneten Punkten betrug 3 mm. Der gezeigte Ausschnitt betrug in X/Y-Richtung parallel zu den beiden Spulen 90 mm, in Richtung der Spulen (Z-Richtung) 42 mm. Der Mittelpunkt des Ausschnittes ist auch der Mittelpunkt zwischen den beiden Spulen (siehe Legende zu Abb. 3). Der Abstand der verschiedenen Contour-Felder beträgt 2,5, d.h. der grüne Bereich gibt das Volumen an, das innerhalb des 5%-Homogenitätsbereiches liegt. In X/Y-Richtung hat der 5%-Bereich einen ungefähren Durchmesser von 66 mm, in der Höhe reicht er über den nutzbaren Bereich (Abstand der inneren Platten) hinaus.

Die Magnetfeldverteilung in den angefertigten Helmholtzspulen wurde mit einer Hallsonde ausgemessen. Diese Messungen wurden vom Institut für Medizintechnik und Biophysik (IMB), Leiter: Prof. Dr. H. Dertinger, des Forschungszentrums Karlsruhe durchgeführt. Abb. 4 zeigt das Ergebnis: der Abstand der Messpunkte, der Ausschnitt und die Lage der Contour-Felder wurde wie in Abb. 3 gewählt, um einen direkten Vergleich zwischen theoretischer und experimenteller Verteilung zu haben.

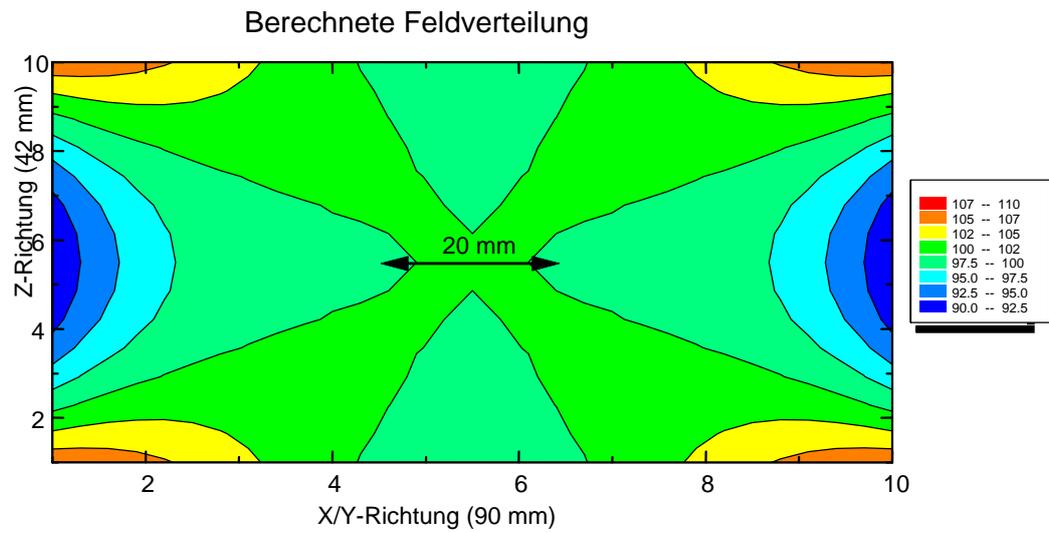


Abbildung 3: Berechnete Feldverteilung innerhalb der Helmholtzspule im Bereich von 90 x 42 mm; Abstand der berechneten Punkte beträgt 3 mm; die beiden Spulen liegen ober- und unterhalb der Zeichnung.

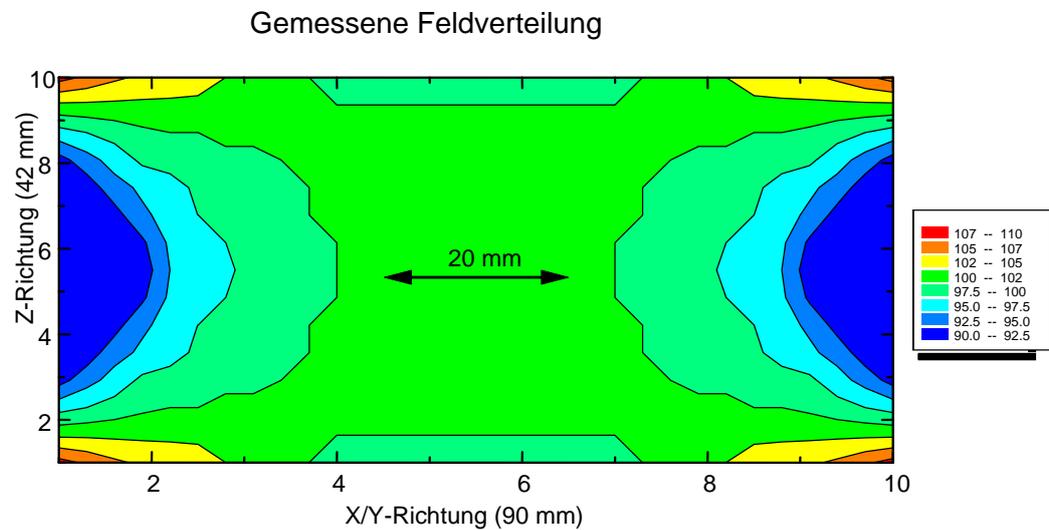


Abbildung 4: Gemessene Feldverteilung innerhalb der Helmholtzspule im Bereich von 90 x 42 mm; Abstand der gemessenen Punkte beträgt 3 mm; die beiden Spulen liegen ober- und unterhalb der Zeichnung.

Auch die den Abbildungen 1, 2, 3, 4 und 5 zugrundeliegenden physikalischen Untersuchungen wurden vom Institut für Medizintechnik und Biophysik (IMB), Leiter: Professor Dr. H. Dertinger, des Forschungszentrums Karlsruhe durchgeführt.

Die gemessene Verteilung (Abb. 4) stimmt gut mit der theoretischen Feldverteilung überein (Abb. 3). In X/Y-Richtung hat der 5%-Bereich einen Durchmesser von circa 56 mm, d.h. er ist etwas kleiner als der theoretisch berechnete Bereich. In der Höhe reicht er ebenfalls über den nutzbaren Bereich (Abstand der inneren Platten) hinaus.

Aus Gründen der besseren Anschaulichkeit sind in der nächsten Abbildung noch einmal Schnittlinien durch die gemessenen Feldverteilungen im Abstand von 6 mm dargestellt.

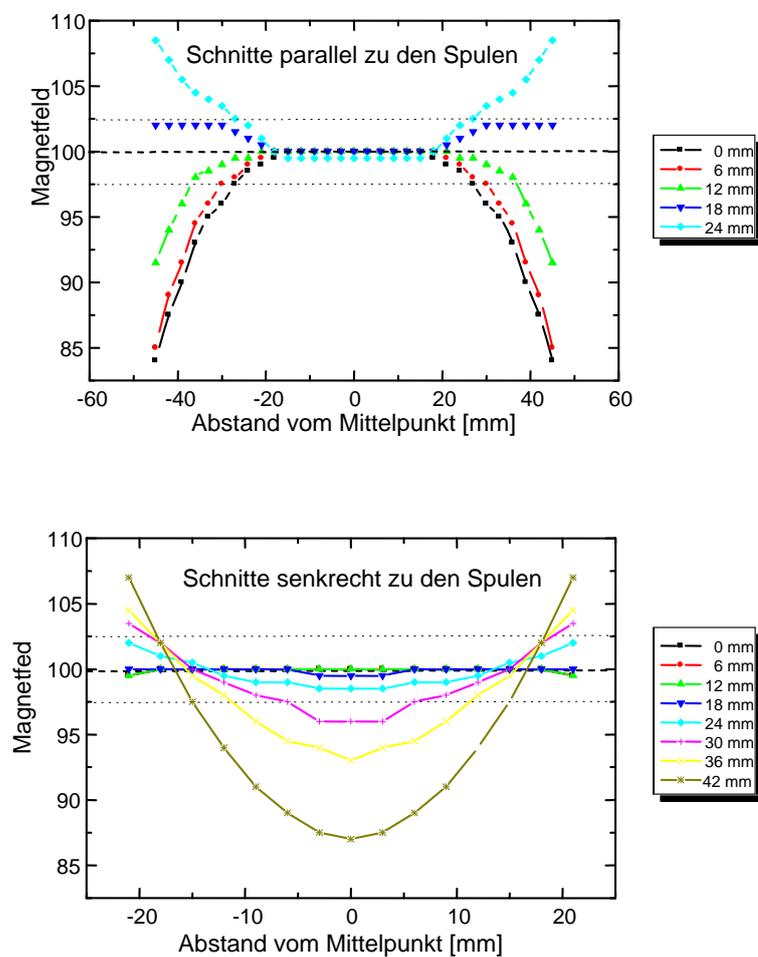


Abbildung 5: Feldverteilung in der Helmholtzspule in verschiedenen Schnittebenen parallel (oben) und rechtwinklig (unten) zu den Spulen. Der Abstand der Schnittebenen betrug 6 mm. Die gepunkteten Linien zeigen den Abstand $\pm 2.5\%$ an.

In der Abb. 5 sieht man noch deutlicher als in den beiden vorhergehenden Darstellungen, dass die Feldverteilung eine Sattelverteilung ist; in der einen Richtung wird das Feld größer, während es in der anderen Richtung abnimmt. Durch die positiven und negativen Abweichungen des Feldes ist der Mittelwert in einem relativ großen Volumen gleich dem Wert im Mittelpunkt. In dem Kugelvolumen mit dem Radius $r = d$ wurden der Mittelwert und die Standardabweichung mit $100 \pm 1.74\%$ berechnet, d.h. die Standardabweichung ist bedeutend kleiner als die Feldabweichungen in einzelnen Randfeldern.

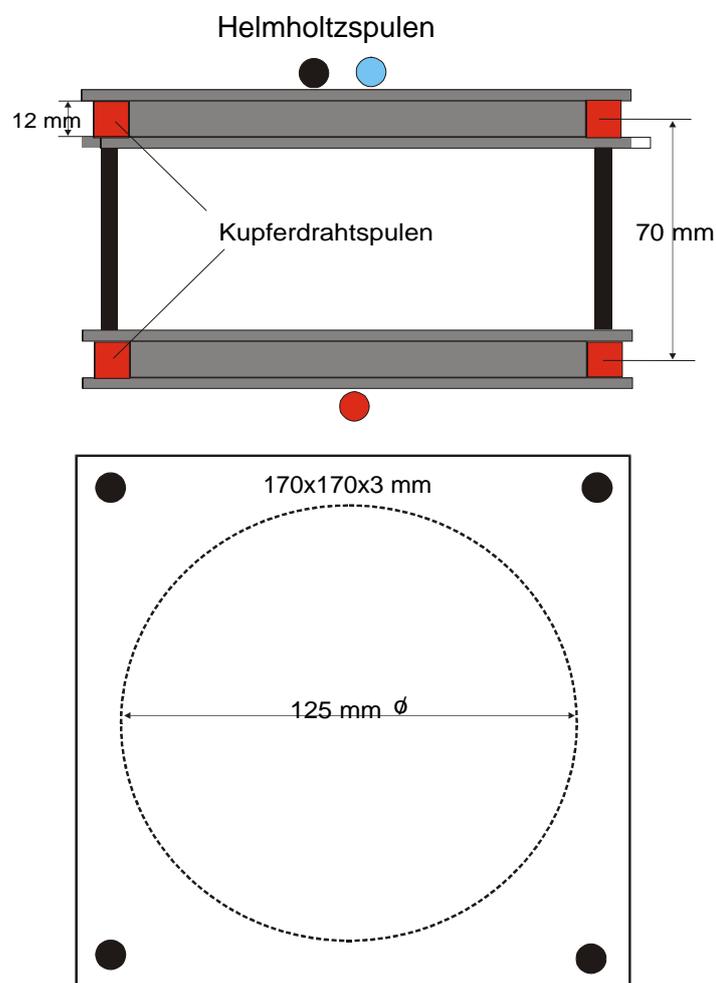


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Helmholtzspulen mit den wichtigsten Maßangaben

2.2 Bestromungskammern

Im Gegensatz zu magnetischen Feldern, die die Zellen durchdringen, können niederfrequente elektrische Felder und Ströme nur mit den Oberflächenstrukturen der Zellen wechselwirken. Der Grund hierfür liegt darin, dass die Zellmembran gegenüber elektrischen Feldern wie ein Kondensator wirkt, der nur die höherfrequenten Felder durchlässt. Bei Suspensionskulturen genügt es, zwei inerte Elektroden (Platin) von oben in das Medium einzutauchen, um sämtliche schwimmenden Zellen gleichmäßig zu bestromen. Bei der Bestromung von adhärennten Zellen ist darauf zu achten, dass ebenfalls die gesamte Zelloberfläche dem Strom ausgesetzt ist. Deshalb wurden für die Zellkulturexperimente mit adhärennten Zelllinien spezielle Bestromungskammern entwickelt.

Für die Stromkammern wurden 6-Loch-Platten mit einem flachen Boden modifiziert (Falcon 3046). Jedes der Wells (Löcher) hat einen Durchmesser von 35 mm und eine Tiefe von 17,75 mm. Am Boden jedes Wells befindet sich ein Platinnetz, das über einen Platindraht mit den roten Anschlüssen außerhalb der Wells an deren Seite verbunden ist. Der Gegenpol befindet sich als stempelförmiger Elektrodenträger aus Teflon im Deckel.

Daran ist für jedes Loch ein Platinnetz (24,5 mm Ø) befestigt, das über einen Platindraht mit den schwarzen Anschlüssen auf dem Deckel verbunden ist. Die stromaktive Fläche pro Loch ist also 4,71 cm². Alle Halterungen der Platinnetze sind aus Teflon. In die Löcher kommen 6 sterile Inserts (Falcon 3090) mit 0,45 µm Porengröße (Abb. 7, oben).

Der Abstand zwischen der unteren Platinelektrode und der Unterseite der Membran des Inserts beträgt 0,9 mm. Der Abstand von der Oberseite der Membran bis zur oberen Platinelektrode beträgt 3,0 mm (Abb. 7, unten), sodass der Abstand der beiden Platinelektroden ungefähr 4 mm beträgt. Die Löcher werden mit circa 3 ml Medium und die Inserts mit 2 ml Medium befüllt.

Die Zellen wurden nun folgendermaßen bestromt. Die oberen drei Löcher (1, 2 und 3) dienten als interne Kontrolle und wurden nicht bestromt. Dazu sind die zugehörigen unteren und oberen drei Elektroden miteinander verbunden, so dass induzierte Ströme

verhindert werden (Abb. 7). Die Zellen in den unteren drei Löchern (4-6) werden bestromt.

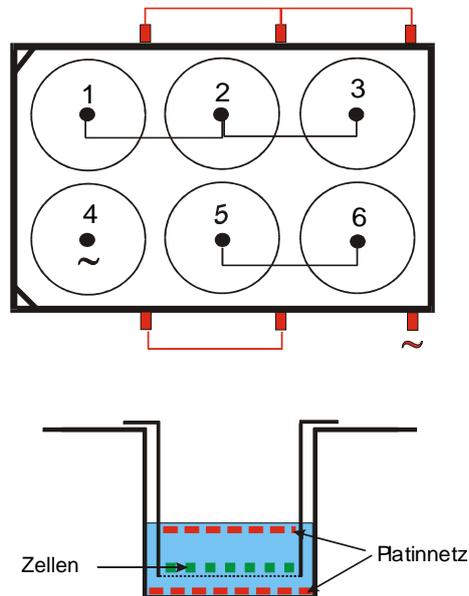


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Bestromungskammer (oben) und eines einzelnen Lochs (Well) mit Einsatz (unten).

Um eine gleichmäßige Bestromung aller Proben zu gewährleisten, sind die drei Löcher in Reihe geschaltet (siehe Abbildung 7), d.h. der Wechselstrom fließt von der Deckelelektrode (Loch 4) durch die Zellen (Loch 5) und über die Deckelelektroden (Loch 5 und 6) in das Loch 6, wo er über die Bodenelektrode (Loch 6) wieder austritt. Die Fläche der Platinelektroden beträgt $4,70 \text{ cm}^2$, d.h. die gemessene Stromstärke muss durch 4,70 dividiert werden um die Stromdichte [A / cm^2] zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zelltypen

Bei den durchgeführten Versuchen wurde das Proliferationsverhalten von Zellen unter dem Einfluss von Magnetfeldern und Interferenzströmen untersucht. Dafür sind drei verschiedene Zelltypen verwendet worden:

1. transgene koronare glatte Muskelzellen vom Rind (bov-cSMC)
2. aortale glatte Muskelzellen der Maus (ms-aSMC) mit induzierbarer Expression von SV 40 Tumorantigen
3. umbilikalvenöse Endothelzellen vom Menschen (HUVEC)

Die glatten Muskelzellen vom Rind und von der Maus sind sowohl im proliferierenden als auch im ruhenden Zustand untersucht worden, wie unter 3.1.4 näher beschrieben.

3.1.2 Kulturmedien

Die Kultivierung der glatten Muskelzellen sowohl vom Rind (bei 37°C) als auch von der Maus (bei 33°C) erfolgte unter sterilen Bedingungen in einer Atmosphäre aus 95% Luft und 5% CO₂. Für die Versuche wurde „Dulbecco’s Modification of Eagle Medium“ (DMEM) der Firma AppliChem, Darmstadt als Kulturmedium verwendet. Das DMEM-Pulver enthält:

- a) 4,5 g/l D(+)-Glucose
- b) L-Glutamine
- c) Natriumpyruvat

Pro Liter gebrauchsfertigen Mediums werden 13,5 g/l DMEM-Pulver benötigt. Zugemischt werden pro Liter Lösung 3,7g NaHCO_3 , 5ml L-Glutamin der Firma Biochrom AG, Biochrom, 50 ml Kälberserum (Calf Serum) von GIBCO®, Eggenstein und 5 ml einer antibiotisch-antimykotischen Lösung (A5955) der Firma Sigma, Deisenhofen; der pH-Wert lag bei 7,2. Die Aussaat der Zellen erfolgte in 75 ml Zellkulturflaschen (Nunc, Wiesbaden) in einer Konzentration von $0,25 - 0,5 \times 10^6$ Zellen in 12 ml Medium.

Bei der Kultivierung der humanen Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC) der Firma PromoCell® kamen Substanzen desselben Herstellers zum Einsatz. Dazu wurde der „Endothelial Cell Kit HUVEC-c“ der Firma PromoCell®, Heidelberg benutzt.

Die Kultivierung der HUVEC erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die der bovinen glatten Muskelzellen bei 37°C. Als Kulturmedium wurde „Endothelial Cell Growth Medium“ der Firma PromoCell® verwendet. Auch die Aussaat der Endothelzellen erfolgte in 75 ml Zellkulturflaschen der Firma Nunc in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen in 12 ml Medium.

3.1.3 Subkultivierung der Zellen

3.1.3.1 Glatte Muskelzellen

Zur Subkultivierung wurden die konfluenten Zellen zunächst einmal mit HANKS-Lösung (HANKS Balanced Salt Solution) gespült um eventuell vorhandenen Zelldetritus und Serumanteile des Mediums zu entfernen; letztere würden die Trypsinisierung der Zellen stören. Das HANKS-Pulver zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung stammt von der Firma ICN, Eschwege und enthält natriumbicarbonatfreie „Balanced Salts“. Für 5 l der fertigen Lösung benötigt man 48,8 g des Pulvers. Der Lösung werden zusätzlich 1,75 g/5l NaHCO_3 hinzugefügt und der pH auf 7,4 eingestellt.

Anschließend werden 1500 µl Trypsin/EDTA Lösung (0,05/0,02%) auf den Zellrasen der glatten Muskelzellen der Maus, beziehungsweise 3 ml auf den Zellrasen der glatten bovinen Muskelzellen gegeben und gleichmäßig verteilt. Daraufhin wurden die Mäusezellen für circa 2 min bei 33°C, die bovinen Zellen für circa 5 min bei 37°C inkubiert. Das verwendete 1x Trypsin-EDTA stammt von der Firma ICN.

Im Anschluss wurden die Zellen durch leichtes Klopfen vom Flaschenboden gelöst. Dann wurde entsprechend der vorgelegten Trypsinmenge so viel Kulturmedium in die Zellkulturflasche gegeben, dass ein Suspensionsvolumen von 10 ml entstand. Durch wiederholtes Aufnehmen der Suspension und Abspülen des Flaschenbodens wurde sichergestellt, dass sich alle abgelösten Zellen in der Suspension befinden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 100 oder 200 µl aus der Zellsuspension entnommen. Die darauffolgende Aussaat erfolgte entweder zur weiteren Kultivierung in 75 ml Zellkulturflaschen oder zum Ansatz eines Versuches in die für die 6er Wells passenden Inserts der Firma Falcon (3090), Heidelberg oder direkt in 6er-Wells „CELLSTAR“ der Firma Greiner bio-one, Essen für die Magnetfeldversuche.

3.1.3.2 Endothelzellen

Zur Subkultivierung wurden die Endothelzellkulturen zunächst mit 5 ml HepesBSS (Buffered Saline Solution) gespült. Daran schloss sich die Ablösung der Zellen mit Trypsin/EDTA an, das maximal 7 Minuten auf die Kultur einwirken darf. Das Abstoppen der Reaktion erfolgt mit 5 ml Trypsin Neutralizing Solution (TNS).

Die erhaltene Suspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, das für 4 Minuten bei Raumtemperatur (22°C) und einer Beschleunigung von 220 g zentrifugiert wurde.

Im Anschluss daran wurde der klare Überstand vorsichtig abpipettiert und das am Boden zurückbleibende Zell-Pellet in 6 bis 10 ml Medium resuspendiert. Die Zellzählung erfolgte je nach Zelldichte mit 100 oder 200 µl dieser Zellsuspension.

Bei der Aussaat der Endothelzellen für die Magnetversuche wurden 35 mm Zellkulturschalen („Tissue culture dishes“) der Firma Falcon (35 3001) verwendet.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Nach vorsichtiger Resuspension der abgelösten Zellen in Medium wurden 200 μ l der jeweiligen Zellsuspension in 9,8 ml eines schwachen Elektrolyten (BLR 174, Firma Waldeck, Münster) überführt. Bei extrem hoher Zelldichte wurden nur 100 μ l eingesetzt, um die Kapazität des Zellzählgerätes nicht zu überschreiten.

Sämtliche Zellzählungen erfolgten mit einem CASY®1 Cell Counter + Analyser System Model TT der Firma Schärfe System GmbH, Reutlingen. Angaben erfolgten dabei stets in Zellzahl/ ml.

3.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterial

3.1.5.1 Elektromagnet

Der verwendete Signalgenerator ist der TOE 7402 Function Generator (Abb. 8) der Firma Toellner, Herdecke mit einem Frequenzspektrum von 0,5 Hz bis 5 MHz. Er hat am 50 Ω Ausgang eine maximale effektive Spannung/Stromstärke von 10.9 V/ 210 mA. Damit ergibt sich rechnerisch eine maximale Feldstärke (siehe Gleichung 1) von 260 μ T. Die in der Versuchsspule gemessene Magnetfeldstärke betrug 36 μ T. Die Helmholtzspulen mussten nicht gekühlt werden, da die maximale Feldstärke ohne messbare Erwärmung bei 2 mT liegt. Die eingesetzte Feldstärke ist um ein Vielfaches niedriger.



Abb. 8: Magnetfeld-Signalgenerator TOE 7402 Function Generator der Firma Toellner

Die äußeren Abmessungen der Magnete lagen bei 170 mm in der Breite, 170 mm in der Tiefe und 110 mm in der Höhe (Abb. 6). Die Spulen waren aus Kupferlackdraht gewickelt (0.5 mm Durchmesser), der mittlere Durchmesser betrug 140 mm und der mittlere Abstand der beiden Spulen 70 mm. Der maximal nutzbare Abstand zwischen den beiden inneren Platten der Spulenträger betrug 52 mm. Die mechanischen Teile der Helmholtzspulen waren aus PVC gefertigt und die einzelnen Teile mit Nygonschrauben verbunden. Um eine Erwärmung der Proben durch die Spulen und mechanische Vibrationen zu minimieren, wurde die Unterseite und Oberseite der Spulen mit 3 mm Dämmmaterial beklebt.

Da unter Versuchsbedingungen im Zellkulturschrank der Abstand der beiden Spulen zu gering war, musste die sogenannte Kontrollspule gegen das Streufeld der eingeschalteten Magnetspule abgeschirmt werden. Als Kontrollspule fungierte daher eine zweite Helmholtzspule (Abb. 10), deren Magnetspulen durch einen Metallrahmen voneinander getrennt waren. Dadurch konnte die Magnetfeldstärke von 36 μT auf 1 μT reduziert werden.

An der Unterseite der Magnete befand sich eine rote Buchse, an der Oberseite links eine schwarze und rechts eine blaue Buchse (siehe Abb. 6). Wurde die Helmholtzspule als Magnet betrieben, mussten die schwarze und die blaue Buchse verbunden und die Spannung dann an der roten und der schwarzen/blauen Buchse angelegt werden. Wurde die Helmholtzspule zur Kontrollexposition ohne angelegte Stromquelle benutzt, mussten alle drei Buchsen miteinander verbunden sein, um induzierte Spannungen auszuschließen.

Zwischen Magnetspule und dem Transformatorausgang war zur Feinregulierung des Stromes ein Widerstand von 10 Ω in Reihe geschaltet. Bei von 50 Hz abweichenden Frequenzen musste das Ausgangssignal des Signalgenerators nachverstärkt werden.

Zur Durchführung der Versuche wurden die unter 3.1.3 beschriebenen Dishes bzw. 6er-Wells zwischen die beiden Magnetspulen gebracht.

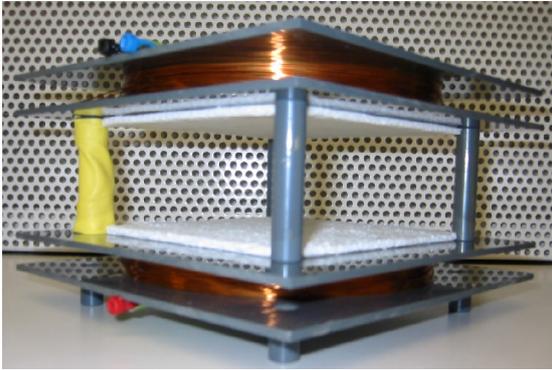


Abb. 9: Helmholtzspule; Versuchsspule, die eine Magnetfeldstärke von $36\mu\text{T}$ generierte

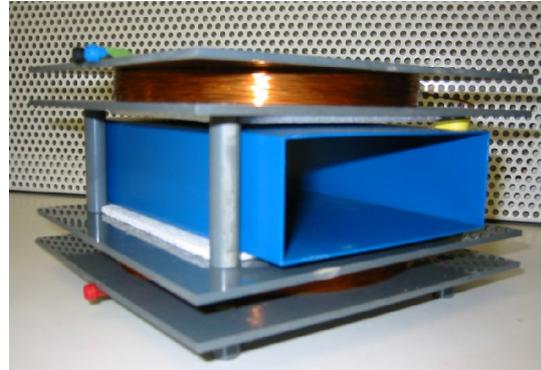


Abb. 10: Helmholtzspule; diese durch einen Metallrahmen ausgekleidete Spule diente bei den Experimenten als Kontrollspule, die die Stärke des oben genannten Magnetfeldes auf $1\mu\text{T}$ reduzierte

3.1.5.2 Bestromungsgerät

Die elektrischen Signale für die Stromkammer wurden aus dem Signalgenerator Nemectron EDIT2 der Firma Nemectron GmbH, Karlsruhe entnommen.



Abb. 11: Signalgenerator Nemectron EDIT2 zur Interferenzstromerzeugung

Das Behandlungsgerät EDIT2 ist für den medizinischen Gebrauch konzipiert. Daher konnte es nur über ein Interface (das die unterschiedlichen Widerstände für Zellkulturmedium im Vergleich zur menschlichen Haut berücksichtigt) an die Zellkulturbedingungen angepasst werden. Das Interface wurde auf der einen Seite

über einen 5-poligen Stecker an das EDIT2 angeschlossen, auf der anderen Seite befanden sich zwei Paar Buchsen (I cells und U cells), vgl. Abb. 12. Der Strom kann mit dem 10-gängigen Potentiometer zwischen 0 und ungefähr 15 mA eingestellt werden. Das Reizstromgerät EDIT2 hat viele Funktionen, die über die entsprechenden Tasten aktiviert werden können. Für die Bestromung der Zellen wird jedoch nur ein Teil dieser Funktionen benutzt, die im folgenden kurz beschrieben werden:

- a) mit dem Druckknopf links wird das Gerät ein- und ausgeschaltet
- b) mit dem linken Drehknopf (Festfrequenz) lässt sich die Modulationsfrequenz von 0.5 bis 200Hz in Schritten einstellen (bei kleinen Frequenzen in 0,5 Hz- bei größeren Frequenzen in 5 Hz-Schritten)
- c) links im Display wird die Modulationsfrequenz digital in Hertz angezeigt
- d) die Stromintensität wird am grünen Drehknopf eingestellt
- e) links vom Drehknopf wird der vom Gerät gelieferte Strom angezeigt; der angezeigte Strom liegt am Eingang des Interfaces, der Strom durch die Kammer ist bedeutend kleiner
- f) mit dem rechten schwarzen Drehknopf wird die Bestromungszeit eingestellt (ist nur möglich, wenn der grüne Drehknopf auf null steht)
- g) links davon wird die eingestellte Zeit digital am Display angezeigt; wird der schwarze Drehknopf rechts bis zum Anschlag gedreht, ist das Gerät dauernd eingeschaltet und das Display erlischt
- h) der Strom wird jedes Mal nur dann eingeschaltet, indem die Intensität mit dem grünen Drehknopf erst nach links bis zum Anschlag auf 0 und dann nach rechts bis zur gewünschten Intensität gedreht wird. Dann zeigt das Gerät eine unter g) eingestellte Bestromungszeit an und zählt rückwärts nach null; bei null wird der Strom abgeschaltet und ein akustisches Signal ertönt.

Die Stromkammer (der Multiwell-Platte) wurde mit Kabeln (2 mm Stecker) an den beiden Eingängen (U cells) angeschlossen. Der Strom, der durch die Kammer floss, musste mit einem Strommessgerät (siehe 3.1.5.3) bei I cells gemessen und eingestellt werden. War kein Amperemeter angeschlossen, mussten die beiden Buchsen (I cells) verbunden werden.

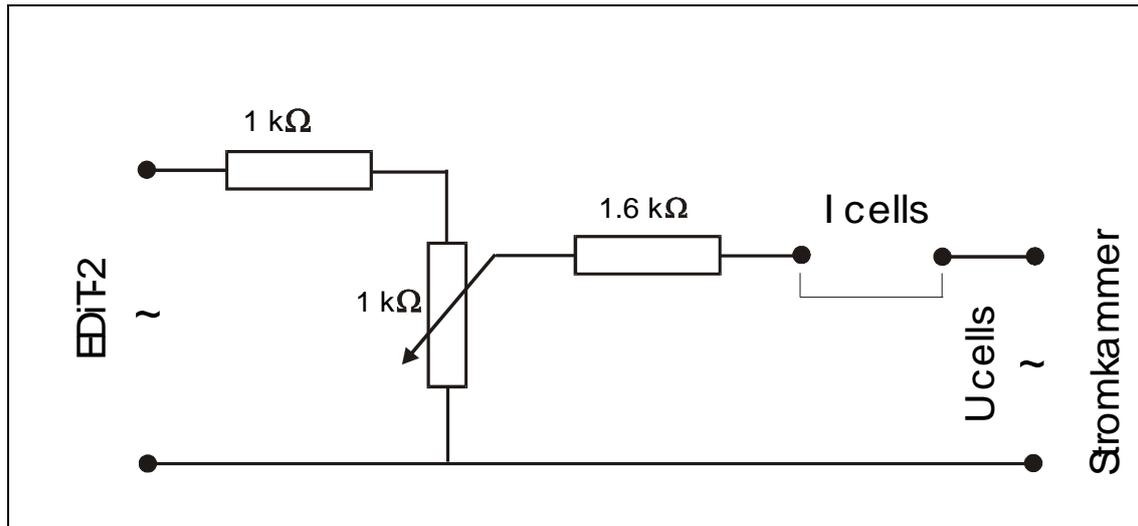


Abbildung 12: Schematische Schaltung des Interfaces

3.1.5.3 Strommessgerät

Bei dem Strommessgerät, das bei unseren Versuchen verwendet wurde, handelt es sich um das Digitalmultimeter VC 820 aus dem Hause Conrad Electronic, Bremen.

Mit diesem Gerät konnten Gleich- und Wechselstrommessungen auch im Mikroampere-Bereich durchgeführt werden, wie es für die Experimente erforderlich war.

3.1.6 Standardversuch

3.1.6.1 Vaskuläre glatte Muskelzellen

Eigene Vorversuche haben ergeben, dass sowohl für die Inserts der Bestromungskammern, als auch für die bei den Magnetversuchen zum Einsatz gekommenen 6er-Wells „CELLSTAR“ der Firma Greiner bio-one bei einem Beobachtungszeitraum zwischen 24 und 72 Stunden eine Aussaat von 30.000 Zellen pro Insert beziehungsweise 6er-Well-Vertiefung optimal ist. Ein dementsprechendes Suspensionsvolumen wurde in die Inserts, Dishes und 6er-wells gegeben und mit Medium auf 2 ml Gesamtvolumen aufgefüllt.

Die glatten Muskelzellen wurden sowohl in proliferierendem als auch in ruhendem Zustand für die Experimente eingesetzt. Um die proliferierenden Zellen in den ruhenden Status zu überführen, erfolgt 24 h nach Aussaat ein Mediumwechsel, bei dem das kälberserumhaltige Normalmedium gegen serumfreies Medium ausgetauscht wird.

In diesem sogenannten „0“-Medium wurden die Zellen für weitere 48 h belassen, um sicherzustellen, dass die Proliferation vor Versuchsbeginn gestoppt ist. Der Aufbau und die Durchführung des Standardversuchs entsprach bei den ruhenden Zellen ansonsten denen der proliferierenden Zellen.

3.1.6.2 Endothelzellen

Das Versuchsschema bei den Endothelzellen entsprach dem der proliferierenden glatten Muskelzellen. Aufgrund der von der Firma Promocell bei der Aussaat empfohlenen Zelldichte wurden 50.000 Zellen pro Dish ausgesät.

3.2 Experimentalserien

3.2.1 Einfluss von Magnetfeldern auf die Zellproliferation

In den Experimentalserien zum Einfluss eines Magnetfeldes auf die Zellproliferation wurden folgende Parameter variiert:

- a) Frequenz des Magnetfeldes
- b) Dauer der Magnetfeldeinwirkung
- c) Inkubationszeitraum nach Magnetfeldeinwirkung

Die für die Experimente verwendeten Kombinationen dieser drei Parameter sind in Tab. 1 dargestellt:

Tabelle 1: Untersuchte Versuchsparameterkombination Magnetfeld

Kombination	Frequenz	Einwirkungsdauer	Proliferationszeitraum
1.	25 Hz	15 min	24 h
2.	25 Hz	15 min	48h
3.	50 Hz	5 min	24 h
4.	50 Hz	5 min	48 h
5.	50 Hz	15 min	24 h
6.	50 Hz	15 min	48 h
7.	50 Hz	30 min	24 h
8.	50 Hz	30 min	48 h
9.	100 Hz	15 min	24 h
10.	100 Hz	15 min	48 h

3.2.2 Einfluss von Interferenzstrom auf die Zellproliferation

In den Experimentalserien zum Einfluss von Interferenzstrom auf die Zellproliferation wurden bei konstanter Frequenz von 125 Hz folgende Parameter variiert:

- a) Stromstärke des Interferenzstromes
- b) Dauer der Interferenzstromeinwirkung
- c) Inkubationszeitraum nach Interferenzstromeinwirkung

Die für die Experimente verwendeten Kombinationen dieser drei Parameter sind in Tab. 2 dargestellt:

Tabelle 2: Untersuchte Versuchsparameterkombination Interferenzstrom

Kombination	Stromstärke	Einwirkungsdauer	Proliferationszeitraum
1.	100 μ A	15 min	24 h
2.	100 μ A	15 min	48 h
3.	200 μ A	15 min	24 h
4.	200 μ A	15 min	48 h
5.	300 μ A	15 min	24 h
6.	300 μ A	15 min	48 h
7.	200 μ A	5 min	24 h
8.	200 μ A	30 min	24 h

3.3 Darstellung und Auswertung der Ergebnisse

Sämtliche erhobenen Daten wurden im Tabellenkalkulationsprogramm Excel (Microsoft Corp., Redmond, USA) in einem Erhebungsbogen zusammengefasst und anschließend unter Verwendung des Programms SigmaPlot 2002 für Windows Version 8.0 (SPSS Inc., Chicago, USA) graphisch dargestellt.

Absolute wie relative Ergebnisse wurden, sofern nicht anders angegeben, als Mittelwert (MW) mit zugehöriger Standardabweichung (\pm SD) aufgeführt. Für alle durchgeführten T-Tests war das gewählte Signifikanzniveau $p < 0,05$. In der graphischen Darstellung entspricht * = $p < 0,05$ und ** = $p < 0,01$.

Da die absoluten Zellzahlen von Zelltyp zu Zelltyp und von Passage zu Passage schwanken können, wurden alle Ergebnisse auf die zugehörigen Kontrollen normiert und in % dargestellt. Alle Kontrollen wurden dabei 100% gleichgesetzt.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von Magnetfeldern auf die Zellproliferation

4.1.1 Vaskuläre glatte Muskelzellen

Für die Experimente wurden die bereits erwähnten bov-cSMC und ms-aSMC eingesetzt. Im Gegensatz zu den ms-aSMC wurden die bov-cSMC nicht nur im proliferierenden Zustand, sondern auch im ruhenden Zustand in die Experimente eingesetzt. Die Zeiträume bis zur Zellzählung (Inkubationsdauer) betragen bei allen Versuchsreihen entweder 24 oder 48 Stunden.

4.1.1.1 Experimente mit proliferierenden bovinen coronaren SMCs

In der ersten Experimentalserie wurde die Frequenz des jeweiligen Magnetfeldes zwischen 25, 50 und 100 Hz variiert. Die Expositionsdauer lag konstant bei 15 Minuten.

Wie auch der Abb. 13 zu entnehmen ist, konnte die Zellproliferation bei den bov-cSMC durch alle drei Feldfrequenzen bei 15minütiger Exposition gesteigert werden. Bei einer Frequenz von 50 Hz war der Effekt am größten. Sowohl nach 24 h als auch nach 48 h Inkubationsdauer wurde der Kontrollwert um knapp 20% überschritten (24h: 19,2%, 48h: 19,1%, jeweils $p < 0,01$). Bei einer Frequenz von 25 Hz betrug die Steigerung immerhin noch 13,7% nach 24 h ($p < 0,01$) und 11,8% nach 48 h ($p < 0,05$). Der positive Einfluss auf die Zellproliferation fiel bei einer Frequenz von 100 Hz am geringsten aus: nach 24 h wurden durchschnittlich 110,7% erreicht ($p < 0,05$) und nach 48 h Inkubation 111% (nicht signifikant (ns)).

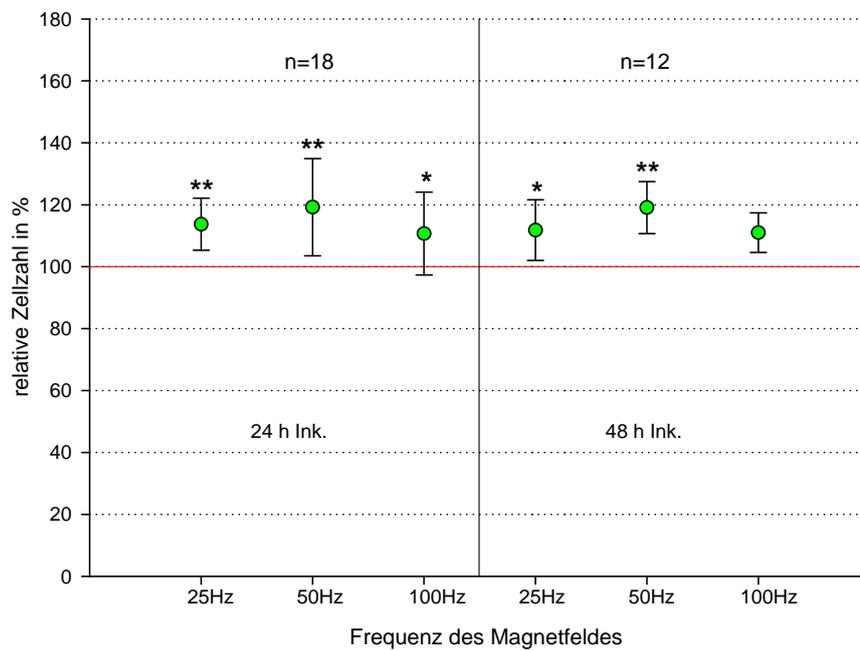


Abb. 13: Einfluss des Magnetfeldes auf die Zellproliferation von proliferierenden bovinen cSMC in Abhängigkeit von der Frequenz (Hz) und der anschließenden Inkubationsdauer (Ink.) bis zur Zellzählung; Mittelwerte (n=12-18) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie), * = Zellzahlen signifikant verschieden vom Kontrollwert (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

In einer zweiten Experimentalserie n=12-18 wurde die Frequenz konstant bei 50 Hz gehalten und die Expositionsdauer zwischen 5 und 30 min variiert, wobei die Zellzählungen analog der ersten Experimentalserie erfolgten.

Abgesehen von den Resultaten der 5minütigen Exposition mit anschließender Inkubation von 48 h (relative Zellzahl 98,4%, ns) erfolgte auch bei dieser Experimentalserie eine Steigerung der Zellproliferation.

Bei einer Expositionsdauer von 5 Minuten wurde der Kontrollwert um 21,9% nach 24stündiger Inkubation gesteigert ($p < 0,01$) und nach 30 min immerhin noch um 16,2% ($p < 0,01$). Bei einer 30minütigen Expositionsdauer und einem 48stündigen Inkubationszeitraum stieg die Zellproliferation durchschnittlich allerdings nur noch um 8,4% (ns).

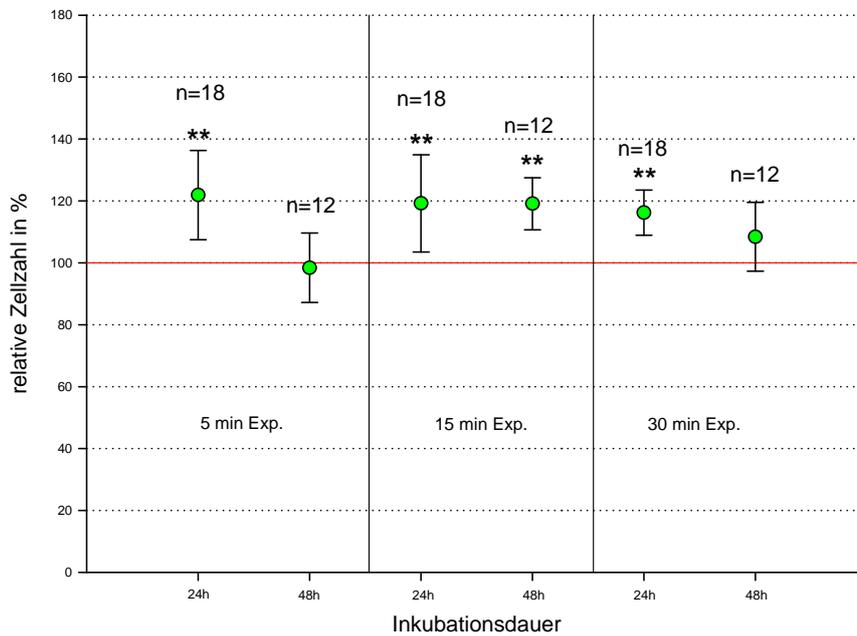


Abb. 14: Einfluss des Magnetfeldes auf die Zellproliferation von proliferierenden bovinen cSMC bei konstanter Frequenz von 50 Hz in Abhängigkeit von der Magnetfeld-Expositionsdauer (Exp.) und der anschließenden Inkubationsdauer bis zur Zellzählung; Mittelwerte (n=12-18) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie), * = Zellzahlen signifikant verschieden vom Kontrollwert (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

4.1.1.2 Experimente mit ruhenden bovinen coronaren SMC

Bei den Experimenten mit ruhenden bov-cSMC gab es bei keiner Frequenz (weder 25, 50 noch 100Hz) eine signifikante Induktion der Zellproliferation. Bei dieser Serie lag die Expositionsdauer konstant bei 15 Minuten.

24 Stunden nach Exposition entsprachen die Zellzahlen bei allen drei Frequenzen nahezu denen der jeweiligen Kontrollen (25 Hz 99,4%, 50 Hz 100,3%, 100 Hz 104,4%). 48 Stunden nach Exposition konnten mit 112,4% bei 25 Hz und 108,4% bei 50 Hz zumindest Tendenzen einer induzierten Proliferation ermittelt werden. Aufgrund der relativen großen Streuweite sind die Differenzen jedoch nicht signifikant von den Kontrollen verschieden. Bei 100 Hz entsprach die Zellzahl mit 100,5% wieder dem Kontrollwert.

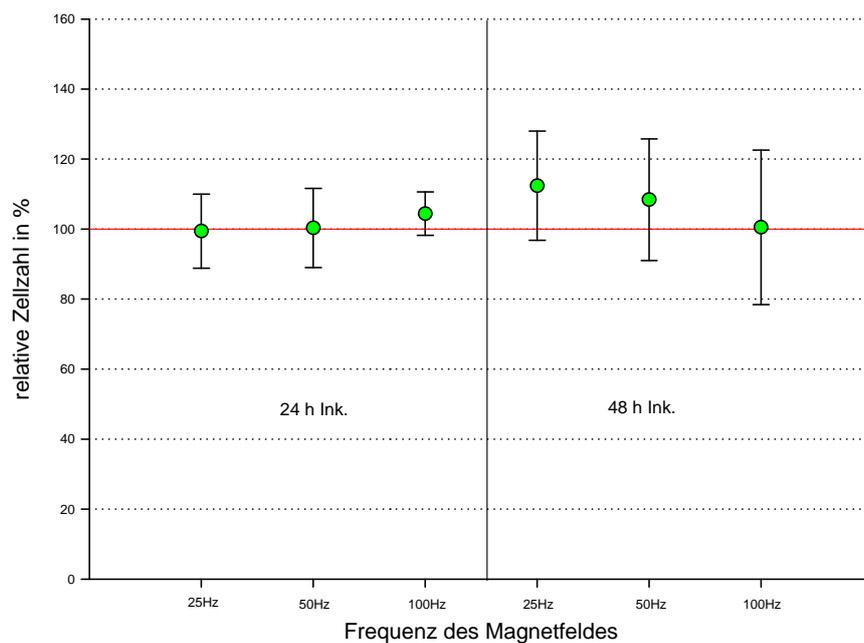


Abb. 15: Einfluss des Magnetfeldes auf die Zellproliferation von ruhenden bovinen cSMC in Abhängigkeit von der von der Frequenz (Hz) und der anschließenden Inkubationsdauer bis zur Zellzählung; Mittelwerte (n=6) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie), * = Zellzahlen signifikant verschieden vom Kontrollwert (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

Bei einer Frequenz von 25 Hz (12,4%) und bei einer Frequenz von 50 Hz (8,4%) konnte nach einer Inkubation von 48 Stunden die Zellproliferation etwas deutlicher gesteigert werden.

4.1.1.3 Experimente mit proliferierenden murinen transgenen aortalen SMC mit Expression von SV 40 Tumorantigen

In der ersten Experimentalserie mit aortalen glatten Muskelzellen der Maus (ms-aSMC) wurde zunächst die Frequenz des jeweiligen Magnetfeldes wie bei den vorangehenden Versuchen variiert (25, 50 und 100 Hz). Bei allen drei Frequenzen konnte zumindest eine Tendenz zur Steigerung der Zellproliferation durch die Magnetfeldexposition erreicht werden. Vier der sechs Experimente ergaben dabei signifikante Ergebnisse. Die Expositionsdauer lag auch bei dieser Serie konstant bei 15 Minuten.

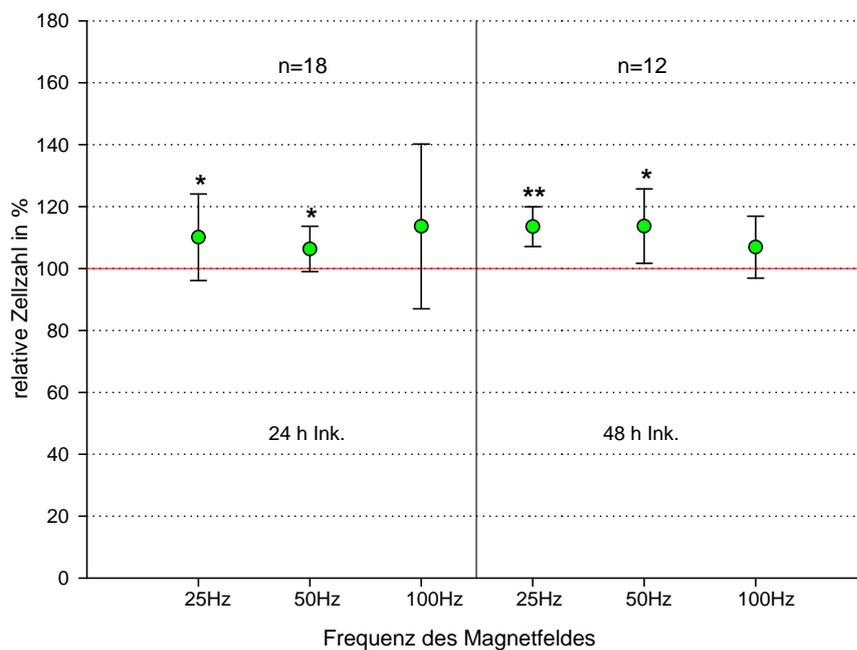


Abb. 16: Einfluss des Magnetfeldes auf die Zellproliferation von proliferierenden ms-aSMC in Abhängigkeit von der Frequenz (Hz) und der anschließenden Inkubationsdauer bis zur Zellzählung; Mittelwerte (n=12-18) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie), * = Zellzahlen signifikant verschieden vom Kontrollwert (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

In Abb. 16 ist zu sehen, dass die Zellproliferation bei den ms-aSMC durch alle Frequenzen bei 15minütiger Exposition gesteigert werden konnte. Bei einer Frequenz von 25 Hz wurde die relative Zellzahl 24 h nach Exposition um 10,1% im Vergleich zum Kontrollwert gesteigert ($p < 0,05$), nach 48stündiger Inkubation sogar um 13,5% ($p < 0,01$). Lag die Frequenz bei 50 Hz, wurde die Kontrolle um 6,3% nach 24 h ($p < 0,05$) und 13,7% nach 48 h ($p < 0,05$) übertroffen. Aufgrund der großen Standardabweichung (SD) ist die Steigerung der Zellproliferation um 13,6% bei einer Frequenz von 100 Hz nicht signifikant von den Kontrollwerten verschieden. Ebenfalls nicht signifikant war das Ergebnis bei 100 Hz mit einer 6,9 %igen Steigerung der Zellproliferation.

Die zweite Serie wurde mit einer konstanten Frequenz von 50 Hz mit verschiedenen Expositionsdauern (5 und 30 min) durchgeführt.

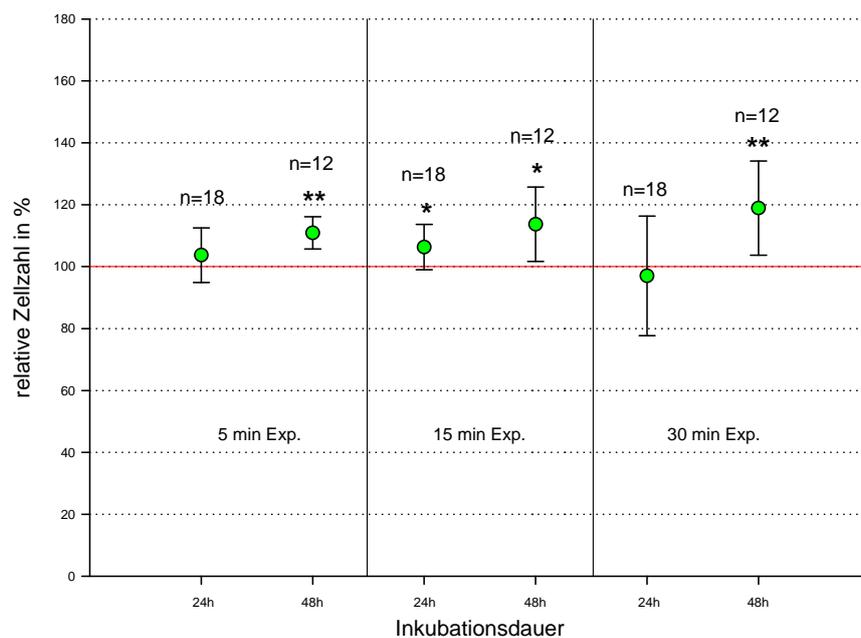


Abb. 17: Einfluss des Magnetfeldes auf die Zellproliferation von proliferierenden ms-aSMC in Abhängigkeit von der Magnetfeld-Expositionsdauer (min) und der anschließenden Inkubationsdauer bis zur Zellzählung; Angabe der relativen Zellzahl in % des Kontrollwertes (Mittelwerte, $n=6-18$) mit zugehöriger Standardabweichung; Mittelwerte signifikant verschieden vom Kontrollwert (100%), *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$

Die Zellproliferation konnte (siehe Abb. 17) bei zwei der vier Experimente mit den ms-aSMC gesteigert werden; bei einer Expositionsdauer von 30 min und einem Inkubationszeitraum von 24 Stunden war dies bei einer relativ großen SD nicht der Fall; bei fünfminütiger Exposition mit anschließender Inkubation für 24 Stunden steigerte sich die Zellproliferation auch nicht signifikant.

Nach jeweils 48stündiger Inkubation bei einer Expositionsdauer von 5 wie von 30 Minuten wurde der Kontrollwert um 10,9% beziehungsweise 18,9% übertroffen ($p < 0,01$).

4.1.2 Endothelzellen

Für die Experimente an Endothelzellen standen humane Umbilikalvenen-Zellen (HUVEC) zur Verfügung. Die Endothelzellen wurden ausschließlich im proliferierenden Zustand verwendet.

Dabei wurden die schon zuvor benutzten Frequenzen (25, 50 und 100 Hz) bei den Experimenten eingesetzt. Außerdem wurde die Serie ausschließlich bei einer konstanten Expositionsdauer von 15 Minuten durchgeführt, wobei die Zellzählungen wie schon in den vorangegangenen Experimentalserien nach 24 oder 48 Stunden erfolgten.

Bei dieser Experimentalserie wurden unabhängig von veränderten Versuchsparametern bei zum Teil sehr großen Standardabweichungen keine signifikanten Ergebnisse erzielt.

In drei Fällen blieb die Zellproliferation im Vergleich zu den Kontrollwerten unbeeinflusst: 24 h 50 Hz – 101,6%, 25 Hz 97,9%; 48 h 50 Hz – 97,4%.

Im Gegensatz dazu konnte die Zellproliferation bei einer Frequenz von 100 Hz immerhin noch um 9,7% nach 24 Stunden Inkubation gesteigert werden - um 9,9% bei einer Frequenz von 25 Hz und um 11,3% bei einer Frequenz von 100 Hz (jeweils 48h Inkubation), wobei aufgrund der sehr großen Streubreite der Einzelergebnisse auch bei einer Frequenz von 100 Hz das Ergebnis nicht signifikant war.

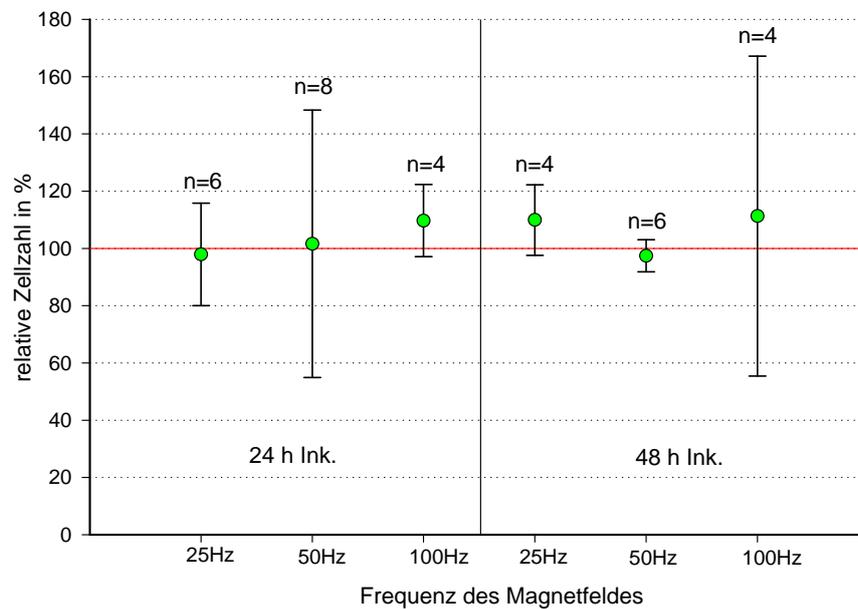


Abb. 18: Einfluss des Magnetfeldes auf die Zellproliferation von proliferierenden HUVEC in Abhängigkeit von der Frequenz (Hz) und der anschließenden Inkubationsdauer bis zur Zellzählung; Mittelwerte (n=4-8) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie)

4.2 Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss von Magnetfeldern

Für die vergleichenden Untersuchungen wurden alle drei eingesetzten Zelltypen herangezogen. Es wurden einerseits die verschiedenen Zelltypen untereinander verglichen und andererseits die Ergebnisse der bov-cSMC im ruhenden und proliferierenden Status gegenübergestellt. Die Angaben bezüglich der Signifikanzen in den Vergleichs-Abbildungen beziehen sich jeweils auf die Kontrollen desselben Zelltyps, entsprechen also den bei den Einzelergebnissen dargestellten.

4.2.1 Vergleich glatter Muskelzellen von Rind und Maus

In der ersten Gegenüberstellung wurden bov-cSMC mit ms-aSMC bei identischen Versuchsparametern verglichen. Als erstes wurden die Resultate aus den Experimenten mit verschiedenen Versuchsfrequenzen (25, 50 und 100 Hz) bei einer konstanten Expositionsdauer von 15 Minuten (Zellzählungen 24 oder 48 Stunden nach Magnetfeldexposition) miteinander verglichen.

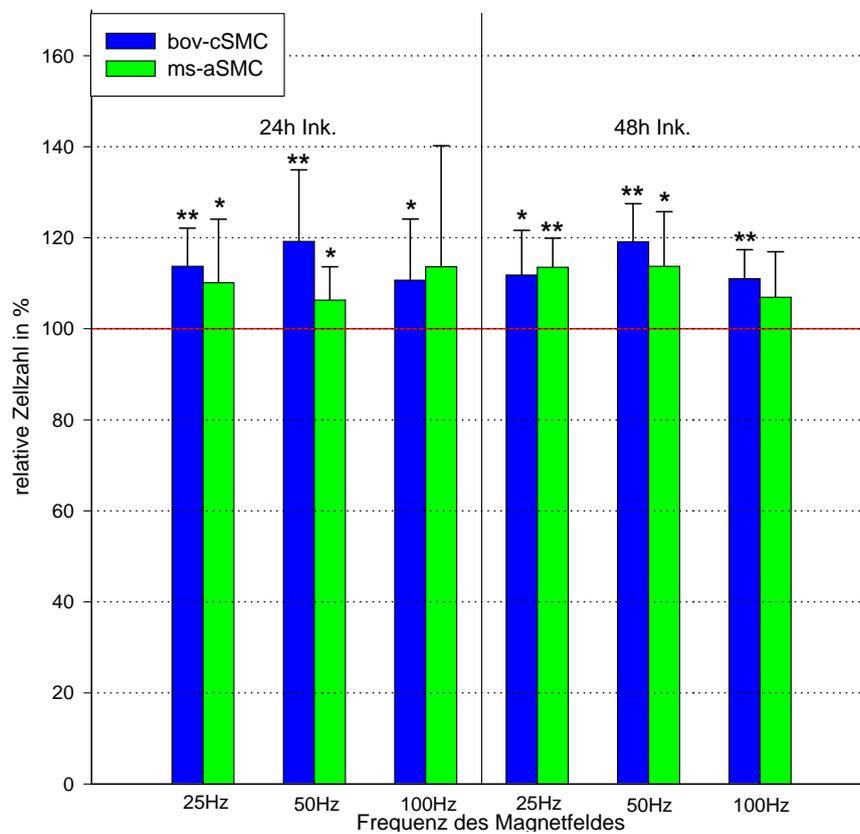


Abb. 19: Einfluss des Magnetfeldes auf die Zellproliferation von proliferierenden bov-cSMC im Vergleich mit ms-aSMC in Abhängigkeit von der Frequenz (Hz) und der anschließenden Inkubationsdauer bis zur Zellzählung; Mittelwerte (n=7-18) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie), * = Zellzahlen signifikant verschieden vom Kontrollwert (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

Abbildung 19 ist zu entnehmen, dass in vier der sechs Experimente die Zellproliferation der bov-cSMC stärker als die der ms-aSMC beeinflusst wurde. Bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden waren bei Frequenzen von 25 und 50 Hz die Zellproliferationsraten der bov-cSMC im Mittel um 3,6 beziehungsweise 12,9% höher als die der ms-aSMC. Wurde eine Frequenz von 100 Hz angelegt, führte das zu einer relativen Steigerung der Proliferation der ms-aSMC gegenüber den bov-cSMC von 2,9%, sodass in dieser Gruppe nur bei einer Frequenz von 50 Hz ein wirklich deutlicher Unterschied der Proliferation zu erkennen war.

Tab. 3: Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Zellzahlen glatter boviner Muskelzellen und glatter Muskelzellen der Maus in proliferierendem Zustand; alle Angaben in %

		25 Hz		50 Hz		100 Hz	
		MW	SD	MW	SD	MW	SD
bov cSMC	24 h	113,7	8,4	119,2	15,7	110,7	13,4
	48 h	111,8	9,8	119,1	8,4	111	6,4
ms cSMC	24 h	110,1	14	106,3	7,3	113,6	26,6
	48 h	113,5	6,4	113,7	12	106,9	10

Eine 48 Stunden währende Inkubationszeit führte nur zu einer geringfügigen Verringerung der gemittelten Zellzahl der bov-cSMC verglichen mit den ms-aSMC, wenn die Frequenz bei 25 Hz lag. Gesteigert wurde die Rate hingegen um 5,4% und 4,1%, lagen die Frequenzen bei 50 Hz beziehungsweise 100 Hz. Insgesamt fielen somit die Differenzen der Proliferation beider Zelltypen in dieser Gruppe gering aus.

Beim folgenden Experiment lag die Frequenz konstant bei 50 Hz. Die Expositionsdauer betrug 5, 15 und 30 min. Die Zellzählungen erfolgten in diesem Fall 24, 48 oder 72 Stunden im Anschluss an die Magnetfeldexposition. Wurden die Zellzählungen nach 72 Stunden durchgeführt, dann wurden die Zellen entweder einmal oder zweimal für 15 Minuten dem Magnetfeld von 50 Hz ausgesetzt.

Nur in zwei Fällen proliferierten in diesem Vergleich die bov-cSMC stärker als die ms-aSMC. Zum einen um 18,2% nach fünfminütiger Exposition, zum anderen um 19,2% nach 30minütiger Exposition bei einem jeweiligen Inkubationszeitraum von 24 Stunden. Nach 48stündiger Exposition bei ansonsten gleichen Versuchsparametern vermehrten sich im Vergleich die ms-aSMC stärker; und zwar um 12,5% (5 min Exp.) und 10,5% (30 min Exp.).

Genauso wie in den letzten beiden Fällen verhielt sich das Proliferationsverhalten bei einer Gesamtinkubationsdauer von 72 Stunden.

Nach einmaliger Magnetfeldexposition war das Wachstum der ms-aSMC nahezu gleich, nach zweimaliger sogar um 16,1% erhöht.

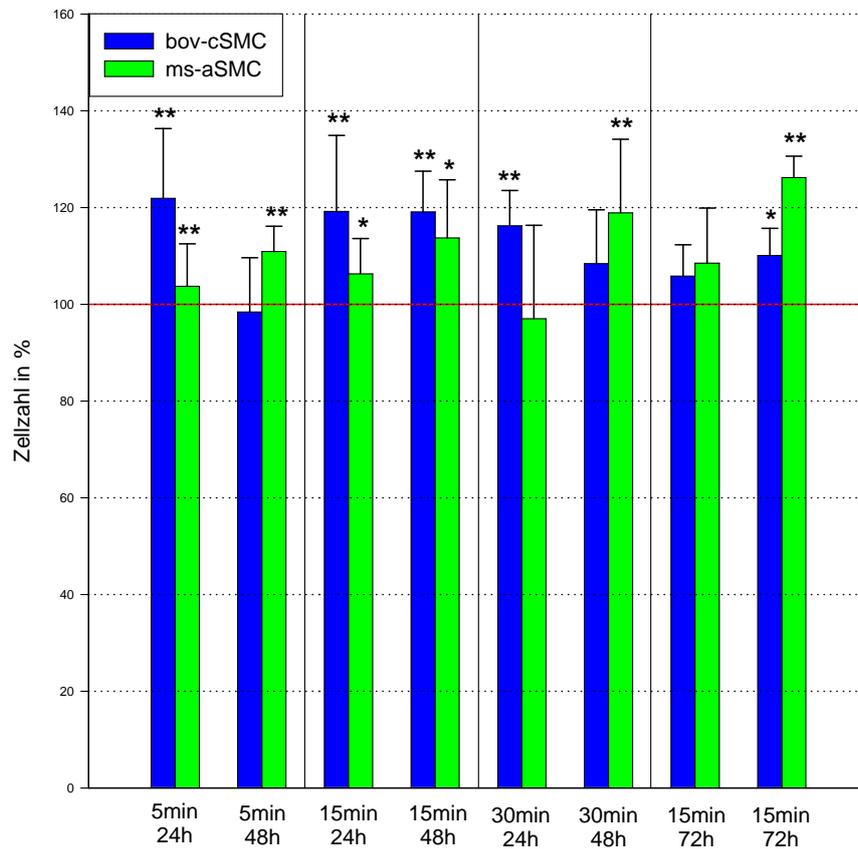


Abb. 20: Einfluss des Magnetfeldes (50Hz) auf die Zellproliferation von proliferierenden bov-cSMC im Vergleich mit ms-aSMC in Abhängigkeit von der Magnetfeld-Expositionsdauer (min) und der anschließenden Inkubationsdauer (h) bis zur Zellzählung; Mittelwerte (n=7-18) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie); * = Zellzahlen signifikant verschieden vom Kontrollwert (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

4.2.2 Vergleich proliferierender glatter Muskelzellen mit ruhenden glatten Muskelzellen vom Rind

Im dritten Vergleich wurden die Zellproliferationswerte proliferierender bov-cSMC und ruhender bov-cSMC einander gegenübergestellt.

Dabei wurden die beiden verschiedenen Zellstatus der bov-cSMC bei jeweils gleichen Versuchsparametern verglichen. Die Frequenz des angelegten Magnetfeldes wurde wie schon in den vorangegangenen Versuchsserien zwischen 25, 50 und 100 Hz variiert. Die Expositionsdauer lag erneut konstant bei 15 Minuten und auch die Zellzählungen erfolgten entsprechend den vorangegangenen Darstellungen (24, 48 oder 72 Stunden nach Magnetfeldexposition).

Insgesamt konnte die Proliferation der ruhenden Zellen nur in drei der acht Fälle angeregt werden. In den anderen fünf Fällen war sie nicht signifikant von den Kontrollen abzugrenzen.

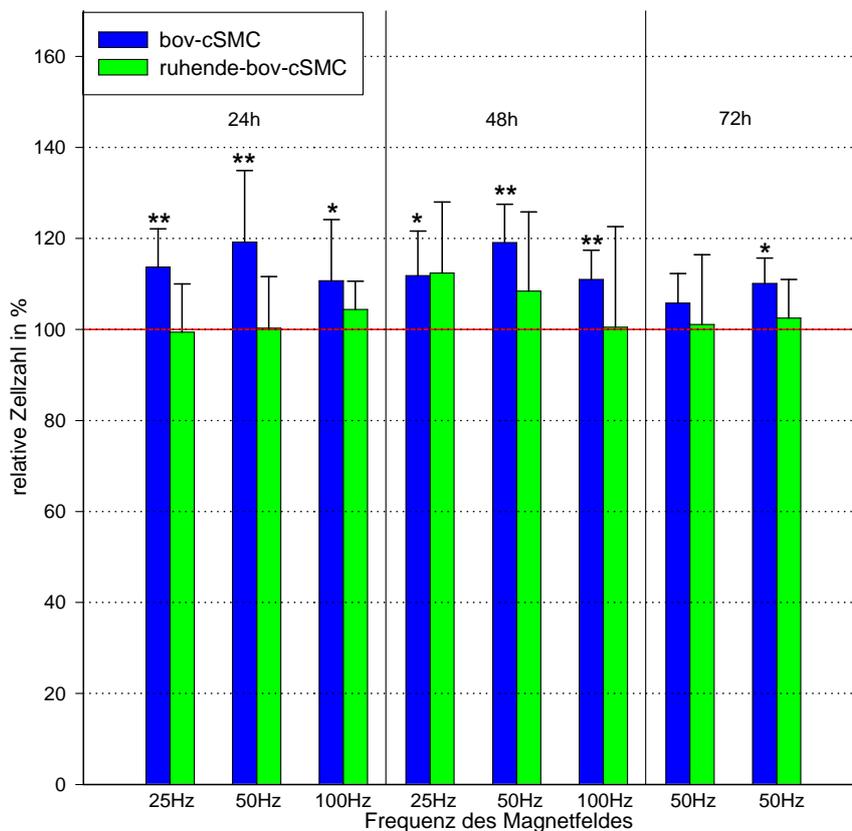


Abb. 21: Vergleich des Einflusses von Magnetfeldern unterschiedlicher Frequenz (Hz), Dauer (min) und Inkubationsräume (h) auf die Proliferation von proliferierenden und ruhenden glatten Rindermuskelzellen; Angabe der relativen Zellzahl in % des Kontrollwertes (n=7-18); Darstellung der Signifikanzen hinsichtlich der Proliferation zum jeweiligen Kontrollwert: *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$

Bei einem von acht Vergleichspaaren entsprach die Proliferation der ruhenden bov-cSMC der der Vergleichszellen (25 Hz, 48 h).

In den übrigen sieben Fällen war dieses Verhältnis umgekehrt – die Proliferationsraten der proliferierenden bov-cSMC waren im Vergleich zu den ruhenden Zellen, wenn zum Teil auch nur geringfügig, erhöht.

Nach einer Inkubation von 24 Stunden lag diese Steigerungsrate bei 14,3% (25 Hz), 18,9% (50 Hz) und relativ niedrigen 6,3% (100 Hz).

Außerdem ist in Abb. 21 zu sehen, dass im Gegensatz zum erstgenannten Vergleichspaar eine Steigerung von 10,7% (50 Hz) und nahezu identischen 10,5% (100 Hz) bei 48stündiger Inkubation erreicht wurde.

Weniger deutlich fielen die Ergebnisse aus, wurde das Wachstum nach 72stündiger Exposition bei einer Feldfrequenz von 50 Hz betrachtet. Einmalig dem Magnetfeld exponierte proliferierende bov-cSMC zeigten ein um 4,7% erhöhtes Wachstum, zweimalig exponierte immerhin eine um 7,6% gesteigerte Proliferation.

In der Tendenz wurde also die Proliferation bei den ruhenden Muskelzellen weniger stark beeinflusst als bei den proliferierenden Zellen.

4.2.3 Vergleich von proliferierenden Endothel- und glatten Muskelzellen

Als letztes wurde ein Vergleich zwischen den drei untersuchten Zelltypen (menschliche Endothelzellen, glatte Muskelzellen von Maus und Rind) hinsichtlich ihres Proliferationsverhaltens bei Magnetfeldexposition gezogen.

Die Versuchsparemeter entsprachen exakt den beim ersten Vergleich unter 4.2.1 angegebenen.

Da der Vergleich von bov-cSMC und ms-aSMC bereits in Kapitel 4.2.1 differenziert erläutert wird, soll hier nur noch ein Vergleich der HUVEC mit den beiden vorgenannten Zelltypen gezogen werden.

Dabei bezieht sich in der folgenden Darstellung die Prozentangabe auf die Mittelwertdifferenz zwischen den HUVEC und den bov-cSMC. Die Prozentangabe in Klammern ist die Mittelwertdifferenz zwischen HUVEC und ms-aSMC.

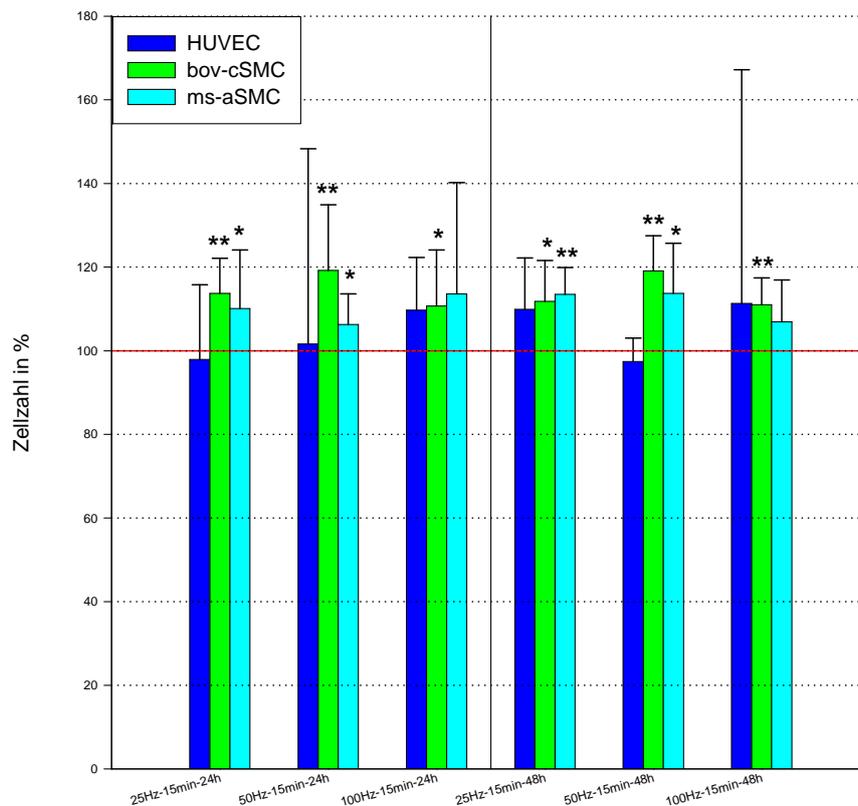


Abb. 22: Einfluss des Magnetfeldes auf die Zellproliferation von proliferierenden bov-cSMC im Vergleich mit ms-aSMC und HUVEC in Abhängigkeit von der Frequenz (Hz) und der anschließenden Inkubationsdauer (h) bis zur Zellzählung; Mittelwerte (n=7-18) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie), * = Zellzahlen signifikant verschieden vom Kontrollwert (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

Die Steigerung der Proliferation der glatten Muskelzellen entsprach entweder unter Einbeziehung einer großen Standardabweichung der der Endothelzellen oder war in allen anderen Versuchen überlegen.

Bezogen auf die HUVEC lagen diese bei -15,8% (-12,2%) – Frequenz 25 Hz – und bei -17,6% (-4,7%) – Frequenz 100 Hz – bei jeweils 24stündiger Inkubation. Weniger deutlich fielen die Ergebnisse bei einer Feldfrequenz von 100 Hz aus, ebenso bei einer Frequenz von 25 Hz, bei einer jeweiligen Inkubation von 48 Stunden.

Eindeutiger wiederum waren die Vergleichswerte von -21,7% (-16,3%) bei einer Magnetfeldfrequenz von 50 Hz und anschließendem Inkubationszeitraum von 48 Stunden.

4.3 Einfluss von Interferenzstrom auf die Zellproliferation von glatten Muskelzellen

Bei den Versuchsreihen hinsichtlich des Einflusses von Interferenzstrom auf die Zellproliferation glatter Muskelzellen wurden alle Experimente bei einer konstanten Stromfrequenz von 125 Hz durchgeführt.

Die Zellzählungen erfolgten immer nach 24 oder 48 Stunden.

4.3.1 Experimente mit proliferierenden bovinen coronaren SMC

In der ersten Experimentalserie wurde die Stromstärke des jeweiligen Interferenzstromes (100, 200 und 300 μA) variiert. Die Expositionsdauer lag konstant bei 15 Minuten. Wie Abb. 23 zu entnehmen ist, konnte die Zellproliferation bei den bov-cSMC nur bei einer Stromstärke von 100 μA (15min Exposition) im Vergleich zu den Kontrollen gesteigert werden. In den anderen fünf Fällen hatte der Interferenzstrom nur einen geringen oder keinen Effekt.

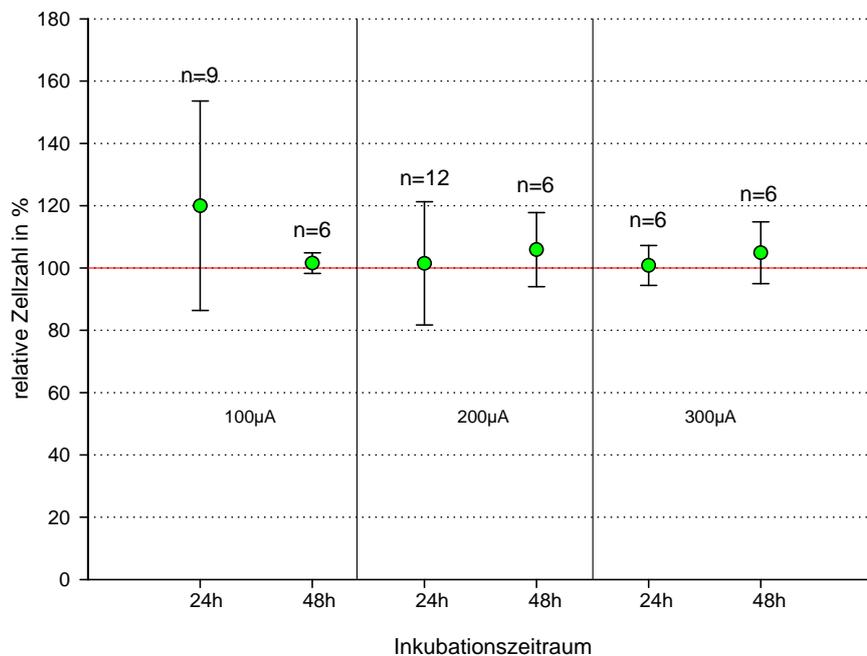


Abb. 23: Einfluss von Interferenzstrom auf die Zellproliferation von proliferierenden bovinen cSMC in Abhängigkeit von der Stromstärke (μA) und der anschließenden Inkubationsdauer bis zur Zellzählung; Mittelwerte (n=6-12) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie)

Bei einer Stromstärke von 100µA wurde der Kontrollwert nach 24 Stunden nicht gesteigert.

Eine Stromstärke von 200 µA führte im Vergleich zu den Kontrollen ebenfalls zu keiner Steigerung (1,5% ,ns) nach 24 Stunden und nur zu einem geringen Effekt von 5,9% (ns) nach 48 Stunden. Die Ergebnisse bei 300 µA waren bei etwas größeren Standardabweichungen mit den gemessenen Werten bei einer Stromstärke von 200 µA nahezu identisch. Die Zellproliferation entsprach nach 24 Stunden den Kontrollen und lag mit 4,9% nach 48 Stunden auch nur knapp darüber, so dass auch hier keine signifikanten Ergebnisse erzielt wurden.

In einer weiteren Experimentalserie wurde bei konstanter Stromstärke (200 µA) die Expositionsdauer (5, 15 und 30 Minuten) variiert. Wie der Abb. 24 zu entnehmen ist, konnte die Zellproliferation bei allen drei Expositionsdauern – wenn auch nur geringfügig – gesteigert werden.

Die relative Zellzahl steigerte sich bei allen drei Expositionsdauern nicht wesentlich (8,8%, 5 min) oder der Interferenzstrom hatte im Vergleich zu den Kontrollen keinen Effekt (0,3%, 15 min; 4,7%, 30 min). Dabei wurde mit zunehmender Expositionsdauer die von vornherein relativ große SD ebenfalls größer, sodass in dieser Serie keine signifikanten Ergebnisse erzielt wurden.

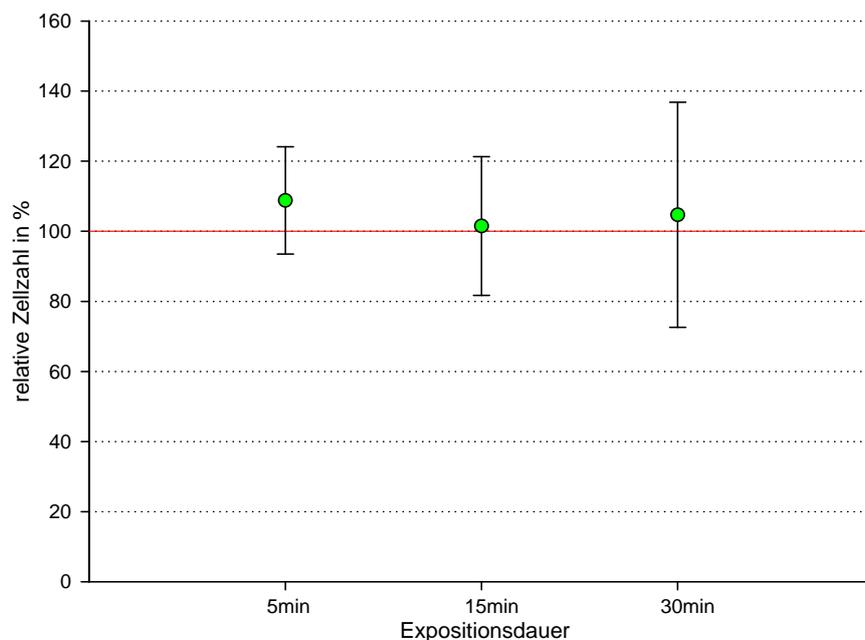


Abb. 24: Einfluss von Interferenzstrom auf die Zellproliferation von proliferierenden bovinen cSMC in Abhängigkeit von der Expositionsdauer (min); Mittelwerte (n=6-12) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie)

4.3.2 Experimente mit ruhenden bovinen coronaren SMC

Es wurde eine dritte Experimentalserie durchgeführt, bei der die Stromstärke des jeweiligen Interferenzstromes zwischen 100 und 200 μA variiert wurde. Die Expositionsdauer lag konstant bei 15 Minuten.

Bei einer Stromstärke von 100 μA entsprach die relative Zellzahl nach 24 Stunden Exposition der Kontrolle (-0,6%), nach 48 Stunden wurde die Kontrolle hingegen um 30% übertroffen. Bei einer Stromstärke von 200 μA lag die Steigerung nach 24 Stunden mit 8,2% höher als die Kontrollen, nach 48 Stunden entsprach sie diesen (-3,8%); auch bei diesen Experimenten hatten die Einzelergebnisse eine große Streubreite, die zu relativ hohen Standardabweichungen (SD) und konsekutiv nicht signifikanten Ergebnissen führten.

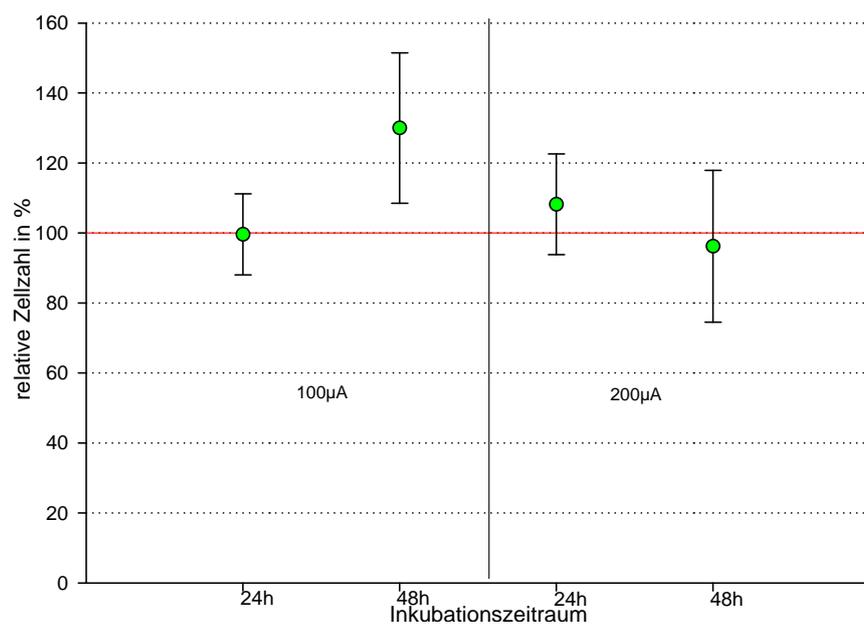


Abb. 25: Einfluss von Interferenzstrom auf die Zellproliferation von ruhenden bov-cSMC in Abhängigkeit von der Stromstärke (μA) und der anschließenden Inkubationsdauer (h) bis zur Zellzählung; Mittelwerte ($n=6$) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie)

4.4 Vergleichende Untersuchungen zum Einfluss von Interferenzstrom auf ruhende und proliferierende glatte Muskelzellen vom Rind

In diesem Vergleich wurde die Zellproliferation von bov-cSMC unter Einfluss von Interferenzstrom in proliferierendem und ruhendem Zustand einander gegenübergestellt.

Die Stromstärke wurde zwischen 100 und 200 μA und der Inkubationszeitraum zwischen 24 und 48 Stunden variiert.

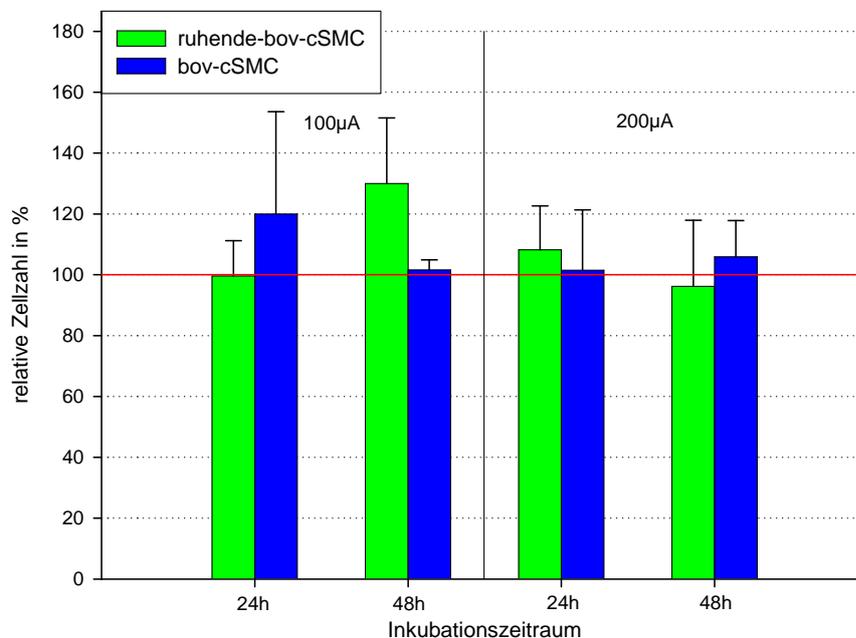


Abb. 26: Einfluss von Interferenzstrom auf die Zellproliferation von ruhenden im Vergleich mit proliferierenden bov-cSMC in Abhängigkeit von der Stromstärke (μA) und der anschließenden Inkubationsdauer (h) bis zur Zellzählung; Mittelwerte ($n=6-12$) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie)

Insgesamt war bei diesem Vergleich keine deutliche Tendenz im Zusammenhang mit dem zellulären Proliferationsverhalten zu erkennen.

Das relative Wachstum stieg bei einer Stromstärke von 100 μA mit 20,4% (24 h Inkubation) zugunsten, mit -6,7% (48 h Inkubation) zuungunsten der proliferierenden bov-cSMC.

Tab. 4: Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Zellzahlen glatter boviner Muskelzellen in proliferierendem und ruhendem Zustand; alle Angaben in %

	100 μ A				200 μ A			
	proliferierend		ruhend		proliferierend		ruhend	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
MW	120,6	101,6	99,6	130	101,5	105,9	108,2	96,2
SD	33,6	3,3	11,6	21,5	19,8	11,9	14,4	21,7

Umgekehrt verhielt es sich bei einer Stromstärke von 200 μ A; nach 24stündiger Inkubation proliferierten die ruhenden bov-cSMC um 6,7% stärker, nach 48 Stunden Inkubation die proliferierenden Muskelzellen um 9,7%.

4.5 Doppelexpositionen Magnet/Magnet und Magnet/Strom

4.5.1 Magnetfeld-Doppelexposition bei proliferierenden und ruhenden glatten Muskelzellen

Bei dieser Experimentalserie wurde ein Gesamtinkubationszeitraum von 72 Stunden zugrundegelegt, wobei die Zellen entweder einmalig nach 24 oder zweimalig nach 24 und 48 Stunden für 15 Minuten einem Magnetfeld einer konstanten Frequenz von 50 Hz ausgesetzt wurden.

In vier der sechs Fälle neigten die glatten Muskelzellen zu einer im Vergleich zur Kontrolle leicht gesteigerten Proliferationsrate, wohingegen die relativen Zellzahlen der Endothelzellen den Kontrollen entsprachen.

Die relative Zellzahl steigerte sich dabei leicht bei den proliferierenden bov-cSMC und noch etwas stärker bei den ms-aSMC; sowohl bei ein- als auch bei zweimaliger Magnetfeldexposition.

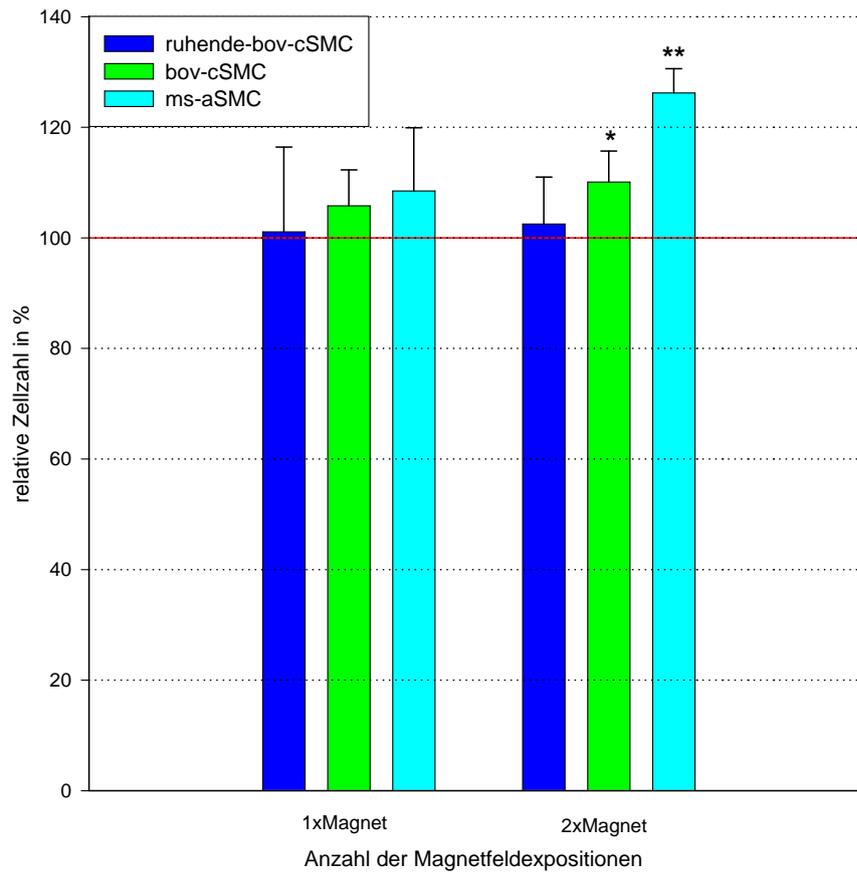


Abb. 27: Einfluss von Magnetfeld-Doppelexposition auf die Zellproliferation von ruhenden im Vergleich mit proliferierenden bov-cSMCs und proliferierenden ms-aSMCs in Abhängigkeit von der Stromstärke (μA) und der anschließenden Inkubationsdauer (h) bis zur Zellzählung; Mittelwerte (n=7-18) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie), *=Zellzahlen signifikant verschieden vom Kontrollwert (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

Außerdem waren die Proliferationsraten bei demselben Zelltyp grundsätzlich nach zweimaliger Exposition größer als nach einmaliger.

Tab. 5: Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Zellzahlen der drei untersuchten Zelltypen; alle Angaben in %

	50Hz-15min-72h-1xMag		50Hz-15min-72h-2xMag	
	MW	SD	MW	SD
bov cSMC	105,8	6,5	110,1	5,6
ms cSMC	108,5	11,4	126,2	4,4
ruhende bov cSMC	101,1	15,3	102,5	8,5

Wurde das Magnetfeld zweimal angelegt, zeigten sowohl die bov-cSMC mit $p < 0,05$ und die ms-aSMC mit $p < 0,01$ ein signifikantes Ergebnis. Die Einzelergebnisse sind der oben eingefügten Tabelle zu entnehmen.

4.5.2 Magnetfeld-Doppelexposition im Vergleich zur Kombination Magnetstrom bei proliferierenden bovinen coronaren SMCs

Abschließend wurden Experimente mit einer Kombination aus Magnetfeld- und Interferenzstromexposition durchgeführt. Die Expositionen erfolgten jeweils nach 24 beziehungsweise 48 Stunden, die Zellzählungen erfolgten jeweils nach insgesamt 72 Stunden.

Tab. 6: Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Zellzahlen der drei untersuchten Zelltypen bei Gesamtkubationsdauer von 72 Stunden ; alle Angaben in %

	1xMagnet	2xMagnet	Magnet/Strom	Strom/Magnet
MW	105,8	110,1	120,1	119,1
SD	6,5	5,6	8,1	9,6

Diese Ergebnisse wurden mit den bereits unter 4.5.1 dargestellten Ergebnissen nach ein- und zweimaliger Magnetfeldexposition verglichen. Bei dieser Serie waren beide Kombinationen aus Magnetfeld- und Interferenzstromexposition proliferativ circa doppelt so wirksam wie die ausschließliche Magnetfeldexposition – ob ein- oder zweimalig. Die Einzeldaten sind der oben angeführten Tabelle 6 zu entnehmen.

Die Kombination der Magnetfeld- mit einer nach 24 Stunden anschließenden Interferenzstromexposition führte zu einer nicht signifikanten Steigerung der Zellproliferation um 19,1%; bei umgekehrter Reihenfolge gab es eine Steigerung von 20,1% ($p < 0,01$).

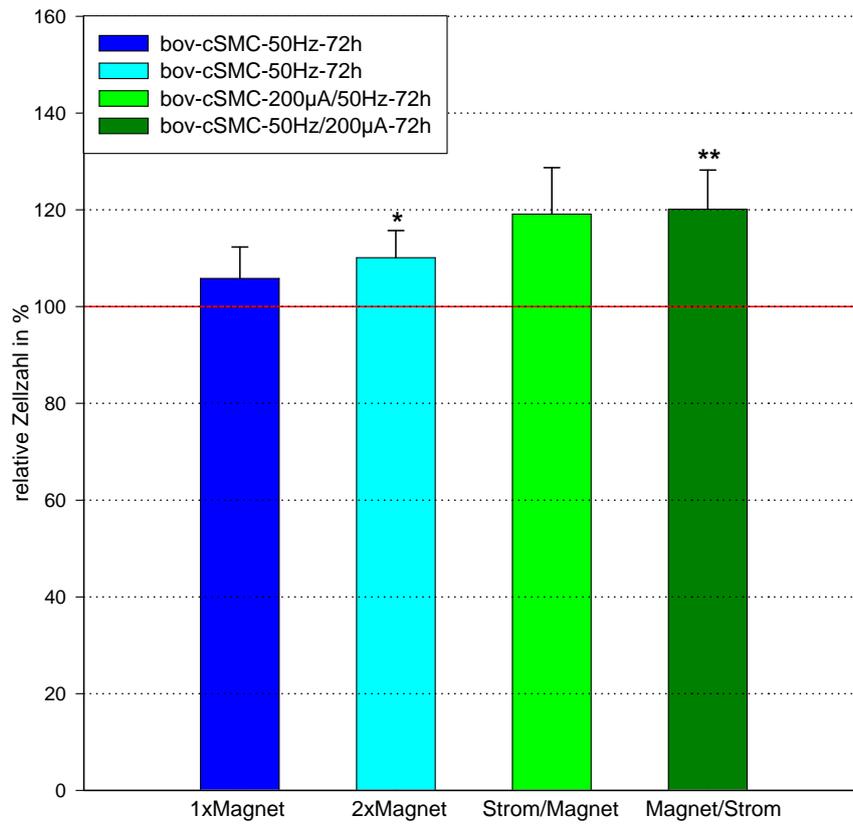


Abb. 28: Einfluss von Magnetfeld-Doppelexposition im Vergleich zur Kombination Magnet/ Strom auf die Zellproliferation von proliferierenden bov-c-SMC in Abhängigkeit von der Art und Häufigkeit der Experimente; Mittelwerte (n=9-18) mit Standardabweichung für die relativen Zellzahlen in %, Kontrollen = 100% (rote Linie), * = Zellzahlen signifikant verschieden vom Kontrollwert (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$)

5 Diskussion

Grundlage dieser Dissertation war die Hypothese, dass Gefäßwandzellen (glatte Muskelzellen, Endothelzellen) durch Exposition mit niederfrequenten elektrischen Feldern *in vitro* aktiviert werden und wieder in den Zellzyklus eintreten können, und dass analog dazu unter Umständen eine Induktion koronarer Arterio- / Angiogenese durch elektrische Felder möglich sein könnte.

Innerhalb des Gefäßsystems existieren Unterschiede bezüglich der elektrischen Potentialdifferenzen, die sowohl vom Blutfluss als auch von Situationen, in denen aktive Angiogenese stattfindet, wie z.B. bei der Wundheilung, der Zelldifferenzierung oder dem Tumorwachstum, abhängig sind. In der Literatur werden unterschiedliche Effekte von elektromagnetischen Feldern auf das Proliferationsverhalten verschiedener Zellen beschrieben. Insbesondere der Einfluss auf Lymphozyten und periphere Blutzellen war Gegenstand mehrerer Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass es sowohl zu einer Steigerung der Zellteilung (19, 59) als auch zu einem starken Anstieg der DNA-Syntheseleistung kommt (19, 59, 67) – wichtiger Faktor scheint hierbei die durch elektrische Felder gesteigerte Produktion von Cytokinen und Interleukinen zu sein (69). Auch neuere Arbeiten zeigen, dass elektrische Stimulation *in vivo* die Angiogenese durch direkte Induktion der VEGF-Produktion in Muskelzellen signifikant stimuliert (79).

Die in der Versuchsreihe verwendeten transgenen bov-cSMC weisen im Gegensatz zu den HUVEC, für die folgendes nicht nachgewiesen ist, bereits in Ruhe (65) eine starke proliferative Aktivität auf, sodass untersucht wurde, ob sich diese durch elektrische Felder weiter steigern lässt.

5.1 Einfluss elektromagnetischer Felder

Elektromagnetische Felder (EMF) konnten bereits in der Vergangenheit erfolgreich zu der Behandlung therapieresistenter pathologischer Prozesse im muskulären-knöchernen System beitragen. Dabei beeinflussen die EMF bestimmte biologische Prozesse im Metabolismus ihrer Zielzellen. Diese Technik erscheint z.B. bei der klinischen Behandlung von Pseudarthrosen oder avaskulären Knochennekrosen als eine sichere und effektive Therapieoption, die erstmalig 1974 bei einer Tibiafraktur infolge kongenitaler Pseudarthrose angewendet wurde (9).

Es wurde gezeigt, dass verschiedene Zelltypen, darunter Nervenzellen, Muskelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen, auf elektromagnetische Felder mit einer verstärkten Proliferation reagieren (58). Als Wirkmechanismus wurden Veränderungen des elektrischen Potentials entlang der Plasmamembran, die zu einer vermehrten Öffnung spannungsabhängiger Ionenkanäle führen könnten, wie auch die Möglichkeit eines direkten Einflusses der Felder auf die Synthese der extrazellulären Matrix diskutiert (4). MADRI ET AL. (51) zeigten, dass sich die endotheliale Zellmorphologie infolge von Veränderungen ihrer extrazellulären Matrix stark verändern kann.

Außerdem wurden sowohl in verschiedenen experimentellen Systemen als auch bei Patienten Veränderungen im zellulären Kalzium-Gehalt und bei der Kalzifikation festgestellt (28). Die gleichen Ergebnisse zeigten sich bei Pseudarthrosen im Kaninchenmodell sowie in Gewebekulturen von Hühnerchondrozyten (7, 28).

Andere Veröffentlichungen hingegen weisen darauf hin, dass EMF zwar lokal den Mineralisierungsprozess (5, 29) beeinflussen können, aber auf den gesamten Kalzium-Metabolismus im Körper keinen Einfluss haben (77). Weitere Einflüsse von EMF zeigten sich aber auch auf anderen zellulären Ebenen. So stieg unter EMF-Einfluss der Zellgehalt an Adenylatcyclase und Phosphodiesterase (44); des weiteren wurde eine Verminderung der DNA Synthese in phytohemagglutininstimulierten Lymphozyten (18), beobachtet, sowie eine gesteigerte Kollagensynthese und ein verminderter Laktat Spiegel in Fibroblasten (23, 24, 52). Ebenso wurde eine herabgesetzte Insulin-Sekretion der Langerhans-Inseln im Pankreas (43), nachgewiesen. EMF haben demnach offensichtlich einen Einfluss auf verschiedene Signaltransduktionswege.

Der Effekt von gepulsten elektromagnetischen Feldern (PEMF) wurde ebenfalls bezüglich der therapeutischen Effektivität bei Weichgewebe untersucht (32). Es wurde von einer beschleunigten Wundheilung chronischer Hautläsionen, die im Bereich der therapeutisch angewendeten Magnetfelder lagen, berichtet (8, 63). Verschiedene Tierversuche, die zur Untersuchung des Wundheilungseffektes durch bioelektrische Stimulation gemacht wurden, führten zu widersprüchlichen Ergebnissen (6, 12, 16, 40, 76). GLASSMAN ET AL. (32) kamen zu dem Ergebnis, dass Magnetfelder, die klinisch erfolgreich eingesetzt wurden, keinen Einfluss auf die Heilung von Weichgewebe haben.

Frühere Untersuchungen zeigten bereits, dass die genetische Transkription durch PEMF gesteigert werden kann: spezifische Genloci von *Sciaracophila*-Chromosomen zeigten nach Magnetstimulation einen massiven Anstieg der mRNA-Produktion (34). PEMF könnten außerdem die Entspiralisierung der DNA triggern (41) und die DNA-Synthese stimulieren (67).

Da diese physiologischen Prozesse einer Proliferation von Zellen zugrunde liegen und diese Grundlage von Gefäßneubildungen sind, kann man zu der Hypothese gelangen, dass durch elektromagnetische Wellen oder Interferenzstrom (IFC) Angio- und Arteriogenese induziert werden könnte.

Diese Experimente zeigten nun, dass die Zellproliferation bei bereits teilungsaktiven Zellen durch die Exposition mit elektromagnetischen Feldern signifikant gesteigert werden konnte. Eine 15minütige Exposition im elektromagnetischen Feld einer Frequenz von 50 Hz erwies sich als besonders effektiv.

Signifikante Steigerungen der Zellproliferation zeigten sich bei diesen Zellkulturexperimenten ausschließlich bei den glatten Muskelzellen. Als effektivste Magnetfeldfrequenz stellte sich eine Frequenz von 50 Hz heraus, bei der sich unabhängig von Expositions- und Inkubationsdauer mit bis zu 21,9% Zellproliferationssteigerung die signifikantesten Ergebnisse zeigten.

Legt man die Dauer der Magnetfeld-Exposition zugrunde, so erwies sich ein Zeitraum von 15 Minuten als derjenige, bei dem die bov-cSMC in allen Fällen bei Inkubationszeiträumen von 24 oder 48 Stunden signifikante Ergebnisse erzielten. Bei

einer Exposition von 5 bzw. 30 Minuten wurden mit $p < 0,01$ ebenfalls signifikante Ergebnisse erzielt - diese waren allerdings nicht so hochsignifikant wie die bei einer Frequenz von 50 Hz erzielten Ergebnisse, sodass sowohl die Expositions- als auch die Inkubationsdauer bei diesem Zelltyp einen untergeordneten Einfluss auf die Zellproliferation zu haben scheinen. Ähnliche, aber weniger deutliche Ergebnisse wurden bei den ms-aSMC erzielt. Auch bei dieser Zelllinie erwies sich eine Magnetfeldfrequenz von 50 Hz als die effektivste. Hier zeigte sich ebenfalls kein kausaler Zusammenhang zwischen Expositions-/ Inkubationszeitraum.

Verlängerte man den Gesamtinkubationszeitraum auf 72 Stunden mit ein- oder zweimaliger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld (50 Hz), so konnte bei wiederholter Exposition nur bei den ms-aSMC ein deutlich signifikantes Ergebnis erzielt werden. In den anderen Fällen hatte diese Verlängerung keinen nennenswerten Einfluss auf die Zellproliferation.

Bei den ruhenden Zellen (ausschließlich bov-cSMC) ließen sich keine signifikanten Steigerungen der Zellproliferation erreichen. In diesem Status der Zelle scheinen elektromagnetische Felder allein also keinen Einfluss auf den Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus zu haben.

Auf zellulärer Ebene könnten die elektromagnetischen Felder an verschiedenen Stoffwechselwegen Einfluss auf die Zellproliferation haben. Einen entscheidenden Einfluss auf den möglichen Wiedereintritt der Zelle in den Zellzyklus scheint nach derzeitigem Stand der Literatur bei diesen Prozessen des Zellzyklus der sogenannte vascular endothelial growth factor (VEGF) zu haben. VEGF ist einer der potentesten und spezifischsten endogenen angiogenen Faktoren, die bis heute identifiziert wurden (25, 26, 27) und der eine Spezifität für vaskuläre Endothelzellen hat (50).

Weitere wichtige Faktoren der Angiogenese sind die Angiopoietine mit ihrem Rezeptor Tie-2. Die beiden am besten charakterisierten Vertreter dieser Familie sind Angiopoietin-1 (Ang-1) und Angiopoietin-2 (Ang-2) (20, 78). Während Ang-1 bestehende Gefäße durch Bindung an vaskuläres Tie-2 stabilisiert und in ihrem Ruhezustand hält, führt dessen natürlicher Antagonist Ang-2 zur Destabilisierung der Gefäßstruktur, indem es Ang-1 kompetitiv vom Rezeptor verdrängt (52). Diese gefäßdestabilisierende Wirkung von Ang-2 steht am Anfang der angiogenen Kaskade

und scheint Voraussetzung zur Angiogenese-Induktion durch mitogene Wachstumsfaktoren wie VEGF oder bFGF zu sein (71). Dass die Ang-2-Produktion auch durch elektromagnetische Felder stimuliert werden kann - wie es bereits für Thrombopoietin und den Epidermal Growth Factor nachgewiesen wurde - konnte kürzlich durch TEPPER ET AL. gezeigt werden (72).

Auch Angiotensin II (Ang II) ist ein Mediator, der einen entscheidenden Einfluss bei der Zellproliferation haben könnte. Ang II ist ein Oktapeptid, das als Agonist des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems an Arteriolen stark vasokonstriktorisch wirkt und die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde stimuliert; außerdem ist Ang II ein wachstumsfördernder Mediator für glatte Gefäßmuskelzellen (vSMC) (75) und stimuliert die Freisetzung von VEGF in Zellkulturen (17, 57). Es wurde gezeigt (3), dass bei elektrischer Stimulierung durch Rechteckimpulse die Expression von VEGF in Skelettmuskulatur ebenso wie die Gefäßproliferation gesteigert wurde. Durch die elektromagnetischen Felder könnten ähnliche Effekte hervorgerufen worden sein.

VEGF wird von intakten Zellen sezerniert und ist spezifisch mitogen für EC (50). Von menschlichen vSMC ist bekannt, dass sie VEGF produzieren (74). Aufgrund der gegebenen direkten anatomischen Nähe von vSMC und EC könnte es möglich sein, dass die vSMC als lokale Quelle für angiogene Wachstumsfaktoren funktionieren. Die Untersuchung der zugrundeliegenden Mechanismen lag jedoch jenseits der Ziele der vorliegenden Arbeit, könnte jedoch Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. In diesem Zusammenhang konzentrierte man sich hier auf die Bestimmung der Feldparameter.

Es wurde zudem schon zuvor gezeigt (2), dass chronische Muskelstimulation durch oben bereits erwähnte Rechteckwellen mit einer Spannung von 3-4 Volt zu einem vermehrten Wachstum von Arterien mit Begleitvenen führt. Sogar mechanische Faktoren, die eine Vasodilatation und einen gesteigerten Blutfluss zur Folge haben, können zu einer Vergrößerung des Arterien durchmessers führen (38, 45, 73).

Andere Untersuchungen haben einen direkten Zusammenhang zwischen einer durch elektromagnetische Felder hervorgerufenen Steigerung des Calcium-Ionen-Flusses und der Zellproliferation herzustellen versucht, wobei in einem Fall eine Steigerung (13) in einem anderen eine Reduzierung (10) des Calcium-Ionen-Flusses beobachtet wurde. Transmembranöse Calcium-Flüsse kontrollieren z.B. auch die Mobilität von *Amphora coffeaeformis* (Diatomeen) – Untersuchungen an dieser Spezies haben

gezeigt, dass deren Mobilität durch Gleichstrom und elektromagnetische Felder stimuliert werden kann (66). KORZHSLEPTSOVA ET AL. (49) zeigten 1995, dass auch das Inositol-Triphosphat – derjenige intrazelluläre Überträgerstoff, der für die Erhöhung der Calciumkonzentration verantwortlich ist – durch elektromagnetische Felder vermehrt gebildet wird, sodass ein Einfluss auf transmembranöse Calcium-Transportproteine und somit ein mittelbarer Effekt auf die Zellproliferation durch elektromagnetische Felder möglich erscheint und Teil einer Erklärung für die erzielten Steigerungen der Zellproliferation bei glatten Muskelzellen sein kann.

Das jüngste im Gefäßbett identifizierte molekulare Regelsystem sind die Ephrine und die Eph-Moleküle. Nach der derzeitigen Vorstellung sind die Ephrine und die Eph-Moleküle in entscheidendem Maße dafür verantwortlich, dass aus sprossenden Blutkapillaren ein funktionsfähiges Netzwerk blutdurchströmter Gefäße, bestehend aus Arterien, Kapillaren und Venen entstehen kann. Sie üben diese Funktion aus, indem sie sowohl anziehende (Zellattraktion) als auch abstoßende (Zellrepulsion) Signale aussenden. Bei der Aussprossung von Blutgefäßen in nicht vaskularisierte Bereiche (z.B. Tumor) scheinen die Ephrine und Eph-Moleküle damit als ein zelluläres Wegweisersystem zu fungieren. Zur Zeit liegen allerdings noch keine Untersuchungen bezüglich der Wirkung elektromagnetischer Felder auf diese Moleküle vor.

Bei den HUVEC zeigten sich im Vergleich zu den glatten Muskelzellen weitaus weniger ausgeprägte Wirkungen elektromagnetischer Felder auf die Zellproliferation, sodass bei diesem Zelltyp keine signifikanten Proliferationssteigerungen erzielt werden konnten.

Dieses deutliche Ergebnis war für diesen Zelltypus nicht zu erwarten, da zuvor bereits gezeigt wurde, dass VEGF mRNA durch chronische elektrische Stimulation (39, 46) vermehrt synthetisiert wird. VEGF ist, wie schon oben erwähnt, ein direktes Mitogen für Endothelzellen (EC), ein Permeabilitätsfaktor und es kann außerdem *in vivo* die Bildung neuer Blutgefäße stimulieren. Viele Studien haben gezeigt, dass VEGF bei einer verlängerten Exposition durch ein hypoxisches Umfeld sowohl *in vitro* (31, 36, 64), als auch *in vivo* (15), vermehrt gebildet wird, sodass ein positiver stimulierender Effekt auf die Proliferation der HUVEC nicht unwahrscheinlich erschien. Dieser war möglicherweise aufgrund der geringeren proliferativen Aktivität der HUVEC im Vergleich zu den SMC nicht zu beobachten. Da es sich um Zellen zweier

verschiedener Spezies handelt, lässt sich zwischen den Zelltypen kein direkter Vergleich ziehen.

In einer neueren Arbeit (72) wurde im Gegensatz dazu gezeigt, dass die Exposition von HUVEC durch elektromagnetische Felder eine signifikant gesteigerte Proliferation und auch eine Zunahme der absoluten Zellzahl zur Folge hat.

5.2 Einfluss von Interferenzstrom

Elektrische Felder, wie z.B. Interferenzströme (IFC), werden zunehmend zur Unterstützung der sekundären und primären Knochenheilung eingesetzt. Der therapeutische Effekt dieser Maßnahme wird mit einer verbesserten Vaskularisierung des Knochens und primärer Osteogenese erklärt. Wenn auch die zugrundeliegenden Mechanismen ungeklärt sind, ist ausreichend belegt, dass elektrische Felder eine Energieübertragung auf wässrige Systeme (Zellen) mit konsekutiver Beeinflussung molekularer Vorgänge bewirken (2, 15, 39, 46).

In dieser Versuchsreihe führten Interferenzströme dagegen – unabhängig vom untersuchten Zelltyp – bei keinem der Experimente zu einer signifikanten Steigerung der Zellproliferation.

Die bei den Interferenzstrom-Versuchen zu beobachtenden deutlichen Unterschiede der absoluten Zellzahl im Vergleich zu den Versuchen mit elektromagnetischen Feldern könnten auf den durch die Anwendung der unter 2.2 beschriebenen Inserts und dem damit verbundenen komplizierteren Versuchsaufbau zurückzuführen sein. Durch diese gestaltete sich das Lösen der Zellen aufgrund der Beweglichkeit der Inserts innerhalb der 6er-wells ungleich schwerer als beim direkten Ablösen der Zellen in den 6er-wells der Fall war.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass IFC einen Einfluss auf die Konzentration von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in adhärennten Maus-SV40-3T3-Zellen und nicht-aktivierten menschlichen, nicht-adhärennten HL-60 Zellen haben (48, 68). Die Freisetzung des second messengers zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) und der Cytokine TNF- α und IL-8 wurden gesteigert, wohingegen die IFC keinen Einfluss auf die Freisetzung cytosolischen Ca^{2+} , IL-1 β , IL-6 oder der intrazellulären ATP und ADP Konzentration hatten (69). Darin scheinen sich die Wirkungen von IFC und elektromagnetischen Feldern zu unterscheiden. Ein wichtiger Parameter des Zellstoffwechsels und des Proliferationsverhaltens von Zellen ist die cytosolische Konzentration von Ca^{2+} , die durch elektromagnetische Felder im Gegensatz zu IFC positiv beeinflusst wird (siehe auch 5.1.1), was mit der oben bereits erwähnten Tatsache zu tun haben könnte, dass IFC die Zellmembran nicht effektiv durchdringen können, da die Phospholipid-Doppelschicht als elektrischer Isolator funktioniert.

Der Einfluss von IFC auf die Konzentrationen von mitogenen oder wachstumsfördernden Faktoren wie Angiotensin II oder VEGF war bis jetzt noch nicht Gegenstand weiterführender Untersuchungen, sodass diesbezüglich keine Aussage gemacht werden kann, ob ein positiver proliferativer Einfluss denkbar oder wahrscheinlich gewesen wäre. Ausgehend von den eigenen Ergebnissen scheint eine vermehrte Freisetzung dieser Substanzen eher unwahrscheinlich.

Ein aktueller Ansatz zur Induktion von Angiogenese ist die Gentherapie. Das Ziel der Gentherapie ist, Gene in somatische Zellen einzuführen damit sie die Synthese von Stoffwechselprodukten, die zur Wiederherstellung einer normalen Zellfunktion dienen, steigern.

Im Fall der koronaren Herzerkrankung würde das bedeuten, dass Gene, die in der Nähe der die Herzfunktion einschränkenden Stenose eingeführt würden, das Wachstum von Kollateralen fördern sollen. Die Einführung der entsprechenden wachstumsfaktorkodierenden Gene soll so zu einer dauerhaften Produktion von Wachstumsfaktoren führen, die die Gefäßneubildung stimulieren können.

Die in diesem Zusammenhang am ausführlichsten untersuchten Gene gehören der Familie der VEGF, die für Endothelzellen spezifisch sind, und der Familie der FGF an. Die VEGF wurden im Zuge der REVASC-Studie und die FGF im Zuge der AGENT-Studie näher untersucht.

Die REVASC-Studie war die erste große randomisierte Studie, die die Vorzüge der intramyokardialen Einbringung von VEGF-Genen untersuchte. Es handelt sich um eine multizentrische Phase-II-Studie, die die Wirksamkeit und Sicherheit von adenoviralem Transfer von VEGF-121 in Patienten mit koronarer Herzkrankheit zeigen sollte. Die Ergebnisse nach 26 Wochen zeigten einen signifikanten Anstieg der Ausdauer im Belastungs-EKG im Vergleich zur Kontrollgruppe, wie auch bei anderen Übungsparametern (70).

Die AGENT-Studie (*Angiogenic Gene Therapy*) war eine randomisierte, doppel-blinde und Placebo-kontrollierte Studie. Sie untersuchte den Effekt von replikationsunfähigem Adenovirus, das mit dem für FGF-4-kodierenden Gen (b-FGF) „beladen“ war bei Patienten mit stabiler Angina pectoris. Bei Patienten, die vor Therapie bei dem angewendeten Belastungstest (ETT (Exercise Treatmill Test)) eine Belastungsdauer von 10 Minuten oder weniger hatten, zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe nach 4 und 12 Wochen ein signifikanter Anstieg der ETT-Belastungsdauer (36).

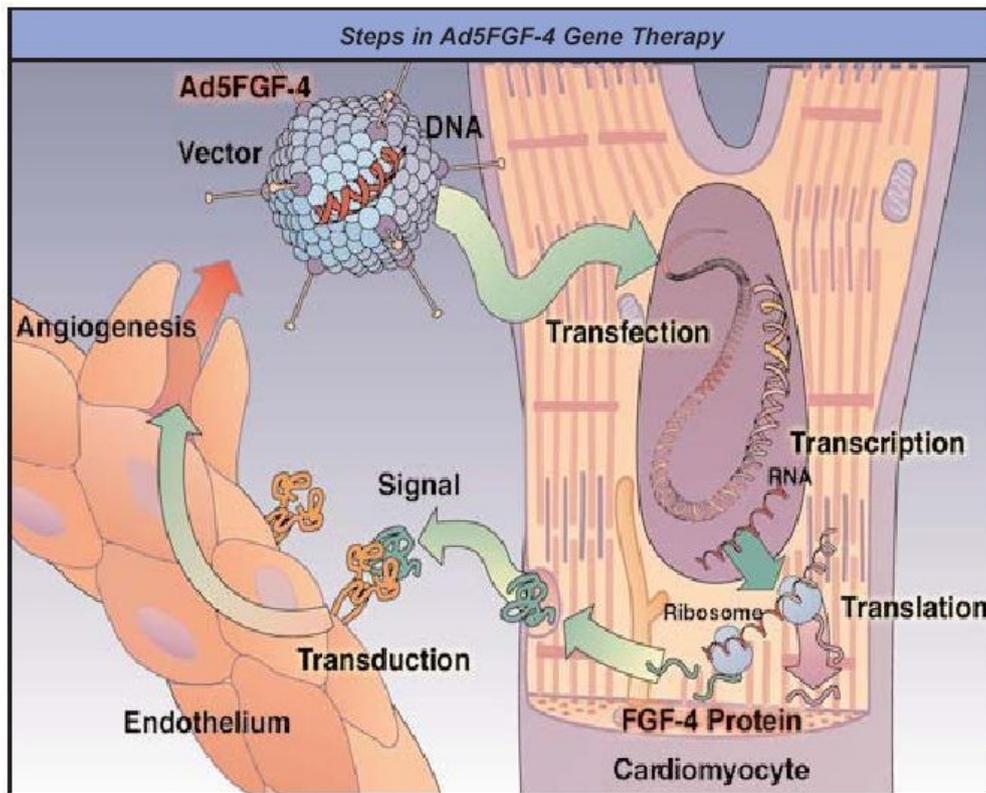


Abb. 29: Schritte in der Ad5FGF-4 Gen-Therapie (www.biotechjournal.com, Stand 3. Oktober 2004))

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Gentherapie eine wirksame Methode zur Behandlung der koronaren Herzkrankheit zu sein scheint. Probleme können hierbei durch nötige operative Eingriffe, durch die Proliferations-Induktion maligner Zellen und durch die Auslösung inflammatorischer und anderer immunogener Prozesse auftreten.

Daher könnte die Verknüpfung gentherapeutischer Verfahren mit dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten angiogenen Potential von elektromagnetischen Feldern in Zukunft ein interessanter Ansatz für die patientenschonende Induktion von Angiogenese sein, die der weiterführenden Untersuchung in zusätzlichen Studien bedarf.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit soll gezeigt werden, dass das Wachstum von Endothel- und glatten Muskelzellen durch elektrische Ströme beziehungsweise elektromagnetische Felder induzierbar ist. Dieser Weg der induzierbaren Zellproliferation wäre u.U. für den therapeutischen Einsatz zur Induktion der Angiogenese zu evaluieren, da im Rahmen der Angiogenese Endothel- und glatte Muskelzellen schneller in den Zellzyklus wieder eintreten.

Bei den durchgeführten Versuchen wurde das Proliferationsverhalten von drei verschiedenen Zelltypen (transgene coronare glatte Muskelzellen vom Rind (bov-cSMC), aortale glatte Muskelzellen der Maus (ms-aSMC) mit induzierbarer Expression von SV 40 Tumorantigen und umbilikalvenöse Endothelzellen vom Menschen (HUVEC)) unter dem Einfluss von Magnetfeldern und Interferenzströmen untersucht.

Diese Experimente zeigten, dass die Zellproliferation bei bereits teilungsaktiven Zellen durch die Exposition mit elektromagnetischen Feldern signifikant gesteigert werden konnte. Es wurden verschiedene Kombinationen aus Expositionsdauer, Inkubationszeitraum und Magnetfeldfrequenz getestet. Eine 15minütige Exposition im elektromagnetischen Feld einer Frequenz von 50 Hz erwies sich bei diesen Versuchen als besonders effektiv.

Signifikante Steigerungen der Zellproliferation zeigten sich bei diesen Zellkulturexperimenten ausschließlich bei den glatten Muskelzellen. Als effektivste Magnetfeldfrequenz stellte sich, wie oben schon erwähnt, eine Frequenz von 50 Hz heraus, bei der sich unabhängig von Expositions- und Inkubationsdauer mit bis zu 21,9% Zellproliferationssteigerung die signifikantesten Ergebnisse zeigten. Im Gegensatz dazu führten in dieser Versuchsreihe Interferenzströme – unabhängig vom untersuchten Zelltyp – bei keinem der Experimente zu einer signifikanten Steigerung der Zellproliferation.

Als alleiniges Verfahren scheint die Anwendung elektromagnetischer Felder bzw. von Interferenzströmen begrenzt wirksam. Für die Zukunft könnte daher die Verknüpfung aktuell in Erprobung befindlicher gentherapeutischer Verfahren mit dem in der vorliegenden Arbeit untersuchten angiogenen Potential von elektromagnetischen Feldern ein interessanter Ansatz für die patientenschonende Induktion von Angiogenese sein. Dies bedarf weiterführender Untersuchung in zusätzlichen Studien.

7 Literaturverzeichnis

1. Accerigui MJ, Penisten ST, Goss KL, Ramirez K, Snyder JM (1999). Vascular endothelial growth factor gene expression in human fetal lung in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 20:14-23
2. Adair TH, Hang J, Wells ML, Magee FD, Montani JP (1995). Long-term electrical stimulation of rabbit skeletal muscle increases growth of paired arteries and veins. *Am J Physiol.*; 269(2 Pt 2): H717-24
3. Amaral SL, Linderman JR, Morse MM, Greene AS (2001). Angiogenesis induced by electrical stimulation is mediated by angiotensin II and VEGF. *Microcirculation*; 8(1): 57-67
4. Ameia Yen-Patton GP, Patton WF, Veer DM and Jacobson BS (1988). Endothelial cell response to pulsed electromagnetic fields: Stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro. *J Cell Physiol*; 134: 37-46
5. Assailly J, Monet JD, Boureau Y and Christel P (1981). Effect of weak inductively coupled pulsating currents on calcium uptake in embryonic chick tibia explants. *Bioelectrochem. Bioenerg.*; 8: 515-521
6. Assimacopoulos D (1968). Wound healing promotion by the use of negative electric current. *Am Surg*; 34(6): 423
7. Bassett CAL, Chokshi HR, Hernandez E, Pawluk RJ, Strop M (1979). The effect of pulsing electromagnetic fields on cellular calcium and calcification of non-uninons. *Electrical Properties of Bone and Cartilage; Experimental Effects and Clinical Applications*; 427-442. Gune & Stratton, New York
8. Bassett CAL, Mitchell SN and Gaston SR (1981). Treatment of ununited tibial diaphyseal fractures with pulsing electromagnetic fields. *J Bone Joint Surg*; 63: 511
9. Bassett CAL, Pawluk RJ and Pilla AA (1974). Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields. *Science*; 184: 575-577
10. Bawin SM, Adey WR (1976). Sensitivity of calcium binding in cerebral tissue to weak environmental electric fields oscillating at low frequency. *Proc Natl Acad Sci USA*; 73(6): 1999-2003
11. Berg H and Zhang L (1993). Electrostimulation in cell biology by low frequency electromagnetic fields. *Electro-Magnetobiol*; 12: 147-163

12. Bigelow JB, Al-Hussein SA, Von Recum AF et al. (1979). Effect of electrical stimulation of canine skin and percutaneous device-skin interface healing. New York, Grune and Stratton; 289-310
13. Blackman CF, Benane SG, Kinney LS, Joines WT, House DE (1982). Effects of ELG fields on calcium-ion efflux from brain tissue in vitro. *Radiat Res.*; 92(3): 510-20
14. Bodamyali T, Bhatt B, Hughes FJ, Winrow VR (1998). Pulsed electromagnetic fields simultaneously induce osteogenesis and upregulate transcription of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in rat osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Comm*; 250:458-461
15. Breen EC, Johnson EC, Wagner H, Tseng H-M, Sung LA and Wagner PD (1996). Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. *J Appl Physiol*; 81 (1): 355-361
16. Carey LC, Lepley D Jr. (1962) Effect of continuous direct electric current on healing wounds. *Surg Forum*; 13: 33
17. Chua CC, Hamdy RC, Chua BHL (1998). Upregulation of vascular endothelial growth factor by angiotensin II in rat heart endothelial cells. *Biochim Biophys Acta*; 1401: 187-194
18. Conti P, Gigante GE, Alesse E, Cifone MG, Fieschi C, Reale M and Angeletti PU (1985). A role for Ca⁺⁺ in the effect of very low frequency electromagnetic field on the blastogenesis of human lymphocytes. *FEBS Lett.*; 181: 28-35
19. Cossarizza A, Monti D, Bersani F, Cantini M, Cadossi R, Saachi A and Franceschi C (1989). Extremely low frequency pulsed electromagnetic fields increase cell proliferation in lymphocytes from young and aged subjects. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 160, 692-698
20. Davis S, Aldrich TH, Hones PF, Acheson A, Compton DL, Jain V, Ryan TE, Bruno J, Radziejewski C, Maisonpierre PC and Yancopoulos GD (1996). Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning. *Cell*, 87: 1161-1169
21. Dertinger H, Sontag W (1999). Electromagnetic fields: Mode of action. *Biologic Effects of Light 1998* (MF Holick and EG Jung, Eds), Kluwer Academic Publishers, Boston/London/Dordrecht; pp. 281-286
22. DiCarlo AL, Farrell JM, Litovitz TA (1999). Myocardial protection conferred by electromagnetic fields. *Circulation*; 99:813-816

23. Farndale RW and Murray JC (1985). Low frequency pulsed magnetic fields enhance collagen production in connective tissue cultures. *Bioelectrochem. Bioenerg.*; 14: 83-91
24. Farndale RW and Murray JC (1985). Pulsed electromagnetic fields promote collagen production in bone marrow fibroblasts via athermal mechanisms. *Calcif. Tissue Int.*; 37: 178-182
25. Ferrara N and Davis-Smyth T (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*; 18 (1): 4-24
26. Ferrara N, Houck K, Jakeman L and Leung DW (1992). Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev*; 13 (1): 18-32
27. Ferrara N (1999). Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr Top Microbiol Immunol*; 237: 1-29
28. Fitton Jackson S and Bassett CAL (1980). The response of skeletal tissues to pulsed magnetic fields. *Use of Tissue Culture in Medical Research*; 21-29. Pergamon Press, New York
29. Fitton Jackson S (1985). Biophysical studies of pulsed magnetic field interactions with biological systems: Part I. *Interactions Between Electromagnetic Fields and Cells*; 547-557. Plenum, New York
30. Folkman J and Klagsbrun M (1987). Vascular physiology. A family of angiogenic peptides. *Nature*: Oct. 22-28; 329 (6141): 671-2
31. Forsythe JA, Jiang B-H, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RT and Semenza GL (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol*; 16 (9): 4604-4613
32. Glassman LS, McGrath and Bassett CAL (1986). Effect of External Pulsing Electromagnetic Fields on the Healing of Soft Tissue. *Annals of Plastic Surgery*; 16 (4): 287-295
33. Goodman EM, Greenebaum B, Marron MT (1995). Effects of electromagnetic fields on molecules and cells. *Int Rev Cytol.*;158:279-338. Review.
34. Goodman R, Bassett CAL, Henderson AS (1983). Pulsing electromagnetic fields induce cellular transcription. *Science*; 220: 1283
35. Gossling HR, Bernstein RA, Abbott J (1992). Treatment of ununited tibial fractures: A comparison of surgery and pulsed electromagnetic fields (PEMF). *Orthopedics*;15:711-719

36. Grines LC, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL (2002). Angiogenic Gene Therapy (AGENT) Trial in Patients With Stable Angina Pectoris. *Circulation*; 105: 1291
37. Gu JW and Adair TH (1997). Hypoxia-induced expression of VEGF is reversible in myocardial vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*; 273: H628-H633
38. Guyton JR (1987). Mechanical control of smooth muscle growth. *Hypertrophic Response in Smooth Muscle*; chapt. 7, p. 122-148
39. Hang J, Kong L, Gu JW, Adair TH (1998). VEGF gene expression is upregulated in electrically stimulated rat skeletal muscle. *Am J Physiol*; 269: H1827-H1831
40. Harrington DB, Meyer R Jr, Klein RM (1974). Effects of small amounts of electric current at the cellular level. *Ann N Y Acad Sci.*; 238:300-6
41. Hinsenkamp M, Chiabrera A, Ryaby J, Pilla AA, Bassett CA (1978). Cell behaviour and DNA modification in pulsing electromagnetic fields. *Acta Orthop Belg.*; 44(5): 636-50
42. Ito M, Fay LA, Ito Y, Yuan MR (1997). The effect of pulsed electromagnetic fields on instrumented posterolateral spinal fusion and device-related stress shielding. *Spine*; 22: 382-388
43. Jolley WB, Hinshaw DB and Knierim K (1983). Magnetic field effects on calcium efflux and insulin secretion in isolated rabbit islets of Langerhans. *Bioelectromag.*; 4: 103-106
44. Jones DB (1984). The effect of pulsed magnetic fields on cyclic AMP metabolism in organ cultures of chick embryo tibiae. *J. Bioelectr.*; 3: 427-450
45. Kamiya A and Togawa T (1980). Adaptive regulation of wall shear stress to flow change in the canine carotid artery. *Am J Physiol*; 239: H14-H21
46. Kanno S, Oda N, Abe M, Saito S, Hori K, Handa Y, Tabayashy K, Sato Y (1999). Establishment of a simple and practical procedure applicable to therapeutic angiogenesis. *Circulation*; 99: 2682-2687
47. Knedlitschek G, Gottwald E, Weibezahn KF (1999). Effects of interferential current in cellular systems. *Biologic Effects of Light 1998* (MF Holick and EG Jung, Eds), Kluwer Academic Publishers, Boston/London/Dordrecht; pp. 303-311

48. Knedlitschek G, Noszvai-Nagy M, Meyer-Waarden H, Schimmelpfeng J, Weibezahn KF, Dertinger H (1994). Cyclic AMP response in cells exposed to electric fields of different frequencies and intensities. *Radiat Environ Biophys*; 33(2):141-7
49. Korzhseptsova IL, Lindstrom E, Meld KH, Berglund A, Lundgren E (1995). Low frequency EMF's increased inositol 1,4,5-triphosphate levels in the Jurkat cell line. *FEBS Lett*; 359: 151-154
50. Leung DW, Cachianes G, Kuang W-J, Goeddel DV and Ferrara N (1989). Vascular Endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*; 246: 1306-1309
51. Madri JA, Williams SK, Wyatt T and Mezzio C (1983). Capillary endothelial cell cultures: Phenotypic modulation matrix components. *J Cell Biol*; 97: 153-165
52. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N., Daly TJ, Davis S, Sato TN and Yancopoulos GD (1997). Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277: 55-60
53. Murray JC and Farndale RW (1985). Modulation of collagen production in cultured fibroblasts by a low-frequency, pulse magnetic field. *Biochim. Biophys. Acta*; 838: 98-105
54. Philipp A, Wolf GK, Rzany B, Dertinger H, Jung EG (2000). Interferential current is effective in palmar psoriasis: an open prospective trial. *Eur.J.Dermatol.*; 10:195-198
55. Polk C and Postow E (1986). Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields; CRC, Boca Raton, FL
56. Popovici RM, Irwin JC, Giaccia AJ, Giudice LC (1999). Hypoxia and cAMP stimulate vascular endothelial growth factor (VEGF) in human endometrial stromal cells: potential relevance to menstruation and endometrial regeneration. *J Endocrinol Metab*; 84: 2245-2248.
57. Pupilli C, Lasagni L, Romagnani P, Bellini F, Mannelli M, Misciglia N, Mavilia C, Vellei U, Villari D, Serio M (1999). Angiotensin II stimulates the synthesis and secretion of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor in human mesangial cells. *J Am Soc Nephrol*; 10 (2): 245-255
58. Robinson KR (1985). The response of cells to electrical fields. A review. *J Cell Biol*; 101: 2023-2027

59. Rosenthal M and Obe G (1989). Effect of 50Hz electromagnetic fields on proliferation and on chromosomal alterations in human peripheral lymphocytes untreated or pre-treated with chemical mutagens. *Mutat. Res.*, 210, 329-335
60. Schimmelpfeng J, Dertinger H (1997). Action of 50 Hz magnetic fields on cAMP content in SV40-3T3 cells: dependence on flux density and extracellular calcium. *Bioelectrochemistry & Bioenergetics*;43:51-54
61. Schimmelpfeng J, Dertinger H (1997). Action of a 50 Hz magnetic field on proliferation of cells in culture. *Bioelectromagnetics*;18:177-183
62. Schimmelpfeng J, Stein JC, Dertinger, H (1995). Action of 50 Hz magnetic fields upon cyclic AMP and intercellular communication in monolayers and spheroids of mammalian cells. *Bioelectromagnetics*;16:381-386
63. Sharrard WJW, Sutcliffe ML, Robson MJ et al. (1982). The treatment of fibrous non-union of fractures by pulsing electromagnetic stimulation. *J Bone Joint Surg*; 64: 189
64. Shweiki D, Itin A, Soffer D and Keshet E (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*; 359 (29): 843-845
65. Sindermann JR, Babij P, Klink JC, Köbbert C, Plenz G, Ebbing J, Fan L and March KL (2002). Smooth muscle-specific expression of SV40 large Tag induces SMC proliferation causing adaptive arterial remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 283: H2714-H2724
66. Smith SD, McLeod BR, Liboff AR, Cooksey K (1987). Calcium cyclotron resonance and diatom mobility. *Bioelectromagnetics*; 8(3); 215-27
67. Sollazzo V, Traina GC, DeMattei M, PellatiA, Pezzetti F, Caruso A (1997). Responses of human MG-63 osteosarcoma cell line and human osteoblast-like cells to pulsed electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics*;18:541-547
68. Sontag W, Dertinger H (1998). Response of cytosolic calcium, cyclic AMP and cyclic GMP in DMSO-differentiated HL-60 cells to modulated low frequency currents. *Bioelectromagnetics*;19:452-458
69. Sontag W (1998). Action of extremely low frequency electric fields on the cytosolic calcium concentration of differentiated HL-60 cells: nonactivated cells. *Bioelectromagnetics*;19(1):32-40

70. Stewart DJ (2002). A phase 2, randomised, multicenter, 26-week study to assess the efficacy and safety of BIOBYPASSTM (Ad_{GV}VEGF121.10) delivered through minimally invasive surgery versus maximum medical treatment in patients with severe angina, advanced coronary artery disease, and no option for revascularization. *American Heart Association Scientific Sessions 2002*; November 17-20; Chicago, Illinois
71. Tait CR and Jones PF (2004). Angiopoietins in tumours: the angiogenic switch. *Journal of Pathology*, 204: 1-10
72. Tepper OM, Callaghan MJ, Chang EI, Galiano RD, Bhatt KA, Baharestani S, Gan J, Simon B, Hopper RA, Levine JP, Gurtner GC (2004). Electromagnetic fields increase in vitro and in vivo angiogenesis through endothelial release of FGF-2. *Faseb Journal*, 18, 1231-1233
73. Thoma R (1893). Untersuchungen über die Histogenese und Histomechanik des Gefäßsystems. Verlag von Ferdinand Enke
74. Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA (1991). The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*; 266: 11947-11954
75. Williams B, Baker AQ, Gallacher B, Lodwick D (1995). Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*; 25: 913-917
76. Wu KT, Go N, Dennis C, Enquist I, Sawyer PN (1967). Effects of electric currents and interfacial potentials on wound healing. *J Surg Res*;7(3):122-8
77. Yamada S, Gruenther HL and Fleisch H (1985). The effect of pulsed electromagnetic fields on bone cell metabolism and calvaria resorption *in vitro*, and on calcium metabolism in the live rat. *Internat. Orthop.*; 9: 129-134
78. Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ and Holash J (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407: 242-248
79. Zhao M, Bai H, Wang E, Forrester JV, McCaig CD (2004). Electrical stimulation directly induces pre-angiogenic responses in vascular endothelial cells by signalling through VEGF responses. *J Cell Sci.*, 117(Pt 3): 397-405

Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit schulde ich vielen Menschen, die ich im Zuge meiner Doktorarbeit kennen und schätzen gelernt habe, meinen herzlichen Dank.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jürgen Sindermann, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ganz besonders danke ich auch Dr. rer. nat. Christiane Köbbert, die mir viel Geduld und Vertrauen entgegengebracht und mich in schwierigen Situationen mit ihrer Diskussionsbereitschaft und ihren wertvollen Ratschlägen zum Weitermachen motiviert und zum erfolgreichen Abschluss dieser Dissertation begleitet und geleitet hat.

Ebenfalls gebührt mein Dank Univ.-Prof. Dr. med. Günter Breithardt, der es ermöglichte, diese Arbeit an seiner Klinik durchzuführen.

Großen Dank schulde ich den Mitarbeitern des Instituts für Medizintechnik und Biophysik (IMB) des Forschungszentrums Karlsruhe, im Besonderen dessen Leiter Professor Dr. H. Dertinger und Professor W. Sontag, an dem die zur Strombehandlung von Zellen erforderlichen Vorrichtungen konzipiert und gebaut wurden. Hierzu gehören eine elektromagnetische Spulenvorrichtung zur Behandlung von Zellkulturen mit elektromagnetischen Wellen und ein Interferenzstromgenerator zur Behandlung mit Interferenzstrom. Die Zusammenarbeit mit ihnen war eine wichtige Voraussetzung für das Entstehen und das Gelingen der Arbeit. Ohne ihre Mitarbeit und weitreichende Unterstützung wäre mein Forschungsprojekt nicht zur Doktorarbeit ausgereift.

Münster, Juli 2005

Lebenslauf

8 Anhang

Die folgenden Tabellen fassen sämtliche in die Auswertung einbezogene Daten zusammen:

Tab. I: absolute Zellzahlen humaner Umbilikalvenenendothelzellen nach 15minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

15 min	Kontrolle	Magnet	15 min	Kontrolle	Magnet
25 Hz-24 h	62875	71000	25 Hz-48 h	119625	116875
	72250	70375		106875	117750
	82500	64375		39375	41875
	49500	49750		44125	49875
	43875	48875			
MW	62200	60875	MW	41750	45875
SD	15895,3	10871,8	SD	3358,8	5656,9
MW %	97,9		MW %	109,9	
SD %	17,9		SD %	12,3	
TTest	8,82E-01		TTest	0,487	

Tab. II: absolute Zellzahlen humaner Umbilikalvenenendothelzellen nach 15minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

15 min	Kontrolle	Magnet	15 min	Kontrolle	Magnet
50 Hz-24 h	161375	174750	50 Hz-48 h	145625	127875
	154875	141250		138375	139750
	156375	155625		150375	132250
	150125	167625		125250	145000
	63125	72125		116250	138875
	63625	60125			
	72000	61500			
	58875	61875			
MW	110047	111859	MW	139906	136218
SD	49018,2	52282,3	SD	10946,1	7636,5
MW %	101,6		MW %	97,4	
SD %	46,7		SD %	5,6	
TTest	0,9440		TTest	8,3E-01	

Tab. III: absolute Zellzahlen bov-cSMC nach 5minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

15 min	Kontrolle	Magnet	15 min	Kontrolle	Magnet
50 Hz-24 h	25625	35000	50 Hz-48 h	86375	58250
	26375	34250		60750	65375
	21875	36000		61000	64375
	32000	43125		63125	75125
	27500	28125		65375	69375
	25125	30750		57500	62875
	26625	38625		84000	54875
	33625	34375		78500	81500
	31875	36000		55875	65625
	32125	34000		66625	63375
	35625	36000		64625	58500
	31125	33750		54000	66125
	28625	39625			
	34375	33750			
	27125	34375			
	34500	37500			
	35000	52625			
30000	39125				
MW	29951	36500	MW	66479	65448
SD	4002,1	52282,3	SD	10765,7	7330,9
MW %	121,9		MW %	98,4	
SD %	14,4		SD %	11,2	
TTest	0,00019		TTest	7,9E-01	

Tab. IV: absolute Zellzahlen bov-cSMC nach 15minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

15 min	Kontrolle	Magnet	15 min	Kontrolle	Magnet
50 Hz-24 h	73750	60875	50 Hz-48 h	95375	118000
	57000	63438		113125	137375
	59875	48375		102625	130625
	43375	70750		84250	131875
	57000	63125		112500	131750
	52500	48313		97125	106125
	63125	76750		117000	131000
	68125	59125		96125	112375
	48750	81750		107000	112125
	56750	62500		100250	128875
	75250	76375		112000	112250
	67375	67750		103125	125250
	59375	73750			
	61125	74625			
	48125	88000			
	47500	69375			
	53313	75500			
48125	80000				
MW	57802	68910	MW	103375	123135
SD	9194,9	10804,9	SD	9454,6	10357
MW %	119,2		MW %	119,1	
SD %	15,7		SD %	8,4	
TTest	0,0022		TTest	7,2E-0,5	

Tab. V: absolute Zellzahlen bov-cSMC nach 30minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

24 h	Kontrolle	Magnet	48 h	Kontrolle	Magnet
	42750	53125		155125	166875
	47125	52625		189500	218125
	38625	54000		151625	190625
	46250	54000		161875	163125
	50750	52500		192875	211250
	38125	55625		182625	206375
	44500	52500		161500	170250
	52250	59000		218625	188500
	54125	54500		170750	181875
	43375	51375		164375	212500
	39375	56625		157750	162750
	41625	46875		200125	211750
	47625	52625			
	49375	56250			
	48750	55500			
	44500	46250			
	44250	43750			
	41875	50250			
MW	45292	52632	MW	175562,5	190333
SD	4620,9	3867,6	SD	20982,6	21206,8
MW %	116,2		MW %	108,4	
SD %	7,3		SD %	11,1	
TTest	0,00001		TTest	1,0E-01	

Tab. VI: absolute Zellzahlen bov-cSMC nach 15minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 25 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

24 h	Kontrolle	Magnet	48 h	Kontrolle	Magnet
	61625	67125		84250	102125
	51875	73125		90500	107375
	58125	69000		80000	101875
	59375	61250		88375	92375
	67250	72750		88750	109375
	56000	58750		72375	92000
	55625	65000		108125	94000
	68250	73125		97375	94000
	57125	64500		72500	78500
	51375	66875		99125	111250
	62875	70750		85000	91875
	57125	62250		75125	89500
	56000	56000			
	68750	62875			
	58125	77625			
	56250	63625			
	60375	68125			
	51250	69750			
MW	58743	66806	MW	86792	97021
SD	5346,4	5586,6	SD	11050,8	9549,0
MW %	113,7		MW %	111,8	
SD %	8,4		SD %	9,8	
TTest	9,5E-05		TTest	0,024	

Tab. VII: absolute Zellzahlen bov-cSMC nach 15minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 100 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

24 h	Kontrolle	Magnet	48 h	Kontrolle	Magnet
	31250	45875		176625	174750
	37500	36500		196250	215625
	34500	44500		167875	200625
	31375	37875		188750	204625
	36875	39125		210125	195000
	32875	32500		190625	196875
	30000	33125		159375	201375
	29000	32250		202250	199000
	30625	31875		187750	201000
	32375	33625		147500	230375
	33250	31750		193125	200000
	32500	30250		156625	197625
	27750	42375			
	27625	31250			
	33000	36375			
	28875	33125			
	36875	36875			
	32000	31125			
MW	32125	35576	MW	86792	97021
SD	2973,2	4756,2	SD	11050,8	9549,0
MW %	110,7		MW %	111,8	
SD %	13,4		SD %	9,8	
TTest	0,014		TTest	0,024	

Tab. VIII: absolute Zellzahlen ruhender bov-cSMC nach 15minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 25 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

24 h	Kontrolle	Magnet	48 h	Kontrolle	Magnet
	89250	67000		56750	56625
	92500	89125		59875	58875
	78875	80375		51625	45125
	65375	79750		49375	71500
	80250	80750		43000	68000
	85000	91375		58000	58125
MW	81875	81396	MW	53104	59708
SD	9601,4	8610,8	SD	6345,0	9307,8
MW %	99,4		MW %	112,4	
SD %	10,6		SD %	15,6	
TTest	9,29E-01		TTest	1,85E-01	

Tab. IX: absolute Zellzahlen ruhender bov-cSMC nach 15minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

24 h	Kontrolle	Magnet	48 h	Kontrolle	Magnet
	70500	72500		49125	50625
	79875	66750		59500	55625
	64375	63750		55625	59750
	63500	84000		59875	69375
	72000	69625		60875	80625
	67375	62250		73000	72125
MW	69604	69813	MW	59667	64688
SD	6026,7	7897,7	SD	7832,9	11274,3
MW %	100,3		MW %	108,4	
SD %	11,3		SD %	17,4	
TTest	9,6E-01		TTest	3,94E-01	

Tab. X: absolute Zellzahlen ruhender bov-cSMC nach 15minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 25 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

24 h	Kontrolle	Magnet	48 h	Kontrolle	Magnet
	56750	54625		48750	45000
	47750	59875		53375	43250
	51250	54000		46250	49250
	54000	53625		52875	73000
	56500	60000		48125	47750
	53750	51875		52750	45250
MW	53333	55667	MW	50354	50583
SD	3401	3432,1	SD	3020,2	11186,7
MW %	104,4		MW %	100,5	
SD %	6,2		SD %	22,1	
TTest	2,64E-01		TTest	9,63E-01	

Tab. XI: absolute Zellzahlen ms-aSMC nach 5minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

24 h	Kontrolle	Magnet	48 h	Kontrolle	Magnet
	41875	46375		55125	57250
	42500	44375		58750	57125
	41875	44375		46125	56500
	49000	46875		54125	61000
	55000	46750		47500	56375
	51250	50125		51250	59250
	40125	48375		45625	54375
	36750	53375		55250	49750
	36000	44875		48375	56000
	49125	50625		41375	57875
	51875	50750		51500	53500
	50375	41250		56375	59000
	39375	40625			
	42500	38125			
	36875	52375			
	42750	44875			
	51875	49750			
	51750	46875			
MW	45049	46708	MW	50948	56500
SD	6176,8	4131,6	SD	5209,4	2958
MW %	103,7		MW %	110,9	
SD %	8,8		SD %	5,2	
TTest	3,5E-01		TTest	5,0E-03	

Tab. XII: absolute Zellzahlen ms-aSMC nach 15minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

24 h	Kontrolle	Magnet	48 h	Kontrolle	Magnet
	34250	30250		55125	57250
	32250	30625		58750	57125
	25125	32500		46125	56500
	32750	28125		54125	61000
	28875	33625		47500	56375
	29250	33000		51250	59250
	26750	34875		45625	54375
	28125	32125		55250	49750
	26500	29625		48375	56000
	26625	31875		41375	57875
	26625	27750		51500	53500
	32250	30000		56375	59000
	30375	28250			
	26500	29500			
	29625	27250			
	32500	30625			
	27375	30000			
	25375	34125			
MW	28951	30785	MW	57041	64854
SD	2846,3	2256,4	SD	6727,7	7756,4
MW %	106,3		MW %	113,7	
SD %	7,3		SD %	12,0	
TTest	4,0E-02		TTest	1,5E-02	

Tab. XIII: absolute Zellzahlen ms-aSMC nach 30minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

24 h	Kontrolle	Magnet	48 h	Kontrolle	Magnet
	34500	37250		66500	103000
	38750	36250		67000	81250
	34375	36875		72250	104000
	39375	41625		61750	75625
	39000	38750		74625	75750
	36125	36000		62375	73500
	52000	42250		65625	78125
	50875	42000		64125	72750
	42250	37875		67750	65625
	54625	42750		68250	78750
	54125	39875		63125	68875
	50625	45375		66250	73875
	54875	64875			
	46500	51875			
	46875	58625			
	59000	57500			
	52000	52750			
	46750	45000			
MW	46257	44861	MW	66635	79260
SD	7784,4	8666,3	SD	3827,8	12079,3
MW %	97,0		MW %	118,9	
SD %	19,3		SD %	15,2	
TTest	6,1E-01		TTest	4,2E-03	

Tab. XIV: absolute Zellzahlen bov-cSMC nach 15minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 25 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

24 h	Kontrolle	Magnet	48 h	Kontrolle	Magnet
	40625	53250		56500	61125
	47125	45000		49500	65000
	42250	41875		53000	65000
	38750	45250		48750	57750
	44375	40500		62875	59000
	43000	41500		55000	62625
	43125	37125		52625	62500
	32375	44250		58000	64500
	33250	35500		55750	68875
	33375	35500		60625	65250
	42500	39625		54500	54000
	39000	44250		53875	64625
	41875	34625			
	41250	43125			
	32000	48125			
	39375	46500			
	38375	44375			
	34625	58125			
MW	39292	43250	MW	55083	62521
SD	4488,5	6056,7	SD	4110,5	4024,7
MW %	110,1		MW %	113,5	
SD %	14,0		SD %	6,4	
TTest	3,32E-02		TTest	0,0002	

Tab. XV: absolute Zellzahlen bov-cSMC nach 15minütiger Exposition durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 100 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

24 h	Kontrolle	Magnet	48 h	Kontrolle	Magnet
	29000	24500		87625	68750
	31125	27250		91875	80250
	33125	32125		72000	96500
	34500	40250		67500	81250
	36375	34625		79250	95000
	24250	30550		80500	87250
	47000	40750		87500	96500
	32625	41375		90750	91250
	34500	59750		70000	82000
	41125	44750		80375	91500
	43500	45125		88875	80000
	42500	59625		81875	95625
	32875	52500			
	57250	52750			
	36125	56500			
	56375	57875			
	55000	57000			
	52125	60250			
MW	39965	45419	MW	81510	87156
SD	9986,4	12103,8	SD	8241,1	8752,5
MW %	113,6		MW %	106,9	
SD %	26,6		SD %	10,0	
TTest	0,1498		TTest	0,1181	

Tab. XVI: absolute Zellzahlen bov-cSMC nach ein- und zweimaliger 15minütiger Exposition nach 24 bzw. 24 und 48 Stunden durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei Inkubationszeit 48 Stunden

	Kontrolle	1x Magnet 24 h	2x Magnet 24 h/ 24 h
	184250	191500	218250
	170125	208125	190000
	193125	219250	223000
	190750	197500	216250
	203500	200000	209125
	168250	184750	203375
	209250	209500	213250
	216000	224625	225500
	215000	216125	227625
MW	194472	205708	214042
SD	17976,6	13280,8	11912,3
MW %		105,8	104,1
SD %		6,5	5,6
TTest	0,1527	0,1476	0,0166

Tab. XVII: absolute Zellzahlen ruhender bov-cSMC nach ein- und zweimaliger 15minütiger Exposition nach 24 bzw. 24 und 48 Stunden durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei Inkubationszeit 48 Stunden

	Kontrolle	1x Magnet 24 h	2x Magnet 24 h/ 24 h
	40750	53875	60125
	39125	48250	50500
	62000	51250	61000
	58750	48875	50500
	71250	70500	59250
	56375	59250	55000
MW	54708	55333	56063
SD	12518,7	8438,6	4776,1
MW %		101,1	102,5
SD %		15,3	8,5
TTest	0,9215	0,8585	0,8122

Tab. XVIII: absolute Zellzahlen ms-aSMC nach ein- und zweimaliger 15minütiger Exposition nach 24 bzw. 24 und 48 Stunden durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei Inkubationszeit 48 Stunden

	Kontrolle	1x Magnet 24 h	2x Magnet 24 h/ 24 h
	76250	76250	94000
	78250	90875	95500
	64750	85000	92500
	68000	85000	97875
	67750	65750	89375
	85500	75000	86875
MW	73417	79646	92688
SD	7924,1	9051,4	4033,3
MW %		108,5	126,2
SD %		11,4	4,4
TTest	0,2339	0,0148	0,0009

Tab. XIX: absolute Zellzahlen ruhender bov-cSMC nach 15minütiger Exposition durch ein elektrisches Feld einer Stromstärke von 100 μA , einer Frequenz von 125 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

24 h	Kontrolle	Magnet
	58250	64375
	47500	47500
	65375	51750
	58750	51500
	45625	48500
	40625	51125
MW	52688	52458
SD	9497	6090,3
MW %	99,6	
SD %	11,6	
TTest	9,61E-01	

48 h	Kontrolle	Magnet
	30500	64375
	34625	40500
	35000	42500
	51875	59500
	50750	69875
	58125	62500
MW	43479	56542
SD	11459,6	12148,2
MW %	130,0	
SD %	21,5	
TTest	8,45E-02	

Tab. XX: absolute Zellzahlen ruhender bov-cSMC nach 15minütiger Exposition durch ein elektrisches Feld einer Stromstärke von 200 μA , einer Frequenz von 125 Hz bei Inkubationszeiten von 24 bzw. 48 Stunden

24 h	Kontrolle	Magnet
	72000	47875
	56500	59250
	48125	46875
	46500	64625
	51500	59125
	25500	47000
MW	50021	54125
SD	15129,5	7796,2
MW %	108,2	
SD %	14,4	
TTest	5,72E-01	

48 h	Kontrolle	Magnet
	60000	56125
	56125	45500
	52500	63500
	61875	41125
	58500	71750
	72000	69250
MW	60167	57875
SD	6646,3	12572,3
MW %	96,2	
SD %	21,7	
TTest	7,04E-01	

Tab. XXI: absolute Zellzahlen bov-cSMC nach 15 minütiger Exposition durch 1) ein elektrisches Feld: 200 μ A, 125 Hz nach 24 Stunden und 2) ein elektromagnetisches Feld: 50 Hz nach 48 Stunden bei jeweils 72stündiger Inkubation

	Kontrolle	Strom / Magnet
	195625	190000
	190375	190625
	136625	190625
	196000	234000
	171000	220125
	131125	190375
MW	170125	202625
SD	29576,5	19432,4
MW %	119,1	
SD %	9,6	
TTest	5,22E-02	

Tab. XXII: absolute Zellzahlen bov-cSMC nach 15 minütiger Exposition durch 1) ein elektrisches Feld: 200 μ A, 125 Hz nach 24 Stunden bzw. 2) ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz nach 48 Stunden bei jeweils 72stündiger Inkubation

	Magnet nach 48 h	Strom nach 24 h
	171375	206875
	193375	209500
	192875	209500
	215000	167125
	207750	149875
	219000	170250
MW	199869	185521
SD	17663,8	26261,1
MW %	92,8	
SD %	14,2	
TTest	2,96E-01	

Tab. XXIII: absolute Zellzahlen bov-cSMC nach 15 minütiger Exposition durch 1) ein elektromagnetisches Feld: 50 Hz nach 24 Stunden und 2) ein elektrisches Feld: 200 μ A, 125 Hz nach 48 Stunden bei jeweils 72stündiger Inkubation

	Kontrolle	Magnet / Strom
	120000	136250
	123875	146750
	131875	166625
	133875	170000
	139375	155500
	133500	153875
MW	128917	154833
SD	5681,5	12498,9
MW %	120,1	
SD %	8,1	
TTest	2,43E-03	

Tab. XXIV: absolute Zellzahlen bov-cSMC nach 15 minütiger Exposition durch 1) ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz nach 24 Stunden bzw. 2) ein elektrisches Feld: 200 μ A, 125 Hz nach 48 Stunden bei jeweils 72stündiger Inkubation

	Strom nach 48 h	Magnet nach 24 h
	134375	152250
	125250	127625
	142500	142500
	140375	146875
	132250	148625
	140875	148000
MW	135938	144313
SD	6593,9	8758,1
MW %	106,2	
SD %	6,1	
TTest	9,31E-03	

Tab. XXV: absolute Zellzahlen bov-cSMC nach ein- und zweimaliger 15minütiger Exposition nach 24 bzw. 24 und 48 Stunden durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei einer Inkubationszeit von 72 Stunden

	Kontrolle	Magnet nach 24 h	Magnet nach 24 und 48 h
	184250	191500	218250
	170125	208125	190000
	193125	219250	223000
	190750	197500	216250
	203500	200000	209125
	168250	184750	203375
	209250	209500	213250
	216000	224625	225500
	215000	216125	227625
MW	194472	205708	214042
SD	17976,6	13280,8	11912,3
MW %		105,8	104,1
SD %		6,5	5,6
TTest	0,1527	0,1476	0,0166

Tab. XXVI: absolute Zellzahlen ruhender bov-cSMC nach ein- und zweimaliger 15minütiger Exposition nach 24 bzw. 24 und 48 Stunden durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei einer Inkubationszeit von 72 Stunden

	Kontrolle	Magnet nach 24 h	Magnet nach 24 und 48 h
	40750	53875	60125
	39125	48250	50500
	62000	51250	61000
	58750	48875	50500
	71250	70500	59250
	56375	59250	55000
MW	54708	55333	56063
SD	12518,7	8438,6	4776,1
MW %		101,1	102,5
SD %		15,3	8,5
TTest	0,9216	0,8585	0,8122

Tab. XXVII: absolute Zellzahlen proliferierender ms-aSMC nach ein- und zweimaliger 15minütiger Exposition nach 24 bzw. 24 und 48 Stunden durch ein elektromagnetisches Feld einer Frequenz von 50 Hz bei einer Inkubationszeit von 72 Stunden

	Kontrolle	Magnet nach 24 h	Magnet nach 24 und 48 h
	76250	76250	94000
	78250	90875	95500
	64750	85000	92500
	68000	85000	97875
	67750	65750	89375
	85500	75000	86875
MW	73417	79646	92688
SD	7924,1	9051,4	4033,3
MW %		108,5	126,2
SD %		11,4	4,4
TTest	0,2339	0,0148	0,0009

Tab. XXVIII: absolute Zellzahlen ruhender bov-cSMC nach 15minütiger Exposition durch ein elektrisches Feld einer Stromstärke von 200 μ A, einer Frequenz von 125 Hz bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden

	Kontrolle	Strom
	25750	33375
	29678	33750
	24625	23625
	27061	29063
	25500	32061
	27625	32625
MW	26707	30750
SD	1816,6	3866,3
MW %	115,1	
SD %	12,6	
TTest	5,3E-02	

9 Abkürzungsverzeichnis

EMF	Elektromagnetische Felder
VEGF	Vascular endothelial growth factor
FGF	Fibroblast growth factor
EC	Endothelzellen
Ang II	Angiotensin II
vSMC	glatte Gefäßmuskelzellen
IFC	Interferenzströme
PEMF	gepulste elektromagnetische Felder
SD	Standardabweichung
MW	Mittelwert
cSMC	glatte Muskelzellen aus Koronararterien
aSMC	glatte Muskelzellen aus der Aorta
HUVEC	Humane Umbilikalvenen Endothelzellen
bov	Zellen vom Rind
ts	Zellen von der Maus
ns	nicht signifikant
Exp.	Expositionsdauer
Ang-1	Angiopietin-1
Ang-2	Angiopietin-2
Eph	Ephrine

Dieses Dokument wurde mit Win2PDF, erhaeltlich unter <http://www.win2pdf.com/ch>
Die unregistrierte Version von Win2PDF darf nur zu nicht-kommerziellen Zwecken und zur Evaluation eingesetzt werden.