

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Medizinische Klinik und Poliklinik C, Kardiologie und Angiologie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt-

und dem

Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung, Department Molekularkardiologie
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Assmann
Department-Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS
NIEDERENERGETISCHER ELEKTROMAGNETISCHER FELDER AUF DIE
PROLIFERATION VON GEFÄßWANDZELLEN IN VITRO

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae
der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Bierbaum, Tanja
aus Bielefeld

2007

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. V. Arolt

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. J. Sindermann

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. C. Müller-Tidow

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2007

Aus dem Universitätsklinikum Münster, Medizinische Klinik und Poliklinik C, Kardiologie und Angiologie, -Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt- und dem

Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung, Department Molekularkardiologie

Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. G. Assmann

Department-Leiter: Univ.-Prof. Dr. med. G. Breithardt

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. J. Sindermann

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. C. Müller-Tidow

Zusammenfassung

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS NIEDERENERGETISCHER ELEKTROMAGNETISCHER FELDER AUF DIE PROLIFERATION VON GEFÄßWANDZELLEN IN VITRO

Bierbaum, Tanja

Für die Behandlung koronarer Herzerkrankungen ist eine therapeutisch induzierte Angiogenese eine viel versprechende Methode. Da bereits ein positiver Effekt elektromagnetischer Felder auf die Revaskularisierung bei der Knochenbruchheilung beschrieben wurde, stellt sich die Frage, ob dieser Effekt auf die koronare oder peripher arterielle Angiogenese übertragbar ist.

Eigene *in vitro*-Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass elektromagnetische Felder einen positiven Einfluss auf die Proliferation von Gefäßwandzellen zeigen. Bei bereits in Proliferation befindlichen vaskulären glatten Muskelzellen konnte eine signifikante Steigerung der Zellproliferation um bis zu 21 % nachgewiesen werden. In weitergehenden Untersuchungen wurde versucht, diese phänotypischen Veränderungen und Expressionsmuster proliferationsassoziiierter Marker auf Proteinebene (Westernblot) zu untersuchen.

Dazu wurden koronare glatte Muskelzellen vom Rind (bov cSMC) und humane Endothellzellen (EC) einem elektromagnetischen Feld mit verschiedenen Frequenzen für unterschiedliche Expositionszeiträume ausgesetzt. Die Experimente wurden mit proliferierenden und ruhenden Zellen durchgeführt. Eine Aufarbeitung für den Westernblot erfolgte 24 h und 48 h nach Magnetfeldexposition. Im Westernblot wurden die Proteine α -Actin und Calponin als Phänotypenmarker glatter Muskelzellen und PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) als Proliferationsmarker untersucht. Mittels Westernblot konnten alle o.g. Parameter nachgewiesen werden, allerdings konnte trotz des eindeutigen pro-proliferativen Effekts elektromagnetischer Felder auf glatte Muskelzellen keine offensichtliche Veränderung der Expression von Proliferations- und Phänotypmarkern gezeigt werden. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die pro-proliferativen Effekte elektromagnetischer Felder für einen Nachweis proliferations-assoziiierter Parameter auf Proteinebene mittels Westernblot zu schwach ausgeprägt sind.

Tag der mündlichen Prüfung: 22.02.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Geschichtlicher Hintergrund	1
1.2	Theoretischer Hintergrund.....	3
1.3	Bisherige Forschungsansätze, medizinische Anwendungen	4
1.4	Angiogenese	12
2	Material und Methoden	16
2.1	Zellkultur.....	16
2.1.1	Bovine Coronary Smooth Muscle Cells.....	18
2.1.2	Human Umbilical Vein Endothelial Cells	22
2.2	Westernblot.....	24
3	Ergebnisse	32
3.1	Proliferationsstudie	32
3.1	Einfluss der Feldfrequenz	34
3.1.1	Proliferierende glatte Muskelzellen	34
3.1.2	Ruhende glatte Muskelzellen.....	36
3.1.3	Endothelzellen	38
3.2	Einfluss der Expositionsdauer	39
3.3	Vergleich proliferierender und ruhender glatter Muskelzellen	42

3.4	Zweimalige Magnetfeldexposition.....	44
4	Diskussion	45
4.1	Alternative Methoden zum Westernblot.....	47
4.2	Probleme bei der Magnetfeldforschung	51
4.3	Risiken durch elektromagnetische Felder.....	52
4.4	Nutzen für die Angiogenese	55
	Glossar	57
	Abbildungsverzeichnis.....	58
	Tabellenverzeichnis.....	59
	Literatur	60
	Lebenslauf.....	74
	Danksagung	75
	Anhang	I

1 Einleitung

1.1 Geschichtlicher Hintergrund

„Die magnetische Energie ist die elementare Energie, von der das gesamte Leben des Organismus abhängt.“ [83]

Dieses Zitat von Prof. Werner Heisenberg (1901 – 1976), Physiker, Philosoph, Nobelpreisträger der Physik, spiegelt die große Bedeutung und Faszination des magnetischen Feldes wider und erklärt somit die seit Jahrhunderten andauernde Auseinandersetzung mit dessen Wirkung und Auswirkung auf lebende Organismen. Die Erde erzeugt ein Magnetfeld, das evident für das Leben ist. Dies zeigt sich z.B. an den Zugvögeln, die die Feldlinien zur Orientierung nutzen. Fehlt das Magnetfeld, wie dies bei Weltraumflügen der Fall ist, entwickelt sich die so genannte Weltraumkrankheit. Diese konnte behoben werden, indem die NASA Magnetfeldgeneratoren in die Raumkapseln eingebaut und somit ein künstliches Magnetfeld ähnlich dem der Erde erzeugt hat. In Japan beschäftigt sich seit langer Zeit Kyoichi Nakagawa [82] in mehreren Studien mit der Auswirkung von Magnetfeldern auf den menschlichen Organismus. Aufgrund des schwächer werdenden Magnetfeldes der Erde spricht er von einem Magnetfeldmangelsyndrom bei den Menschen. Die genannten Beispiele verdeutlichen den erheblichen Einfluss des Magnetfeldes auf das menschliche Leben. [73]

Die These, dass das Leben von einem Magnetfeld beeinflusst werden kann, wurde schon früh aufgestellt und kontrovers diskutiert. Bereits die alten Ägypter verwendeten Magnetsteine unter anderem zur Heilung von Kopfschmerzen und schlecht heilenden Wunden. Man fand bei Ausgrabungen Magnete als Halsketten, Armbänder und Amulette, die durch permanentes Tragen den Körper beeinflussen sollten. Auch aus China, Rom und Griechenland gibt es Belege dafür, dass Dauermagneten eine heilende Wirkung zugeschrieben wurde. [73], [104]

Im abendländischen Kulturkreis dagegen finden sich erst im 16. Jahrhundert bei Paracelsus (1493 - 1541) erstmalig Hinweise auf eine Art Magnettherapie. Er erkannte als erster, dass Magnete zwei verschiedene Pole haben und dass die dadurch hervorgerufenen Magnetfelder gegen Epilepsie und Gelbsucht wirken. Um sich diese offensichtlichen Einflüsse von Magneten besser zu Nutzen zu machen, wurde zunächst versucht, bessere, künstliche Magnetfelder zu erzeugen. Dies geschah mit hocherhitztem Eisen, welches in diesem Zustand ein Magnetfeld um sich aufbaut. Wegweisende Forschungen reihten sich dann in kurzen Zeitabständen hintereinander. Diese bedeuteten große Fortschritte für den medizinischen Nutzen von Magnetfeldern. So erforschte Michael Faraday (1791 - 1867) die elektromagnetische Induktion (Induktionsgesetz 1831) und die magnetische Eigenschaft des Sauerstoffs. Die Entdeckung einer Wechselbeziehung von biologischen Funktionen und Elektrizität von Luigi Galvani (1737 - 1798) wurde von Alessandro Volta (1745 - 1827) weiterentwickelt, indem er die Erzeugung von Stoffwechselfvorgängen auf elektrische Ladungen zurückführte. [32], [48], [73], [83], [104]

Die Beeinflussung dieser biologischen (zellulären), elektrischen Felder durch exogen zugeführte elektrische und elektromagnetische Felder ist seitdem Gegenstand der bis heute andauernden Forschung. Dabei wurde die Methode zur Erzeugung künstlicher Magnetfelder permanent weiterentwickelt. Einen entscheidenden Schritt tat 1820 Hans Christian Oersted (1777 - 1851) mit der Entdeckung des Magnetfeldes stromdurchflossener Leiter. Damit war eine gute Methode zur Erzeugung eines Magnetfeldes gegeben. Ende des 19. Jahrhunderts erzeugte man erstmals künstliche Magnetfelder, indem man Strom durch Ringe oder Spulen fließen ließ. Die Weiterentwicklung der ursprünglich verwendeten statischen Magnetfelder führte im Laufe der Zeit zu der Entwicklung bewegter Permanentmagnete. Bei diesen drehte ein elektrischer Motor einen Permanentmagneten mit einer Frequenz von ca. 10 Hz. Man versprach sich mit dieser ständigen Veränderung des Magnetfeldes eine bessere biologische Wirksamkeit. Heutzutage erzeugt man elektrisch induzierte Magnetfelder, bei denen ein elektrischer Strom über eine Drahtspule ein Magnetfeld kontinuierlich auf- und abbaut. [34], [48], [40]

1.2 Theoretischer Hintergrund

Jede bewegte elektrische Ladung (Strom) erzeugt ein magnetisches Feld. Je mehr Strom fließt, desto stärker ist das magnetische Feld. So ist das magnetische Feld in jedem Punkt des Raumes proportional zu dem Strom, der es hervorruft. Richtung und Größe des Feldes werden durch die Feldlinien angegeben. Dabei ist die Stärke des Feldes proportional zu der Zahl der Feldlinien. Ein Elektromagnet wird aus einem Eisenkern und einer stromführenden Wicklung aus Drahtschleifen (Spule) hergestellt. Wenn Strom durch den Draht fließt, wirken die Drahtschleifen als Magnet, indem sie im Inneren ein homogenes magnetisches Feld erzeugen, d.h. die Feldlinien haben gleichen Abstand voneinander und verlaufen parallel. Hier gilt:

Magnetische Feldstärke $H = w \cdot I/l$ [A/m],

wobei w die Windungszahl der Spule, I die Stromstärke in Ampère und l die Länge der Spule ist. Die magnetische Feldstärke ist lediglich durch die Form des Leiters bedingt. [8], [48]

Jede bewegte elektrische Ladung umgibt sich mit einem magnetischen Feld. Wenn sich die Ladung durch ein bereits bestehendes Magnetfeld bewegt, tritt das von ihr erzeugte magnetische Feld mit diesem in Wechselwirkung. Dabei wird auf die bewegte Ladung eine Kraft ausgeübt, die so genannte Lorentz-Kraft F .

$$\vec{F} = Q\vec{v} \times \vec{H}\mu\mu_0 \quad \text{oder} \quad \vec{F} = Q\vec{v} \times \vec{B} \quad [\text{N}]$$

Die auf einen Leiter wirkende Lorentz-Kraft ist proportional zu der im Leiter fließenden Stromstärke I und der Länge l des Leiters. (Das Produkt aus der Stromstärke und der Länge kann als Produkt der transportierten Ladungsmenge Q und der Bewegungsgeschwindigkeit \vec{v} ausgedrückt werden.) Außerdem ist die Lorentz-Kraft proportional zu der magnetischen Feldstärke H . Durch die relative Permeabilitätskonstante μ und die magnetische Feldkonstante μ_0 ($\mu_0 = 4\pi \cdot 10^{-7}$ Vs/Am) wird das magnetische Feld weiter beeinflusst. Das Produkt aus Feldstärke H , relativer Permeabilität μ und magnetischer Feldkonstante μ_0 heißt magnetische Flussdichte B , ein Maß für die Stärke des Magnetfeldes.

$$\dot{\mathbf{B}} = \mu\mu_0 \dot{\mathbf{H}} \quad \text{oder} \quad \dot{\mathbf{B}} = \frac{\dot{\mathbf{F}}}{Q\mathbf{v}} \quad [\text{Vs m}^{-2} = \text{Tesla}].$$

Die Lorentz-Kraft steht senkrecht zur Richtung der Geschwindigkeit $\dot{\mathbf{v}}$ und der Flussdichte \mathbf{B} . Somit beeinflusst sie lediglich die Richtung der Geschwindigkeit aber nicht den Betrag. [8], [51], [49], [77]

Aufgrund dieser elektromagnetischen Wechselwirkungen sind sowohl die magnetischen als auch die elektrischen Felder eng miteinander verbunden, so dass von einem elektromagnetischen Feld gesprochen wird. [8]

Bei den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde die Anordnung von Helmholtz-Spulen zur Erzeugung eines elektromagnetischen Feldes gewählt. Die Helmholtz-Spule besteht aus zwei kurzen Spulen (Windungszahl w), die parallel zueinander im Abstand a angeordnet sind. Hierbei ist a gleich dem Radius der beiden Spulen. Wenn in den Spulen der gleiche Strom I fließt, ist das Feld zwischen den beiden Spulen nahezu homogen und entlang der Verbindungsachse zwischen den Spulen gerichtet. Genau zwischen den beiden Spulen erhält man:

$$H = 0,716\mu_0 \frac{w}{r} I \quad [\text{mT}].$$

Dabei ist I der Strom in Ampère, w die Windungszahl und r der Radius der Spule. Der Vorteil der Helmholtz-Spulen ist, dass sehr leicht von allen Seiten Gegenstände in das Magnetfeld eingebracht werden können und somit gut experimentell gearbeitet werden kann. [33], [39], [52], [77]

1.3 Bisherige Forschungsansätze, medizinische Anwendungen

Bis heute ist es nicht eindeutig möglich, eine allgemeingültige Aussage über die Wirkungszusammenhänge von Magnetfeldeinflüssen auf den Organismus zu treffen. Um die offensichtlichen Einflüsse und Veränderungen aber überhaupt greifen und allgemein eine Aussage über den Nutzen von Magnetfeldern treffen zu können, ist die Erforschung der Wirkmechanismen evident. Daher wird das Thema noch weiter

kontrovers diskutiert und ist Gegenstand vieler aktueller Forschungsarbeiten. Besonders untersucht wurde bislang die Auswirkung elektromagnetischer Felder auf die Heilung von Frakturen:

Bereits 1957 stellten Fukada and Yasuda [37] erstmals fest, dass trockene Knochen elektrische Signale erzeugen können, wenn sie mechanischem Druck ausgesetzt sind. Basset und Becker [11] konnten diesen so genannten piezoelektrischen Effekt auch auf lebendes, humides Knochengewebe übertragen. Das Prinzip des piezoelektrischen Effektes beruht auf der Entdeckung des französischen Wissenschaftlers Pierre J. Curie (1859 - 1906), dass bestimmte Kristalle sich unter Druck an ihrer Oberfläche aufladen (1880) [32]. Da das Ausüben von Druck gerade in der operativen Versorgung von Frakturen eine wichtige Rolle spielt, lag die Vermutung nahe, dass der piezoelektrische Effekt ein fördernder Faktor bei der Osteogenese sein könnte. Daraufhin wurden Experimente bezüglich der Auswirkung elektrischen Stromes auf die Knochenheilung durchgeführt. Es konnte beobachtet werden, dass mit elektrischem Strom die Knochenbildung bei Mesenchymzellen angeregt wurde [12]. In einer Weiterentwicklung dieser Idee zeigte sich, dass elektromagnetische Felder einen ähnlichen Effekt wie elektrischer Strom im Rahmen der Osteogenese bewirken [13]. Da elektromagnetische Felder über mehrere Variable wie Felddichte, Frequenz und Anwendungsdauer definiert werden, können diese Felder präzise bestimmt werden. Dies ist ein Vorteil gegenüber der Anwendung des elektrischen Stromes, denn Magnetfelder lassen eine gezieltere therapeutische Anwendung zu. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden Vergleichsstudien zwischen der Behandlung von unverbundenen Tibiafrakturen mit elektromagnetischem Feld und einer herkömmlichen chirurgischen Versorgung angestellt [45]. Die Magnetfeldtherapie erzielte in Bezug auf Erfolgsrate und Behandlungszeit die gleichen guten Ergebnisse wie eine chirurgische Versorgung. Somit ist die Magnetfeldtherapie als eine supportive Maßnahme bis hin zum vollständigen Ersatz einer Operation einsetzbar. Im Vergleich zu einer nichtinvasiven, konservativen Behandlung zeigte sich eine Therapie mit elektromagnetischem Feld sogar erfolgreicher.

Darüber hinaus konnte sich die Anwendung eines elektromagnetischen Feldes auch in weiteren Behandlungsbereichen etablieren. In Versuchen mit ovariectomierten Ratten

stellte sich heraus, dass eine Magnetfeldexposition die Tiere vor Osteoporose schützte [26]. Des Weiteren zeigte Bassett [10] den positiven Nutzen dieser Methode bei Knochenspenden, Osteotomien und Osteonekrose. Darendeliler et al. [31] führten Experimente mit 30 Schweinen durch, an denen sie eine Osteotomie der Mandibula durchführten und diese anschließend einem elektromagnetischen Feld aussetzten. Es konnte histologisch ein signifikant schnelleres Knochenwachstum im Vergleich zu einer nichtexponierten Kontrollgruppe beobachtet werden. Einen Anstieg in der Aktivität von Osteoblasten und der Osteogenese konnten auch Kesemenli et al. bestätigen [57]. Ciombor et al. [28] bewiesen im Tierversuch eine Verzögerung von Osteoarthritis unter der Anwendung elektromagnetischen Feldes.

Eine Übertragung dieser Ergebnisse auf frische Frakturen ist bisher allerdings nicht eindeutig gelungen. So konnten in einem Tierversuch keine Hinweise auf eine bessere Osteogenese bei frischen Ulnarfrakturen nach der Exposition im elektromagnetischen Feld festgestellt werden [66]. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass Osteocyten nicht in jedem beliebigen Entwicklungsstadium auf elektromagnetisches Feld ansprechen, wie Yamaguchi et al. [109] zeigten. Demnach sprechen wenig differenzierte Vorstufen oder Präosteoblasten besser auf ein elektromagnetisches Feld an als ausdifferenzierte Osteocyten.

Der positive Einfluss elektromagnetischer Felder auf die beschleunigte Heilung von unverbundenen Knochenbrüchen wird heute therapeutisch bei schlecht heilenden Knochenfrakturen genutzt. Dabei werden an den betreffenden Körperteilen Spulen angelegt, die Frequenzen unter 50 Hz und Magnetfeldstärken um 0,5 mT erzeugen [34]. Allerdings ist die Art und Weise der Wirkmechanismen des elektromagnetischen Feldes weiterhin ungeklärt.

Diesbezüglich wurden weiterführende Experimente durchgeführt, die zeigten, dass die Rate der Revaskularisierung bei vorheriger Devaskularisierung des Femurkopfes im Tierversuch sowohl im ossären Bereich als auch in benachbarten Regionen nach einer Exposition im elektromagnetischen Feld anstieg [24], [89]. Daraufhin untersuchten Yen-Petton et al. [108] die Auswirkungen elektromagnetischen Feldes auf Endothelzellen. Eine signifikante Erhöhung der Wachstumsrate in Anwesenheit des Magnetfeldes konnte gezeigt werden. Des Weiteren kristallisierte sich eine

dreidimensionale, gefäßähnliche Struktur nach einer fünf- bis achtstündigen Magnetfeldexposition heraus. Die beobachteten Phasen der Neovaskularisierung hatten große Ähnlichkeit mit den Phasen der Angiogenese *in vivo*. Folglich wäre der Schluss zu ziehen, dass die Anwendung elektromagnetischer Felder bei Frakturen einen Strom im defekten Knochengewebe erzeugt, der unter anderem zu einer gesteigerten Angiogenese führt und somit zu einer schnelleren Ossifikation beiträgt. Darüber hinaus reagieren auch andere Zellarten auf Magnetfelder. Dies zeigte Robinson [90] beispielsweise für Neuronen, Muskelzellen, Fibroblasten und Epithelzellen.

Eine der wegweisenden Untersuchungen über die Mechanismen, die der Wirkungsweise des magnetischen Feldes zugrunde liegen, wurde von Goodman [44] durchgeführt. Er zeigte einen generellen Anstieg der Transkriptionsrate der Zellen nach Magnetfeldexposition. Des Weiteren beobachtete er quantitative Unterschiede bezüglich der Proteinmenge magnetfeldexponierter Zellen im Vergleich zu nichtexponierten Zellen. Diese quantitativen Unterschiede korrelierten mit den quantitativen Unterschieden der RNA Transkription. Durch seine Studien kamen Goodman et al. [43] zu folgenden Schlussfolgerungen:

- 1) Direkte Transkriptionsveränderungen treten innerhalb von 4 min bei Zellen auf, die einem elektromagnetischen Signal gleich welcher Eigenschaft ausgesetzt sind.
- 2) Es wird eine Transkription angeregt, die bereits vor Exposition des elektromagnetischen Feldes aktiv war.
- 3) Zellen reagieren auf elektromagnetische Felder wie auf andere Umweltreize (z.B. Hitzeschock, Chemikalien).

Daraus folgerte man, dass elektromagnetische Felder die Transkription und somit die Proteinproduktion der Zellen beeinflussen.

Diese Ergebnisse konnten von vielen Wissenschaftlern bestätigt werden. So betrachteten Nagai and Ota [81] die Auswirkung eines elektromagnetischen Feldes auf die Bildung von Proteinen, die an der Knochenbildung beteiligt sind. Es stellte sich

heraus, dass das Magnetfeld die mRNA zur vermehrten Expression stimuliert und dies zu einer erhöhten Bildung der Proteine führt. Eine mögliche Ursache dafür entwickelten Cridland et al. [30], indem sie menschliche Fibroblasten in der G₀-Phase einem elektromagnetischen Feld aussetzten und die Zeit maßen, bis die Zellen in die S-Phase eintraten, die mit dem Beginn der DNA-Synthese gemessen wurde. Sie beobachteten einen kleinen aber signifikanten Anstieg in der Länge der Wachstumsphase G₁ allerdings nur bei sehr geringen Feldstärken. Folglich verharren die Zellen aufgrund der Magnetfeldexposition länger in der G₁-Phase, in der sie zelleigene Proteine bilden und die S-Phase vorbereiten. Dies wäre ein möglicher Grund für die gesteigerte mRNA-Synthese und die vermehrte Proteinproduktion, wobei der Angriffspunkt des elektromagnetischen Feldes nicht direkt an der DNA zu sehen ist, sondern in einer Verlängerung des Zellzyklus.

Nachdem allgemein eine quantitative Erhöhung der RNA festgestellt werden konnte, untersuchten Wu et al. [107], ob spezielle Sequenzen besonders auf elektromagnetische Felder ansprechen. Sie konnten beweisen, dass bei der Exposition von lymphatischen B-Zellen in einem 50 Hz Magnetfeld speziell die Genexpression der Glucosyltransferase gesteigert war, die wiederum eine Steigerung von Zellwachstum und -differenzierung zur Folge hat.

Beobachtungen, wobei nach einer Magnetfeldexposition bei *E. coli* vermehrt Steuerungs- und Regulatorproteine gebildet werden, bestätigen weiterhin die Annahme, dass elektromagnetische Felder über eine gesteigerte Transkription und Proteinbildung bestimmter Schlüsselproteine wirken [42]. Andere Versuche zeigten, dass Zellen nach einer Magnetfeldexposition vermehrt Kollagen Typ II-mRNA und somit auch Kollagen Typ II produzieren [29] bzw. TGF- β -mRNA und TGF- β überexprimieren [2], [3], [46]. Da TGF- β regulatorische Aufgaben wie die Suppression von Proenzymen von Stromelysin oder Kollagenasen, sowie eine Stimulation der Kollagensynthese zukommen, liegt die Vermutung nahe, dass über diesen Intermediärmechanismus das Magnetfeld die beobachtete Verzögerung von Osteoarthritis bewirkt [28].

Eine etwas genauere Untersuchung dieser Vorgänge unternahmen Zhou et al. [111]. Sie exponierten HL60 Zellen einem extrem niedrigen magnetischen Feld von 50 Hz

und bewiesen eine magnet- und zeitabhängige Bindung eines Transkriptionsfaktors (cyclic-AMP responsive element binding protein) an die DNA. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass die Bindung sowohl von extra- als auch von intrazellulärem Ca^{2+} abhängig ist, woraus zu schließen ist, dass die magnetfeldinduzierte Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA über einen Ca^{2+} -verbundenen Signaltransduktionsweg wirken muss. Die Veränderungen durch das Magnetfeld sind hier also direkt an der DNA zu suchen und nicht bei einer Verlängerung des Zellzyklus.

Ähnliche Beobachtungen bezüglich des Ca^{2+} Einflusses und des Transkriptionsanstiegs konnten auch Rodan et al. [91] machen. Sie stellten einen Anstieg der zellulären ^3H Thymidin Aufnahme bei Chondrocyten und somit eine gesteigerte Transkription nach Magnetfeldexposition fest. Nach einer Blockade der Na^+ - und Ca^{2+} -Kanäle war kein Effekt des Magnetfeldes mehr zu verzeichnen. Die gleichen Versuche mit Hautfibroblasten zeigten nicht diese Effekte. Dies veranlasste Rodan et al. [91] zu der Vermutung, dass der festgestellte Mechanismus gewebeabhängig sei, womit die verschiedenen Ergebnisse von unterschiedlichen Laboratorien bezüglich der Auswirkung von elektromagnetischem Feld zu erklären wären.

Die Bedeutung von Ca^{2+} bei der Wirkungsweise von elektromagnetischen Feldern auf Zellen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. So zeigten Lindström et al. [67], [68] einen Anstieg der cytosolischen Calciumkonzentration in T-Lymphozyten nach einer Exposition in einem sehr geringen elektromagnetischen Feld, der dem physiologischen Anstieg bei einer Antikörperstimulation dieser Zellen entspricht. Ebenfalls einen Anstieg des Ca^{2+} -Flusses in Abhängigkeit von der Feldstärke konnten Blackman et al. [19] beobachten. Allerdings konnten sie keine lineare Abhängigkeit feststellen, sondern lediglich gewisse Intervalle ausmachen, in denen ein erhöhter Ca^{2+} -Fluss zu verzeichnen war.

Eine generelle Verschiebung der Ionenverhältnisse als Wirkmechanismus wird angenommen. Diese Annahme gründet sich auf den gemeinsamen Wirkungsweg bei elektromagnetischen und mechanischen Einflüssen bezüglich der Knochenheilung. Hierbei ist bei beiden Einflüssen der Aufbau eines elektromagnetischen Feldes zu beobachten. Diese auf verschiedene Art und Weise zustande kommenden

elektromagnetischen Felder entsprechen sich bezüglich ihrer Wellencharakteristik. Sie bewirken eine Ionenverschiebung durch die Knochenkanälchen oder direkt durch die Zelloberfläche [85].

Diese Beobachtungen lassen auf Veränderungen an der Zellmembran, verursacht durch das elektromagnetische Feld, schließen. Solche strukturellen Veränderungen an der Zelloberfläche und bei Membrankomponenten konnten Marron et al. [74], [75] feststellen. Nach ihren Ergebnissen vermindert oder verändert das magnetische Feld die hydrophobe Eigenschaft der Zellmembran.

Neben diesen strukturellen Veränderungen an der Zellmembran wird auch die Hypothese aufgestellt, dass elektromagnetische Felder strukturelle Veränderungen an dem Zytoskelett bewirken. So beobachteten Iwasaka et al. [54], dass sich glatte Muskelzellen bei Exposition in einem hochintensiven Magnetfeld entlang der magnetischen Feldlinien ausrichten und begründeten dies damit, dass die Stärke des diamagnetischen Drehmomentes das Zytoskelett beeinflusst, welches wiederum durch Polymerisation bzw. Depolymerisation für die Dynamik der Zelle verantwortlich ist.

Als ein weiterer Wirkmechanismus wird die Beeinflussung von Enzymen durch das elektromagnetische Feld gesehen. So untersuchten unter anderem Litovitz et al. [70] menschliche Lymphomzellen und murine Myelomzellen auf eine Veränderung der Ornithincarboxylase nach Magnetfeldexposition. Sie stellten eine fünffach erhöhte Aktivität dieses Enzyms nach der Exposition für 1 h bei 60 Hz fest. Auch die ATP-spaltende Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ scheint von einem elektromagnetischen Feld beeinflussbar zu sein [20], [21]. Einen Anstieg des *second messengers* cAMP auf 120 % im Vergleich zur Kontrollgruppe in Mausfibroblastenzellen nach einer Magnetfeldexposition konnte von Schimmelpfeng und Dertinger [94] beobachtet werden. Bolognani et al. [22] stellten bei Magnetfeldexposition von *S. cerevisiae* Hefe eine gesteigerte ATP-Synthese fest.

Neben der Beeinflussung der Enzyme wird auch eine Anregung der Produktion von freien Radikalen postuliert. So vermuten Simko et al. [96] eine Aktivierung von Makrophagen durch das elektromagnetische Feld, die zur Phagozytose und somit letztendlich zu einem Anstieg der freien Radikale führt.

Die Vermutung liegt nahe, dass die verschiedenen, möglichen Wirkmechanismen des elektromagnetischen Feldes sich nicht nur positiv auf die Zellen auswirken. Bei einem Mechanismus, der die Zellproliferation beeinflusst, zur Bildung freier Radikale führt oder gezielt an der DNA wirkt, besteht potentiell immer die Gefahr einer Schädigung der DNA, was zu einer unkontrollierten Proliferation und somit zur Tumorentstehung führen kann. Diesbezüglich fanden viele verschiedene Studien statt, die keine eindeutige Aussage zulassen, aber eine gewisse Tendenz gegen einen Zusammenhang von elektromagnetischem Feld und Tumorentstehung erkennen lassen. So wurden humane, periphere Lymphozyten untersucht, die einem elektromagnetischen Feld ausgesetzt wurden. Es konnten weder Chromosomenbrüche noch ein Austausch von Chromosomen beobachtet werden [38], [92]. Heikkinen et al. [50] führten eine Studie durch, bei der sie weibliche Mäuse einem Magnetfeld mit einer Frequenz von 50 Hz für lange Zeiträume aussetzten. Sie konnten keine erhöhte Inzidenz von primären Neoplasmen und da speziell malignen Lymphomen feststellen. Tofani et al. [102] beschäftigten sich mit den Auswirkungen eines sehr schwachen elektromagnetischen Feldes auf zwei transformierte Zellreihen (*WiDr human colon adenocarcinoma*, *MFC-7 human breast adenocarcinoma*) und eine nichttransformierte Zellreihe (*MRC-5 embryonal lung fibroblast*). Bei beiden transformierten Zellreihen konnte *in vitro* bei Magnetfeldexposition eine erhöhte Apoptose beobachtet werden, wobei dies unabhängig von der Frequenz war. *In vivo* zeigte sich bei einer Transformation mit *WiDr*-Tumorzellen in Mäuse und anschließender Magnetfeldexposition für 70 min pro Tag über vier Wochen eine signifikante Verminderung des Tumorwachstums. Gegensätzlich zeigen aber auch einige Studien, dass ein schwacher Zusammenhang zwischen Magnetfeldexposition und der Entstehung von Neoplasmen besteht [87]. Dieser Zusammenhang ist folglich immer noch Gegenstand aktueller Forschung und lässt noch keine eindeutigen Rückschlüsse zu.

Im Gegensatz zu all den Auswirkungen, die elektromagnetischen Feldern zugewiesen werden, gibt es auch den Standpunkt, dass elektromagnetische Felder eine zu geringe Energie aufweisen, als dass sie über bekannte physikalische Mechanismen wie Hitze oder Elektrophorese Eingriff auf den Zellstoffwechsel nehmen könnten [100]. Ein weiteres Argument gegen eine Interaktion von elektromagnetischen Feldern auf Zellen

besteht darin, dass Zellen ein fünf- bis sechsmal höheres endogenes elektrisches Feld über ihre Membranen aufweisen, als es von einer Exposition im elektromagnetischen Feld erreicht wird [4]. Ebenfalls gegen einen Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf Zellen spricht, dass anderweitig erzeugte Energien, die in der Größenordnung der magnetfelderzeugten Energien entsprechen, die Zellen nicht beeinflussen [18].

So gehen die Meinungen der Wissenschaftler darüber auseinander, ob es überhaupt eine Auswirkung von elektromagnetischen Feldern auf Zellen und somit Organismen gibt. Geht man von einer Beeinflussung aus, stellt sich dann die Frage, ob die Auswirkungen als positiv oder negativ für die Zellen zu bewerten sind. Um zu eindeutigen Aussagen kommen zu können, ist die Erforschung des Wirkmechanismus evident. Mit diesen Erkenntnissen könnten dann kontrollierbare und sinnvolle Therapiemöglichkeiten entwickelt werden, um den positiven Einfluss von elektromagnetischen Feldern z.B. auf die Angiogenese nutzen zu können.

1.4 Angiogenese

Die Folgen, die z.B. durch Gefäßsklerosen oder -stenosen entstehen, sind oft fatal und meist mit einem irreversiblen Zellschaden verbunden. Gerade Organe wie das Gehirn oder das Herz, die keine Mehrfachversorgung oder Kollateralbildung haben, sondern durch Endarterien versorgt werden, sind bei einer Gefäßsklerose/-stenose besonders betroffen. Hier stehen als Folge Schlaganfall und Herzinfarkt an erster Stelle, wobei speziell ein Herzinfarkt in ca. 20 % einen tödlichen Ausgang haben kann. So starben in der Bundesrepublik Deutschland laut statistischem Bundesamt im Jahr 2004 84163 Menschen (10,3 % der Todesfälle) an einer chronisch ischämischen Herzkrankheit und 61736 Menschen (7,5 % der Todesfälle) an einem akuten Myokardinfarkt. Damit standen diese beiden Erkrankungen an erster bzw. zweiter Stelle der 10 häufigsten Todesursachen.

In der Vergangenheit gab es daher bereits vielfältige Bestrebungen, defekte Gefäße zu ersetzen, um somit eine bessere Perfusion bzw. eine Reperfusion des betroffenen Gewebes zu erzielen.

So wurde bereits 1935 versucht, Asbestpulver zunächst in das Perikard von Tieren und später auch von Menschen mit koronarer Herzkrankheit zu gießen, um neue Gefäße zu bilden [16]. Das Erschaffen eines Umgehungskreislaufes mit Hilfe eines Bypasses in Form einer Implantation der *A. thoracica interna* in das Myocard wurde 1946 erstmals durchgeführt und stellte damit die Weichen für die moderne Bypassoperationen [103]. Bei einer anderen Idee zur Erlangung einer besseren Perfusion bzw. Reperfusion des Herzens wurde versucht, eine Verbindung zwischen den Ventrikeln und den Koronargefäßen herzustellen, um diese besser an die Blutversorgung anschließen zu können [95]. Der Gedanke einer transmyokardialen Revaskularisierung mit einem CO₂-Laser vom Epicard aus wurde umgesetzt [78]. Im Tierversuch waren ein signifikanter Anstieg der Gefäßproliferation und eine Erhöhung der Blutflusskapazität unter Stress zu verzeichnen [110]. Eine Weiterentwicklung bestand in einer perkutanen transmyokardialen Revaskularisierung mit Ultraviolett- oder Infrarotbestrahlung [58]. Dabei wird eine Laserbehandlung mit Hilfe eines Katheters an dem Endocard durchgeführt. Die Resultate sind der ursprünglichen transmyokardialen Revaskularisierung vergleichbar, nur dass bei der weiterentwickelten Methode die Belastung einer offenen Thorakotomie entfällt. Für die beiden letzten Entwicklungen gibt es Hinweise, dass ein Zusammenhang zwischen der niedrig dosierten Laserbestrahlung und dem Wachstum von Endothelzellen besteht. Darüber hinaus induzierte niedrig dosierte Laserbestrahlung bei glatten Muskelzellen eine Erhöhung des Gefäßwachstumsfaktors VEGF (*Vascular Endothelial Growth Faktor*) und eine Erhöhung von VEGF und des Tumorstromwachstumsfaktors TGF-β (*Tumor Growth Faktor*) bei Cardiomyocyten [59]. Diese Erkenntnisse sind jedoch sehr umstritten und die Verfahren wegen ihrer Risiken obsolet.

Schon seit der Erforschung der Angiogenese bei der Tumorentstehung stand fest, dass Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese spielen [36], allerdings war die Frage, wie die Wachstumsfaktoren einzusetzen sind, um eine Angiogenese zu erreichen, und was für Kofaktoren eine Rolle spielen. So wurden erfolgreich Tierversuche in der Bildung von Kollateralen mit der Applikation von VEGF sowohl intraarteriell [53] als auch intramuskulär [98] und mit der Verabreichung von bFGF (*basic Fibroblast Growth Faktor*) intrapericardial [64] durchgeführt. Eine Weiterentwicklung der Ergebnisse bestand darin, einen Gentransfer von VEGF

durchzuführen. Dabei wurde im Tierversuch phVEGF₁₆₅ mit Hilfe eines Ballonkatheters direkt in die *A. iliaca* eingebracht. Eine Verbesserung der Hämodynamik aufgrund neu gebildeter Kapillaren konnte festgestellt werden [88], [99]. In den 90er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde versucht, diese Ergebnisse auf den Menschen zu übertragen [84]. Hierbei zeigte sich, dass durch die direkte Applikation von VEGF in das Myocard bei einer Versuchsgruppe von 20 Patienten nach einer dreijährigen Beobachtungszeit ein dichteres Kapillarnetz und ein Anstieg der linksventrikulären Auswurfraction im Vergleich zu der Kontrollgruppe (20 Patienten) bestanden. Die Forschungen laufen noch weiterhin mit dem Ziel, Gefäße bilden zu können, ohne den Patienten einer aufwendigen und belastenden Operation unterziehen zu müssen.

Dies wäre ein großer Fortschritt, denn dank der vielfältigen Diagnostikmöglichkeiten können in der heutigen Zeit atherosklerotisch veränderte Koronargefäße mit Stenosen häufig schon früh erkannt und die Entscheidung über eine geeignete Therapie kann getroffen werden. Neben einer Pharmakotherapie gibt es dann invasive Maßnahmen wie eine Stentimplantation, Ballondilatation oder Bypassoperation.

Gerade für Patienten mit einem erhöhten Risiko für eine invasive Maßnahme wäre eine alternative, weniger invasive Methode zur Erlangung einer besseren Perfusion bzw. Reperfusion des betroffenen Gewebes äußerst notwendig. Hierbei wäre die therapeutische Angiogenese ein hervorragendes Verfahren, denn neue Gefäße würden dort entstehen, wo für die klassischen Methoden kein Erfolg abzusehen wäre. Die therapeutische Angiogenese könnte eine Unterstützung der alleinigen medikamentösen Therapie bzw. eine sinnvolle Ergänzung eines nicht oder nur mäßig gelungenen invasiven Eingriffes darstellen.

So wurde auf den Grundlagen der proliferativen Wirkung von Magnetfeldern auf verschiedene Zelltypen die Idee entwickelt, dass durch den Einfluss von elektromagnetischen Feldern sowohl bei Endothelzellen als auch bei glatten Muskelzellen die Proliferation angeregt und/oder gesteigert werden könnte. Anhaltspunkte für eine derart induzierte Angiogenese konnten bereits früher im Rahmen der Osteogeneseforschung geliefert werden [24], [89], [108] (s.o.). Auf diese Art und Weise wäre ein neuer Ansatz für die therapeutische Angiogenese geschaffen.

Die im eigenen Labor durchgeführte *in vitro*-Studie [17], [61], [62] zum Einfluss elektromagnetischer Felder auf die Proliferation von Gefäßwandzellen belegte zumindest für glatte Gefäßmuskelzellen eine signifikante Steigerung der Zellproliferation bis zu 21 %.

Bei den Endothelzellen waren deutlich schwächere Effekte zu verzeichnen.

Daraus lässt sich schließen, dass elektromagnetische Felder offensichtlich geeignet sind, einen induzierten Proliferationsstatus *in vitro* zu verstärken. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Erkenntnisse aus den Proliferationsstudien auf molekularer Ebene anhand von Immunoblots (Westernblots) zu manifestieren und weiter zu vertiefen.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Chemikalien:

Zellkulturmedium für glatte Muskelzellen:

- § Dulbecco´s mod. Eagle-Medium (DMEM): 13,50 g/l versetzt mit
3,7 g/l NaHCO₃, pH 7,2
- § L-Glutamin; Biochrom KG
- § Antibiotic-antimycotic-solution für Zellkultur; Sigma
10000 U/ml Penicillin G
10 mg/ml Streptomycin Sulfat
25 µg/ml Amphotericin B
- § Newborn Calfserum; Biochrom KG

Physiologische Lösung zum Spülen:

- § HANKS: 9,68 g/l balanced salts without sodiumbicarbonate; ICN Biomedicals
75 g/l NaHCO₃, pH 7,2 - 7,3
- § Trypsin-EDTA; ICN Biomedicals, Inc.

Zellkulturmedium für Endothelzellen:

- § Endothelial Cell Basal Medium und SupplementPack; PromoCell:
 - 0,4 % Endothelial Cell Growth Supplement/Heparin (ECGS/H)
 - 2 % Fetal Calf Serum
 - 0,1 ng/ml Human Epidermal Growth Factor (hEGF)
 - 1 µg/ml Hydrocortison
 - 1 ng/ml Human Basic Fibroblast Growth Factor (hbFGF)
 - 50 ng/ml Amphotericin B
 - 50 µg/ml Gentamicin

Promocell Detach Kit:

- § HEPES Puffer; PromoCell
- § Trypsinlösung; PromoCell
- § Trypsin Neutralising Solution (TNS); PromoCell

Proteinlysepuffer (reduziert):

- 6,25 ml Tris-HCL (0,5 M, pH 6,8); AppliChem
- 1,5 g Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) reinst; AppliChem
- 0,27 g 1,4 Dithio-DL-threitol (DTT); AppliChem
- 2 ml Bromphenolblau (0,05 %); Sigma-Aldrich
- 5 ml Glycerin (100 %); AppliChem
- mit A. dest. auf 25 ml auffüllen

Materialien/Geräte:

- § Zellkulturflaschen: 75 cm²; Nunclon; Nunc Brand Products
- § Zellkulturschalen (Dishes): 35 × 10 mm, Falcon Tissue Culture Dish; Becton; Dickinson Labware
- § Zellschaber

- § Magnet: kreisförmige Helmholtzspulen (170 mm breit, 170 mm tief, 110 mm hoch) mit 2×112 Wicklungen aus Kupferdraht (ca. 46 m, 0,5 mm \varnothing), 3,1 Ω Widerstand in Magnetschaltung, 170 μT max. Feldstärke, Versuchsaufbau siehe H. Dertinger, W. Sontag, Institut für Medizintechnik und Biophysik (IMB), Karlsruhe
- § Zellkulturschrank: 37 °C, 5 % CO₂ Hera Cell; Heraeus
- § Zentrifuge: Megafuge 1.0R; Heraeus
- § Zellzähler: Casy 1; Schärfe System
- § Ultraschall: 50 Hz; Bioblock Scientific Vibracell 72434

2.1.1 Bovine Coronary Smooth Muscle Cells

Zelltyp: Bovine Coronary Smooth Muscle Cell (bov cSMC); Durch Explantmethode herangezogen und durch α -Aktinfärbung bestätigt.

Subkultivierung der Zellen

Die Anzüchtung der glatten Muskelzellen erfolgte in Nährmedium bestehend aus 440 ml DMEM, 5 ml Antibiotikum, 5 ml Glutamin und 50 ml Kälberserum. Für die Subkultivierung wurden jeweils 500.000 Zellen pro Zellkulturflasche in insgesamt 12 ml Nährmedium (37 °C) ausgesät. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Zellkulturschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Sobald die Zellen konfluent waren (ca. 6 – 7 Tage), erfolgte die Subkultivierung (Passage der Zellen). Dazu wurde das Nährmedium abgesaugt, die adhärenen Zellen mit 7 ml HANKS (37 °C) gespült, um Zelldetritus und Mediumreste zu entfernen, und die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Flasche abgelöst. 2,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung wurden dazu gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt und für ca. 3 min bei 37 °C inkubiert. Durch Klopfen konnten die Zellen vom Boden gelöst werden. Die Enzymreaktion wurde dann zügig durch die Zugabe von 7,5 ml Nährmedium abgestoppt, bevor es zu einer durch das Trypsin verursachten dauerhaften Schädigung der Zellen kommen konnte. Die so erhaltenen 10 ml Zellsuspension wurden mit weiteren 10 ml Nährmedium versetzt, um

eine für die Zellzählung geeignete Zelldichte zu erzielen. Mit einem Casy 1-Zellzählgerät wurde die Zellzahl/ml Zellsuspension bestimmt. Im Anschluss erfolgte die Aussaat zur Subkultivierung in Zellkulturflaschen oder eine Aussaat in 35 × 10mm Dishes für eine Exposition der Zellen im Magnetfeld.

Aussaaten für Zellzählexperiment

Hierfür erfolgte eine Aussaat von je 25.000 Zellen in 35 × 10 mm Dishes mit 2 ml Nährmedium. Die Dishes wurden in einem Zellkulturschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h vorinkubiert und anschließend einem Magnetfeld exponiert.

Aussaaten für molekulare Experimentalserien

A. Versuche mit proliferierenden bov cSMC

Hierfür erfolgte eine Aussaat von je 80.000 Zellen für die Proben, die 24 h nach Magnetfeldexposition aufgearbeitet wurden und eine Aussaat von je 40.000 Zellen für die Proben, die 48 h nach Magnetfeldexposition aufgearbeitet wurden. Dadurch befanden sich zum Zeitpunkt der Aufbereitung annähernd gleich viele Zellen in allen Zellkulturschalen (200.000 Zellen/Dish), so dass die Ergebnisse aus den anschließenden Westernblot-Analysen miteinander zu vergleichen waren. Die Aussaat erfolgte in 35 × 10 mm Dishes mit 2 ml Nährmedium. Die Dishes wurden in einem Zellkulturschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für 24 h vorinkubiert, um ein Anwachsen der adhärennten Zellen zu gewährleisten. Anschließend erfolgte die Exposition im Magnetfeld.

B. Versuche mit ruhenden bov cSMC

Dazu wurden für alle Proben je 60.000 Zellen in 35 × 10mm Dishes mit 2 ml Nährmedium ausgesät und zunächst für 24 h in einem Wärmeschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ vorinkubiert. Das serumhaltige Normalmedium wurde anschließend gegen

serumfreies Medium ausgetauscht, um die Proliferation der Zellen zu stoppen. Eine Exposition im Magnetfeld erfolgte 48 h nach dem Mediumwechsel. Zu diesem Zeitpunkt war gewährleistet, dass sich alle Zellen im ruhenden Status befanden.

Exposition im Magnetfeld

Mit zwei Luftspulen nach Helmholtz wurde ein homogenes elektrisches Magnetfeld von 35 μT erzeugt. Der nutzbare Abstand zwischen den inneren Platten der Spulenträger für die Dishes betrug ca. 52 mm. Um parallel unter den gleichen Voraussetzungen Kontrollversuche durchführen zu können, wurde der Innenraum zweier weiterer Spulen mit einem Eisenmantel ausgekleidet, der den Raum innerhalb des Eisenmantels nahezu vollständig vom erzeugten Magnetfeld abschirmte (Faraday'scher Käfig, Restfeldstärke: max. 3 μT). Ansonsten war der Versuchsaufbau identisch. Die beiden Elektromagnete wurden in einen Wärmeschrank mit 37 °C und 5 % CO₂ gestellt, so dass die Zellen auch während der Magnetfeldexposition üblichen Zellkulturbedingungen ausgesetzt blieben. Magnetfeld- und Kontrollexpositionen wurden grundsätzlich parallel durchgeführt, um sicher zu stellen, dass die Zellen abgesehen vom Magnetfeldeinfluss gleichen Parametern ausgesetzt waren.

In Anlehnung an die im eigenen Labor zuvor durchgeführten Proliferationsstudien [17], [61], [62] wurden zunächst typische Zellzählungen bei konstanter Feldfrequenz mit variablen Expositionszeiten durchgeführt. Anschließend folgten drei verschiedene Experimentalserien, einmal basierend auf einer Variation der Expositionszeit, einmal basierend auf einer Variation der Feldfrequenz und einmal basierend auf der Anzahl der Expositionen, für die Untersuchungen auf molekularer Ebene.

Zellzählexperiment:

Die proliferierenden Zellen wurden hierbei einem Magnetfeld von konstant 50 Hz für verschiedene Zeiträume (5 min, 15 min, 30 min) ausgesetzt. Eine Zellzählung erfolgte 24 h bzw. 48 h nach der Aussaat.

Experimentalserie 1:

Einfluss des Magnetfeldes in Abhängigkeit von der Magnetfeldfrequenz.

Dazu wurden die Zellen entweder einer Magnetfeldfrequenz von 25 Hz, 50 Hz oder 100 Hz ausgesetzt. Der Expositionszeitraum betrug konstant 15 min.

Experimentalserie 2:

Einfluss des Magnetfeldes in Abhängigkeit von der Expositionszeit.

Hierbei wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiträume von 5 min, 15 min oder 30 min dem Magnetfeld ausgesetzt. Die verwendete Magnetfeldfrequenz betrug konstant 50 Hz.

Bei den ruhenden Zellen beschränkten sich die Versuche auf die Variation der Feldfrequenzen bei konstant 15 min Expositionszeit.

Sowohl bei proliferierenden als auch bei ruhenden Zellen erfolgte die Aufarbeitung der Zellen 24 h und 48 h im Anschluss an die Magnetfeldexposition. In einer dritten Serie wurde die Anzahl der Magnetfeldexpositionen variiert.

Experimentalserie 3:

Einfluss des Magnetfeldes in Abhängigkeit von der Anzahl der Expositionen.

Dafür wurden proliferierende Zellen (Aussaat von je 40.000 Zellen/Dish) im Abstand von 24 h zweimal für jeweils 15 min einem Magnetfeld von 50 Hz ausgesetzt. Als zeitgleich mitgeführte Kontrollen dienten einerseits Zellen, die nur einmal dem Magnetfeld ausgesetzt wurden, und Zellen, die nur den Kontrollbedingungen unterlagen. Alle Zellen wurden 72 h nach Aussaat aufgearbeitet.

Zellzählung

Dazu wurde das Nährmedium abgesaugt, die adhärennten Zellen mit 2 ml HANKS (37 °C) gespült und die Zellen mit 500µl Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden abgelöst, indem die Trypsin-EDTA-Lösung gleichmäßig auf dem Zellrasen verteilt und für ca. 3 min bei 37 °C inkubiert wurde. Nachdem die Zellen durch leichtes Schütteln vom Boden abgelöst werden konnten, wurde die Enzymreaktion mit 2 ml Nährmedium zum Stoppen gebracht. Anschließend wurde mit einem Casy 1-Zellzählgerät die Zellzahl/ml Zellsuspension bestimmt.

Aufarbeitung der Zellen für anschließende Proteinanalyse

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit 2 ml HANKS (37 °C) gespült, um Reste des Mediums und Zelldetritus zu entfernen. 50 µl des vortemperierten Proteinlysepuffers (65 °C) wurden auf den Zellrasen gegeben und die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers abgeerntet. Das viskose Zellhomogenat wurde einer Ultraschallbehandlung bei 50 Watt für dreimal 10 s unterzogen und anschließend bis zur Verwendung für den Westernblot bei -20 °C eingefroren.

2.1.2 Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Zelltyp: Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUVEC); PromoCell

Subkultivierung der Zellen

Nach dem Zusammenfügen von *Endothelial Cell Basal Medium* und dem *SupplementPack* wurden in diesem Medium (37 °C) 500.000 Zellen/Zellkulturflasche ausgesät. Die Anzüchtung der HUVEC erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen im Zellkulturschrank bei 37 °C und 5 % CO₂. Laut Anweisung der Firma Promocell wurde 24 h nach Aussaat ein Mediumwechsel durchgeführt. Eine Passage der Zellen erfolgte im subkonfluenten Zustand. Dazu wurde mit 2 ml HEPES Puffer (37 °C) gespült, um

Zelldetritus und Mediumreste zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin-EDTA (37 °C) für 3 min bei 37 °C inkubiert, so dass die Zellen durch Klopfen von dem Flaschenboden abzulösen waren. Die Lysereaktion wurde dann mit 2 ml TNS (37 °C) abgestoppt. Diese Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 4 min bei 220 g (1000 Umdrehungen/min) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet in 4 ml Medium resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des *Casy 1*-Zellcounters. Dann konnte eine erneute Aussaat in 75 cm² Zellkulturflaschen oder in 35 × 10mm Dishes stattfinden.

Für die Experimente erfolgte eine Aussaat von 50.000 Zellen/Dish in insgesamt 2 ml Nährmedium. Auch hier wurde zunächst nach 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt, bevor dann die Exposition im Magnetfeld stattfand. Bei den Versuchen mit HUVEC wurde ausschließlich mit proliferierenden Zellen gearbeitet.

Exposition im Magnetfeld

Die Exposition im Magnetfeld erfolgte nur in Abhängigkeit von der Frequenz (25 Hz, 50 Hz bzw. 100 Hz), die Expositionsdauer betrug konstant 15 min. Magnetfeld- und Kontrollexpositionen wurden wie schon bei den glatten Muskelzellen stets parallel durchgeführt. Die Aufarbeitung erfolgte 24 h bzw. 48 h nach Magnetfeldexposition.

Aufarbeitung der Zellen für anschließende Proteinanalyse

Das Medium wurde zunächst abgesaugt und der Zellrasen mit 2 ml HANKS (37 °C) gespült. 50 µl des Proteinlysepuffers (65 °C) wurden auf dem Zellrasen gleichmäßig verteilt und die Zellen mit einem Zellschaber vollständig vom Boden abgelöst. Das zähe Zellhomogenat wurde dann für dreimal 10 s einer Ultraschallbehandlung bei 50 Watt unterzogen und bis zur Verwendung für den Westernblot bei -20 °C eingefroren.

2.2 Westernblot

Chemikalien:

- § 30 % Acrylamid/Bisacrylamid; AppliChem
- § Lösung A:
 - 36,3 g Tris (1,5 M), reinst; AppliChem
 - 0,8 g Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), reinst; AppliChem
 - in 150 ml A. dest. lösen, mit halbkonzentrierter HCL, pH 8,8 einstellen, mit A. dest. auf 200 ml auffüllen
- § Lösung B:
 - 6,06 g Tris (0,5 M), reinst; AppliChem
 - 0,8 g SDS, reinst; AppliChem
 - in 70 ml A. dest. lösen, mit halbkonzentrierter HCL, pH 6,8 einstellen, mit A. dest. auf 200 ml auffüllen
- § Tetramethylethylenediamin (TEMED); AppliChem
- § 10 % Ammoniumpersulfat (APS): Ammoniumperoxodisulfat; Merck
 - 0,1 g ad 1 ml A. dest.
- § Isopropanol, reinst; AppliChem
- § SDS-Laufpuffer (10 x konzentriert):
 - 60 g Tris (25 mM, pH 8,8); AppliChem
 - 288,27 g Glycin (192 mM) reinst; AppliChem
 - 20 g SDS (0,1 %), reinst; AppliChem
 - mit A. dest. auf 2000 ml auffüllen
- § Heigh Molecular Weight Standard (HMW): 205 kDa, 116 kDa, 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 29 kDa Banden; Sigma

- § Low Molecular Weight Standard (LMW): 66 kDa, 45 kDa, 36 kDa, 29 kDa, 24 kDa, 20 kDa, 14 kDa Banden; Sigma
- § Proteinlysepuffer: s.o.
- § Anodenpuffer I (für 1l):
20 % techn. Methanol; AppliChem
36,34 g Tris, reinst; AppliChem
- § Anodenpuffer II (für 1l):
20 % techn. Methanol; AppliChem
3,02 g Tris, reinst; AppliChem
- § Kathodenpuffer (für 1l):
20 % techn. Methanol; AppliChem
5,24 g 6-Aminohexansäure (ϵ -Aminocarbonsäure, $C_3H_{13}NO_2$);
AppliChem
- § Färbebad:
400 ml techn. Methanol; AppliChem
105 ml Eisessig (CH_3COOH); AppliChem
1 g Coomassie® Brillantblau R-250 (Cylenbrillantcyanin); AppliChem
- § Entfärbebad:
50 ml techn. Methanol; AppliChem
105 ml Eisessig (CH_3COOH); AppliChem
- § Ponceau S (5 %) (3 Hydroxy 4 [2-sulfo-4-(4-sulfo-phenylazo)-phenylazo]-2,7 naphthalene disulfonic acid):
2,5 g Ponceau S; AppliChem
25 g Trichloressigsäure (5 %); AppliChem
in A. dest. lösen und auf 500 ml auffüllen

- § Primärantikörper:
 - § Monoclonal Mouse Anti- α Smooth Muscle Actin: Clone 1A4, Product No. A2547; Sigma
 - § Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA): Catalog No. MAB424; Chemicon
 - § Monoclonal Mouse Anti-Calponin: Clone hCP, Product No. C2687; Sigma
- § Sekundärantikörper:
 - § Anti Mouse IgG: Sigma

- § ECL Plus Western Blotting Detektionsreagenz (Lumineszenzreagenz, Solution A+B); Amersham Biosciences

- § Lactalbumin; Sigma

- § Phosphate Buffered Saline (PBS-Puffer) mit KCl, KH_2PO_4 , NaCl, Na_2HPO_4 ohne Ca^{2+} , Mg^{2+} : 9,55 mg PBS auf 1 l A. dest.; AppliChem

Materialien/Geräte:

- § Gel Electrophoresis Units, SE 600 Series; Hoefer Pharmacia Biotech Inc.
- § Fastblot B33, 16 x 20cm, with cooling; Biometra
- § Geltrockner: Model 583; BioRad
- § Chromatographie-Papier: 3 mm; Whatman
- § Nitrocellulose: Protran BA83, 300 x 3000mm, Porengröße 0,2 μm ; Schleicher und Schuell
- § Hyperfilm; Amersham Biosciences

Durchführung:

Gießen der SDS-Gele

Nach der fett- und staubfreien Reinigung zweier Glasplatten und zweier *Spacer* mit 70 %igem Alkohol (Ethanol) wurden diese zu einem „Glasplattensandwich“ zusammengesetzt und im Gießstand verankert.

Unter dem Abzug wurde zunächst ein 10 %iges Trenngel mit folgender Zusammensetzung gegossen:

- § 12,9 ml A. dest.
- § 8,0 ml Lösung A
- § 10,6 ml Acrylamid
- § 20 µl TEMED

- § 180 µl APS.

Das APS initiierte den Polymerisationsvorgang, so dass es stets als letzte Substanz hinzugefügt werden musste. Abschließend wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um ein Austrocknen während der Polymerisation zu verhindern. Die Polymerisationszeit betrug 20 – 30 min. Danach wurde das Isopropanol abgekippt, das Gel mehrmals mit A. dest. gespült und die restliche Flüssigkeit zwischen den Glasplatten mit Chromatographie-Papier aufgenommen. Der Kamm, der die Probenaschen im Gel bildet, wurde dann zwischen die Platten gesetzt. Mit einem 4 %igen Sammelgel, bestehend aus den folgenden Substanzen:

- § 6,0 ml A. dest.
- § 2,5 ml Lösung B
- § 1,5 ml Acrylamid
- § 12,5 µl TEMED

- § 30 µl APS,

wurde das Trenngel bis an den oberen Rand der Glasplatten überschichtet. Am Ende der Polymerisationszeit von 20 – 30 min wurde der Kamm entfernt und das Gel mit dem Standardmix und den Proben beladen.

Vorbehandlung der Proteine und Standards

Je 15 µl der Standards *HMW* und *LMW* wurden zusammenpipettiert und mit 30 µl Proteinlysepuffer versetzt. Zusammen mit den Proben wurde der Standardmix für 7 min im Wasserbad aufgekocht, um eine irreversible Denaturierung der Proteine zu erzielen. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Taschen des Gels mit Standardmix und Proben beladen.

Probenbeladung und Gellauf

Zunächst wurde das fertige Acrylamidgel im Glasplattensandwich in die Gelkammer mit angeschlossenen Kühlsystem (4 °C) eingebaut. Die Kammer wurde mit insgesamt 2000 ml 1 × SDS-Laufpuffer gefüllt. Davon wurden 1400 ml in den unteren Teil der Kammer und 600 ml in den oberen Teil der Kammer eingefüllt.

Die Taschen des Gels wurden dann mit den vorbehandelten Standards und Proben beladen. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 120 Volt für etwa vier Stunden. Unmittelbar danach wurde die Gelkammer

auseinandergelöst, das Sammelgel abgetrennt und verworfen und der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran, dem eigentlichen Blot, vorbereitet.

Semidry Blotting

Bei dem angewandten Verfahren zur Überführung der Proteinbanden vom Gel auf die Nitrocellulosemembran handelte es sich um ein „*semidry blotting*“. Dazu wurde zunächst das Gel für 5 min in Kathodenpuffer und ein 13 x 15 cm großes Stück Nitrocellulosemembran für 5 min in Anodenpuffer II vorinkubiert. Von insgesamt 26 Stücken Chromatographie-Papier mit einer Größe von jeweils 13 x 15 cm wurden neun im Anodenpuffer I getränkt und auf die Blotkammer gelegt. Anschließend wurden vier Stücke in Anodenpuffer II getränkt und auf die vorherigen neun Stücke gelegt. Dann folgten zuerst die Nitrocellulosemembran und dann das Gel, bevor die Schichtung mit 13 Stücken in Kathodenpuffer getränkten Chromatographie-Papiers abgeschlossen wurde. Bei dem ganzen Vorgang war auf luftblasenfreies Arbeiten zu achten. Die Kammer wurde verschlossen und mit 1 kg Gewicht beschwert. Die Laufzeit des Blots betrug 1 h bei 180 mA und 4 °C.

Nach dem Blotten wurde das Gel im Färbebad für 30-45 min gefärbt und anschließend im Entfärbebad differenziert. Abschließend wurde das Gel viermal mit Wasser gespült und auf Chromatographie-Papier bei 80 °C für 2 h unter Vakuum getrocknet. Auf diese Weise wurde der erfolgreiche Übertrag der Proteinbanden auf die Nitrocellulosemembran überprüft. Da sehr große Proteine (>200 kDa) bei der angegebenen Blotdauer nur sehr gering übertragen wurden, konnte zusätzlich der gleichmäßige Proteinauftrag anhand des gefärbten Gels belegt werden.

Die Nitrocellulose wurde mit Ponceau S angefärbt, um die Banden des Standardmixes markieren und den erfolgreichen Blotvorgang überprüfen zu können. Mit einem Kugelschreiber wurden die 29, 36, 45 und 66 kDa großen Standardbanden gekennzeichnet, um das Zuschneiden der Nitrocellulosemembran zu erleichtern und auch später die Größe der immunologisch nachgewiesenen Proteine bestimmen zu können.

Aufgrund der Größe der zu untersuchenden Proteine (α -Actin 42 kDa, PCNA 36 kDa, Calponin 34 kDa), wurde die Nitrocellulosemembran so zurechtgeschnitten, dass ein Blot immer für zwei Nachweise genutzt werden konnte. Mit drei Schnitten in Höhe der 29 und 66 kDa Bande sowie mittig zwischen der 36 und 42 kDa Bande konnten zwei schmale Blotstreifen abgetrennt werden. Der obere (39-66 kDa) wurde für den α -Actin-Nachweis, der untere (29-39 kDa) für den PCNA- oder Calponin-Nachweis weiterbehandelt.

Immunologischer Nachweis der Proteine:

1. Abblocken der unspezifischen Bindungsstellen
mit Lactalbumin (5 %ig in PBS) für 1 h bei Raumtemperatur auf einem
Rundschüttler
2. Waschen der Nitrocellulose-Membran mit PBS für 2 x 2 min
3. Zugabe des primären Antikörpers (Verdünnung mit PBS)
 - § α -Actin 1:4.000
 - § PCNA 1:1.000
 - § Calponin 1:10.000Inkubation über Nacht bei 4 °C auf einem Rundschüttler
4. Waschen der Nitrocellulose-Membran mit PBS
 - § 2 x kurz
 - § 3 x 5 min
5. Zugabe des sekundären Antikörpers (Verdünnung mit PBS)
 - Anti IgG Mouse 1:10.000Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur auf einem Rundschüttler
6. Waschen der Nitrocellulosemembran mit PBS
 - § 2 x kurz
 - § 3 x 5 min

7. Zugabe des ECL Plus Western Blotting Detektionsreagenzes (Lumineszenzfarbstoff)

- § Lösung A und B (auf Raumtemperatur erwärmt) im Verhältnis 40:1 mischen
- § 0,1 ml Detektionsreagenz pro cm² Nitrocellulosemembran
- § Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur

8. Entwicklung

- § Reagenz ablaufen und Blotstreifen auf Fließpapier abtropfen lassen
- § Blotstreifen in Folie verschweißen und bis zur Belichtung des Filmmaterials zum Schutz des Lumineszenzfarbstoffes dunkel aufbewahren (Filmkassette)
- § Belichtungszeiten des verwendeten Röntgenfilms zwischen 30 s bis zu 2,5 min

Die belichteten und entwickelten Röntgenfilme wurden mit einem Flachbettscanner mit Durchlichtfunktion eingescannt (*HP Precisionscan Pro 3.1*) und mit Hilfe von *Microsoft Picture It! Foto 7.0* und *Powerpoint 2000 SR-1* zu den im Ergebnisteil dargestellten Abbildungen zusammengefügt.

3 Ergebnisse

3.1 Proliferationsstudie

Hierfür wurden die bov cSMC einer als sich bereits besonders effektiv erwiesene Magnetfeldfrequenz von 50 Hz für verschiedene Zeiträume (5 min, 15 min, 30 min) ausgesetzt und die Zellzahl nach 24 h bzw. 48 h bestimmt. Die Ergebnisse der Zellzählungen sind in **Abb. 1** aufgeführt.

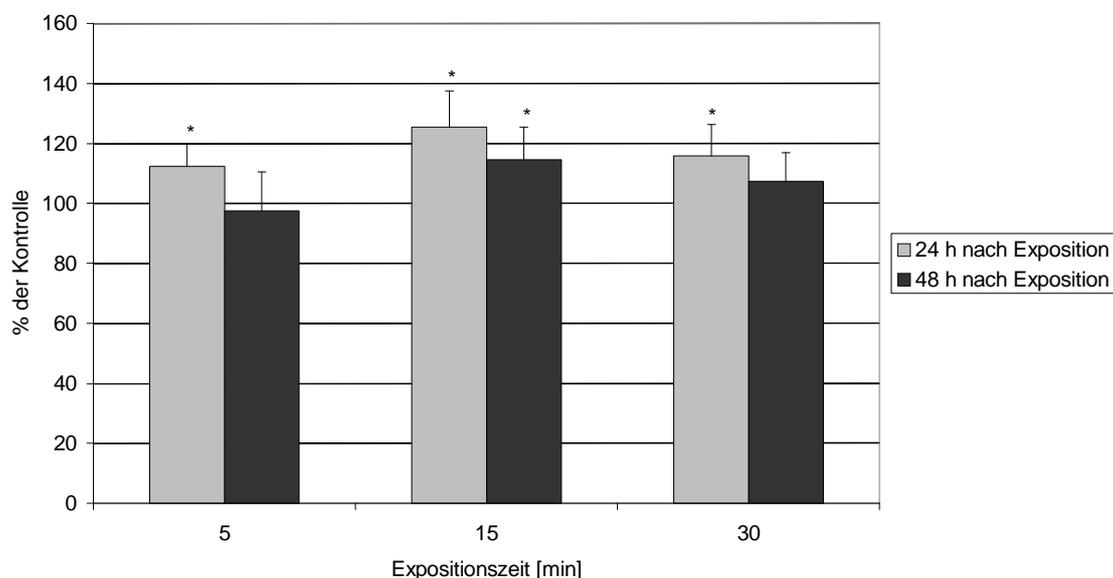


Abb. 1: Proliferationsexperiment mit bov cSMC nach Magnetfeldexposition (Feldfrequenz 50 Hz) für 5 min, 15 min und 30 min, Zellzählung 24 h bzw. 48 h im Anschluss an die Magnetfeldexposition. Darstellung der prozentualen Mittelwerte (n=6) mit Standardabweichung, * = Wert signifikant verschieden vom Kontrollwert (= 100%), p<0,05

Da die absoluten Zellzahlen von Passage zu Passage schwanken können, wurden alle Ergebnisse auf die parallel mitgeführten Kontrollen normiert und als Prozentwerte dargestellt. Die Kontrollen wurden jeweils 100 % gleich gesetzt.

Die zugehörigen prozentualen Mittelwerte (MW), deren Standardabweichung (Stabw) und die Ergebnisse des T-Testes nach Student sind in **Tab. 1A** und **Tab. 1B** dargestellt. Eine Auflistung der nicht normierten Rohdaten aller Zellzählungen befindet sich im Anhang (**Tab. 2, Tab. 3**).

Tab. 1: Zusammenfassende Darstellung der prozentualen Mittelwerte einschließlich Standardabweichung und T-Test mit Signifikanzniveau p aus den Proliferationsexperimenten.
A) 24 h und B) 48 h im Anschluss an die Magnetfeldexposition

A)

	5 min	15 min	30 min
MW (in %)	112,3	125,4	115,8
Stabw	7,42	11,99	10,41
T-Test (p)	0,049	0,019	0,019

B)

	5 min	15 min	30 min
MW (in %)	97,5	114,6	107,3
Stabw	13,02	10,86	9,61
T-Test (p)	0,776	0,026	0,267

Wie aus **Abb. 1** und **Tab. 1A+B** zu erkennen ist, zeigte sich bei der Zellzählung 24 h nach Magnetfeldexposition bei allen drei Expositionszeiträumen eine signifikante Erhöhung der Zellzahl der exponierten Zellen im Vergleich zu den Kontrollgruppen (5 min: +12,3 %, 15 min: +28,4 %, 30 min: +15,8 %). Bei den Zählungen 48 h nach Exposition führte allein die 15-minütige Exposition zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl (+14,8 %).

Zusammenfassend ist somit festzuhalten, dass bei einer Magnetfeldfrequenz von 50 Hz eine Expositionsdauer von 15 min die Zellproliferation der bov cSMCs am stärksten beeinflusste. Die maximal erreichte Steigerung betrug dabei 25,4 %.

Basierend auf den Erkenntnissen der Proliferationsstudie beschäftigt sich die vorliegende Arbeit im Folgenden mit einer genaueren Untersuchung der Zusammenhänge von Zellproliferation und elektromagnetischem Feld auf molekularer Ebene. Mit Hilfe von Immunoblots (Westernblots) wurde dabei die Expression folgender drei Proteine analysiert: α -Actin, Calponin und PCNA.

α -Actin als ein Hauptbestandteil des kontraktiven Apparates und **Calponin** als assoziiertes Regulatorprotein sind typische Bestandteile glatter Muskelzellen und wurden als Phänotypmarker herangezogen. [71]

PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) ist eine Untereinheit der DNA-Polymerase δ . Darüber hinaus beeinflusst PCNA auch die DNA-Polymerase α . Beide Polymerasen spielen bei der Replikation der DNA eine entscheidende Rolle. PCNA wird als Proliferationsmarker eingesetzt. [71]

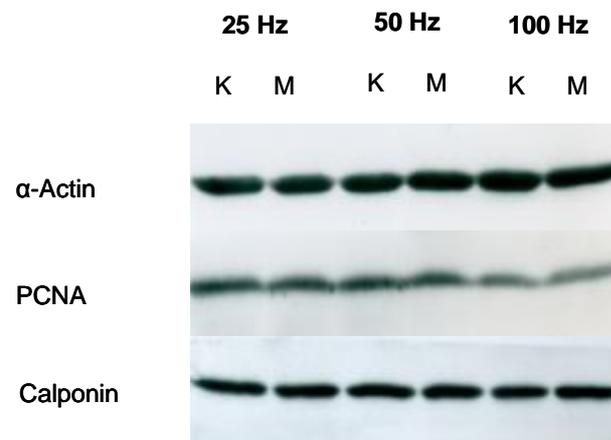
3.1 Einfluss der Feldfrequenz

In einer ersten Experimentalserie wurde der Einfluss eines elektromagnetischen Feldes auf die Zellproliferation von glatten Muskelzellen und Endothelzellen in Abhängigkeit von der Feldfrequenz (25 Hz, 50 Hz, 100 Hz, Expositionszeit konstant 15 min) untersucht. Dabei befanden sich die glatten Muskelzellen in verschiedenen Phasen des Zellzyklus (proliferierend oder ruhend).

3.1.1 Proliferierende glatte Muskelzellen

Die Resultate bezüglich des Magnetfeldeinflusses auf proliferierende bov cSMC in Abhängigkeit von der Magnetfeldfrequenz sind in **Abb. 2** dargestellt. Dabei zeigt **Abb. 2A** die Ergebnisse der Proteinaufarbeitung 24 h nach Magnetfeldexposition und **Abb. 2B** die Ergebnisse der Aufarbeitung 48 h nach der Exposition im elektromagnetischen Feld.

A)



B)

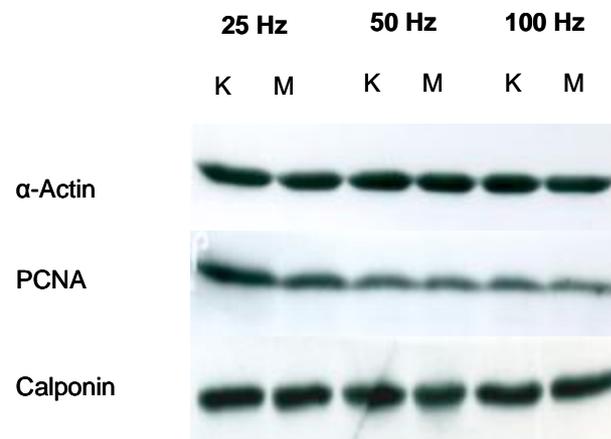


Abb. 2: Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von α -Actin, PCNA und Calponin in proliferierenden glatten Muskelzellen in Abhängigkeit von der Feldfrequenz
Expositionsdauer 15 min, K: Kontrollexposition, M: Magnetfeldexposition, A) Aufarbeitung nach 24 h, B) Aufarbeitung nach 48 h

Die Zellen wurden bei den Feldfrequenzen 25 Hz, 50 Hz bzw. 100 Hz für jeweils konstant 15 min dem Magnetfeld exponiert. Sowohl bei der Aufarbeitung 24 h als auch 48 h nach der Magnetfeldexposition stellten sich die korrespondierenden Banden der einzelnen Proteine als annähernd homogen dar.

Im Vergleich untereinander zeigte α -Actin als Hauptbestandteil des kontraktilen Apparates bei glatten Muskelzellen in beiden Teilversuchen **A** und **B** die stärkste

Bande. PCNA als Proliferationsmarker zeigte im direkten Vergleich zu den beiden kontraktilen Proteinen die schwächste Bandenintensität. Dennoch konnte eine deutliche Proliferationsaktivität der Zellen im Westernblot belegt werden. Hinsichtlich der verschiedenen Magnetfeldfrequenzen waren bei keinem der drei Proteine Unterschiede zwischen den jeweiligen Kontroll- und Expositionsgruppen festzustellen.

Auch die Gegenüberstellung der verschiedenen Aufarbeitungszeiträume von 24 h und 48 h nach Exposition ließ keine Unterschiede in Bezug auf die Intensität der Banden erkennen.

3.1.2 Ruhende glatte Muskelzellen

Die Experimentalserie 1 wurde ebenso mit in der Ruhephase arretierten bov cSMC durchgeführt, um die Auswirkung elektromagnetischer Felder auf die Proliferation in einer anderen Phase des Zellzyklus zu untersuchen. **Abb. 3** zeigt die Ergebnisse, wobei in **A** die Proteinaufarbeitung 24 h nach Magnetfeldexposition und in **B** die Aufarbeitung 48 h nach der Exposition dargestellt ist.

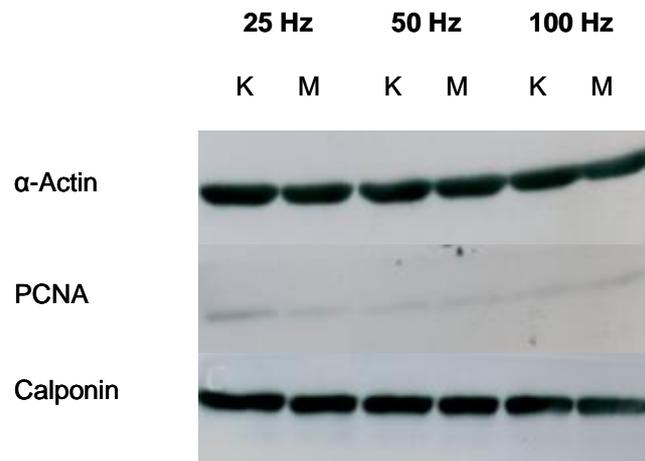
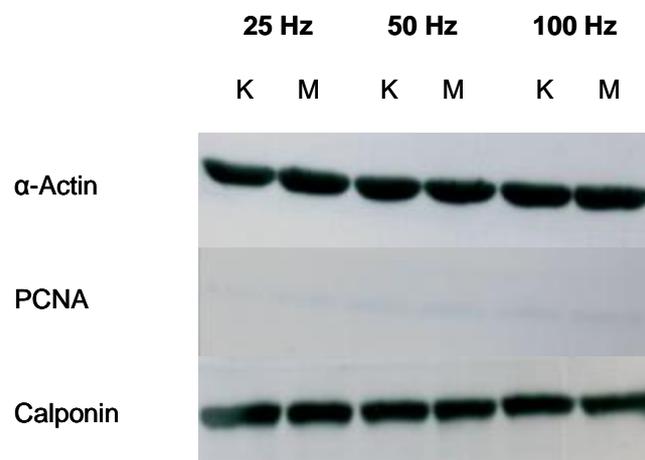
A)**B)**

Abb. 3: Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von α -Actin, PCNA und Calponin in ruhenden glatten Muskelzellen in Abhängigkeit von der Feldfrequenz
Expositionsdauer 15 min, K: Kontrollexposition, M: Magnetfeldexposition, A) Aufarbeitung nach 24 h, B) Aufarbeitung nach 48 h

In beiden Versuchsansätzen (**A** und **B**) erschienen die Banden von α -Actin und Calponin durchweg gleich bleibend stark. Es waren weder Differenzen bezüglich der Intensität der Banden zwischen Kontroll- und Expositionsgruppen zu verzeichnen, noch ergaben sich Unterschiede im unmittelbaren Vergleich der verschiedenen Aufarbeitungszeiträume im Anschluss an die Kontroll- oder Magnetfeldexposition.

Die Banden des Proliferationsmarkers PCNA fehlten nahezu oder stellten sich sowohl in der Kontroll- als auch in der Expositionsgruppe nur sehr schwach dar. Die Zellen befanden sich folglich auch nach der Magnetfeldexposition nach wie vor in der ruhenden Phase und ließen sich unabhängig von der Feldfrequenz nicht zum Wiedereintritt in den Zellzyklus stimulieren. Auch der mit 24 h und 48 h unterschiedlich lang gewählte Inkubationszeitraum im Anschluss an die Magnetfeldexposition führte nicht zu voneinander abweichenden Ergebnissen, womit ein verzögerter Wiedereintritt der ruhenden Zellen in die Zellproliferation nach der Magnetfeldexposition ausgeschlossen werden konnte.

3.1.3 Endothelzellen

Die Experimentalserie 1 wurde abschließend mit humanen Endothelzellen wiederholt. Da Endothelzellen nur in begrenzter Menge für die Experimente zur Verfügung standen, fand aufgrund der Ergebnisse aus den vorangegangenen Proliferationsstudien mit glatten Muskelzellen eine Aufarbeitung der Endothelzellen ausschließlich 24 h im Anschluss an eine Magnetfeld-/Kontrollexposition statt.

Der nachfolgend in **Abb. 4** dargestellte Westernblot-Nachweis beschränkte sich auf den Proliferationsmarker PCNA, da α -Actin und Calponin in Endothelzellen nicht vorkommen. Der endothelzellspezifische Nachweis von VEGF und VEGF-Rezeptor verlief negativ. (ohne Abbildung)

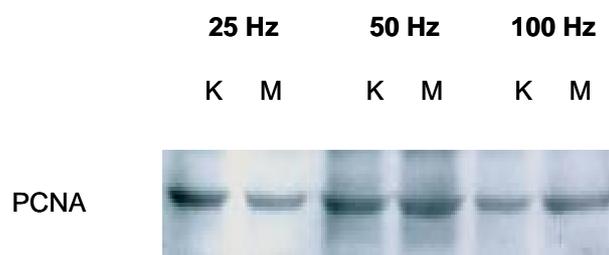


Abb. 4: Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von PCNA in Endothelzellen in Abhängigkeit von der Feldfrequenz
Expositionsdauer 15 min, K: Kontrollexposition, M: Magnetfeldexposition

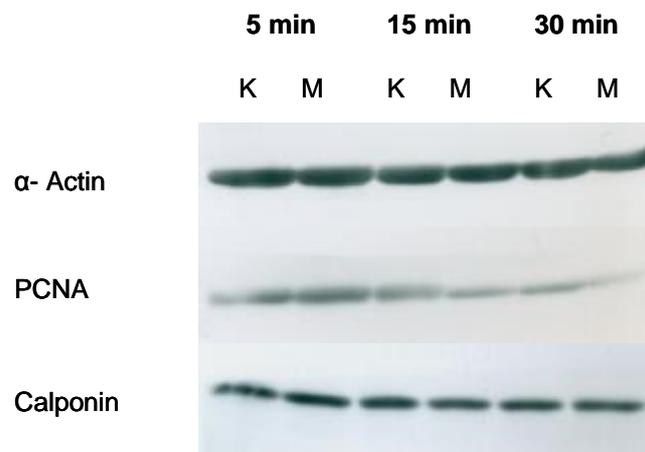
Die PCNA-Banden der jeweils korrespondierenden Kontroll- und Expositionsgruppen zeigten sich in ihrer Intensität weitestgehend homogen. Unabhängig von der Feldfrequenz konnten demnach auch bei den Endothelzellen mittels Westernblot-Analyse kein signifikanter Einfluss auf die Zellproliferation nachgewiesen werden.

3.2 Einfluss der Expositionsdauer

Eine zweite Experimentalserie basierte auf der Variation der Expositionsdauer im elektromagnetischen Feld (Expositionen für 5 min, 15 min und 30 min, Feldfrequenz konstant 50 Hz). Aufgrund der Ergebnisse aus den vorab unter gleichen Bedingungen durchgeführten Proliferationsstudien [17], [61], [62] und den Ergebnissen aus der oben beschriebenen Experimentalserie 1 beschränkte sich die Durchführung dieser zweiten Experimentalserie auf eine Verwendung von proliferierenden glatten Muskelzellen.

Abb. 5 spiegelt die Ergebnisse der Magnetfeldexposition von proliferierenden bov cSMC für die verschiedenen Expositionszeiträume von 5 min, 15 min und 30 min wider. Dabei zeigt **A** die Ergebnisse der Proteinaufarbeitung 24 h nach Magnetfeldexposition und **B** die Ergebnisse der Aufarbeitung 48 h nach der Exposition im elektromagnetischen Feld.

A)



B)

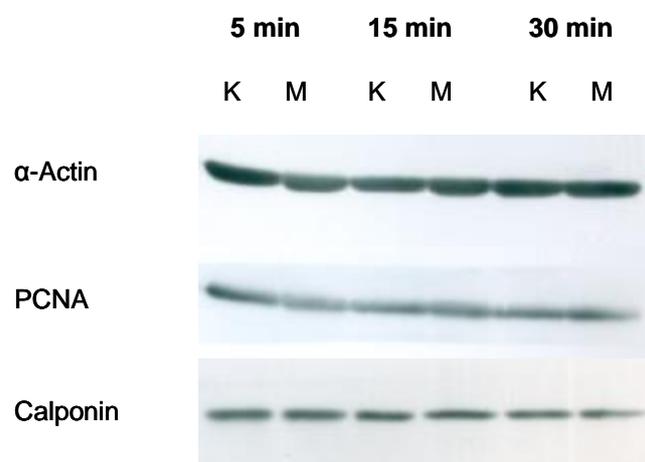


Abb. 5: Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von α -Actin, PCNA und Calponin in proliferierenden glatten Muskelzellen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer
Feldfrequenz 50 Hz, K: Kontrollexposition, M: Magnetfeldexposition, A) Aufarbeitung nach 24 h, B) Aufarbeitung nach 48 h

Die Intensität aller α -Actin Banden entsprachen sich sowohl 24 h als auch 48 h nach Kontroll-/Magnetfeldexposition. Ebenso verhielt es sich mit den Banden von PCNA und Calponin. Da keine nennenswerten Unterschiede in der Proteinmenge innerhalb eines Experimentes zu beobachten waren, entwickelten sich sowohl die Expositions- als

auch die Kontrollproben offensichtlich gleich, ohne dass eine Beeinflussung der Proliferation durch das Magnetfeld erkennbar wäre. Die Ergebnisse stellten sich unabhängig von der Dauer der Magnetfeldexposition ein, so dass diese mittels Westernblot keinen erkennbaren Einfluss auf die Proliferation der Zellen zeigte.

Die direkte Gegenüberstellung der verschiedenen Aufarbeitungszeiten (bei **A** nach 24 h und bei **B** nach 48 h) ließ ebenfalls keine Unterschiede erkennen, womit eine verzögerte Auswirkung des elektromagnetischen Feldes auf die Zellproliferation ausgeschlossen werden konnte.

3.3 Vergleich proliferierender und ruhender glatter Muskelzellen

Eine direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse für die ruhenden und proliferierenden bov cSMC aus der Experimentalserie 1 ist in **Abb. 6** erfolgt.

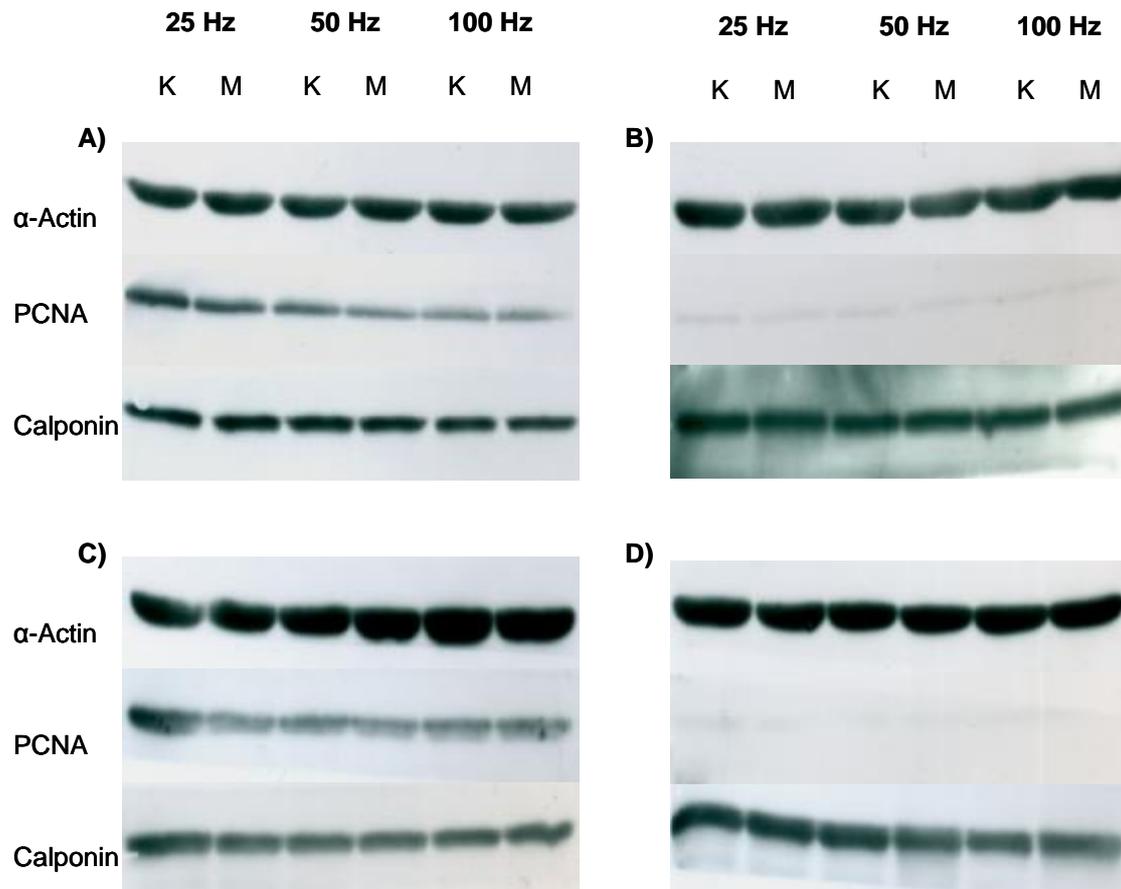


Abb. 6: Vergleich des Einflusses von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von α -Actin, PCNA und Calponin in proliferierenden und ruhenden glatten Muskelzellen in Abhängigkeit von der Feldfrequenz
Expositionsdauer 15 min, K: Kontrolleexposition, M: Magnetfeldexposition, A) proliferierende bov cSMC, Aufarbeitung nach 24 h, B) ruhende bov cSMC, Aufarbeitung nach 24 h, C) proliferierende bov cSMC, Aufarbeitung nach 48 h, D) ruhende bov cSMC, Aufarbeitung nach 48 h

Abb. 6A zeigt die Ergebnisse der Expression von α -Actin, PCNA und Calponin in proliferierenden glatten Muskelzellen, die 24 h nach einer Exposition im elektromagnetischen Feld aufgearbeitet wurden. Im Vergleich dazu sind bei **Abb. 6B** die Ergebnisse der ruhenden glatten Muskelzellen ebenfalls nach einer Aufarbeitung 24 h nach Magnetfeldexposition dargestellt. **Abb. 6C** spiegelt die Proteinanalyse proliferierender glatter Muskelzellen wider, die 48 h nach der Magnetfeldexposition aufgearbeitet wurden, ebenso wie die ruhenden glatten Muskelzellen, deren Ergebnisse in **Abb. 6D** dargestellt sind.

Bei einem Vergleich der Proteinanalysen der Aufarbeitungen 24 h nach Magnetfeldexposition (**A** und **B**) zeigten sich die Banden von α -Actin und Calponin bei proliferierenden Zellen (**A**) in ihrer Intensität vergleichbar stark wie bei ruhenden Zellen (**B**). Demgegenüber stellten sich die Banden des Proliferationsmarkers PCNA bei den ruhenden Zellen erwartungsgemäß signifikant schwächer dar als bei den proliferierenden Zellen und waren teilweise kaum noch nachweisbar, was die fortbestehende Arretierung des Zellzyklus bei den ruhenden Zellen belegte. Generell konnte kein wesentlicher Unterschied in der Reaktion der Zellen auf das elektromagnetische Feld in Abhängigkeit von verschiedenen Zellzyklusphasen festgestellt werden.

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse einer Aufarbeitung 48 h nach Magnetfeldexposition (**C** und **D**) führte zu vergleichbaren Schlussfolgerungen wie zuvor bei der Aufarbeitung nach 24 h. Die Intensität der Banden von α -Actin und Calponin bei proliferierenden Zellen (**C**) entsprach der bei ruhenden Zellen (**D**). Die Banden von α -Actin waren hier im Vergleich zu der Aufarbeitung nach 24 h intensiver.

Die PCNA-Banden stellten sich erneut aufgrund der offensichtlich anhaltenden Arretierung des Zellzyklus bei den ruhenden Zellen in deutlich geringerer Intensität dar, bzw. waren kaum noch auszumachen. Die Reaktionen der Zellen auf das elektromagnetische Feld waren demnach sowohl 24 h als auch 48 h im Anschluss an die Magnetfeldexposition unabhängig von der Zellzyklusphase.

3.4 Zweimalige Magnetfeldexposition

Eine weitere Möglichkeit in der Variation der Versuchsbedingungen bestand in der Veränderung der Anzahl der Magnetfeldexpositionen. Dafür wurden proliferierende Zellen im Abstand von jeweils 24 h zweimal für je 15 min einem Magnetfeld von 50 Hz ausgesetzt. Als Kontrollen dienten einerseits Zellen, die nur einmal dem Magnetfeld ausgesetzt wurden, und andererseits Zellen, die ausschließlich den Kontrollbedingungen unterlagen. 72 h nach Aussaat wurden die Zellen aller drei Versuchsgruppen aufgearbeitet. Die Ergebnisse sind in **Abb. 7** dargestellt.

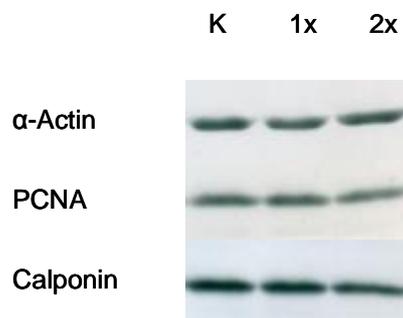


Abb. 7: Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von α -Actin, PCNA und Calponin in proliferierenden glatten Muskelzellen nach einmaliger bzw. zweimaliger Magnetfeldexposition (50 Hz, 15 min)
K: Kontrolle

Die proteinspezifische Bandenintensität von α -Actin, PCNA und Calponin war für alle drei Proteine durchweg homogen. Auch bei zweimaliger Magnetfeldexposition konnte im Westernblot demnach kein Unterschied zu den Kontrollgruppen mit einmaliger Magnetfeldexposition und alleiniger Kontrollexposition festgestellt werden.

Auf Proteinebene ließen sich somit keine Rückschlüsse darauf ziehen, dass bei einer mehrmaligen Exposition im elektromagnetischen Feld mögliche Auswirkungen verstärkt würden und es somit zu einer mittels Westernblot dokumentierbaren Beeinflussung der Zellproliferation käme.

4 Diskussion

Wie sich in der im eigenen Labor durchgeführten *in vitro*-Proliferations-Studie [17], [61], [62] zeigte, können niederenergetische elektromagnetische Felder einen induzierten Proliferationsstatus verstärken. Hierbei stellte sich bei Versuchen mit Gefäßwandzellen eine signifikante Steigerung der Zellproliferation bei teilungsaktiven glatten Muskelzellen unter Magnetfeldeinfluss von bis zu 21,9 % heraus. Als eine besonders effektive Magnetfeldfrequenz erwies sich 50 Hz, wobei die Expositionsdauer den Effekt nicht weiter beeinflusste. Ruhende Zellen waren mit einer Magnetfeldexposition nicht zu einem erneuten Eintritt in den Zellzyklus zu stimulieren.

Die Auswirkungen des elektromagnetischen Feldes zeichneten sich bei den Endothelzellen wesentlich schwächer ab. Hier war eine nicht signifikante Steigerung der Zellproliferation von 10,2 % festzustellen. [17], [61], [62]

In der vorliegenden Arbeit sollten diese proliferationssteigernden Effekte von elektromagnetischen Feldern näher evaluiert und auf Proteinebene mit Hilfe von Westernblots untersucht und manifestiert werden.

In Anlehnung an die Proliferationsstudie wurden drei Experimentalserien durchgeführt. Mit der Experimentalserie 1 wurde der Einfluss des Magnetfeldes in Abhängigkeit von der Magnetfeldfrequenz untersucht (Feldfrequenz: 25 Hz, 50 Hz, 100 Hz, Expositionszeit konstant 15 min). Die Experimentalserie 2 behandelte den Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von der Expositionszeit (Expositionen für 5 min, 15 min und 30 min, Feldfrequenz konstant 50 Hz). Die Experimentalserie 3 beschäftigte sich mit dem Einfluss des Magnetfeldes auf die Zellproliferation in Abhängigkeit von der Anzahl der Expositionen. Hierbei wurde eine Gruppe der proliferierenden Zellen 24 h nach einer ersten Magnetfeldexposition einer zweiten ausgesetzt.

Die Aufarbeitung und Analyse der Zellproteine erfolgte 24 h und 48 h nach der Magnetfeldexposition mit Westernblots. Dabei wurden die Proteine α -Actin, Calponin

und PCNA betrachtet. α -Actin und Calponin sind typische Bestandteile glatter Muskelzellen. Actinfilamente bilden zusammen mit Myosinfilamenten den kontraktile Apparat der glatten Muskelzellen. Als wichtiges Regulatorprotein enthalten Actinfilamente unter anderem Calponin zur Steuerung des Kontraktionsvorganges [71]. Folglich sind sowohl Actin als auch Calponin im Wesentlichen für die Funktion glatter Muskelzellen verantwortlich und dienen als Phänotypenmarker, mit denen die Differenzierung der Zellen kontrolliert werden kann.

PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) ist eine Untereinheit der DNA-Polymerase δ , dessen Prozessivität sie sehr stark erhöht, und beeinflusst darüber hinaus die DNA-Polymerase α . Beide Polymerasen sind für eine Replikation der DNA unentbehrlich. Dabei ist die DNA-Polymerase δ für die Synthese des Führungsstranges des bereits gespaltenen DNA-Doppelstranges verantwortlich. Für die Synthese des verzögerten Stranges ist die DNA-Polymerase α zuständig [71]. Demnach liefert die Betrachtung von PCNA Aufschluss über die Proliferationsaktivität der Zellen.

Die Ergebnisse der durchgeführten Proteinanalysen zeigten im Westernblot für keines der drei untersuchten Proteine Unterschiede bezüglich der Proteinexpression der Zellen in Abhängigkeit eines elektromagnetischen Feldes. Weder eine Varianz der Feldfrequenz noch eine Varianz der Expositionsdauer führten zu sichtbaren Abweichungen in der Expression der Proteine zwischen Kontrollen und exponierten Zellen. Der jeweilige Proteinstatus zeigte sich darüber hinaus auch unabhängig von den verschiedenen Aufarbeitungszeiträumen (24 h und 48 h), so dass eine deutbare verzögerte Auswirkung des elektromagnetischen Feldes auf die Zellproliferation ausgeschlossen werden konnte. Des Weiteren waren die Ergebnisse unbeeinflusst von der Art der Zellen (bov cSMC oder EC) und vom Stadium des Zellzyklus, in dem sich die Zellen befanden (proliferierend oder ruhend). Die offensichtlichen Unterschiede in der Zellproliferation lagen unterhalb der Nachweisgrenze des Westernblots.

Ein Pendant zu den quantitativen Ergebnissen aus den Proliferationsstudien [17], [61], [62] konnte auf molekularer Ebene mit der Methode des Westernblots folglich nicht gefunden werden. Die naheliegendste Erklärung für diese Ergebnisse besteht in der begrenzten und daher nicht ausreichenden Sensitivität des Westernblots, denn erwartungsgemäß gravierende Unterschiede im PCNA-Gehalt z.B. zwischen ruhenden

und teilungsaktiven Zellen ließen sich problemlos im Westernblot darstellen. Schwankungen im Bereich von 10 – 20 % lassen sich jedoch offensichtlich nicht mehr dokumentieren. Des Weiteren ist zu diskutieren, dass die pro-proliferativen Effekte elektromagnetischer Felder für einen Nachweis proliferations-assoziiierter Parameter auf Proteinebene mittels Westernblot zu schwach ausgeprägt sind.

Um den Einfluss elektromagnetischer Felder auf die Proliferation von Gefäßwandzellen auf molekularer Ebene zu untersuchen, ist die Methode des Westernblots ungeeignet. So müssen andere, sensitivere Methoden herangezogen werden, um den geringen Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf die Zellproliferation zu bestätigen. Derlei Versuchsansätze lagen jenseits des Ziels der hier vorgelegten Arbeit und werden Gegenstand weitergehender Untersuchungen sein.

4.1 Alternative Methoden zum Westernblot

Transkriptionsanalysen

Aaron et al. [1] gehen davon aus, dass elektromagnetische Felder direkt auf die DNA einwirken und zur vermehrten Transkription von Wachstumsfaktoren anregen. Eine direkte Untersuchung der mRNA mittels RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) oder Array-Technologie könnte bei den hier verwendeten bovinen glatten Muskelzellen und den humanen Endothelzellen genauere Ergebnisse über den primären Wirkmechanismus des elektromagnetischen Feldes liefern. Diese Methode ist sensitiver als der Westernblot und selbst minimale Änderungen wie Punktmutationen können erkannt werden.

Neben der Methode der PCR lässt auch eine Messung des Verbrauchs von markiertem Thymidin Rückschlüsse auf die DNA-Aktivität ziehen, wie dies schon bereits Yen-Patton et al. [108] in ihren Versuchen taten. Dabei kamen sie zu den Ergebnissen, dass die Magnetfeldexposition bei Zellen einen erhöhten Verbrauch von markiertem Thymidin zur Folge hatte, was auf eine gesteigerte DNA-Synthese schließen ließ.

Um einen Fehler aufgrund der Betrachtung eines möglicherweise ungeeigneten Proliferationsmarkers (PCNA) ausschließen zu können, ist die Untersuchung anderer Proliferationsmarker sinnvoll. Denn wie sich bereits in anderen Studien zeigte, kann der Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf Zellen eine quantitative Erhöhung der Zellproteine bewirken [30], [81]. Diese allgemeine Aussage konnte aufgrund der Ergebnisse von Wu et al. [107] insofern spezifiziert werden, als dass sie ein Ansprechen auf das elektromagnetische Feld von nur bestimmten DNA-Sequenzen feststellten. Sie bewiesen, dass bei lymphatischen B-Zellen nach einer Magnetfeldexposition von 50 Hz speziell die Genexpression der kodierenden DNA-Sequenzen für die Glucosyltransferase gesteigert war. Diese bewirkt ihrerseits eine vermehrte Zellproliferation. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass die DNA-Sequenz des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Proliferationsmarkers PCNA kaum oder nur geringfügig auf den Einfluss des elektromagnetischen Feldes reagiert hat. Demzufolge wären die gleich bleibenden Bandenintensitäten des Proteins PCNA bei den Kontroll- und Magnetfeldgruppen erklärbar. Eine vermehrte Proliferation der Zellen unter Magnetfeldeinfluss wäre somit nicht auszuschließen und kann mit einem anderen Proliferationsmarker nachgewiesen werden. Dies könnte zunächst erneut mit der Methode des Westernblots geschehen, wenn davon ausgegangen wird, dass nun die Reaktion des Proliferationsmarkers auf das elektromagnetische Feld ausreichend ist bei genügender Sensitivität des Westernblots.

Membranfunktionen

Neben den Untersuchungen an der DNA besteht ein weiterer Ansatz der Auswirkung elektromagnetischen Feldes auf die Proliferation von Zellen darin, dass sich Oberflächenproteine und -lipide der Zellmembran aufgrund einer Magnetfeldexposition ändern und somit eventuell zu einer Membranhydrophobie führen. Dies postulieren unter anderem Luben et al. [72] aufgrund ihrer Ergebnisse bezüglich der Auswirkung von elektromagnetischem Feld auf die Stimulierung von Knochenzellen. Sie führen die inhibierende Antwort von Osteoblasten auf Parathormon nach einer Exposition im elektromagnetischen Feld auf Veränderungen in der Plasmamembran zurück. Dabei

gehen sie entweder von einer Interferenz mit Hormonrezeptoren oder von einer Blockade der Bindung der Rezeptor-Cyclase an der Membran aus.

Auch andere Arbeiten basieren auf der Vorstellung der Zellmembranänderung durch elektromagnetische Felder. So beobachtete Goltsov [41] anhand einer Computersimulation eine Separation der Doppelpospholipidmembran und eine daraus resultierende Filterstruktur während des Einflusses eines starken elektromagnetischen Feldes. Diese Struktur baute sich periodisch auf und zerfiel auch ebenso wieder. Dies ließ ihn zu der Vermutung kommen, dass durch diese Filterfunktion der Membran ein Signal- und Transportprozess angeregt werden könnte. Mossop et al. [79] vermuten eine indirekte Proportionalität zwischen dem intrazellulär erzeugten Feld und dem Membranwiderstand. Diese Ansätze sind zum Großteil theoretischer Natur und lassen sich bezüglich einer Versuchsanordnung nur schwer in die Praxis übertragen.

Funktionen des Ca²⁺-Transportes

Eine Betrachtung der Permeabilität für Ca²⁺-Ionen scheint hier besonders von Interesse, wie sich in mehreren Arbeiten abzeichnet. In Versuchen mit 10 Tage alten Chondrocyten aus Hühnerembryonen, die einem elektromagnetischen Feld ausgesetzt wurden, zeigte sich zunächst ein Anstieg der Transkription nach Magnetfeldexposition. In einer Weiterführung dieser Versuche wurden die Na⁺-Kanäle mit Tetrodotoxin und die Ca²⁺-Kanäle mit Verapamil geblockt. Dabei konnte keine Erhöhung der Transkriptionsrate mehr beobachtet werden. Folglich scheint der Ionenfluss hier eine entscheidende Rolle für den Wirkmechanismus des elektromagnetischen Feldes zu spielen. [91]

Einen ähnlichen Versuchsansatz hatten Cho et al. [27]. Sie bestätigen diese Ergebnisse, indem sie humane Leberzellen (Hep3B) für 30 min einem elektromagnetischen Feld aussetzten und anschließend einen vierfachen Anstieg des intrazellulären Ca²⁺ verzeichnen konnten. Dieser Effekt blieb aus, wenn das extrazelluläre Medium kein Ca²⁺ enthielt, was bewies, dass das Ca²⁺ über die Membran in die Zellen gelangen musste. Dies konnten sie dadurch verifizieren, indem sie sowohl bei einer unspezifischen Blockade der Kationenkanäle als auch bei einer spezifischen

Blockade der Ca^{2+} -Kanäle eine Abschwächung des Effektes beobachteten. Bei einer gleichzeitigen Blockade der Kationen- und Ca^{2+} -Kanäle war kein Effekt im Ca^{2+} -Fluß mehr zu verzeichnen.

Diesen Ca^{2+} -Fluß sehen Baureus Koch et al. [15] darin begründet, dass es zu einer direkten Interaktion des elektromagnetischen Feldes mit dem Ca^{2+} -Kanal in der Zellmembran kommt, wie sich bei ihren Untersuchungen mit radioaktivmarkiertem Ca^{2+} herausstellte.

Dies entspricht schon früheren Überlegungen von Adey et al. [5]. Sie stellen die Hypothese auf, dass elektromagnetische Felder die Zelloberfläche durch veränderte Rezeptorbindungen und –aktivitäten beeinflussen. Diese Rezeptorinteraktionen stellen den ersten Schritt in einer Transduktionskette dar, die letztlich zu einer Freisetzung von intrazellulären Botenstoffen führt, zu denen unter anderem Ca^{2+} zählt.

Neuere Untersuchungen von Takahashi et al. [97] ergaben, dass ein spezieller ATP-Rezeptor durch das elektromagnetische Feld angeregt wird, was wiederum zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} führt.

Die Funktion des Ca^{2+} Transportes ist eine bereits häufiger erforschte mögliche Ursache zur Klärung des Wirkmechanismus der elektromagnetischen Felder. Somit liegen verschiedene Versuchsanleitungen vor, die gut als Basis für weiterführende Versuche bei einer Untersuchung des Ca^{2+} -Ionenflusses bei den hier verwendeten bovinen, glatten Muskelzellen und humanen Endothelzellen dienen können.

Zellzyklusabhängigkeit und Zelldifferenzierung

Eine andere Überlegung in der Auswirkung von elektromagnetischen Feldern auf Zellen besteht darin, dass ein Ansprechen der Zellen auf diesen Reiz abhängig von der Zelldifferenzierung bzw. der Proliferationsphase sein könnte. So zeigten bereits Yamaguchi et al. [109] eine magnetfeldinduzierte Inhibierung der interzellularen Kommunikation durch gap junctions in Abhängigkeit von der Zelldifferenzierung. Dabei sprachen wenig differenzierte Vorstufen oder Präosteoblasten besser auf das elektromagnetische Feld an als ausdifferenzierte Osteocyten. Bei der im eigenen Labor

durchgeführten *in vitro*-Proliferations-Studie [17], [61], [62] zeigte sich des Weiteren, dass eine Abhängigkeit auf das Ansprechen des elektromagnetischen Feldes von der Phase der Zellproliferation besteht.

Wie hier dargestellt, gibt es diverse Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen, die Einblicke in potentielle physiologische Auswirkungen von elektromagnetischen Feldern auf Gefäßwandzellen ermöglichen könnten. Dabei bleibt zu berücksichtigen, dass einige bereits weiter erforscht sind und als gute Basis für weiterführende Untersuchungen dienen können. Andere Ansatzpunkte hingegen sind lediglich theoretisch denkbar. Bei allen möglichen und erhofften positiven Effekten von elektromagnetischen Feldern hinsichtlich deren therapeutischer Anwendung dürfen jedoch auch mögliche Probleme und Risiken nicht außer Acht gelassen werden.

4.2 Probleme bei der Magnetfeldforschung

Trotz der vielfach in Studien belegten These, dass elektromagnetische Felder Zellen beeinflussen können, gibt es auch die gegenteilige wissenschaftliche Meinung. So besteht die Ansicht, dass elektromagnetische Felder eine zu geringe Energie aufweisen, als dass sie über die üblichen physikalischen Mechanismen wie Hitze oder Elektrophorese Eingriff auf den Zellstoffwechsel nehmen könnten [100]. Des Weiteren spricht gegen eine Interaktion von elektromagnetischen Feldern auf Zellen, dass Zellen ein viel höheres endogenes elektrisches Feld über ihre Membranen aufweisen, als es von einer Exposition im elektromagnetischen Feld erreicht wird. So bringt Adair [4] die Berechnung, dass eine Zelle von etwa 90 Å Dicke ein Ruhemembranpotential von ca. 100 mV aufweist und damit ein elektrisches Feld von 10^5 V/cm über der Membran erzeugt. Die experimentell verwendeten Magnetfelder erzeugen jedoch ein fünf- bis sechsmal schwächeres Magnetfeld, was zu gering ist, um das Feld der Zellmembran zu überwinden. In einer theoretischen Studie über die möglichen Wirkungsmechanismen elektromagnetischer Felder reduziert Binhi [18] die paradoxen Überlegungen im Wesentlichen darauf, dass thermische Einflüsse, die Energien in der Größenordnung von experimentellen Magnetfeldern erzeugen, keine Auswirkungen auf

die Zellen haben. Eine Wirkung von elektromagnetischen Feldern wäre damit auf Zellen eher unwahrscheinlich.

So gibt es kontroverse Meinungen über den Nutzen von elektromagnetischen Feldern und ein Konsensus ist nicht abzusehen, so dass noch weiterer Forschungsbedarf besteht. Hierbei ist es sehr schwierig auf allgemeingültige Richtlinien und Versuchsanleitungen aufbauen zu können, denn die zahlreichen bisherigen Versuche basieren auf den verschiedensten Feldern [2], [4], [22], [31], [67], [68], [87], [111]. So werden manche Experimente mit elektromagnetischen Feldern durchgeführt [2], [22], andere mit statischen Magnetfeldern [31], [87]. Die elektromagnetischen Felder wiederum variieren sehr stark in Bezug auf Frequenz und Feldstärke. Zusätzlich unterscheiden sich die Expositionszeiten und die Zelltypen sowie das Alter der Zellen und ihre Entwicklungsphase, so dass es nicht verwundert, wenn es viele verschiedene und gegensätzliche Ergebnisse bei der Erforschung der Mechanismen von magnetischen Feldern gibt. Darüber hinaus scheint sich auch keine allgemeingültige, lineare Abhängigkeit zwischen Frequenz bzw. Expositionszeit und Zellantwort abzuzeichnen. Es gibt lediglich gewisse Frequenz- bzw. Zeitfenster, in denen eine besonders gute Zellantwort zu erwarten ist, allerdings können Werte sowohl oberhalb als auch unterhalb dieses Bereiches wiederum keine Zellantwort bewirken [19], [69]. Demzufolge gibt es nur wenige eindeutige Basisergebnisse, die als Leitfaden dienen und auf denen Weiterentwicklungen aufbauen können.

Der überwiegende Teil der Arbeiten spiegelt im Wesentlichen eine Auswirkung von elektromagnetischen Feldern auf Zellen wieder. Wenn es bis heute auch lediglich Erklärungsansätze darüber gibt, welche Wirkungskaskaden magnetische Felder im menschlichen Körper auslösen, so ist doch das Resultat, dass sie erheblichen Einfluss auf die verschiedensten Zelltypen nehmen können, nur sehr schwer von der Hand zu weisen.

4.3 Risiken durch elektromagnetische Felder

Die therapeutische Anwendung von elektromagnetischen Feldern ist nicht gänzlich unumstritten. Die hypothetischen Wirkmechanismen des elektromagnetischen Feldes

korrelieren eng mit den Induktionsmechanismen der Tumorgenese. So steht vornehmlich der Gedanke im Vordergrund, dass es durch den möglicherweise direkten Angriff des elektromagnetischen Feldes an der DNA der Zellen zu unkontrollierbarem, autonomem Wachstum kommen könnte. Darüber hinaus sind genetische Mutationen und Differenzierungsfehler denkbar, so dass es zu einer Transformation der normalen Zellen in Tumorzellen kommt. Diese Zellen entziehen sich den physiologischen Kontrollmechanismen und können maligne entarten.

Besonderes Interesse bezüglich dieses Zusammenhanges von elektromagnetischem Feld und der Tumorentstehung gilt dabei dem Mammakarzinom und der Leukämie. Diesbezüglich wurde eine Reihe epidemiologischer Studien durchgeführt, die eine gewisse Assoziation zwischen elektromagnetischer Feldexposition und dem Auftreten von Mammakarzinomen bzw. kindlichen Leukämien zulassen. [60], [63], [65], [106]

Neben diesen meistuntersuchten malignen Tumorarten stehen auch noch andere maligne Entartungen wie z.B. Hoden-, Blasen- und neurologische Tumoren als Folge einer Magnetfeldexposition in der Diskussion. In epidemiologischen Studien konnte dieser Zusammenhang für Hodentumore und neurologische Tumore allerdings nicht weiter bestätigt oder geklärt werden [14], [47]. Für Blasen- und neurologische Tumore zeichnete sich ein gewisser Zusammenhang ab, allerdings in Kombination mit weiteren ursächlichen Faktoren [9].

Doch nicht nur eine Korrelation zwischen der Magnetfeldexposition und der Tumorentstehung wird postuliert. Auch Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems sollen durch das elektromagnetische Feld beeinflusst werden:

In einer epidemiologischen Studie untersuchten Savitz et al. [93] die Auswirkungen des elektromagnetischen Feldes auf kardiovaskuläre Erkrankungen. Dafür wurde zwischen 1959 – 1988 eine Kohorte von 138.903 männlichen Elektrikern (USA), die aufgrund ihrer Arbeit einem elektromagnetischen Feld ausgesetzt waren, bezüglich Arrhythmien, Myokardinfarkt, Arteriosklerose und koronare Herzkrankheit untersucht. Es konnte lediglich eine denkbare Assoziation zwischen elektromagnetischem Feld und Rhythmusstörungen hergestellt werden. Dies zeigte sich ebenso in einer neueren epidemiologischen Studie von Johansen [55], in der er keinen Zusammenhang

zwischen der Aussetzung eines elektromagnetischen Feldes und dem Auftreten von kardiovaskulären bzw. cerebrovaskulären Erkrankungen feststellen konnte. Auch ist nicht von einem erhöhten Risiko für einen Myokardinfarkt aufgrund eines elektromagnetischen Feldes auszugehen [6].

Ein erhöhtes Risiko für Thromboembolien konnten Caprani et al. [25] in ihren experimentellen Studien mit einer Magnetfeldexposition bei einer endothelialen Zellreihe beobachten.

Neben den möglichen Folgen des elektromagnetischen Feldes, das Risiko für bestimmte Tumor- oder Herzerkrankungen zu erhöhen, gibt es auch die Hypothese, dass es einen Einfluss auf das Nervensystem gibt. So konnte beispielsweise eine positive Korrelation zwischen elektromagnetischem Feld und der senilen Demenz bzw. der amyotrophen Lateralsklerose festgestellt werden [55], [56]. In einer weiteren epidemiologischen Studie stellte sich ein positiver Zusammenhang bezüglich einer Exposition im elektromagnetischen Feld und dem Risiko für Männer an M. Alzheimer zu erkranken heraus [86].

Aufgrund der Untersuchungsbedingungen von sehr komplexen Populationen bei diesen epidemiologischen Studien kommt es zwangsläufig zu einer sehr ungenauen Definition des elektromagnetischen Feldes und der Expositionsdauer. Sehr geringe Effekte können schlecht wahrgenommen werden, so dass die Ergebnisse äußerst kritisch zu bewerten sind und eine direkte Korrelation zwischen elektromagnetischem Feld und verursachender Krankheit nur sehr schwer nachvollziehbar ist.

Folglich werden viele der Studien über die möglichen Zusammenhänge von Tumorentstehung und der Exposition eines elektromagnetischen Feldes, die zum Großteil epidemiologischer Art sind, durch andere Forscher ihrer unwissenschaftlichen Vorgehensweise wegen kritisiert. Im Mittelpunkt dieser Diskussionen steht die Kritik an einer Fehlenden Dosis-Wirkungs-Beziehung und einer schlechten Vergleichbarkeit der verschiedenen Studien. Darüber hinaus sind viele Ergebnisse nicht replizierbar. [7], [35], [76], [80]

Ein ausgewogenes Verhältnis an Tier- und Zellforschung sowie epidemiologischen Studien fehlt, um letztendlich eine eindeutige Aussage über den Effekt von

elektromagnetischen Feldern auf den Organismus treffen zu können. (siehe auch Kapitel 1.3)

Aufgrund der wachsenden öffentlichen Aufmerksamkeit bezüglich der möglichen negativen Auswirkungen von elektromagnetischen Feldern auf die Gesundheit, gründete 1996 die World Health Organization (WHO) ein großes, multidisziplinäres Wissenschaftsprojekt (International EMF Project), bei dem Forschungen über elektromagnetische Felder und deren Auswirkungen im Mittelpunkt stehen. Die WHO geht davon aus, dass der größte Effekt, den elektromagnetische Felder auf den Organismus ausüben, eine Hitzeentwicklung sei. Weder die Entstehung von psychischen Auffälligkeiten noch eine Begünstigung in der Entwicklung von Katarakt oder einem negative Effekt auf die Schwangerschaft sieht sie als bewiesen an. Aufgrund der vielen kontroversen Studien über einen Zusammenhang bei der Entstehung von malignen Tumoren nach einer Exposition im elektromagnetischen Feld nimmt die WHO im Falle einer positiven Korrelation lediglich ein extrem geringes Risiko an. Sie verweist auf mangelnde Studien und laufende Forschungsarbeiten und kann somit keine eindeutigen Richtlinien geben. [105]

Einer Auswirkung auf die Entstehung von malignen Tumoren und anderen Erkrankungen durch ein elektromagnetisches Feld ist demnach sehr kritisch gegenüberzustehen, da eindeutige Studien fehlen. Dennoch darf dieser Gedanke gerade bei einer möglichen therapeutischen Anwendung eines elektromagnetischen Feldes nicht außer Acht gelassen und muss weiter untersucht werden. Auch dabei verlangt es im Wesentlichen nach der Klärung des Wirkmechanismus, um zu einer endgültigen Aussage über eine mögliche therapeutische Anwendung und deren Nutzen und Risiko kommen zu können.

4.4 Nutzen für die Angiogenese

Die Interaktion von elektromagnetischem Feld und Organismus ist Gegenstand vieler Forschungsarbeiten [1], [31], [72], [81], [82], [103]. Nachdem weitestgehend akzeptiert worden ist, dass es überhaupt eine Beeinflussung der elektromagnetischen Felder auf

den Organismus gibt, steht nun schon lange die Erforschung des Wirkmechanismus im Vordergrund [29], [81], [98], [109], [111].

Bei der vorliegenden Arbeit fand diese Erforschung an glatten Muskel- und Endothelzellen statt, um mögliche Erkenntnisse bei diesen an der Gefäßbildung entscheidend mitwirkenden Zelltypen für eine therapeutische Angiogenese nutzen zu können. Dass es einen positiven Effekt des elektromagnetischen Feldes in Bezug auf die Zellproliferation bei diesen Zellarten und somit eine eventuelle Angiogenese gibt, konnte in eigenen Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe gezeigt werden [17], [61], [62]. Damit es zu einem therapeutischen Nutzen kommen kann, müssen jedoch detailliertere Untersuchungen folgen.

Dabei muss an erster Stelle die Aufklärung des Wirkmechanismus stehen. Weitere Forschungen könnten sich an oben genannten Methoden orientieren und genaueren Aufschluss über die Einflussnahme elektromagnetischer Felder auf Zellen geben. Des Weiteren sollte eine Optimierung der bereits untersuchten Einflussgrößen wie Magnetfeldfrequenz, Expositionszeiträume/-häufigkeiten und Zellzyklusstadium mit im Vordergrund der Forschungen stehen. Mit diesen Erkenntnissen könnte dann gezielt Einfluss auf die Zellproliferation genommen werden, was letztendlich zu einer Etablierung als (unterstützende) therapeutische Maßnahme für eine Angiogenese führen könnte.

Nach den nun vorliegenden ersten Ergebnissen wäre die Hypothese zu überprüfen, ob elektromagnetische Felder dazu beitragen können, eine protrahierte Proliferation von Gefäßwandzellen (glatte Muskelzellen, Endothelzellen) *in vivo* zu bewirken und somit ggf. als supportive Therapie bei gentherapeutischen Ansätzen zur Angiogenese eingesetzt werden könnten.

Glossar

<u>Zeichen</u>	<u>Einheit</u>	<u>Bedeutung</u>
AMP	-	Adenosinmonophosphat
ATP	-	Adenosintriophosphat
B	T	Flussdichte
bFGF	-	basic fibroblast growth factor
DNA	-	Desoxyribonucleid acid
EDTA	-	Ethylene diamine tetraacetic acid
F	N	Lorentz-Kraft
G ₀ -Phase	-	Ruhephase des Zellzyklus
G ₁ -Phase	-	Postmitotische Ruhephase des Zellzyklus
H	A/m	Magnetische Feldstärke
HEPES	-	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
mRNA	-	Messenger ribonucleic acid
RNA	-	Ribonucleid acid
S-Phase	-	Synthesephase des Zellzyklus
TGF- β	-	Tumor growth factor
VEGF	-	Vascular endothelial growth factor

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Proliferationsexperiment mit bov cSMC nach Magnetfeldexposition	32
Abb. 2:	Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von α -Actin, PCNA und Calponin in proliferierenden glatten Muskelzellen in Abhängigkeit von der Feldfrequenz	35
Abb. 3:	Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von α -Actin, PCNA und Calponin in ruhenden glatten Muskelzellen in Abhängigkeit von der Feldfrequenz	37
Abb. 4:	Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von PCNA in Endothelzellen in Abhängigkeit von der Feldfrequenz.....	38
Abb. 5:	Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von α -Actin, PCNA und Calponin in proliferierenden glatten Muskelzellen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer.....	40
Abb. 6:	Vergleich des Einflusses von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von α -Actin, PCNA und Calponin in proliferierenden und ruhenden glatten Muskelzellen in Abhängigkeit von der Feldfrequenz.....	42
Abb. 7:	Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von α -Actin, PCNA und Calponin in proliferierenden glatten Muskelzellen nach einmaliger bzw. zweimaliger Magnetfeldexposition (50 Hz, 15 min)	44

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Zusammenfassende Darstellung der prozentualen Mittelwerte einschließlich Standardabweichung und T-Test mit Signifikanzniveau p aus den Proliferationsexperimenten.	33
Tab. 2:	Ergebnisse der Zellzählungen bei bov cSMC 24 h nach Magnetfeldexposition (Feldfrequenz 50 Hz) in Abhängigkeit des Expositionszeitraumes.....	I
Tab. 3:	Ergebnisse der Zellzählungen bei bov cSMC 48 h nach Magnetfeldexposition (Feldfrequenz 50 Hz) in Abhängigkeit des Expositionszeitraumes.....	II

Literatur

- [1] Aaron RK, Boyan BD, Ciombor DM, Schwartz Z, Simon BJ (2004) Stimulation of growth factor synthesis by electric and electromagnetic fields.
Clin Orthop 419: 30-37
- [2] Aaron RK, Ciombor DM, Keeping HS, Polk C (1999) Power frequency fields promote cell differentiation coincident with an increase in TGF β expression.
Bioelectromagnetic 10 (7): 453-458
- [3] Aaron RK, Wang S, Ciombor DM (2002) Upregulation of basal TGF β levels EMF coincident with chondrogenesis – implications of skeletal repair and tissue engineering.
J Orthop Res 20 (2): 233-240
- [4] Adair R (1991) Constraints on biological effects of weak extremely-low frequency electromagnetic fields.
Phys Rev 43: 1039-1048
- [5] Adey WR (1981) Tissue interactions with nonionizing electromagnetic fields.
Physiol Rev 61: 435-514
- [6] Ahlbom A, Feychting M, Gustavsson A, et al. (2004) Occupational magnetic field exposure and myocardial infarction incidence.
Epidemiology 15 (4): 403-408
- [7] Angelillo IF, Villari P (1999) Residential exposure to electromagnetic fields and childhood leukaemia: a meta-analysis.
Bull World Health Organ 77 (11): 906-915
- [8] Ballif JR, Dibble WE (1987) Anschauliche Physik.
in: de Gruyter, Berlin New York, 2. Aufl.

-
- [9] Band PR, Le ND, MacArthur AC, Fang R, Gallagher RP (2005) Identification of occupational cancer risks in British Columbia: a population-based case-control study of 1129 cases of bladder cancer.
J Occup Environ Med 47 (8): 854-858
- [10] Bassett CAL (1993) Beneficial effects of electromagnetic fields.
J Cell Biochem 51 (4): 387-393
- [11] Bassett CAL, Becker RO (1962) Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress.
Science 137: 1063-1064
- [12] Bassett CAL, Pawluk RJ, Becker RO (1964) Effects of electric currents on bone in vivo.
Nature 204: 652-654
- [13] Bassett CAL, Pawluk RJ, Pilla AA (1974) Augmentation of bone repair by inductively coupled electromagnetic fields.
Science 184: 575-577
- [14] Baumgardt-Elms C, Ahrens W, Bromen K, Boikat U, et al. (2002) Testicular cancer and electromagnetic fields (EMF) in the workplace: results of a population-based case-control study in Germany.
Cancer Causes Control 13 (10): 895-902
- [15] Baureus Koch CL, Sommarin M, Persson BR, Salford LG, Eberhardt JL (2003) Interaction between weak low frequency magnetic fields and cell membranes.
Bioelectromagnetics 24 (6): 395-402
- [16] Beck CS, Tichy VL, Moritz AR (1935) Production of a collateral circulation to the heart.
Proc Soc Exp Biol Med 32: 759-763
- [17] Berndt A (2004) In vitro-Untersuchungen zum Einfluss von Magnetfeldern und Interferenzströmen auf die Proliferation von Gefäßzellen.
in Vorbereitung
-

-
- [18] Binhi VN (1999) An analytical survey of theoretical studies in the area of magnetoreception.
World Health Organization, Geneva, Switzerland; 155-170
- [19] Blackman C, Kinney L, House D, Joines W (1989) Multiple power-density windows and their possible origin.
Bioelectromagnetics 10 (2): 115-128
- [20] Blank M (2005) Do electromagnetic fields interact with electrons in the Na-K-ATPase?
Bioelectromagnetics 26 (8): 677-683
- [21] Blank M, Soo L (1992) Threshold for inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase by ELF alternating currents.
Bioelectromagnetics 13 (4): 329-333
- [22] Bolognani L, Del Monte V, Francia F, Venturelli T, Volpi N, Costato M (1992) Low-frequency electromagnetic pulsed field stimulation in yeast.
Electro- Magnetobiol 11: 1-10
- [23] Borgens R (1984) Endogenous ionic currents traverse intact and damaged bone.
Science 225 (4661): 478-482
- [24] Braun KA, Lemons JE (1982) Effects of electromagnetic fields on the recovery of circulation in mature rabbit femoral heads.
trans orthop res soc 7: 313
Trans 28th Annu Meet Orthop Res Soc 7: 313
- [25] Caprani A, Richert A, Flaud P (2004) Experimental evidence of a potentially increased thrombo-embolic disease risk by domestic electromagnetic field exposure.
Bioelectromagnetics 25 (4): 313-315

-
- [26] Chang K, Chang WH (2003) Pulsed electromagnetic fields prevent osteoporosis in an ovariectomized female rat model: a prostaglandine E2-associated process. *Bioelectromagnetics* 24 (3): 189-198
- [27] Cho MR, Thattai HS, Silvia MT, Golan DE (1999) Transmembrane calcium influx induced by ac electric fields. *FASB J* 13 (6): 677-683
- [28] Ciombor DM, Aaron RK, Wang S, Simon B (2003) Modification of osteoarthritis by pulsed electromagnetic field – a morphological study. *Osteoarthritis Cartilage* 11 (6): 455-462
- [29] Ciombor DM, Lester G, Aaron RK, Neame P, Caterson B (2002) Low frequency EMF regulates chondrocyte differentiation and expression of matrix proteins. *J Orthop Res* 20 (1): 40-50
- [30] Cridland NA, Haylock RGE, Saunders RD (1999) 50 Hz magnetic field exposure alters onset of S-phase in normal human fibroblasts. *Bioelectromagnetics* 20: 446-452
- [31] Darendeliler MA, Darendeliler A, Sinclair PM (1997) Effects of static magnetic and pulsed electromagnetic fields on bone healing. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg* 12 (1): 43-53
- [32] Eckart WU (1998) *Geschichte der Medizin*.
in: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 3. Auflg.
- [33] Ekbart H (1995) *Physik für Ingenieure*.
in: VDI-Verlag GmbH, Düsseldorf, 5. Auflg.
- [34] Fercher AF (1999) *Medizinische Physik - Physik für Mediziner, Pharmazeuten und Biologen*.
in: Springer-Verlag, Wien New York, 2. Auflg.
- [35] Feychting M, Ahlbom A, Kheifets L (2005) EMF and health. *Annu Rev Public Health* 26: 165-189
-

-
- [36] Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: Therapeutic implications.
N England J Med 285 (21): 1182-1186
- [37] Fukada E, Yasuda I (1957) On the piezoelectric effect of bone.
J Phys Soc Japan 12: 1158-1162
- [38] Garcia-Sagredo JM, Parada LA, Monteagudo JL (1990) Effect on SCE in human chromosomes in vitro of low-level pulsed magnetic field.
Environ Mol Mutagen 16 (3): 185-188
- [39] Gascha H (1997) Physik Formeln.
in: Buch und Zeit Verlagsgesellschaft, Köln
- [40] Geschichte der Magnetfeldtherapie.
<http://www.s-hennebach.de/geschichte.html>
17.10.03
- [41] Goltsov AN (1999) Electromagnetic-field-induced oscillations of the lipid domain structures in the mixed membranes.
Bioelectrochem Bioenerg 48 (2): 311-316
- [42] Goodman EM, Greenbaum B, Marron MT (1994) Magnetic fields alter translation in E. coli.
Bioelectromagnetics (N.Y.) 15: 77-84
- [43] Goodman R, Chizmadzhev Y, Shirley-Henderson AS (1993) Electromagnetic fields and cells.
J Cell Biochem 51 (4): 436-441
- [44] Goodman R, Shirley-Henderson A (1991) Transcription and translation in cells exposed to extremely low frequency electromagnetic fields.
Bioelectrochem Bioenerg 25: 335-355
- [45] Gossling HR, Bernstein RA, Abbott J (1992) Treatment of ununited tibia fractures: A comparison of surgery and pulsed electromagnetic fields (PEMF).
Orthopedics 15 (6): 711-719
-

-
- [46] Guerkov H, Lohmann C, Liu Y, Dean D, Simon B, Heckman J, et al. Differential effects of pulsed electromagnetic fields on in vitro production of TGF β by cells isolated from human hypertrophic and atrophic nonunion tissue.
in: Clinic Orthop (in press)
- [47] Gurney JG, van Wijngaarden E (1999) Extremely low frequency electromagnetic fields (EMF) and brain cancer in adults and children: review and comment.
Neuro-oncol 1 (39): 212-220
- [48] Haas U (2002) Physik für Pharmazeuten und Mediziner.
in: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 6. Auflg.
- [49] Harms V (1998) Physik für Mediziner und Pharmazeuten.
in: Harms Verlag, Kiel, 14. Auflg.
- [50] Heikkinen P, Kosma VM, Huuskonen H, Komulainen H, Kumlin T, Penttilä I, Väänänen A, Juutilainen J (2001) Effects of 50 Hz magnetic fields on cancer induced by ionizing radiation in mice.
Int J Radiat Biol 77 (4): 483-495
- [51] Hellenthal W (1997) Physik für Pharmazeuten, Mediziner und Biologen.
in: Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 5. Auflg.
- [52] Hofman H (1986) Das elektromagnetische Feld – Theorie und grundlegende Anwendungen.
in: Springer-Verlag, Wien New York, 3. Auflg.
- [53] Isner JM (1996) Angiogenesis and collateral formation.
Gene Therapy 309-325
- [54] Iwasaka M, Miyakoshi J, Ueno S (2003) Magnetic field effects on assembly pattern of smooth muscle cells.
In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal 39: 120-123

-
- [55] Johansen C (2004) Electromagnetic fields and health effects – epidemiologic studies of cancer, diseases of the central nervous system and arrhythmia–related disease.
Scand J Work Environ Health 30: 1-30
- [56] Johansen C (2000) Exposure to electromagnetic fields and risk of central nervous disease in utility workers.
Epidemiology 11 (59): 539-543
- [57] Kesemenli CC, Subasi M, Kaya H, et al. (2003) The effects of electromagnetic field on distraction osteogenesis.
Yonsei Med J 44 (3): 385-391
- [58] Kim CB, Kesten R, Javier M, et al. (1997) Percutaneous method of laser transmyocardial revascularization.
Catheter Cardiovasc Diagn 40:233
- [59] Kipshidze N, Johnson WD, Haudenschild CC (1999) Therapeutic angiogenesis in patients with advanced coronary artery disease: Hype or hope?
J Invas Cardiol 11(10): 589-599
- [60] Kliukiene J, Tynes T, Andersen A (2004) Residential and occupational exposures to 50-Hz magnetic fields and breast cancer in women: a population-based study.
Am J Epidemiol 159 (9): 852-861
- [61] Köbbert C, Berndt A, Bierbaum T, Möllmann C, Sontag W, Dertinger H, Breithardt G, Plenz G, Sindermann JR: Influence of electric fields on proliferation of cultured vessel wall cells.
in: Vaskuläre Inflammation und endotheliale Dysfunktion, Herausgeber: Heinle H., Schulte H., von Eckardstein A., Köhler, Tübingen, 2005

-
- [62] Köbber C, Berndt A, Bierbaum T, Möllmann C, Sontag W, Dertinger H, Breithardt G, Plenz G, Sindermann JR (2004) In vitro-Studie zum Einfluss elektrischer Felder auf die Proliferation von Gefäßwandzellen: neue Perspektiven zur Induktion von Arterio-/Angiogenese. *Perfusion* 17/2: 88
- [63] Labreche F, Goldberg MS, Valois MF, Nadon L, Richardson L, Lakhani R, Latreille B (2003) Occupational exposures to extremely low frequency magnetic fields and postmenopausal breast cancer. *Am J Ind Med* 44 (6): 643-652
- [64] Landau C, Jacobs AK, Haudenschild CC (1995) Intrapericardial basic fibroblast growth factor induces myocardial angiogenesis in a rabbit model of chronic ischemia. *Am Heart J* 129 (5): 924-931
- [65] Lancet (1999) Exposure to power-frequency magnetic fields and the risk of childhood cancer. UK Childhood Cancer Study Investigators. *Lancet* 354 (9194): 1925-1931
- [66] Leisner S, Shahar R, Aizenberg I, Lichovsky D, Levin-Harrus T (2002) The effect of short-duration, high-intensity electromagnetic pulses on fresh ulnar fractures in rats. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 49 (1): 33-37
- [67] Lindström E, Lindström P, Berglund A, Lundgren E, Mild KH (1995) Intracellular calcium oscillations in a T-cell line after exposure to extremely-low-frequency magnetic fields with variable frequencies and flux densities. *Bioelectromagnetics* 16 (1): 41-47
- [68] Lindström E, Lindström P, Berglund A, Mild KH, Lundgren E (1993) Intracellular calcium oscillations induced in a T-cell line by weak 50 Hz magnetic field. *J Cell Physiol* 156 (2): 395-398
-

-
- [69] Litovitz TA, Montrose CJ, Wang W (1992) Dose-response implications of the transient nature of electromagnetic-field-induced bioeffects: Theoretical hypothesis and predictions.
Bioelectromagnetics S1: 237-246
- [70] Litovitz TA, Krause D, Mullins JM (1991) Effect of coherence time of the applied magnetic field on ornithine decarboxylase activity.
Biochem Biophys Res Commun 178 (3): 862-865
- [71] Löffler G, Petrides PE (1998) Biochemie und Pathobiochemie.
in: Springer-Verlag, Berlin New York Heidelberg, 6. Aufl.
- [72] Luben RA, Cain CD, Chi-Yun Chen M, Rosen D, Adey WR (1982) Effects of electromagnetic stimuli on bone and bone cells *in vitro*: Inhibition of responses to parathyroid hormone by low-energy low-frequency fields.
Proc Natl Acad Sci USA 79 (13): 4180-4184
- [73] Magnetfelder damals und heute.
<http://www.medizinfo.com/magnetfeldtherapie/geschichte.htm>
17.10.03
- [74] Marron MT, Goodman EM, Sharpe PT, Greenbaum B (1988) Low frequency electro and magnetic fields have different effects on the cell surface.
FEBS Lett 230: 13-16
- [75] Marron MT, Greenbaum B, Swanson JE, Goodman EM (1983) Cell surface effect of 60-Hz electromagnetic fields.
Radiat Res 94: 217-220
- [76] McCann J (1998) Cancer risk assessment of extremely low frequency electric and magnetic fields: a critical review of methodology.
Environ Health Perspect 106 (11): 701-717
- [77] Meschede D (2003) Gerthsen Physik.
in: Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 22. Aufl.
-

-
- [78] Mirhoseini M, Cayton MM, Shelgikar S, et al. (1986) Clinical report: Laser myocardial revascularization, *Lasers Surg Med* 6 (5): 459-461
- [79] Mossop BJ, Barr RC, Zaharoff DA, Yuan I (2004) Electric fields within cells as a function of membrane resistivity – a model study. *Trans Nanobioscience* 3 (3): 225-231
- [80] Moulder JE (1998) Power-frequency fields and cancer. *Crit Rev Biomed Eng* 26 (1-2): 1-116
- [81] Nagai M, Ota M (1994) Pulsating electromagnetic field stimulates mRNA expression of bone morphogenetic protein-2 and -4. *J Dent Res* 73: 1601-1605
- [82] Nakagawa K (1976) Magnetic field deficiency syndrome and magnetic treatment. *Japan Medical Journal* 2745
- [83] Orgaterm.de.
<http://www.orgaterm.de/magnetfeld/geschichte.html>
17.10.03
- [84] Pecher P, Schumacher B (2000) Angiogenesis in ischemic human myocardium: Clinical results after 3 years. *Ann Thorac Surg* 69 (5): 1414-1419
- [85] Pilla AA (2002) Low-intensity electromagnetic and mechanical modulation on bone growth and repair: are they equalent? *J Orthop Sci* 7 (3): 420-428
- [86] Qiu C, Fratiglioni L, Karp A, Winblad B, Bellander T (2004) Occupational exposure to electromagnetic fields and risk of Alzheimer´s disease. *Epidemiology* 15 (6): 687-694

-
- [87] Repacholi MH, Greenbaum B (1999) Interaction of static and extremely low frequency electric and magnetic fields with living systems: health effects and research needs.
Bioelectromagnetics 20: 133-160
- [88] Riessen R, Rahimizadeh H, Blessing E, Takeshita S, Barry JJ, Isner JM (1993) Arterial gene transfer using pure DNA applied directly to a hydrogel-coated angioplasty balloon.
Hum Gene Ther 4 (6): 749-758
- [89] Rinsky LA, Halpern A, Schurman DB, Bassett AL (1980) Electrical stimulation of experimentally produced avascular necrosis of the femoral head.
orthop trans 4: 238
Trans 26th Annu Meet Orthop Res Soc 5:131
- [90] Robinson KR (1985) The response of cells to electrical fields. A review.
J Cell Biol 101: 2023-2027
- [91] Rodan GA, Bourrett LA, Norton LA (1978) DNA synthesis in cartilage cells is stimulated by oscillating electric fields.
Science 199: 690-692
- [92] Rosenthal M, Obe G (1989) Effects of 50 Hz electromagnetic fields on proliferation and on chromosomal alterations in human peripheral lymphocytes untreated or pretreated with chemical mutagens.
Mutat Res 210 (2): 329-335
- [93] Savitz DA, Liao D, Sastre A, Kleckner RC, Kavet R (1999) Magnetic field exposure and cardiovascular disease mortality among electric utility workers.
Am J Epidemiol 149 (2): 135-142
- [94] Schimmelpfeng J, Dertinger H (1993) The action of 50 Hz magnetic and electric fields upon cell proliferation and cyclic AMP content of cultured mammalian cells.
Bioelectrochemistry and Bioenergetics 30: 143-150
-

-
- [95] Sen PK, Udwadia TE, Kinare SG, et al. (1965) Transmyocardial acupuncture: A new approach to myocardial revascularization.
J Thorac Cardiovasc Surg 50:181-189
- [96] Simko M, Mattsson MO (2004) Extremely low frequency electromagnetic fields as effectors of cellular responses in vitro: possible immune cell activation.
J Cell Biochem 93: 83-92
- [97] Takahashi K, Doge F, Yoshioka M (2005) Prolonged Ca²⁺ transients in ATP-stimulated endothelial cells exposed to 50 Hz electric fields.
Cell Biol Int 29 (3): 237-243
- [98] Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, et al. (1994) Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia.
Circulation 90 (5 Pt 2): II228-II234
- [99] Takeshita S, Weir L, Chen D, Zheng LP, et al. (1996) Therapeutic angiogenesis following arterial gene transfer of vascular endothelial growth factor in a rabbit model of hindlimb ischemia.
Biochem Biophys Res Commun 227 (2): 628-635
- [100] Tenforde TS, Kaune WT (1987) Interaction of extremely low frequency electric and magnetic fields with humans.
Health Phys 53 (6): 585-606
- [101] Tsong T, Chavin F, Astumian R in Blank M, Findl E (Eds) (1987) Mechanistic approaches to interactions electric and electromagnetic fields with living systems.
Plenum Press New York p 187
- [102] Tofani S, Barone D, Cintorine M, de Santi MM, Ferrara A, Orlassino r, Ossola P, Peroglio F, Rolfo K, Ronchetto F (2001) Static and ELF magnetic field induce tumor growth inhibition and apoptosis.
Bioelectromagnetics 22 (6): 419-428
-

-
- [103] Vineberg AM (1946) Development of anastomosis between coronary vessels and transplanted internal mammary artery.
Can Med Assoc J 55: 117
- [104] Von Meÿenn K. (Hrsg.) (1997) Die großen Physiker.
in: C.H. Beck'sche Verlagsbuchhandlung, München, Band I und II
- [105] WHO: What are electromagnetic fields?
<http://www.who.int/peh-emf/about/WhatisEMF/en/>
30.11.2005
- [106] Willett EV, McKinney PA, Fear NT, Cartwright RA, Roman E (2003)
Occupational exposure to electromagnetic fields and acute leucaemia: analysis of a case-control study.
Occup Environ Med 60 (8): 577-583
- [107] Wu RY, Chiang H, Hu GL, Zeng QL, Bao JL (2000) The effect of 50 Hz magnetic field on GCSmRNA expression in lymphoma B cell by mRNA differential display.
J Cellular Biochemistry 79 (3): 460-470
- [108] Yen-Patton GPA, Patton WF, Beer DM, Jacobson BS (1988) Endothelial cell response to pulsed electromagnetic fields: Stimulation of growth rate and angiogenesis in vitro.
J Cell Physiol 134: 37-46
- [109] Yamaguchi DT, Huang J, Ma D, Wang PK (2002) Inhibition of gap junction intercellular communication by extremely low-frequency electromagnetic fields on osteoblast models is dependent on cell differentiation.
J Cell Physiol 190 (2): 180-188
- [110] Yamamoto N, Kohomoto T, Gu A, De Rosa C, Smith CR, Burkhoff D (1998) Angiogenesis is enhanced in ischemic canine myocardium by transmural laser revascularization.
J Am Coll Cardiol 31 (6): 1426-1433
-

- [111] Zhou J, Yao G, Zhang J, Chang Z (2002) CREB DNA binding activation by a 50-Hz magnetic field in HL60 cells is dependent on extra- and intracellular Ca^{2+} but not PKA, PKC, ERK or p38 MAPK.
Biochem Biophys Res Commun 296 (4): 1013 ff.

Tanja Bierbaum

Persönliche Informationen

- n Geburtsdatum: 17.11.1979
- n Geburtsort: Bielefeld
- n Nationalität: deutsch
- n Familienstand: ledig
- n Eltern: Ulrich Bierbaum,
Ursula Bierbaum, geb. Knauer

Schulbildung

1986-1990	Brüder-Grimm-Grundschule, Bielefeld
1990-1999	Hans-Ehrenberg-Gymnasium, Bielefeld Abschluss allgemeine Hochschulreife

Studium

Oktober 1999	Beginn des Studiums der Medizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität, Münster
August 2001	Physikum an der WWU Münster
November 2001	Beginn der Dissertation an der WWU Münster in der Medizinischen Klinik und Poliklinik C, Institut für Arterioskleroseforschung
August 2002	1. Staatsexamen an der WWU Münster
August 2004	2. Staatsexamen an der WWU Münster
Oktober 2005	3. Staatsexamen an der WWU Münster
17. November 2005	Approbation

Münster, 22. Februar 2007

Danksagung

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jürgen Sindermann für die Bereitstellung des Themas, die Überlassung von Material und Arbeitsplatz und die stete Bereitschaft, mit Rat und Tat diese Arbeit zu begleiten.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Christiane Köbbert, die alle praktischen Probleme mit großem Engagement beseitigen half und deren immer freundliche und geduldige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sehr zur Entstehung der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Christa Möllmann, die mich während der Laborarbeiten ausgezeichnet unterstützt und betreut hat sowie bei Frau Jutta Leng für ihre unzähligen Tipps bei der praktischen Durchführung der Versuche.

Für die gute Zusammenarbeit und motivierende Atmosphäre danke ich allen Mitarbeitern der Medizinischen Klinik und Poliklinik C und dem Institut für Arterioskleroseforschung.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie, die mir diese Arbeit und das Studium erst ermöglicht haben und mir immer wieder unterstützend beigestanden haben. Besonders danke ich meiner Schwester Svenja Bierbaum, die unermüdlich Fragen zur wissenschaftlichen Verfassung dieser Arbeit mit wertvollen Hinweisen beantwortet hat.

Anhang

Tab. 2: Ergebnisse der Zellzählungen bei bov cSMC 24 h nach Magnetfeldexposition (Feldfrequenz 50 Hz) in Abhängigkeit des Expositionszeitraumes

MW: Mittelwert, Stabw: Standardabweichung

5 min	Kontrolle (=100%)	Magnet	Magnet prozentual
	14250	14400	112,9
	12450	13500	105,8
	11450	15850	124,2
	13750	13500	105,8
	10850	13750	107,8
	13800	15000	117,6
MW	12758,33	14333,33	112,3
Stabw	1395,86	946,40	7,42
T-Test (p)			0,049

15 min	Kontrolle (=100%)	Magnet	Magnet prozentual
	30100	30550	127,7
	26950	27100	113,3
	23750	29500	123,3
	24450	29850	124,8
	19250	35200	147,2
	19000	27750	116,0
MW	23916,67	29991,67	125,4
Stabw	4328,93	2866,60	11,99
T-Test (p)			0,019

30 min	Kontrolle (=100%)	Magnet	Magnet prozentual
	15750	22650	125,3
	16650	18750	103,7
	19050	21050	116,4
	19750	22500	124,4
	19500	22200	122,8
	17800	18500	102,3
MW	18083,33	20941,67	115,8
Stabw	1630,85	1881,87	10,41
T-Test (p)			0,019

Tab. 3: Ergebnisse der Zellzählungen bei bov cSMC 48 h nach Magnetfeldexposition (Feldfrequenz 50 Hz) in Abhängigkeit des Expositionszeitraumes

MW: Mittelwert, Stabw: Standardabweichung

5 min	Kontrolle (=100%)	Magnet	Magnet prozentual
	26150	27750	102,1
	23000	25150	92,5
	33600	21950	80,7
	31400	32600	119,9
	22350	26250	96,5
	26650	25350	93,2
MW	27191,67	26508,33	97,5
Stabw	4498,16	3540,68	13,02
T-Test (p)			0,776

15 min	Kontrolle (=100%)	Magnet	Magnet prozentual
	45000	52700	125,5
	38850	42450	101,1
	46800	52400	124,8
	38450	44950	107,0
	42800	44850	106,8
	40100	51550	122,7
MW	42000,00	48150,00	114,6
Stabw	3429,72	4559,50	10,86
T-Test (p)			0,026

30 min	Kontrolle (=100%)	Magnet	Magnet prozentual
	77150	84500	116,2
	73050	82550	113,5
	64600	68100	93,7
	87450	75400	103,7
	68300	72750	100,0
	65750	85000	116,9
MW	72716,67	78050,00	107,3
Stabw	8611,14	6989,56	9,61
T-Test (p)			0,267