

Gentoxizität nichtionisierender Strahlung

Auswirkungen von Mobilfunk- und Terahertzstrahlung
auf das Genom

Genotoxicity of non-ionizing radiation
Effects of mobile phone and terahertz radiation on the genome

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Graduate School of Life Sciences, Klasse Biomedizin
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Henning Hintzsche

aus Halle an der Saale

Würzburg, Januar 2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Elektromagnetische Strahlung	1
1.1.1. Grundlagen	1
1.1.2. Mobilfunkstrahlung	3
1.1.3. Terahertzstrahlung	4
1.2. Wirkungen auf biologische Systeme	5
1.3. Prüfung auf Genotoxizität	6
1.3.1. Comet Assay	6
1.3.2. Mikrokerntest	7
1.4. Mitosestörungen	9
1.5. Biomonitoring	11
1.6. Bisherige Untersuchungen	11
1.6.1. Mobilfunkbereich	11
1.6.2. Terahertzbereich	13
2. Zielsetzung	14
3. Material und Methoden	15
3.1. Material	15
3.1.1. Chemikalien und Reagenzien	15
3.1.2. Zelllinien	15
3.2. Methoden	16
3.2.1. Literaturrecherche	16
3.2.2. Zellkultur	17
3.2.2.1. A _L -Zellen	17
3.2.2.2. Primäre Fibroblasten	18
3.2.2.3. HaCaT-Zellen	18
3.2.3. Expositionen	19
3.2.3.1. Expositionen 900 MHz	19
3.2.3.2. Expositionen 0,106 THz	20
3.2.3.3. Expositionen 0,380 THz	22
3.2.3.4. Expositionen 2,520 THz	22
3.2.4. Genotoxizitätstests	25
3.2.4.1. Comet Assay	25
3.2.4.2. Mikrokerntest	26
3.2.5. Mitosestörungen	28
3.2.6. Biomonitoring	30
3.2.6.1. Probandenrekrutierung	30
3.2.6.2. Fragebogen	30
3.2.6.3. Probenentnahme und -aufbereitung	31
3.2.6.4. Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen	32
3.2.7. Statistik	33

4. Ergebnisse	34
4.1. Literaturrecherche	34
4.1.1. Übersichtsarbeiten	41
4.1.1.1. Literaturübersichten	41
4.1.1.2. Mechanismen	43
4.1.1.3. Programmbericht	44
4.1.2. Originalarbeiten	45
4.1.2.1. Isolierte Systeme	45
4.1.2.2. Mikroorganismen	48
4.1.2.3. Säugerzellsysteme	50
4.1.2.4. Blut(-zellen)	53
4.1.2.5. Tierstudien	56
4.2. Mobilfunkbereich	59
4.2.1. Expositionen in vitro	59
4.2.1.1. Kurzeitexpositionen	59
4.2.1.2. Langzeitexpositionen	64
4.2.2. Biomonitoring	66
4.2.2.1. Probandenbefragung	66
4.2.2.2. Mikrokerntest	68
4.3. Terahertzbereich	72
4.3.1. Comet Assay	72
4.3.2. Mikrokerntest	76
4.3.3. Mitosestörungen	84
5. Diskussion	88
5.1. Literaturrecherche	88
5.1.1. Übersichtsarbeiten	90
5.1.2. Originalarbeiten	90
5.2. Mobilfunkbereich	92
5.2.1. Expositionen in vitro	93
5.2.2. Biomonitoring	96
5.3. Terahertzbereich	99
5.3.1. Comet Assay	99
5.3.2. Mikrokerntest	100
5.3.3. Mitosestörungen	102
6. Zusammenfassung	104
7. Summary	107
8. Literaturverzeichnis	110
9. Ehrenwörtliche Erklärung	117

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µW	Mikrowatt
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
CBPI	Cytochalasin-B-Proliferationsindex
CD59	Cluster of differentiation 59
CHO	Chinese Hamster Ovary
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CW	Continuous Wave
d. h.	das heißt
Dipl.-Ing.	Diplom-Ingenieur
DK	doppelkernig
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNP	Dinitrophenyl
Dr.	Doktor
E. coli	Escherichia coli
ED ₅₀	Effektivdosis 50 %
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-Ethynyl-2'-desoxyuridine
EK	einkernig
et al.	et alii
etc.	et cetera
FIR	Ferninfrarot
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Gramm
GHz	Gigahertz
GSM	Global System for Mobile Communications

h	Stunde
He	Helium
Hz	Hertz
ICNIRP	International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection
ISDN	Isosorbiddinitrat
J	Joule
kg	Kilogramm
kHz	Kilohertz
km	Kilometer
l	Liter
LTE	Long Term Evolution
m	Meter
M	Molar
m ²	Quadratmeter
mA	Milliampere
mbar	Millibar
MHz	Megahertz
min	Minute
MK	mehrkernig
MK	Mikrokern
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMC	Mitomycin C
MMS	Methylmethansulfonat
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mW	Milliwatt
N ₂	Stickstoff
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
P	Puls, gepulst
PBS	phosphate buffered saline
PD	Privatdozent
PHA	Phytohämagglutinin
PHz	Petahertz
pm	Picometer

Prof.	Professor
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SEM	Standardfehler
t	Zeit
TCF	Trichlorfon
TEM	Transversal-elektromagnetisch
THz	Terahertz
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Umdrehung
U	Unit
UMTS	Universal Mobile Telecommunications System
V	Volt
VIN	Vinblastin
WLAN	Wireless Local Area Network

1. Einleitung

1.1. Elektromagnetische Strahlung

1.1.1. Grundlagen

Elektromagnetische Strahlung ist das physikalische Phänomen, das auftritt, wenn elektrische und magnetische Felder direkt miteinander gekoppelt sind und eine Welle bilden. Erstere entstehen immer dann, wenn zwischen Leitern Spannungsdifferenzen bestehen, letztere sind auf bewegte Ladungen zurückzuführen. Elektromagnetische Strahlung verhält sich immer auch wie Teilchen, diese werden Photonen genannt. Dies wird durch den sogenannten Welle-Teilchen-Dualismus beschrieben. Charakterisiert wird elektromagnetische Strahlung durch Ihre Frequenz bzw. die zugehörige Wellenlänge. Die Einheit der Frequenz ist das Hertz (Hz), dies gibt die Anzahl der Schwingungen pro Sekunde an [1]. Abbildung 1.1 illustriert die verschiedenen Frequenzbereiche mit ausgewählten technischen Anwendungen. Der Bereich der untersten Frequenzen bis zu 30 kHz wird als Niederfrequenz bezeichnet. Hauptanwendung in diesem Bereich ist der allgegenwärtige Wechselstrom. Dem schließt sich die Hochfrequenz an, die sich wiederum in Radiowellen (30 kHz bis 300 MHz) und Mikrowellen (300 MHz bis 300 GHz) untergliedern lässt. Erstere finden hauptsächlich bei Rundfunk und Fernsehen, aber u. a. auch bei der Hochfrequenz-Chirurgie, Anwendung, letztere beispielsweise bei Radareinrichtungen und Mikrowellenherden. In den letzten zwei Jahrzehnten werden Mikrowellen in immer steigendem Maße auch zur Telekommunikation eingesetzt, beispielsweise bei Mobilfunk, Bluetooth und WLAN. Im Grenzbereich zwischen Hochfrequenz und optischer Strahlung befindet sich die Terahertzstrahlung (0,1 THz bis 10 THz). Diese wird für Spektroskopie und Materialprüfungen eingesetzt, in naher Zukunft auch in der Sicherheitstechnik und medizinischen Bildgebung. Bei höheren Frequenzen wird

1. Einleitung

elektromagnetische Strahlung üblicherweise nicht mehr mit Hilfe der Frequenz, sondern mit ihrer Wellenlänge beschrieben. Die optische Strahlung untergliedert sich in Infrarotlicht (3 mm bis 780 nm), sichtbares Licht (780 nm bis 380 nm) und UV-Strahlung (380 nm bis 1 nm).

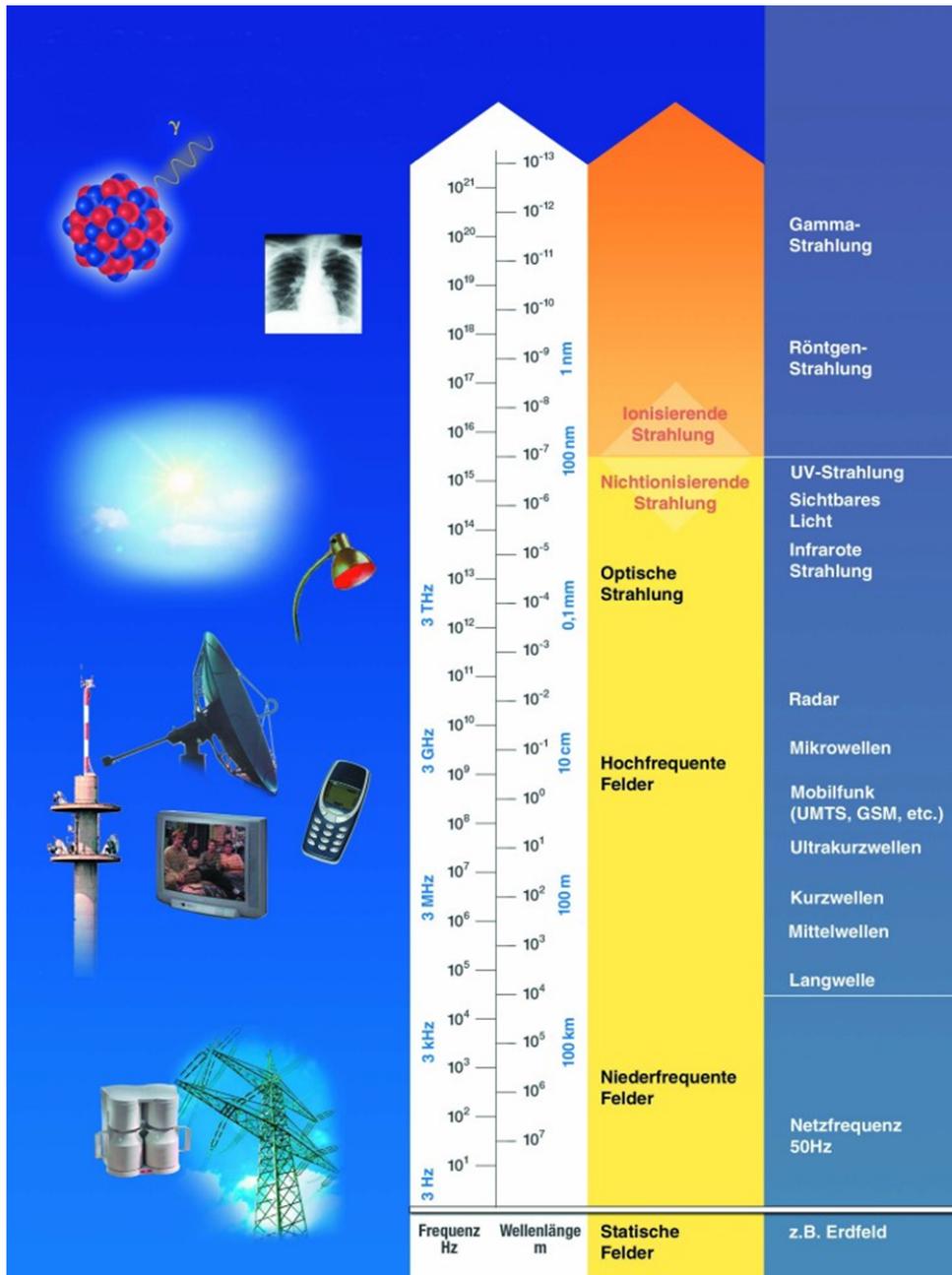


Abb. 1.1: Darstellung des elektromagnetischen Spektrums. Quelle: Bundesamt für Strahlenschutz.

Weiterhin finden sich bei noch kürzeren Wellenlängen die Röntgenstrahlen (1 nm bis 1 pm), die in der medizinischen Diagnostik eine wichtige Rolle spielen, und die γ -Strahlen (< 1 pm), die z. B. in der Strahlentherapie eingesetzt werden.

Es ist wichtig, zwischen ionisierender und nichtionisierender Strahlung zu unterscheiden. Zur ionisierenden Strahlung gehören Röntgen- und γ -Strahlung und ein Teil der UV-Strahlung. Die Quantenenergie dieser Strahlung, d. h. die Energie eines einzelnen Photons, reicht aus, um ein Elektron aus einem Atom oder einem Molekül herauszulösen. Dies führt zu Ionisierung und kann zur Folge haben, dass chemische Bindungen gelöst werden. Im Gegensatz dazu reicht die Quantenenergie der nichtionisierenden Strahlung nicht dafür aus, d. h. sie kann chemische Bindungen nicht direkt lösen.

1.1.2. Mobilfunkstrahlung

Mobiltelefone werden heutzutage weltweit ausgiebig verwendet. Laut dem European Information Technology Observatory gab es im Jahr 2009 mehr als vier Milliarden mobile Telefonanschlüsse. Besonders in Schwellenländern wie Indien oder China sind die Wachstumsraten in diesem Bereich nach wie vor sehr hoch. Aber auch in Westeuropa oder Nordamerika wachsen die Märkte weiter, obwohl die sogenannte Penetrationsrate (Anzahl der Mobilfunkanschlüsse je Einwohner) bereits 100 % übersteigt. Insbesondere junge Menschen verwenden Mobiltelefone heutzutage nicht nur für Telefonate, sondern auch für Kurznachrichten, Datenübertragung, Online-Spiele oder andere Anwendungen [2].

Die eingesetzte Technologie basiert auf der Verwendung elektromagnetischer Strahlung im Mikrowellenbereich. Die Frequenz und der Modulations-Standard unterscheiden sich je nach Weltregion. In Deutschland werden Standards der sogenannten zweiten und dritten Generation eingesetzt. Der wichtigste Standard der

zweiten Generation ist das „Global System For Mobile Communications“ (GSM), bei dem Frequenzen um 900 MHz und 1.800 MHz verwendet werden. Über die Welt verteilt wird dieses System in über 670 Netzwerken in weit mehr als 150 Ländern eingesetzt. Höhere Frequenzen von etwa 2.100 MHz kommen bei dem gebräuchlichsten Standard der dritten Generation „Universal Mobile Telecommunication System“ (UMTS) zur Anwendung. Dieses System wird in über 100 Ländern eingesetzt. Darüber hinaus wurde im Jahr 2010 begonnen, den Standard der vierten Generation „Long Term Evolution“ (LTE) einzuführen, allerdings ist dieser bisher nur in wenigen Ländern verfügbar. Für alle verwendeten Frequenzen (bis zu 300 GHz, d. h. 300.000 MHz) hat die Internationale Kommission zum Schutz vor nichtionisierender Strahlung (ICNIRP) Leitlinien zur Grenzwertfestlegung aufgestellt, die von vielen Ländern in nationale Regularien aufgenommen wurden [3].

1.1.3. Terahertzstrahlung

Terahertzstrahlung wird üblicherweise als elektromagnetische Strahlung im Frequenzbereich von 0,1 bis 10 THz definiert. Die Strahlung ist bereits seit langem bekannt, war jedoch über Jahrzehnte technisch nicht nutzbar, da geeignete Strahlungsquellen und Detektoren nicht zur Verfügung standen [4]. Während der letzten zwanzig Jahre konnten diese Probleme gelöst werden, so dass diese Technologie nun zum Einsatz kommen kann. Mögliche Anwendungen sind In-Prozess-Kontrollen im industriellen Herstellungsbereich, Sicherheits-Scanner, Datenübertragung und medizinische Bildgebung [5-7]. Es ist offensichtlich, dass diese Anwendungen eine Exposition von Menschen mit sich bringen werden. Aus diesem Grund wurde bereits vor einigen Jahren die Frage nach Sicherheits-Richtlinien und der zugehörigen Risikobewertung gestellt, jedoch bisher nicht ausreichend beantwortet [8, 9].

1.2. Wirkungen auf biologische Systeme

Auswirkungen von Hochfrequenzstrahlung auf biologische Systeme auf allen Ebenen, d. h. von einzelnen Biomolekülen bis zum kompletten Organismus, werden seit langem sowohl in der Bevölkerung als auch innerhalb der Wissenschaft kontrovers diskutiert. Diese Diskussion ist dabei beinahe genauso alt wie die technische Nutzung elektromagnetischer Felder [10]. Mehrere epidemiologische Studien haben den Zusammenhang zwischen Mobilfunknutzung und Krebs untersucht, führten allerdings nicht immer zu konsistenten Ergebnissen. Während einige Autoren einen Zusammenhang sehen [11], konnte die Mehrzahl diesen bisher nicht bestätigen [12-14].

Es wurden Studien durchgeführt, die Veränderungen bei Enzymaktivitäten feststellten [15, 16], andere Studien beobachteten keine Änderungen [17]. Widersprüchliche Ergebnisse wurden auch für Zellproliferation [18, 19], Produktion reaktiver Sauerstoffspezies [20, 21] und viele andere biologische Parameter geschildert. Einzelne Wirkungen konnten mehrfach gezeigt und bestätigt werden, beispielsweise Mitosestörungen [22-24].

Mehr als 100 Studien widmeten sich der Frage, ob Hochfrequenzstrahlung Auswirkungen auf die DNA haben könnte. Genexpressionsstudien haben teilweise Veränderungen gezeigt, während ähnlich durchgeführte Untersuchungen dies nicht bestätigten und keine Änderungen fanden [25]. Einzelne Studien berichteten von genotoxischen Effekten [26, 27], die Mehrheit der Publikationen zeigte aber, dass keine Effekte beobachtet werden können [17, 28, 29]. Mehrere Literaturübersichten zu diesem Thema bestätigen diese Aussagen [30-33].

Auch für höhere Frequenzbereiche ab einigen GHz bis zu 100 GHz (0,1 THz) sind zahlreiche Untersuchungen durchgeführt worden, einige Übersichtsartikel haben diese Ergebnisse zusammengefasst [34, 35]. Allerdings befindet sich bei noch höheren Frequenzen, noch vor dem wiederum gut untersuchten Infrarotbereich, die sogenannte Terahertz-Lücke. Diese Bezeichnung stammte ursprünglich daher, dass

es lange keine technischen Anwendungen in diesem Bereich gab. Aus technischer Sicht ist diese Lücke mittlerweile zwar geschlossen, in Bezug auf Studien zu Wirkungen auf biologische Systeme besteht sie aber nach wie vor. Nur sehr wenige Untersuchungen wurden bisher publiziert und alle verfügbaren Literaturübersichten [36-38] umfassen nur einen kleinen Ausschnitt dieser Untersuchungen, eine vollständige Auflistung fehlte bisher.

1.3. Prüfung auf Gentoxizität

1.3.1. Comet Assay

Der Comet Assay (auch Einzelzellgelelektrophorese genannt) ist eine Methode zur Bestimmung des DNA-Schadens auf Einzelzellniveau [39]. Er wurde 1984 in seiner neutralen Variante entwickelt [40], ist aber heute in seiner später etablierten basischen Variante gebräuchlich [41]. Er detektiert Einzel- und Doppelstrangbrüche und sogenannte alkalilabile Stellen. Untersucht wird immer eine Einzelzellsuspension, die aus dem zu untersuchenden System gewonnen werden muss. Die Zellen werden in einer Agarose-Suspension auf einen Objektträger gebracht und lysiert, so dass nur der kompakte Zellkern übrig bleibt. Anschließend werden die Kerne einer Elektrophorese unterzogen. DNA-Fragmente, die durch Strangbrüche entstanden sind, wandern aufgrund ihrer geringeren Größe im elektrischen Feld schneller als der Hauptkern. Dadurch ergibt sich mikroskopisch das charakteristische Bild eines Kometen, bei dem die DNA-Moleküle im Hauptkern den Kometenkopf und die Fragmente den Kometenschweif darstellen. Der Comet Assay ist eine weltweit anerkannte Methode der Gentoxizitätsprüfung [42].

1.3.2. Mikrokerntest

Der Mikrokerntest ist ein seit langem etabliertes Verfahren zur Messung von DNA-Schäden [43, 44]. Er wurde ursprünglich von Boller und Schmid entwickelt [45] und später durch die Verwendung von Cytochalasin B von Fenech und Morley deutlich verbessert [46]. Er quantifiziert das Auftreten kleiner nuklearer Strukturen, die Mikrokerne genannt werden. Sie enthalten entweder gebrochene Chromosomenfragmente im Falle eines klastogenen Agens oder komplette Chromosomen im Falle eines aneugenen Agens. Normalerweise entstehen die Mikrokerne während der Mitose wenn Chromosomen oder deren Bruchstücke nicht vom Spindelapparat erfasst und somit nicht korrekt auf die Tochterzellkerne aufgeteilt werden (Abb. 1.2). Das experimentelle Vorgehen wurde in umfangreiche Ringversuchen für Lymphozyten und Zelllinien validiert und standardisiert [43, 47-51]. Der Mikrokerntest stellt einen guten Indikator test dar, weil die Mikrokernelnfrequenz in peripheren Lymphozyten direkt mit dem Risiko für Krebs und Herz-Kreislauf-Erkrankungen korreliert [52-54]. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass das Auftreten weiterer nuklearer Anomalien, wie z. B. Brücken zwischen zwei Kernen oder Kernblasen, sinnvoll ausgewertet werden kann, wodurch sich der Mikrokerntest als ein „Zytopom“-Test betrachten lässt [55].

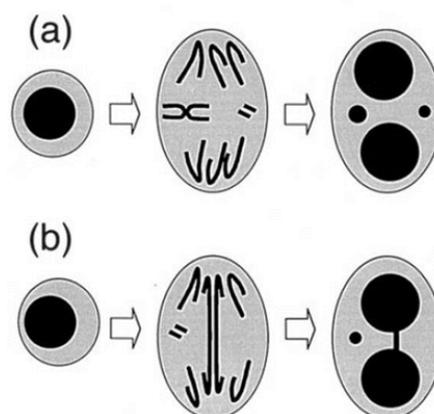


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Mikrokernteststehung (a) und der Formierung einer Brücke zwischen zwei Kernen (b). Modifiziert nach [56].

Mikrokerne können auch in leicht zugänglichen Zellen verschiedener Epithelgewebe ausgewertet werden [57], besonders in Mundschleimhautzellen [58, 59]. Diese Technik wurde von Stich et al. entwickelt [60, 61] und wird derzeit in internationalen Versuchen validiert und harmonisiert [62, 63]. Der Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen wurde bisher eingesetzt, um die Einflüsse verschiedenster Faktoren auf die genomische Stabilität zu untersuchen. Dazu gehören beispielsweise maligne Erkrankungen [64], Pestizide [65], Rauchen [66] und viele andere.

Neben den Vorteilen der schnellen und einfachen Probengewinnung ist der Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen besonders geeignet, mögliche Effekte von Mobilfunkstrahlung zu untersuchen, da sich die Mundhöhle direkt in der Expositionszone, die beim Telefonieren betroffen ist, befindet. Außer der vorliegenden Arbeit [29] untersuchte bisher weltweit nur eine Studie den Einfluss von Mobilfunkstrahlung auf die genomische Stabilität in Mundschleimhautzellen [27]. Die Autoren berichten von einer Erhöhung der Mikrokernfrequenz auf mehr als das Doppelte bei Mobilfunknutzern im Vergleich zu Nichtnutzern. Darüber hinaus wurde auch eine Zunahme der Mikrokerne mit längerer Gesamtnutzungsdauer beschrieben. Ziel eines Teiles der vorliegenden Arbeit war es, zu überprüfen, ob diese Resultate in einer größeren Studienpopulation unter Auswertung einer größeren Zellzahl und der Verwendung einer anderen, DNA-spezifischen Färbemethodik reproduziert werden können.

1.4. Mitosestörungen

Da die Mikrokernformierung hauptsächlich während der Mitose stattfindet, ist es sinnvoll, im Zusammenhang mit diesen Gentoxizitätsprüfungen auch den Ablauf der Mitose zu untersuchen. Es handelt sich hierbei um die Phase des Zellzyklus, in dem sich sowohl der Zellkern als auch die gesamte Zelle in zwei Tochterzellen bzw. -kerne aufteilt. Die Kernteilung erfolgt dabei in mehreren Phasen (Abb. 1.3). Die Chromosomen kondensieren in der Prophase und ordnen sich während der Metaphase in der Mitte der Zelle in der Äquatorialebene an. In der Anaphase werden die Schwesterchromatiden getrennt und auseinandergezogen. In der abschließenden Telophase dekondensieren die Chromosomen wieder, die Kernhülle bildet sich und die Zytokinese, d. h. die Teilung der Zelle beginnt.

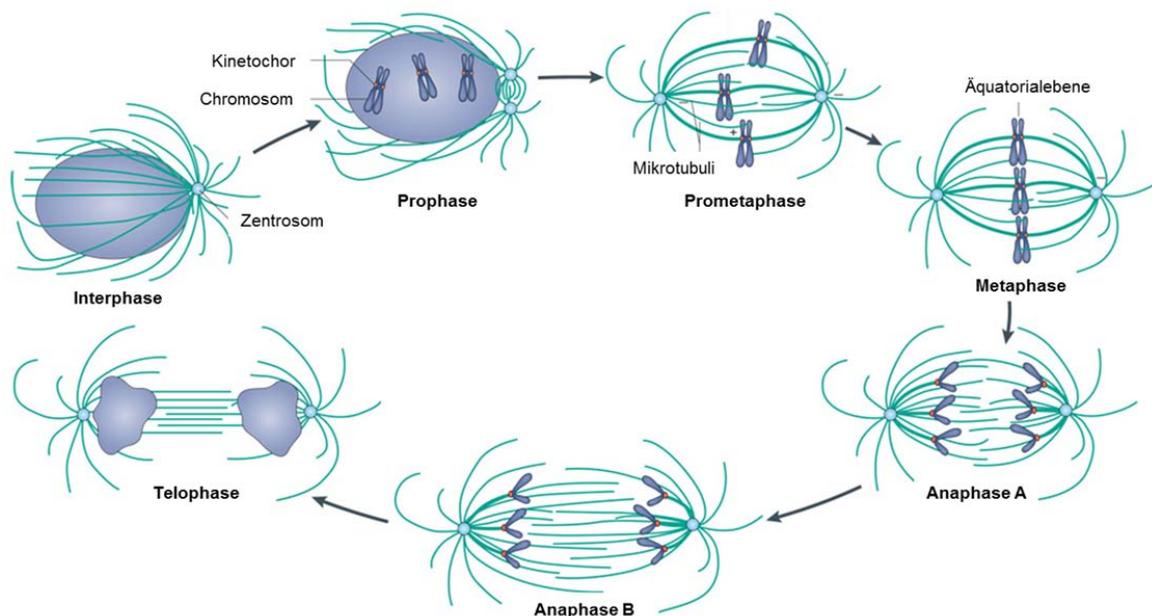


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der einzelnen Phasen bzw. des Ablaufs der Mitose. Modifiziert nach [67].

Läuft die Zellteilung nicht ordnungsgemäß ab, kommt es zu Mitosestörungen, die sich als Fehlverteilungen der Chromosomen äußern und mikroskopisch nachgewiesen werden können [68]. Dabei kann zwischen verschiedenen Arten von Störungen

unterschieden werden (Abb. 1.4). Mitosestörungen sind ein Phänomen von großer Bedeutung für den menschlichen Organismus, da sie sowohl zu Mikrokernbildung als auch zu Aneuploidie führen können, die wiederum mit der Krebsentstehung assoziiert ist [69].

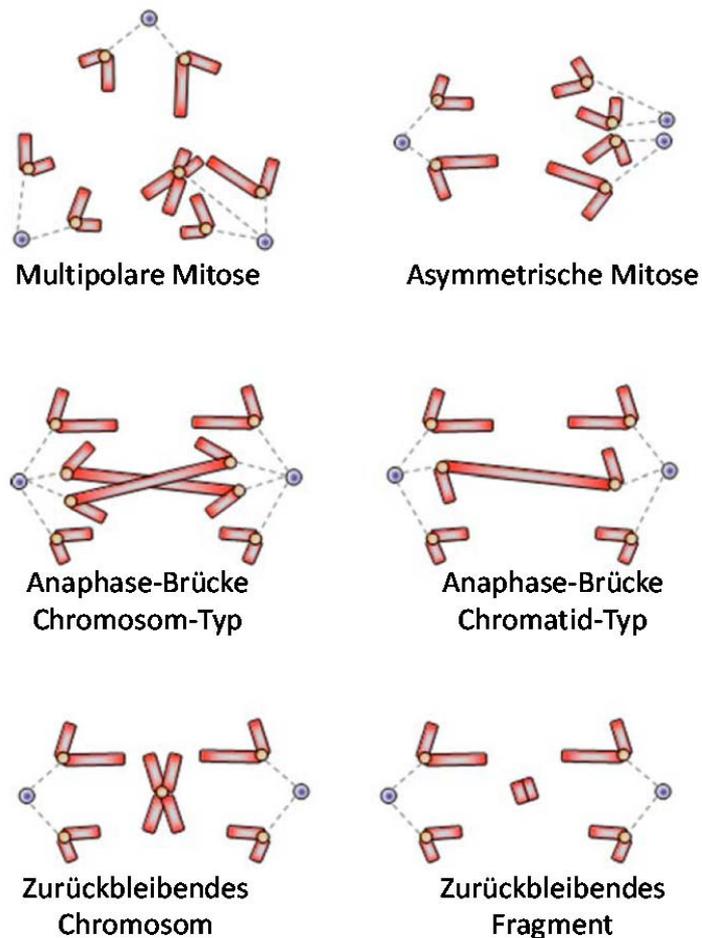


Abb. 1.4: Schematische Darstellung verschiedener Arten von Mitosestörungen. Chromosomen in Rot, Zentromer in Gelb, Zentrosom in Blau. Modifiziert nach [68].

Neben vielen anderen Agenzien ist auch elektromagnetische Strahlung im Mikrowellenbereich als möglicher Auslöser von derartigen Mitosestörungen beschrieben worden [22, 23, 70].

1.5. Biomonitoring

Unter Biomonitoring versteht man das Beobachten und Überwachen biologischer Systeme [71, 72]. In der Ökologie bedeutet dies, bestimmte Eigenschaften von Pflanzen und Tieren zu bestimmen und gegebenenfalls Änderungen festzustellen. In der Arbeits- und Umweltmedizin werden Auswirkungen auf den Menschen untersucht. Klassischerweise werden hierbei die Konzentrationen unterschiedlicher Schadstoffe in humanen Proben analysiert. Hierbei wird die Exposition, von der anschließend auf eine Wirkung geschlossen werden kann, genau untersucht. Es ist aber auch möglich, in Biomonitoring-Studien die Folgen einer Exposition direkt zu bestimmen, etwa indem Konzentrationsänderungen endogener Substanzen bestimmt oder Veränderungen auf Protein- oder Genomebene untersucht werden. Ein Beispiel für ein solches Verfahren ist der Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen [62, 73].

1.6. Bisherige Untersuchungen

1.6.1. Mobilfunkbereich

Auswirkungen elektromagnetischer Wellen, besonders im Hochfrequenzbereich, auf biologische Systeme werden bereits seit langem untersucht. Schon Ende des 19. Jahrhunderts wurden entsprechende Studien durchgeführt [10]. Bald kamen auch die beim Mobilfunk verwendeten Mikrowellen in den Fokus der Untersuchungen. Zu Beginn des 20. Jahrhunderts stand dabei die Suche nach neuen Therapiemöglichkeiten mit Hilfe elektromagnetischer Felder im Mittelpunkt. Nach 1945 änderte sich der Forschungsschwerpunkt und es wurden hauptsächlich Auswirkungen von Radar-Geräten untersucht [74-76]. Nach der Einführung des

Mobilfunks wurde schließlich eine große Zahl an Studien durchgeführt, um festzustellen, ob die hierbei verwendete Strahlung Auswirkungen auf biologische Systeme haben kann. Eine kontinuierlich aktualisierte Übersicht mit Hintergrundinformationen findet sich unter <http://www.emf-portal.de> (Abb. 1.5).

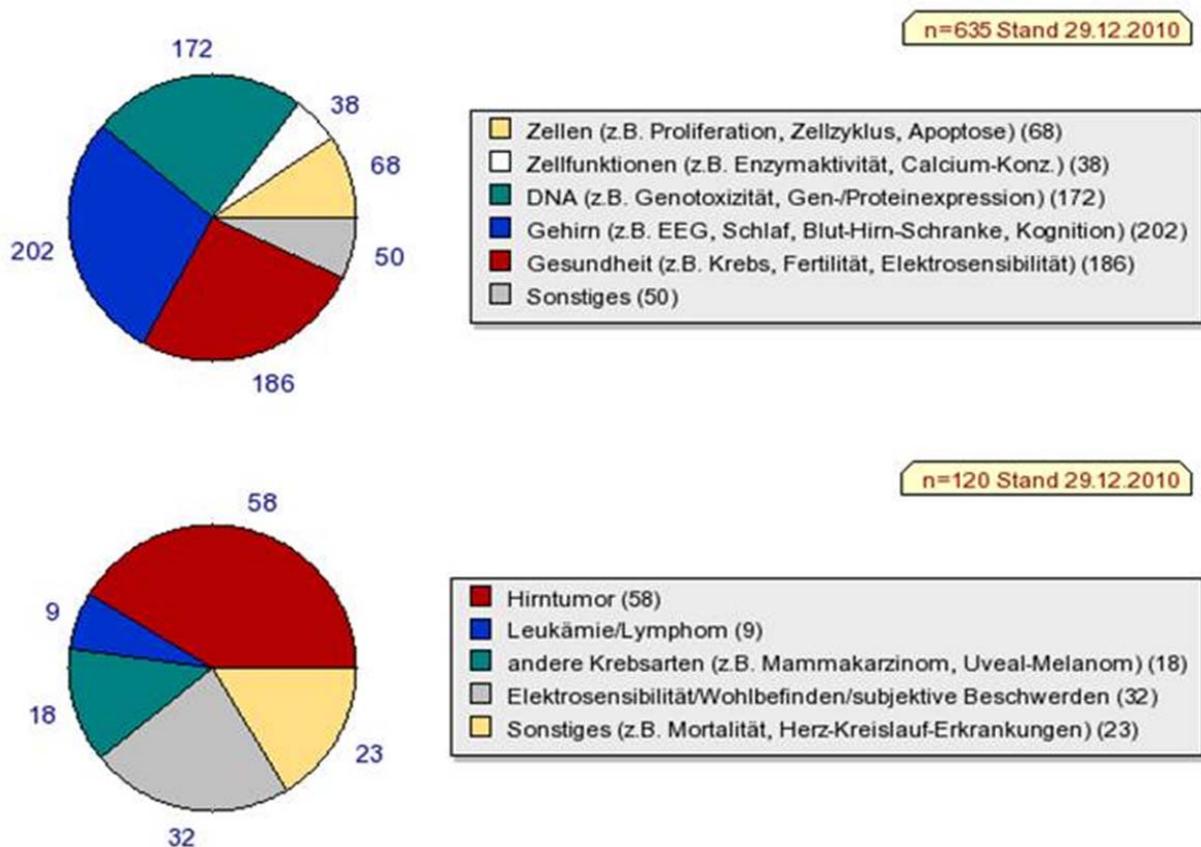


Abb. 1.5: Im EMF-Portal aufgearbeitete Studien mit Mobilfunk-Relevanz, untergliedert in experimentelle (oben) und epidemiologische (unten) Arbeiten. Quelle: EMF-Portal.

Der primäre Wirkmechanismus bei der Interaktion zwischen Mikrowellen und Zellen bzw. Gewebe ist die Erwärmung. Daneben sind auch nicht-thermische Interaktionen bekannt, die jedoch nur bei extrem hohen Leistungsflussdichten auftreten. Diese Mechanismen sind seit längerem bekannt und gut untersucht [77]. Es sind zahlreiche Untersuchungen auf unterschiedlichen biologischen Ebenen durchgeführt worden, die überwiegend zeigten, dass die beim Mobilfunk verwendeten Leistungsflussdichten keine biologischen Wirkungen verursachen können [28, 29, 32, 33, 78]. Auch epidemiologische Studien zeigten bisher keine konsistenten Assoziationen

verschiedener Erkrankungen mit elektromagnetischen Feldern [12-14]. Dennoch wurde immer wieder von nicht-thermischen Wirkungen bei niedrigen Leistungsflussdichten berichtet. Auch wenn diese Befunde bisher in keinem Fall unabhängig reproduziert werden konnten, kann daher noch nicht von einem wissenschaftlichen Konsens gesprochen werden.

1.6.2. Terahertzbereich

Im Gegensatz zum Mobilfunkbereich ist der Terahertzbereich bisher mit Blick auf Auswirkungen auf biologische Systeme kaum untersucht. Die Ursache ist, dass es bis vor wenigen Jahren nicht gelungen war, geeignete Strahlungsquellen und Detektoren zu konstruieren, die Bestrahlungen unter genau kontrollierten Bedingungen ermöglichten. Mittlerweile sind diese Schwierigkeiten überwunden und Anwendungen dieser Technologie sind in Entwicklung bzw. wurden bereits etabliert [4, 79, 80]. Diese Entwicklung ermöglicht Expositionsexperimente nun einerseits, macht diese andererseits aber auch unentbehrlich, da die entwickelten Anwendungen häufig eine Exposition der Bevölkerung mit sich bringen.

Im Zeitraum von 1960 bis 2000 wurden nur vereinzelt derartige Studien durchgeführt. In den letzten zehn Jahren wurden deutlich mehr Arbeiten zu diesem Thema publiziert, einen besonders großen Beitrag leistete hier das von der Europäischen Union geförderte Projekt THz-Bridge [81]. Dennoch sind viele Fragen nach wie vor nicht geklärt. So ist der höhere Frequenzbereich von 4 bis 10 THz nicht untersucht. Außerdem sind fast alle bisherigen Studien in-vitro-Untersuchungen. Qualitativ hochwertige Tierstudien sind bisher nicht durchgeführt wurden, Humanstudien fehlen völlig. In den Kapiteln 4.1. und 5.1. findet sich eine detaillierte Beschreibung und Bewertung aller Untersuchungen.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob nichtionisierende elektromagnetische Strahlung DNA-Schäden in biologischen Systemen verursachen kann. Der Fokus der Untersuchungen lag dabei auf dem Mobilfunk- (900 - 2.100 MHz) und Terahertzbereich (0,1 - 10 THz).

Dazu sollte im Mobilfunkbereich festgestellt werden, ob die Nutzung des Mobilfunks mit DNA-Schäden in menschlichen Mundschleimhautzellen assoziiert ist und ob definierte Strahlung einer Frequenz von 900 MHz bei unterschiedlichen Expositionsbedingungen in vitro zu DNA-Schäden in verschiedenen Zellsorten führt.

Im Terahertzbereich sollte geprüft werden, ob Expositionen bei 0,106, 0,380 und 2,520 THz DNA-Schäden oder andere Veränderungen verursachen.

Ziel war es weiterhin, die erste umfassende Literaturübersicht zu erstellen, die alle bisher veröffentlichten Arbeiten, die sich mit Auswirkungen von Terahertzstrahlung auf biologische Systeme beschäftigen, umfasst.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Soweit im Text nicht anders angegeben, wurden alle Chemikalien von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), PAA (Pasching, Österreich) oder Invitrogen Life Technologies (Darmstadt) bezogen.

3.1.2. Zelllinien

Die A_L-Zellen wurden von Prof. Dr. E. Schmid (Universität München) zur Verfügung gestellt. Diese enthalten neben einem Chromosomensatz von 20 Chromosomen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) zusätzlich das humane Chromosom 11, das u. a. für das Oberflächenprotein CD59 codiert [82]. Aufgrund dieser Eigenschaft können diese Zellen z. B. für Mutationsstudien verwendet werden. HaCaT-Zellen, eine immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie wurde von Cell Line Service (CLS), Eppelheim, bezogen. Die Zellen wurden ursprünglich von der Peripherie eines humanen (HaCaT) Melanoms isoliert und zu Beginn bei niedrigem Calcium-Spiegel (HaCaT) und leicht erhöhter Temperatur (HaCaT) kultiviert [83]. Ohne tumorigen zu sein sind die Zellen unter diesen Bedingungen spontan immortalisiert. Weiterhin wurden humane dermale Fibroblasten (HDF) verwendet, die von Greiner BioOne (Kremsmünster, Österreich) bezogen wurden.

3.2. Methoden

3.2.1. Literaturrecherche

Für die Literaturrecherche wurden die Datenbanken Medline und Web of Science mit verschiedenen Suchbegriffen wie „terahertz“ oder „submillimeter“ durchsucht. Alle Studien, die Wirkungen auf biologische Systeme, verursacht durch elektromagnetische Strahlung der Frequenz 0,1 THz bis 10 THz, untersuchten, wurden in den Datensatz aufgenommen. Arbeiten, die Frequenzen außerhalb dieses Bereiches untersuchten, wurden mit aufgenommen, wenn sie außerdem mindestens eine Frequenz im Terahertzbereich verwendeten. Es wurden nur Publikationen aufgenommen, die sich mit Wirkungen, d. h. funktionalen Effekten, beschäftigten; rein spektroskopische Untersuchungen sind nicht Gegenstand dieser Übersicht. Jede identifizierte Arbeit wurde anschließend daraufhin analysiert, welche Untersuchungen zitiert wurden und welche Publikationen die identifizierte Arbeit als Referenz zitierten. Gegebenenfalls wurden die so gefundenen Arbeiten auch in den Datensatz aufgenommen.

Um eine umfassende Liste an Arbeiten zu präsentieren, wurden keine Beschränkungen in Bezug auf Publikationsdatum, biologische Ebene oder andere Parameter vorgenommen. Es wurden nicht ausschließlich Arbeiten aus Zeitschriften mit Gutachter-System („peer review“), sondern auch andere Publikationen, wie z. B. Konferenzberichte, aufgenommen. Aufnahmekriterien waren jedoch, dass die Arbeit in englischer Sprache vorlag und dass die Versuche über den üblichen Rahmen einer Kurzzusammenfassung („abstract“) hinaus beschrieben waren. Der so gewonnene Datensatz enthält alle bis zum Oktober 2010 verfügbaren Publikationen.

Alle experimentellen Arbeiten wurden mindestens mit den Parametern biologisches System, untersuchter Endpunkt, Frequenz, Expositionszeit und Leistungsflussdichte beschrieben. Die Angaben zur Leistungsflussdichten in mW/cm^2 wurden, sofern möglich, direkt aus der Publikation entnommen, andernfalls wurden sie aus den

angegebenen Daten (Leistung, Energie oder Strahlcharakteristika) umgerechnet oder abgeschätzt. War dies nicht möglich, wurde die Dosimetrie in Abhängigkeit von angegebenen Details in der Form der Leistung oder Energie beschrieben. Modulationsart und -frequenz sowie Strahlungsquellen wurden nicht tiefergehend analysiert, da die Unterschiede bei diesen Parametern für einen sinnvollen Vergleich zu groß sind.

3.2.2. Zellkultur

Alle Zellsorten wurden bei 37 °C in einer feuchten Atmosphäre (5 % CO₂, 95 % Luft) inkubiert. Die Zellen wurden nach dem Auftauen 2 - 3 Mal pro Woche passagiert.

3.2.2.1. A_L-Zellen

Die Zellen wurden als adhärente Zellen in RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 15 % Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und Antibiotika (50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin) kultiviert.

Zur Subkultivierung wurden die Zellen nach Waschen mit PBS durch fünfminütige Inkubation (37 °C) mit 1 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Dieser Prozess wurde durch die Zugabe von mindestens 2 ml Medium beendet. Die Zellen wurden gezählt und eine entsprechende Menge wurde für die neue Kultur bzw. für Experimente neu ausgesät.

3.2.2.2. Primäre Fibroblasten

Die Zellen wurden als adhärenente Zellen in DMEM-Medium (4,5 g/l Glucose) unter Zusatz von 15 % Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und Antibiotika (50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin) kultiviert.

Zur Subkultivierung wurden die Zellen nach Waschen mit PBS durch fünfminütige Inkubation (37 °C) mit 1 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Dieser Prozess wurde durch die Zugabe von mindestens 2 ml Medium beendet. Die Zellen wurden gezählt und eine entsprechende Menge wurde für die neue Kultur bzw. für Experimente neu ausgesät. Nach dem Auftauen wurden die Fibroblasten nicht mehr als zehnmal subkultiviert.

3.2.2.3. HaCaT-Zellen

Die Zellen wurden als adhärenente Zellen in DMEM-Medium (4,5 g/l Glucose) unter Zusatz von 10 % Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und Antibiotika (50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin) kultiviert.

Zur Subkultivierung wurden die Zellen nach Waschen mit PBS-EDTA (0,05 % EDTA in PBS) und zehnminütiger Präinkubation mit PBS-EDTA (37 °C) durch fünfminütige Inkubation (37 °C) mit 1 ml Trypsin-EDTA abgelöst. Dieser Prozess wurde durch die Zugabe von mindestens 2 ml Medium beendet. Durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette wurden die Zellen vereinzelt, da sie andernfalls dazu tendierten, Agglomerate zu bilden. Die Zellen wurden gezählt und eine entsprechende Menge wurde für die neue Kultur bzw. für Experimente neu ausgesät.

3.2.3. Expositionen

3.2.3.1. Expositionen 900 MHz

Expositionen bei 900 MHz wurden in einer μ -TEM-Zelle (TEM: Transversal-elektromagnetisch) durchgeführt. Der Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt. Zunächst wurden elektromagnetische Wellen einer Frequenz von 900 MHz in einem Signalgenerator (Rohde & Schwarz, München) erzeugt und verstärkt (Amplifier Research). Die Leistung wurde mit Hilfe eines Polytec RK-5720 Power Radiometers bestimmt. Die Temperatur der μ -TEM-Zelle wurde durch ein Peltier-Element konstant bei 37 °C gehalten.

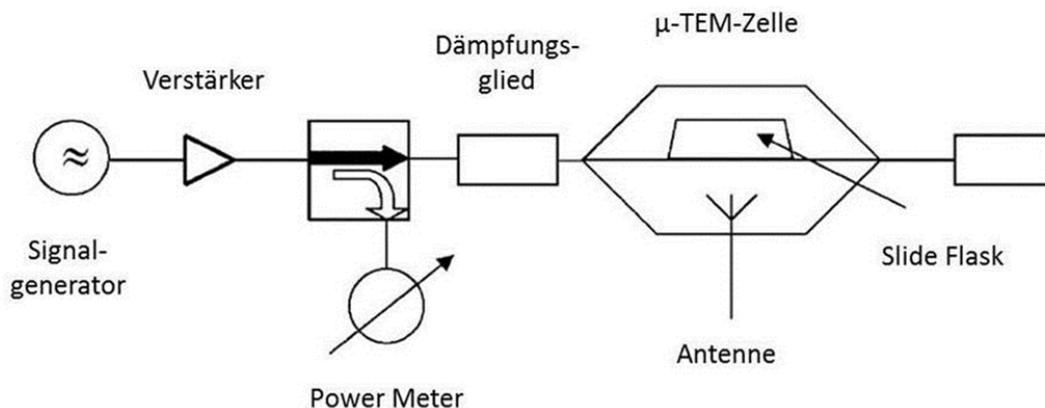


Abb. 3.1: Schematische Darstellung des Expositionsaufbaus bei 900 MHz. Modifiziert nach [24].

Für jedes Experiment wurde ein Aliquot eingefrorener Zellen aufgetaut und in normalen Zellkulturgefäßen kultiviert. Nach einer Inkubation von mindestens 72 Stunden wurden die Zellen in sogenannten Slide Flasks, d. h. Objektträger mit aufgebrachtten Zellkulturkammern ausgesät (Nunc, Langenselbold). Dies ermöglichte, die Zellen direkt auf den Objektträgern zu kultivieren, auf denen später die Auswertungen stattfanden. 20 Stunden später wurden die Zellen exponiert und anschließend entsprechend der jeweiligen Auswertungsmethode aufgearbeitet.

3.2.3.2. Expositionen 0,106 THz

Die Zellen wurden von unten mit einem Gauß-Strahl elektromagnetischer Strahlung einer Frequenz von 0,106 THz exponiert. Der Aufbau der Expositionsapparatur ist in Abbildung 3.2 dargestellt.

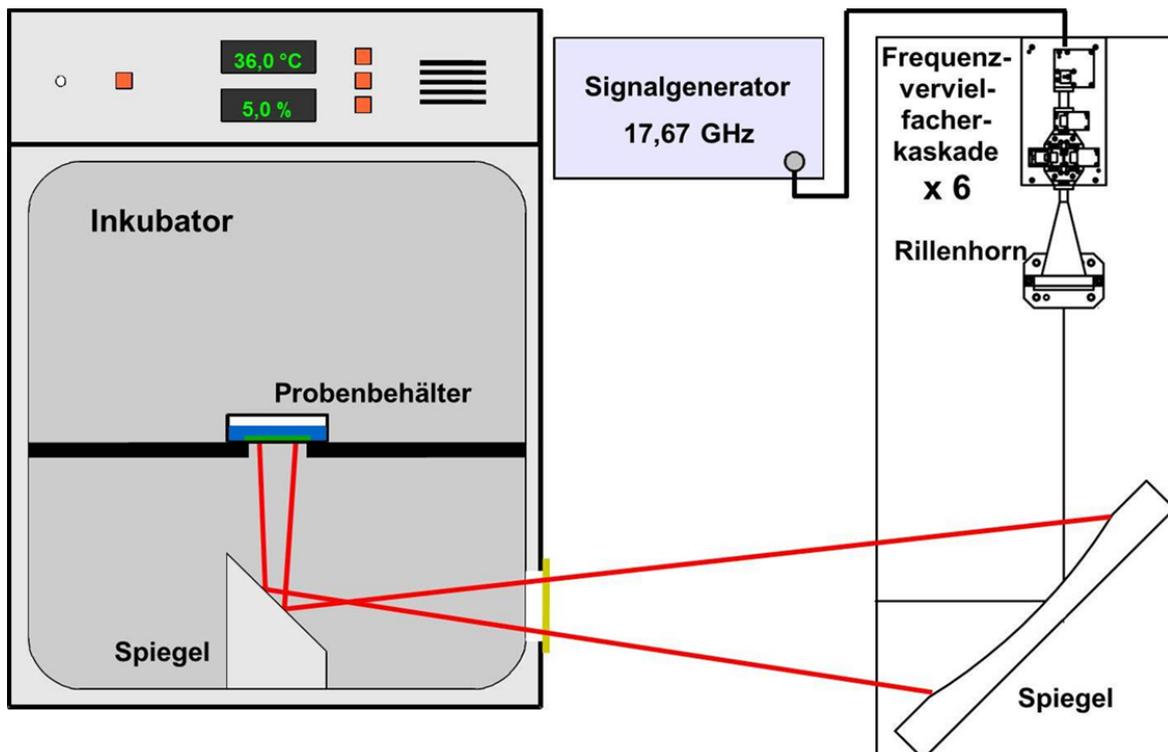


Abb. 3.2: Schematische Darstellung des Expositionsaufbaus bei 0,106 THz.

Ein unmoduliertes Signal einer Frequenz von 17,67 GHz, erzeugt von einem Frequenzsynthesizer (Agilent E8257D, Agilent Technologies, Böblingen), wurde mit Hilfe einer Frequenzvervielfacherkaskade versechsfacht. Das Signal wurde über ein variables Dämpfungsglied in eine Hornantenne geführt und konnte hier auf Leistungen zwischen 0 und 155 mW eingestellt werden. Der Strahl wurde mittels eines Parabolspiegels auf eine Halbwertsbreite von etwa 2 cm am Expositionsort kollimiert. Der für die Expositionen modifizierte Brutschrank enthielt ein in diesem Frequenzbereich transparentes Fenster, durch das der Strahl auf die Probe gelenkt wurde. Während der Exposition wurden die Proben bei definierter Umgebungs-

temperatur (36 °C, 5 % CO₂) gehalten. Alle relevanten Parameter wie Temperatur, Luftfeuchte, CO₂-Gehalt und Leistungsflussdichte wurden während der Exposition im Brutschrank überwacht (Almemo Datalogger, Ahlborn, Holzkirchen). Die Leistungsflussdichte am Ort der Zellen wurde mittels eines photoakustischen Detektors (Thomas Keating Power Meter, Thomas Keating, Großbritannien), rückgeführt auf die SI-Einheiten, gemessen und eingestellt. Dieser Detektor basiert auf einer geschlossenen Gaszelle und einem Druckwandler, der die durch Bestrahlung erzeugten Druckschwankungen in elektrische Signale umwandelt. Durch eine präzise messbare Rechteckheizspannung und die im Messkopf integrierte Widerstandsfolie konnte eine Kalibrierung durchgeführt werden. Die angegebenen Leistungsflussdichten repräsentierten Durchschnitte über die Expositionsfläche von 1,13 cm². Die lokale Leistungsverteilung wurde darüber hinaus experimentell bestimmt. Temperaturmessungen zeigten, dass bei einer Exposition mit 10 mW/cm² eine Temperaturerhöhung von 1,4 °C auftrat. Bei 2 mW/cm² und niedrigeren Leistungsflussdichten lag die Temperaturerhöhung nicht über den Fluktuationen der Brutschranktemperatur (< 0,3 °C).

Für jedes Experiment wurde ein Aliquot eingefrorener Zellen aufgetaut und in normalen Zellkulturgefäßen kultiviert. Nach einer Inkubation von mindestens 72 Stunden wurden die Zellen in spezielle Petrischalen, sogenannten μ -dishes (ibidi, Martinsried), auf eine definierte Fläche von 1,13 cm² ausgesät. Die Begrenzung der Fläche erfolgte mit Hilfe von Flexiperm-Aufsätzen (Greiner BioOne, Kremsmünster, Österreich) um die Zellen ausschließlich in der Expositionszone auszusäen. Es wurden 40.000 Zellen für den Mikrokerntest und 60.000 Zellen für den Comet Assay angesetzt. 20 Stunden später wurden die Zellen exponiert und anschließend entsprechend der jeweiligen Auswertungsmethode aufgearbeitet.

3.2.3.3. Expositionen 0,380 THz

Für die Expositionen bei 0,380 THz wurde ein Rückwärtswellenoszillator (Carcinotron) als Strahlungsquelle verwendet. Die Rückwärtswellenröhre gehört zur Kategorie der Laufzeitröhren, bei denen ein elektromagnetisches Feld mit einem Elektronenstrahl wechselwirkt. Durch den direkten Zusammenhang der Schwingungsfrequenz mit der Elektronengeschwindigkeit im Strahl kann die Frequenz der abgestrahlten Leistung mit Hilfe der Beschleunigungsspannung verändert werden. Die Leistung des hier verwendeten Carcinotrons konnte dabei zwischen 0 und 55 mW eingestellt werden. Die erzeugte Welle wurde mittels eines Rillenhornstrahlers, einer Polyethylenlinse und eines metallischen Planspiegels in den Inkubator eingekoppelt. Die Halbwertsbreite des Strahls betrug dabei etwa 3 cm am Expositionsort.

Da die Strahlbreite bei dieser Expositionsvorrichtung von den anderen Experimenten abwich, ergaben sich hier andere Leistungsflussdichten.

Die Leistungsmessung, der Aufbau des Expositionsinkubators und die Durchführung der Zelleexpositionen erfolgten analog zum Vorgehen bei 0,106 THz.

3.2.3.4. Expositionen 2,520 THz

Die für die Expositionen verwendete Strahlung von 2,520 THz (Wellenlänge 119 μm) wurde durch einen THz-Gaslaser, auch bekannt als FIR-Laser (Far Infrared Laser), erzeugt. Der Aufbau der Expositionseinrichtung ist schematisch in Abbildung 3.3 dargestellt. Ein CO_2 -Laser mit longitudinalem Gasfluss lieferte die Pumpenergie für diese THz-Quelle. Im CO_2 -Laser wurde ein Gasgemisch aus 9 % Kohlenstoffdioxid (CO_2), 11 % Stickstoff (N_2) und 80 % Helium (He) durch eine Plasmaentladung angeregt und Infrarotstrahlung einer Wellenlänge von 9,69 μm emittiert. Die für das

Zünden und Aufrechterhalten der Plasmaentladung benötigte Leistung wurde durch eine ebenfalls zur Emissionsrichtung longitudinal anliegende Hochspannung bereitgestellt. Die Infrarotstrahlung wurde für die Anregung von Methanol (CH_3OH) im Resonator des FIR-Lasers bei einem Druck von 0,66 mbar verwendet. Die Methanol-Moleküle erzeugten beim Übergang vom angeregten Zustand in ein niedrigeres Energieniveau THz-Strahlung mit einer Frequenz von 2,520 THz. Diese langwelligere Strahlung wurde beim Auftreffen auf den Einkoppelspiegel reflektiert und durch ein Kunststofffenster aus dem Laser ausgekoppelt. Anschließend wurde das Ausgangssignal durch einen externen Quarzkristall gefiltert.

Die ausgekoppelten elektromagnetischen Wellen wurden durch strahlführende Komponenten zu einem kollimierten Gauß-Strahl geformt, welcher in einer Entfernung von 110 cm vom letzten Spiegel eine Halbwertsbreite von 2 cm aufwies. Zusätzlich wurde ein geringer Prozentsatz der Strahlung mit einer dünnen Folie vom Hauptstrahl separiert und zur Detektion auf eine Golay-Zelle fokussiert. Dies ermöglichte die spätere Leistungsüberprüfung während der Exposition.

Nach dem Aufbau der Strahlführung wurde durch Anwendung der Rasierklingenmethode das Strahlprofil abgerastert. Mit Hilfe dieser Charakterisierung konnte die optimale Position für den Inkubator berechnet werden. Anschließend wurde die Gesamtleistung des Systems mit einem Polytec RK-5720 Power Radiometer bestimmt und die entsprechende Leistungsflussdichte in der Expositionszone berechnet. Gleichzeitig wurde die Golay-Zelle für die Leistungsüberprüfung an die Gesamtleistung angeglichen. Die für die Expositionen verwendeten Leistungsflussdichten wurden durch das Einbringen von HD-PE Scheiben in den Strahlengang eingestellt.

Der Aufbau des Expositionsinkubators und die Durchführung der Zelleexpositionen erfolgten analog zum Vorgehen bei 0,106 THz.

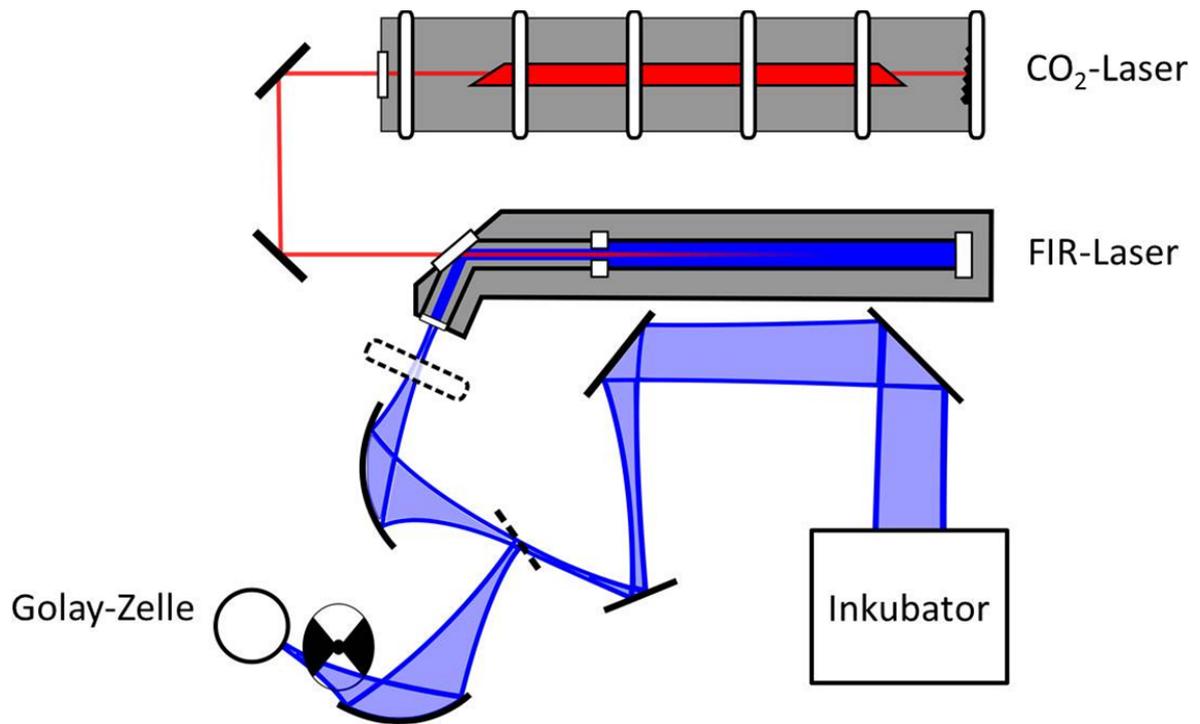


Abb. 3.3: : Schematische Darstellung des Expositionsbaus bei 2,520 THz.

3.2.4. Gentoxizitätstests

3.2.4.1. Comet Assay

Alle folgenden Arbeiten wurden zügig und möglichst unter Lichtausschluss bei 4 °C durchgeführt. Direkt im Anschluss an die Expositionen bzw. die Substanzbehandlungen wurden die Zellen abgelöst, in Medium aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 1.000 U/min). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet wurde mit 180 µl Low-Melting-Point-Agarose (LMP-Agarose) aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 45 µl auf einen Objektträger gegeben, der vorher mit High-Melting-Point-Agarose (HMP-Agarose) beschichtet wurde. Die Schicht mit der Zellsuspension wurde mit einem Deckglas abgedeckt bis sich die Suspension leicht verfestigte. Von jeder Exposition wurden zwei Objektträger angefertigt. Anschließend wurden die Objektträger für mindestens 1 Stunde bei 4 °C in einer Lyse-Lösung (2,225 M NaCl, 89 mM EDTA, 8,9 mM Tris, 10 % DMSO, 1 % Triton X-100 und 0,89 % Na-Sarcosinat) gelagert. Die Zellen wurden im Elektrophorese-Puffer (0,3 M NaOH, 1mM EDTA) bei 4 °C für 20 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde im gleichen Puffer eine Elektrophorese (25 V, 300 mA) durchgeführt. Nach Waschen in Tris-Puffer (5 Minuten) und Fixierung in Methanol (-20 °C, 5 Minuten) wurden die Präparate getrocknet (37 °C, 10 Minuten) und bis zur Auswertung gelagert.

Nach Codierung der Präparate erfolgte die Färbung mit einer Färbelösung aus GelRed- und Dabco-Lösung (1:3). Zur Herstellung der Dabco-Lösung wurden 250 mg Dabco in 10 ml PBS gelöst und anschließend mit 90 ml Glycerin gemischt. Die Auswertung der Präparate wurde computergestützt (Komet 5) mit dem Mikroskop Labophot-2 (Nikon) bei 200-facher Vergrößerung durchgeführt (Abb. 3.4). Es wurden 50 Zellen pro Objektträger ausgewertet. Neben anderen Parametern wurde der prozentuale Anteil der DNA im Kometenschweif (Tail DNA %) erfasst [42].

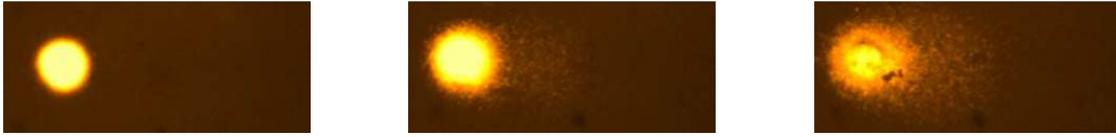


Abb. 3.4: Mikroskopische Aufnahme von Zellkernen mit keinem (links), leichtem (Mitte) und hohem (rechts) DNA-Schaden.

3.2.4.2. Mikrokerntest

Nach den Expositionen bzw. Substanzbehandlungen wurden die Zellen, soweit im Einzelfall nicht anders angegeben, für weitere 24 Stunden unter Zugabe von Cytochalasin B (3 µg/ml) postinkubiert. Danach wurden sie in Methanol (-20 °C) fixiert und für mindestens 1 Stunde gelagert. Vor der Auswertung der Zellen, die im Terahertzbereich exponiert wurden, wurde das Methanol abgenommen und die Zellen wurden codiert und gefärbt. Dies erfolgte durch 90-minütige Inkubation (37 °C) mit einem anti- α -Tubulin-Antikörper (1:50 in PBS) und anschließender Inkubation mit Chromomycin A₃ für 3 Minuten. Vor der Auswertung der Zellen, die mit 900 MHz exponiert wurden, wurde das Methanol abgenommen und die Präparate wurden codiert und mit 5 µl Safe-Green-Lösung (Biotrend Chemikalien GmbH) für 3 Minuten gefärbt. Anschließend wurden die Präparate mit Dabco eingedeckt (Abb. 3.5).

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung (Nikon Eclipse 55i bzw. Nikon TE-2000-E). Erfasst wurde in 1.000 Zellen zunächst der Anteil einkerniger, doppelkerniger und mehrkerniger Zellen sowie von Apoptosen und Mitosen. Die Anzahl der Mikrokerne wurde ausschließlich in doppelkernigen Zellen (mindestens 1.000) bestimmt. Wurde ohne Cytochalasin B inkubiert, erfolgte die Bestimmung der Mikrokerneffrequenzen in einkernigen Zellen. Die folgenden Kriterien mussten erfüllt sein, damit eine nukleare Anomalie als Mikrokernel gewertet werden konnte:

- ✓ Lokalisation innerhalb des Zytoplasmas aber außerhalb des Hauptkerns
- ✓ Färbung analog zum Hauptkern
- ✓ Größe etwa 1/16 bis 1/3 des Hauptkerns
- ✓ Runde Form

Zur Bestimmung der Proliferation wurde der Cytochalasin-B-Proliferationsindex (CBPI) berechnet. Er ergab sich folgendermaßen:

$$CBPI = \frac{1 EK + 2 DK + 3 MK}{EK + DK + MK}$$

[EK = Einkernig, DK = Doppelkernig, MK = Mehrkernig]

Die Fibroblasten wurden nicht mit Cytochalasin B behandelt. Zur Bestimmung der Proliferation wurde hier der Anteil der Zellen bestimmt, die sich während einer vierstündigen Inkubationszeit in der S-Phase befanden. Hierzu wurden die Zellen für 4 Stunden vor der Fixierung mit 10 μ M 5-Ethynyl-2'-desoxyuridine (EdU) inkubiert. Das an Stelle von Thymidin in die DNA inkorporierte EdU wurde nach der Fixierung mit Hilfe einer Farbreaktion mit einem FITC-gekoppelten Azid sichtbar gemacht (Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit, Invitrogen). Die Färbung erfolgte anschließend mit Bisbenzimid.

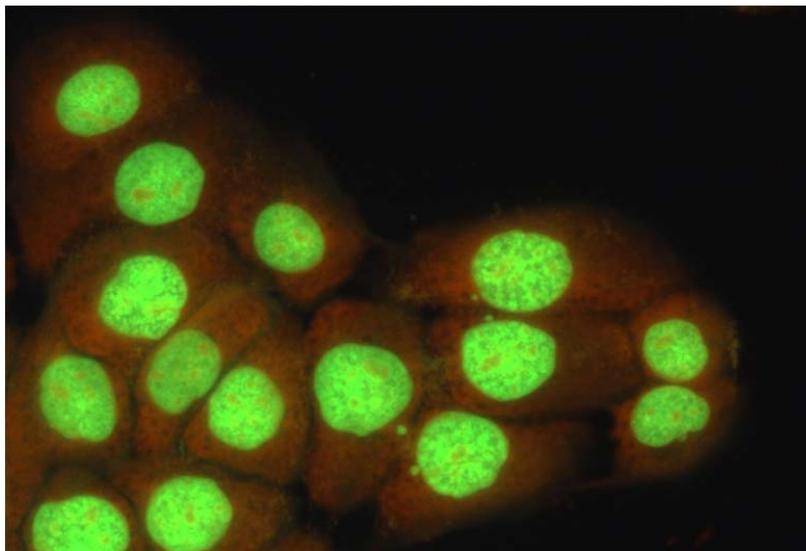


Abb. 3.5: HaCaT-Zellen mit deutlich erkennbaren Mikrokernen neben den Hauptkernen.

3.2.5. Mitosestörungen

Als Positivkontrolle wurden die Zellen hier mit 100 µg/ml Trichlorfon behandelt. Dieses Insektizid verursacht Mitosestörungen, jedoch nicht nach kurzen Inkubationszeiten analog zu den Expositionszeiten der Befeldung. Aus diesem Grund wurden die Zellen hier für 6 Stunden behandelt.

Direkt nach der Exposition bzw. der Substanzinkubation wurden die Zellen in den Kulturschalen fixiert. Hierfür wurde ein Drittel des Kulturmediums durch die Fixierlösung (3 Teile Ethanol (99 %), 1 Teil Eisessig, -20 °C) ersetzt. Diese Prozedur wurde dreimal jeweils im Abstand von fünf Minuten wiederholt. Abschließend wurde die gesamte Lösung gegen Fixierlösung ausgetauscht. Nach frühestens einer Stunde wurden die Zellen an der Luft getrocknet. Anschließend wurde codiert und mit Orceinacetat (2 %) für 10 Minuten gefärbt.

Zur Auswertung wurden Mitosen mit Störungen in der Meta-, Ana- und Telophase mikroskopisch bestimmt (s. Abb. 3.6). Störungen während der Metaphasen waren initiale C-Metaphasen, bei denen die Chromosomen nicht gleichmäßig verteilt waren, sondern sich in einem bestimmten kleinen Bereich der Zelle konzentrierten, typische C-Metaphasen, bei denen die Chromosomen über das gesamte Zytosol verstreut waren und „Non-congression“, bei denen einzelne Chromosomen nicht ordnungsgemäß an der Metaphasenplatte angeordnet waren. Zu den analysierten Störungen der Ana- bzw. Telophase gehörten zurückgebliebene Chromosomen, die einzeln zwischen den Tochterzellkernen liegen blieben, während die anderen Chromosomen bereits von den Spindeln erfasst und zu den beiden Polen gezogen wurden, „Non-disjunction“, wobei ein Chromosom mit beiden Polen verbunden war und diese Verbindung erhalten blieb, während die anderen Chromosomen auf die Tochterzellkerne aufgeteilt wurden und multipolare Mitosen, bei denen nicht nur zwei, sondern drei (oder in sehr seltenen Fällen auch mehr) Tochterzellkerne gebildet wurden.

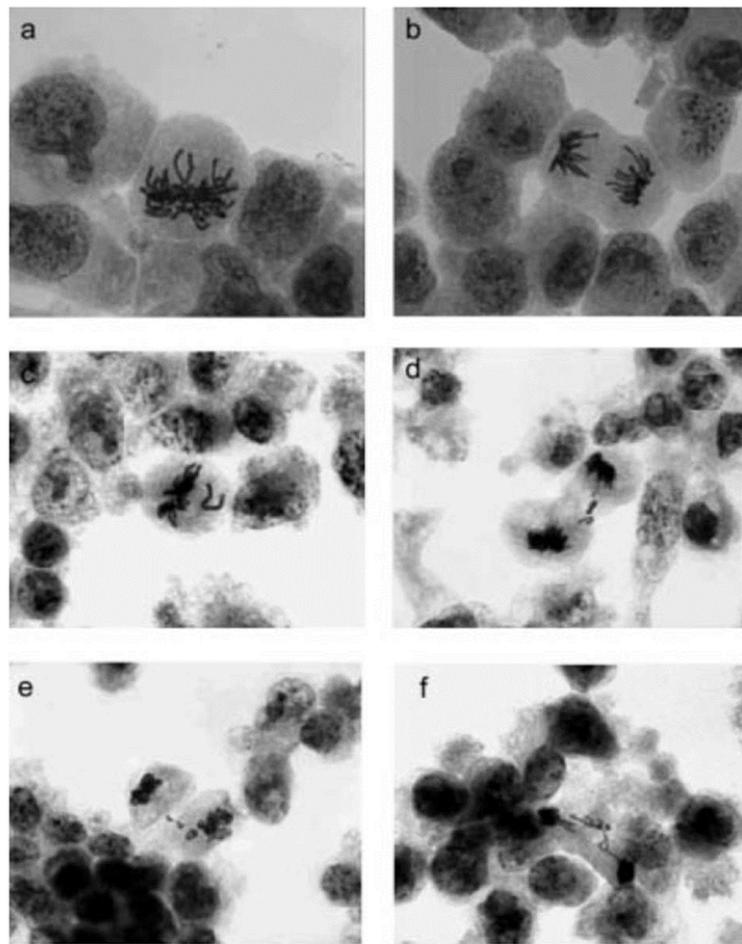


Abb. 3.6: Mikroskopische Aufnahmen von A_L -Zellen: Normale Metaphase (a), normale Anaphase (b), gestörte Metaphase (c), gestörte Ana- und Telophasen (d-f) [23].

3.2.6. Biomonitoring

3.2.6.1. Probandenrekrutierung

Diese Studie wurde vor Beginn der Durchführung von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Würzburg genehmigt (203/08). Eine Berechnung der Mindestgröße der Probandengruppe ergab $n = 9$, um die gleiche Erhöhung der Mikrokernfrequenz, die von Yadav et al. [27] beschrieben wurde, zu detektieren. Als Probanden wurden a) Studenten durch Ankündigung in Lehrveranstaltungen, b) Mitarbeiter der Universität Würzburg bzw. des Universitätsklinikums Würzburg und c) weitere Personen durch Ankündigung in der Tagespresse rekrutiert. Allen Personen wurden schriftliche Informationen über die Studie sowie die Genehmigung der Ethikkommission ausgehändigt.

3.2.6.2. Fragebogen

Alle Teilnehmer erklärten schriftlich ihr Einverständnis zur Teilnahme und füllten einen Fragebogen zur Dauer der täglichen Mobilfunknutzung, Gesamtdauer der Mobilfunknutzung und zur Benutzung eines Headsets aus. Zusätzlich wurden Angaben zu Geschlecht, Alter, Körpergröße und -gewicht, Rauchen, eingenommenen Medikamenten und speziellen Ernährungsgewohnheiten abgefragt. Besonderes Augenmerk wurde darauf gelegt, Personen ähnlicher Altersstruktur, die Mobilfunk nicht nutzten, in die Studie mit aufzunehmen. Um sicherzustellen, dass der Mikrokerntest tatsächlich in der Lage ist, Genomschaden zu detektieren, wurden Positivkontrollen mit eingeschlossen. Dies waren vier Patienten, die im Rahmen einer lokalen Strahlentherapie ionisierender γ -Strahlung (25 - 29 Einzeldosen zu je

2,0 - 2,3 Gy über vier Wochen vor Probenentnahme) ausgesetzt waren, sowie vier dazu passende, nicht behandelte Kontrollen.

3.2.6.3. Probenentnahme und -aufbereitung

Die Zellen wurden mit Hilfe eines Holzstabes mit Wattebausch entnommen, indem der Stab mit leichtem Druck an den Innenseiten beider Wangen unter Drehung auf und ab bewegt wurde. Die Zellen wurden in 5 ml Extraktionslösung aufgenommen. Die Extraktionslösung enthielt 0,9 % Natriumchlorid in demineralisiertem Wasser. Diese Prozedur wurde mit einem zweiten Stab unter Verwendung der gleichen Extraktionslösung wiederholt. Die Zellen wurden zentrifugiert (1.000 U/min, 5 min) und in Wasch-Puffer resuspendiert. Der Wasch-Puffer enthielt 0,01 M Tris-HCl, 0,1 M EDTA und 0,02 M Natriumchlorid in demineralisiertem Wasser. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Anschließend wurden etwa 6.000 Zellen mittels Zytocentrifugation (1.000 U/min, 5 min) auf vorgereinigte Objektträger aufgebracht. Diese wurden für mindestens 1 Stunde in eiskaltem (-20 °C) Methanol gelagert um die Zellen zu fixieren. Zur Färbung der Mundschleimhautzellen wurde eine anti- α -Tubulin-Antikörper-Lösung im Verhältnis 1:50 in PBS verdünnt und Chromomycin A₃ wurde in einer Magnesiumchlorid-haltigen (150 mM) PBS-Lösung zu einer Endkonzentration von 100 mM gelöst. Die Objektträger wurden an der Luft getrocknet und mit anti- α -Tubulin-Antikörper-Lösung inkubiert (37 °C, 60 min). Anschließend wurde mit PBS gespült und mit Chromomycin-A₃-Lösung für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Zum Schluss wurden die Präparate mit Dabco-Medium eingedeckt. Vor der Auswertung wurden die Präparate codiert um eine verblindete Auswertung sicherzustellen.

3.2.6.4. Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen

Zur Auswertung wurde ein Fluoreszenzmikroskop Nikon Eclipse 55i mit 400x-Vergrößerung verwendet. Jeweils zwei Personen werteten je mindestens 1.000 Zellen von jedem Probanden aus, so dass insgesamt mindestens 2.000 Zellen pro Proband erfasst wurden. Die vier Positivkontrollen mit den dazugehörigen nicht behandelten Kontrollen wurden separat von einer weiteren Person ausgewertet. Hauptendpunkt war die Frequenz von Mikrokernen (Abb. 3.7). Die folgenden Kriterien mussten erfüllt sein, damit eine nukleare Anomalie als Mikrokern gewertet werden konnte:

- ✓ Lokalisation innerhalb des Zytoplasmas aber außerhalb des Hauptkerns
- ✓ Färbung analog zum Hauptkern
- ✓ Größe etwa 1/16 bis 1/3 des Hauptkerns
- ✓ Runde Form

Zusätzlich wurde die Frequenz doppelkerniger Zellen und fragmentierter Zellkerne erfasst (Abb. 3.7). Kondensiertes Chromatin konnte mit dieser Färbemethode nicht zweifelsfrei von fragmentierten Kernen unterschieden werden. Pyknose oder Karyolyse wurde nicht beobachtet. Enthielt eine Zelle mehr als einen Mikrokern wurde dies mit erfasst, um nicht nur die Frequenz der Mikrokern, sondern auch die Frequenz mikrokernhaltiger Zellen angeben zu können. Da Zellen mit mehr als einem Mikrokern nur äußerst selten auftraten, wurden die Ergebnisse als Mikrokernfrequenz angegeben.

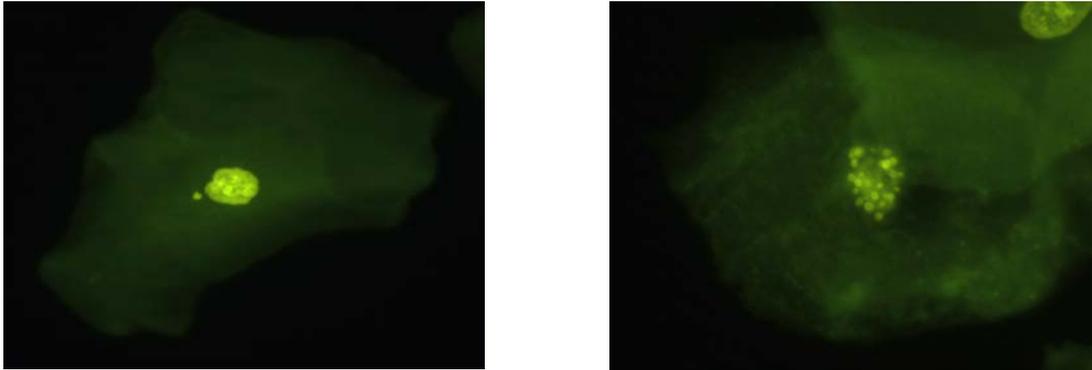


Abb. 3.7: Mundschleimhautzellen mit einem Mikrokern neben dem Hauptkern (links) und einem fragmentierten Kern (rechts) [29].

3.2.7. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurden die Software Statistica 8.0 verwendet.

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte bei den Ergebnissen der Biomonitoring-Studie mit Hilfe des t-Tests. Die Ergebnisse der Comet-Assay- und Mikrokerntest-Versuche wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests analysiert. Soweit im Einzelfall nicht anders angegeben waren die Expositionen nicht statistisch signifikant unterschiedlich von den zugehörigen Negativkontrollen bzw. Sham-Expositionen und die Positivkontrollen waren gegenüber den Negativkontrollen statistisch signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Für die Auswertung der Mitosestörungen wurde die Methode nach Kazmier und Pohl verwendet [84]. Dazu wurden jeweils die relativen Häufigkeiten mit Standardfehler sowohl für die einzelnen Expositionen als auch für die zugehörigen Kontrollen berechnet. Da die Stichprobengrößen jeweils mehr als 100 Zellen umfassten und das Produkt aus Stichprobengröße und relativer Häufigkeit größer als 5 war, konnten die beobachteten Unterschiede in eine Z-Statistik konvertiert werden. Die Nullhypothese lautete, dass zwei Stichproben nicht der gleichen Grundgesamtheit angehören. Bei $p < 0,05$ wurde von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen.

4. Ergebnisse

4.1. Literaturrecherche

Insgesamt konnten 37 veröffentlichte Untersuchungen, die Wirkungen von Terahertzstrahlung auf biologische Systeme untersuchten, identifiziert werden. Einzelheiten zu diesen Arbeiten sind in den Tabellen 4.1 und 4.2 aufgelistet. 22 % (n = 8) dieser Studien beschäftigten sich theoretisch mit diesem Thema, wohingegen 78 % (n = 29) experimentelle Arbeiten waren (Abb. 4.1 A). Die erste Arbeit erschien bereits vor über 40 Jahren (1968), allerdings folgten keine weiteren Untersuchungen in den 1960er Jahren. Auch die folgenden drei Jahrzehnte brachten nur jeweils zwei bis drei Arbeiten hervor. Die Mehrheit der Studien wurde innerhalb der letzten zehn Jahre veröffentlicht. 62 % (n = 23) waren es im Zeitraum von 2000 bis 2009 und immerhin 14 % (n = 5) allein im Jahr 2010. Die Anzahl der publizierten Arbeiten reflektiert die Geschichte dieser Forschung, da es vor den 1960er Jahren praktisch unmöglich war, Sender und Empfänger für diesen Frequenzbereich zu konstruieren. Auch in den folgenden Jahrzehnten blieb dies schwierig und erst ab etwa 2000 konnten alle damit zusammenhängenden Probleme gelöst werden. Besonders die hohe Zahl der Studien, die 2010 innerhalb eines einzigen Jahres veröffentlicht wurden, zeigt das deutlich gestiegene Interesse an diesen Fragestellungen.

Tabelle 4.1: Übersicht über alle identifizierten Publikationen. Wurden mehr als zwei Frequenzen, Leistungsflussdichten oder Expositionszeiten untersucht, sind nur die untersten und obersten Werte angegeben. Einordnung der Ergebnisse: (+) Erhöhung des Parameters, (-) Verminderung des Parameters, (+/-) komplexe bzw. unklare Änderung, (0) keine Änderung, (0/+) und (0/-) teilweise Veränderung der Parameter. (P): Gepulst.

Publikation	Biologisches System	Frequenz [THz]	Leistungsflussdichte [mW/cm ²]	Expositionszeit [min]	Endpunkt	Ergebnis
Webb, 1968	E. coli	0,136	7 μ W	30 - 240	Wachstum	-
Blackman, 1975	E. coli	0,136	-	30 - 240	Wachstum	0
Webb, 1975	E. coli	0,126 - 0,143	10 - 50	-	Wachstum	-
					DNA-Synthese	-
					RNA-Synthese	0
					Protein-Synthese	-
Tuengler, 1979	Alkohol-dehydrogenase	0,075 - 0,115	10 - 50	180	Aktivität	0
	Hämoglobin		3 - 13		Sauerstoffbindung	0
Berns, 1987	PTK2-Zellen	1,500	0,1 (P)	0,5 - 10	Morphologie	0
					DNA-Synthese	-
Berns, 1990	CHO-Zellen	1,500	0,1 (P)	3 - 5	DNA-Synthese	-
Govorun, 1991	Alkohol-dehydrogenase	3,300	0,2 - 3 J (P)	-	Aktivität	+/-
	Albumin					+/-
	Peroxidase					-
Berns, 1994	wie Berns 1987 & 1990					
Hadjiloucas, 2002	S. cerevisiae	0,192 - 0,341	0,0578	30 - 150	Wachstum	+
Clothier, 2003	Keratinozyten	0,100 - 300	2,5 (P)	10 - 30	Differenzierung	0
					Vitalität	0

4. Ergebnisse

Publikation	Biologisches System	Frequenz [THz]	Leistungsflussdichte [mW/cm ²]	Expositionszeit [min]	Endpunkt	Ergebnis
Scarfí, 2003	Lymphozyten	0,120 - 0,130	0,03 - 0,05 (P)	20	DNA-Schaden	0
Doria, 2004	Liposomen	0,130	0,16 - 11,1 (P)	2 - 60	Permeabilität	0/+
	Lymphozyten		0,15 - 5 (P)	20	DNA-Schaden	0/+
Fedorov, 2007	Lymphozyten	3,678	25 mW	30 - 90	Vitalität	+
	Erythrozyten				DNA-Synthese	+
					Membranstabilität	0
Ramundo-Orlando, 2007	Liposomen	0,130 - 0,150	5,2 - 17,1 (P)	2	Permeabilität	0/+
Zeni, 2007	Lymphozyten	0,120 - 0,130	0,03 - 0,23	20	DNA-Schaden	0
Bondar, 2008	Mäuse	3,600	5	5 - 30	Verhalten	+/-
Kirichuk, 2008a	Ratten	0,150	-	15 - 30	Plättchenaggregation	-
Korenstein-Ilan, 2008	Lymphozyten	0,100	0,031	60 - 1.440	Aneuploidie	+
Bourne, 2008	Keratinocyten	0,140	0,1 - 0,25 (P)	1.440	Aktivität	0
	Kornea-Zellen				Differenzierung	0
	ND7/23-Zellen				Protein-Synthese	0
					Morphologie	0
Kirichuk, 2008b	Erythrozyten	0,240	1	15	Viskosität	-
					Deformation	0
					Aggregation	0

Publikation	Biologisches System	Frequenz [THz]	Leistungsflussdichte [mW/cm ²]	Expositionszeit [min]	Endpunkt	Ergebnis
Olshevskaya 2008	Neuronen	0,717 - 3,678	0,3 - 30	60 - 180	Neuron-Netzwerk-Entstehung	+/-
Cherkasova, 2009	Albumin	3,600	10 mW	60	Bindungs-kapazität	+
Homenko, 2009	Alkalische Phosphatase	0,100	0,008	15 - 120	Aktivität	-/0
	Anti-DNP-Antikörper				Bindungs-kapazität	0
Kirichuk, 2009a	Ratten	0,150	0,2	15 - 30	Oxidativer Stress	-
Kirichuk, 2009b	Ratten	0,150	3	15 - 60	Verhalten	-/+
					Plättchen-aggregation	+
Wilmink, 2010a	Fibroblasten	2,520	84,8	5 - 80	Vitalität	-
					Protein-Synthese	0
Wilmink, 2010b	wie Wilmink 2010a					
Wilmink, 2010c	Fibroblasten Jurkat-Zellen	2,520	227	0,25 - 40	Vitalität	-/+
					Apoptose	-/+
					Nekrose	-/+
					mRNA-Synthese	-/+
Dalzell, 2010	Gamsgewebe	0,100 - 1,000	2,000 - 14,000	0,03	Gewebeschaden	+
	Schweinehaut, Eiweiß		1,890			182

Von acht theoretischen Studien beschäftigten sich vier (50 %) mit Betrachtungen zu möglichen Wirkmechanismen, drei (37 %) fassten Teile der vorhandenen Literatur zusammen und eine (13 %) war der Bericht des EU-Forschungsprojektes THz-Bridge (Abb. 4.1 B). 29 Experimentelle Studien konnten identifiziert werden, von denen zwei ausschließlich Daten publizierten, die bereits vorher veröffentlicht worden waren. Im ersten Fall [85-87] ist der Grund hierfür unklar, im zweiten Fall [88, 89] handelt es sich um Ergebnisse, die zunächst auf einer Konferenz vorgestellt und veröffentlicht wurden und anschließend als Artikel in einer Zeitschrift erschienen. Der Vollständigkeit halber sind beide Arbeiten mit aufgeführt, wurden aber nicht für die weiteren Analysen verwendet. Einzelzellsysteme wurden in den meisten experimentellen Arbeiten verwendet (29 %, n = 8), direkt gefolgt von Experimenten mit isolierten Systemen (z. B. Biomoleküle) und Blut bzw. Blutzellen (jeweils 22 %, n = 6). Den niedrigsten Anteil mit jeweils 14 % (n = 4) hatten Studien zu Wirkungen auf Tiere und Mikroorganismen (Abb. 4.1 C). Fast die Hälfte der Arbeiten (42 %, n = 13) untersuchte Frequenzen im Bereich bis zu 0,150 THz, jeweils deutlich weniger arbeiteten mit Frequenzen im Bereich von 0,150 bis 1 THz (26 %, n = 8) bzw. über 1 THz (32 %, n = 10). Es konnte keine Studie, die Frequenzen über 4 THz verwendete, identifiziert werden (Abb. 4.1 D). Acht Studien (19 %) exponierten für weniger als 10 min, 18 Studien (44 %) für 10 - 60 min und 13 Studien (32 %) für mehr als ein Stunde. Zwei Studien (5 %) enthielten keine Angaben zur Expositionszeit (Abb. 4.1 E). Die Mehrheit der Untersuchungen (n = 15, 43 %) konnte keinen Effekt feststellen. Eine Zunahme des untersuchten Parameters wurde von 5 Arbeiten (14 %) beschrieben, eine Abnahme von 10 Arbeiten (29 %). 5 Untersuchungen (14 %) berichteten von Wirkungen, die nicht quantifiziert werden konnten (z. B. Verhaltensänderungen) oder unklar beschrieben waren (Abb. 4.1 F).

Tabelle 4.2: Übersicht über theoretische Untersuchungen.

Publikation	Art	Inhalt
Mi, 1989	Literaturübersicht	Chinesische Studien Auswirkungen auf Pflanzen
Smye, 2001	Theorie	Mechanismen Spektroskopie
Fedorov, 2003	Literaturübersicht	Russische Studien
Gallerano, 2004	Programmbericht	THz-Bridge-Ergebnisse
Chitanvis, 2006	Theorie	Modellierung
Zhifu, 2007	Theorie	Mechanismen
Ramundo-Orlando, 2009	Literaturübersicht	Russische Studien THz-Bridge-Ergebnisse Biologische Anwendungen
Alexandrov, 2010	Theorie	Modellierung

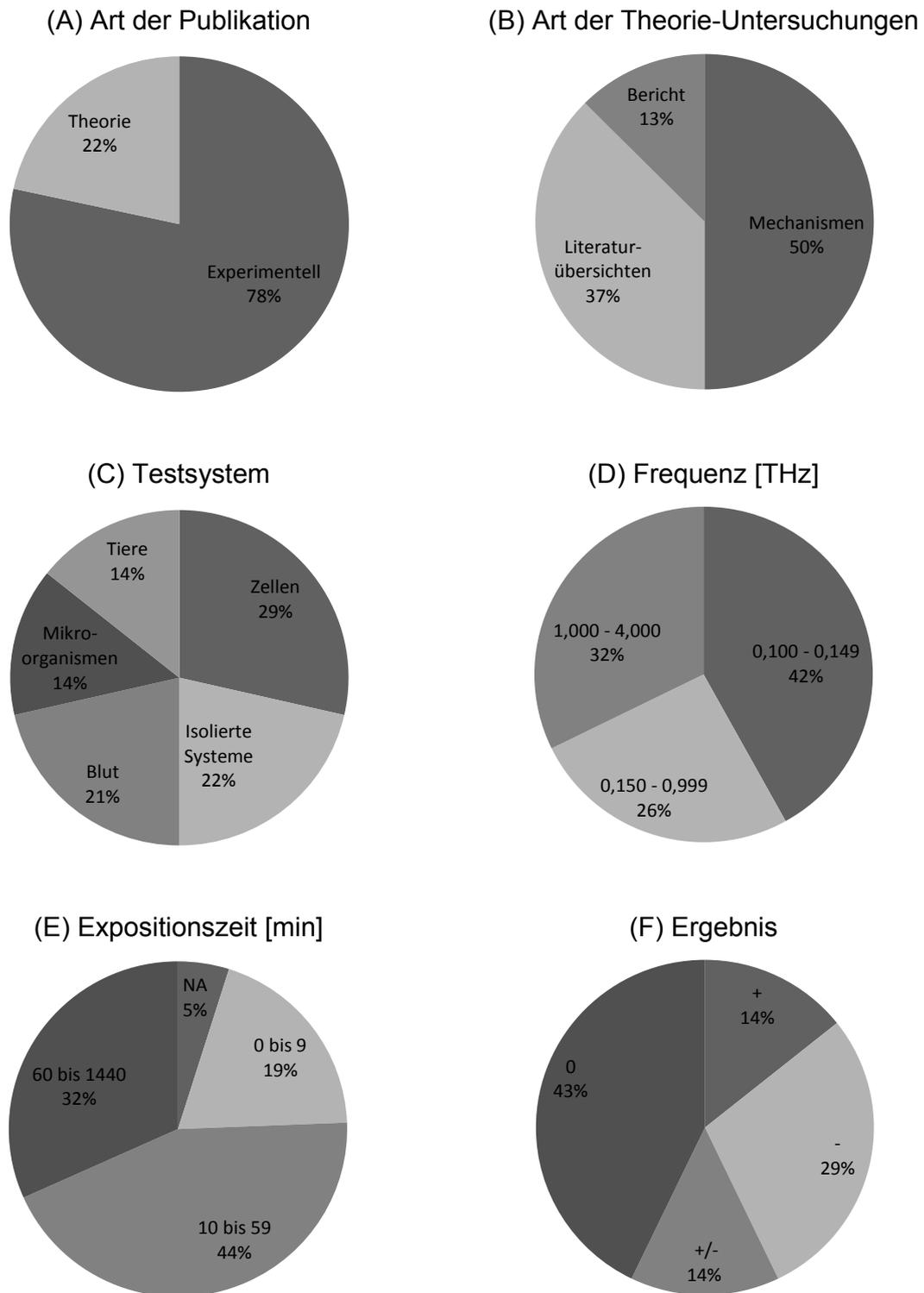


Abb. 4.1: Analyse der identifizierten Publikationen. Prozentuale Verteilung hinsichtlich (A) der Art der Publikation, (B) der Art der Theorie-Untersuchung, (C) des verwendeten Testsystems, (D) der untersuchten Frequenz, (E) der Expositionszeit und (F) des Untersuchungsergebnisses.

4.1.1. Übersichtsarbeiten

4.1.1.1. Literaturübersichten

Die erste Literaturübersicht beschrieb mehrere chinesische Untersuchungen, die sich mit Auswirkungen von Terahertzstrahlung auf Pflanzen beschäftigten [36]. Sie beinhaltet acht Arbeiten, die in der Zeit von 1986 bis 1988 erschienen. Alle verwendeten als Frequenzen 0,670 oder 2,523 THz und untersuchten hauptsächlich Effekte auf Reis, Weizen oder Bohnen. Leistungsflussdichten wurden kaum beschrieben, lagen aber anscheinend im Bereich einiger mW/cm^2 . Expositionszeiten variierten von 10 bis 90 Minuten. Zu den untersuchten Auswirkungen gehörten verschiedene Wachstumsparameter, Esterase-Aktivität und Mutationen. Alle aufgeführten Publikationen beobachteten einen durch Bestrahlung verursachten Effekt. Esterase-Aktivität und Mutationsraten waren erhöht (genauere Angaben fehlen) und Wachstumsparameter verbessert. Zwei Studien untersuchten Proteinexpression und Qualität und Quantität der nachfolgenden Generation in *Drosophila melanogaster*. Genaue Angaben fehlen zwar, aber es ist davon auszugehen, dass ähnliche Parameter wie in den Pflanzen-Studien in Bezug auf Frequenz, Leistungsflussdichte und Expositionszeit verwendet wurden. In Folge der Bestrahlung war die Proteinexpression, sowie die Qualität (vermindert) und Quantität (erhöht) des Nachwuchses verändert. Diese Übersicht ist sehr wertvoll, da Auswirkungen auf Pflanzen bisher nicht anderweitig beschrieben wurden. Die Methodenbeschreibung ist jedoch äußerst dürftig, so dass abzuwarten bleibt, ob die Ergebnisse von anderen Gruppen bestätigt werden können.

Ein weiterer, sehr umfangreicher Übersichtsartikel beschreibt hauptsächlich russische Original-Studien [37]. Er ist entsprechend der Ebenen der untersuchten biologischen Systeme gegliedert. Auf der Ebene der Makromoleküle werden zwei Arbeiten vorgestellt, die auch in der vorliegenden Übersicht beschrieben werden [36, 90], wobei eine fälschlicherweise als Originalarbeit und nicht (wie es richtig wäre) als

Übersichtsartikel dargestellt wird. Zu den weiteren präsentierten Arbeiten gehören eine Studie, die sich mit Bindungskapazität von Hämoglobin nach Bestrahlung mit 330 THz beschäftigt, eine Untersuchung, die exakt den gleichen Inhalt hat wie [90], mehrere spektroskopische Untersuchungen sowie einige Kurzzusammenfassungen von Tagungen. Auf der Ebene der Einzelzellsysteme sind zwei Studien enthalten, die auch in der vorliegenden Übersicht beschrieben werden [85, 86]. Die darüber hinaus aufgeführten Arbeiten untersuchten die Auswirkungen von Bestrahlung mit 3,3 THz auf Zellteilung (vermindert) und Zelltod (erhöht), Bestrahlung mit 330 THz auf den Membranwiderstand in Erythrozyten (vermindert), Bestrahlung mit 0,890 THz auf die Immunantwort (verändert) und Leukozytenmigration (vermindert) in Zellen der Milz, Bestrahlung mit 0,3 bis 3 THz auf die Viruskonzentration (vermindert) in mit Masern infizierten Zellkulturen und schließlich Bestrahlung mit 0,890 THz auf Membranstabilität (vermindert) und Zelltod (erhöht) in humanen Tumorzellen und Shigella-Zellen. Auf der Ebene des Organismus wird wiederum der bereits erwähnte Übersichtsartikel [36] mit zwei darin aufgelisteten Originalarbeiten genannt. Darüber hinaus sind zwei Studien zu Wirkungen auf *Drosophila melanogaster* genannt, eine berichtet von erhöhter Fertilität und Vitalität nach Bestrahlung mit 1 bis 100 THz, die andere von verminderten Mutationsraten nach Bestrahlung mit 3,5 THz. Abschließend wird eine Arbeit genannt, die in Ratten Auswirkungen von Bestrahlung mit 0,890 THz auf die Nebennierenmasse (erhöht), auf die Thymusmasse (vermindert) und auf die Konzentrationen von 11-Oxicorticosteroid und alkalischer Phosphatase (verändert) untersuchte.

Die neueste Literaturübersicht [38] beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit Arbeiten [91-94], die im Zusammenhang mit dem EU-Projekt THz-Bridge [81] entstanden sind. Die experimentellen Arbeiten sowie der Programmreport werden in der vorliegenden Übersicht ausführlich dargestellt. Weiterhin werden drei Übersichtsartikel vorgestellt, von denen einer hier bereits beschrieben wurde [37]. Die anderen beiden beschreiben ausschließlich Arbeiten, die Frequenzen unterhalb von 80 GHz einsetzen, die somit nicht als Untersuchungen im Terahertzbereich bezeichnet werden können [34, 35]. Weitere acht Studien werden genannt, jedoch nicht näher beschrieben. Diese Studien liegen entweder nur in russischer Sprache vor oder

beschäftigen sich mit Frequenzen unterhalb von 100 GHz. Zusätzlich beschreiben die Autoren biologische Anwendungen von Terahertzstrahlung wie z. B. Biokatalyse, pharmazeutisches Screening, Sensorik oder medizinische Bildgebung.

4.1.1.2. Mechanismen

Die erste Arbeit, die sich mit möglichen Wirkmechanismen auseinandersetzte, legte einen deutlichen Schwerpunkt auf spektroskopische Untersuchungen, bezog aber auch mögliche funktionale Konsequenzen in die Überlegungen mit ein [95]. Es werden Veränderungen der Vibrations- und Rotationsenergien beschrieben, die in Aminosäuren, Peptiden und Proteinen auftreten können. Weiterhin werden Vibrationen erläutert, bei denen sich Tertiärstrukturen in DNA-Molekülen gegeneinander bewegen. Die biologische Bedeutung dieser Änderungen wird jedoch offen gelassen.

Eine weitere Mechanismus-Betrachtung verwendete einen eher mathematisch ausgerichteten Ansatz [96]. In einer Reihe von Berechnungen wurden Resonanzeffekte bei der Interaktion zwischen Terahertzstrahlung und lebenden Systemen analysiert. Im Anschluss wurden diese Interaktionen quantenmechanisch betrachtet und abschließend erfolgte eine Analyse möglicher nichtlinearer Effekte. Als Ergebnis wurde postuliert, dass Terahertzstrahlung Resonanzeffekte hervorrufen kann, und dass dies zu starken Oszillationen von Bindungen führt, so dass diese letztlich brechen können.

Eine theoretische Studie untersuchte mit Hilfe von Computermodellierungen Auswirkungen auf die DNA [97]. Es wurde das Pegrard-Bishop-Dauxois-Modell der Doppelstrang-DNA verwendet. Die Modellierung enthielt nicht nur das DNA-Molekül sondern auch das Lösungsmittel. Es zeigte sich ein Einfluss von Terahertzstrahlung auf die Wasserstoffbrückenbindungen.

Das gleiche Modell wurde in einer weiteren Studie verwendet [98]. Hier wurde die Dynamik der Bindung zwischen den komplementären Basen bzw. zwischen den Einzelsträngen untersucht. Es wurde gezeigt, dass Terahertzstrahlung eine dynamische Auftrennung der DNA-Einzelstränge verursachen kann. Keine dieser theoretisch beschriebenen Effekte auf die DNA wurde bisher experimentell nachgewiesen.

4.1.1.3. Programmbericht

Das bisher umfangreichste interdisziplinäre Forschungsprojekt in diesem Forschungsgebiet war das von der Europäischen Union geförderte Projekt THz-Bridge [81]. Der Bericht enthält Ergebnisse, die auch separat publiziert wurden und in der vorliegenden Übersicht behandelt werden [92-94, 99-101]. Neben spektroskopischen Untersuchungen und Betrachtungen zu Sicherheitsfragen enthält der Bericht auch unveröffentlichte Ergebnisse zu direkten Effekten auf DNA-Basen. Die Bestrahlung erfolgte mit etwa 5 mW/cm^2 für 20 Minuten bei einer Frequenz von 0,130 THz. Mögliche Effekte auf Adenin, Guanin und Cytosin wurden mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht. Es konnten keine Auswirkungen beobachtet werden.

4.1.2. Originalarbeiten

4.1.2.1. Isolierte Systeme

Verschiedene Studien untersuchten Wirkungen auf isolierte Systeme wie Enzyme, Antikörper, Biomoleküle und künstliche Liposomen als Modell für die Zellmembran.

Die erste dieser Untersuchungen wurde in den 1970er Jahren durchgeführt [102]. Es wurden Hämoglobin und Alkoholdehydrogenase bestrahlt und funktionale Auswirkungen analysiert. Die Bestrahlung erfolgte mit steigender Frequenz (3,5 MHz/s) im Bereich von 0,075 bis 0,115 THz. Die Autoren gaben die Expositionszeit nicht explizit an, allerdings kann sie aus den Angaben zur Frequenzänderung abgeschätzt werden und betrug etwa drei Stunden. Die Alkoholdehydrogenase wurde mit einer Leistungsflussdichte von etwa 10 - 50 mW/cm² bestrahlt. Es konnten keine Effekte größer als 0,1 % beobachtet werden. Hämoglobin wurde mit etwa 3 - 13 mW/cm² bestrahlt, wobei keine Effekte größer als 0,4 % gezeigt werden konnten. Die Autoren selbst stellten fest, dass die Leistungsflussdichte nicht tatsächlich gemessen, sondern nur abgeschätzt werden konnte.

Auswirkungen auf die Alkoholdehydrogenase wurden auch in einer weiteren Studie untersucht, die zusätzlich noch Albumin und Peroxidase betrachtete [90]. Es wurde gepulste Strahlung einer Frequenz von 3,3 THz verwendet. Hierbei kamen Pulsenergien von 5 mJ zum Einsatz, dies ergab eine durchschnittliche Gesamtenergie von 0,2 bis 3 J. Die Aktivität der Peroxidase nahm leicht ab, wohingegen die Funktion der anderen beiden Proteine komplexere Veränderungen zeigte. Zuerst trat eine Abnahme auf, die bei höheren Energien aufgehoben wurde und sogar in eine Erhöhung überging. Die Autoren gaben keine Erklärung für dieses nichtlineare Ergebnis. Weder Expositionszeit noch Leistungsflussdichten bzw. Strahlcharakteristika wurden angegeben.

Eine weitere Studie untersuchte Auswirkungen auf Albumin, konkret auf die Bindungskapazität von Progesteron zu Albumin [103]. Die Bestrahlung erfolgte bei 3,6 THz mit etwa 10 mW (keine Leistungsflussdichte angegeben) für 60 Minuten und resultierte in einer erhöhten Bindungskapazität. Zusätzlich wurden spektroskopische Unterschiede beobachtet, aus denen die Autoren schlussfolgerten, dass Konformationsunterschiede für die beobachteten Effekte verantwortlich gewesen sein könnten.

Eine letzte Untersuchung zu Effekten auf Proteine untersuchte, welchen Einfluss eine Bestrahlung mit 0,1 THz auf gelöste oder fixierte alkalische Phosphatase hatte [104]. Die Bestrahlung erfolgte mit 0,008 mW/cm² für unterschiedliche Zeiträume von 15 bis 90 Minuten (Enzym allein) und von 30 bis 120 Minuten (Enzym und Substrat). Die Aktivität des fixierten Enzyms war nach Bestrahlung nicht verändert, während das gelöste Enzym eine verminderte Aktivität aufwies. Die Autoren schlossen daraus, dass die Fixierung einen protektiven Einfluss hat. Allerdings muss betont werden, dass die Effekte zwar statistisch signifikant, aber dennoch extrem niedrig sind. Weiterhin ist die Dosimetrie der Untersuchung fraglich, da es sich um ein wässriges System handelt, bei dem starke Absorption auftritt. Zusätzlich wurde die Interaktion zwischen einem Antikörper (anti-DNP gegen Dinitrophenyl) und seinem Substrat untersucht. Es wurde wieder Strahlung einer Frequenz von 0,1 THz mit 0,008 mW/cm² verwendet, hier wurde allerdings nur ein Zeitintervall, 90 Minuten, angewendet. Die Autoren beschrieben einen signifikanten Effekt im Falle der Bestrahlung des Substrat-Antikörper-Komplexes im Gegensatz zur Bestrahlung des Substrates vor der Antikörper-Zugabe. Die Abbildungen der Publikation unterstützten diese Behauptung jedoch nicht.

Ein anderes System, das untersucht wurde, besteht aus künstlichen Liposomen, die als Modell für Zellmembranen eingesetzt werden. Der Einfluss auf die Permeabilität wird getestet, indem ein Enzym (Anhydrase) in das Innere der Liposomen aufgenommen und das entsprechende Substrat (p-Nitrophenylacetat) zur externen Lösung zugegeben wird. Der Gehalt des Reaktionsproduktes wird bestimmt, wobei ein Anstieg bedeutet, dass die Barriere der Liposomengrenzschicht nicht mehr wirksam ist, d. h. die Membranstabilität ist vermindert. In der ersten Studie mit diesem

Modell wurden zwei Versuchsvarianten (beide bei 0,130 THz) eingesetzt. In der ersten Variante wurden die Liposomen für 60 Minuten mit 0,16 mW/cm² (Pulsfrequenz 5 Hz) oder 0,23 mW/cm² (Pulsfrequenz 7 Hz) bestrahlt. In der zweiten Variante wurde die Expositionszeit auf zwei Minuten reduziert, allerdings wurden die Leistungsflussdichten auf 5,6 mW/cm² (Pulsfrequenz 5 Hz), 7,8 mW/cm² (Pulsfrequenz 7 Hz) bzw. 11,1 mW/cm² (Pulsfrequenz 10 Hz) erhöht. Nur in der zweiten Versuchsvariante, und hier nur bei 7,8 mW/cm², konnte ein klarer Effekt auf die Liposomenstabilität beobachtet werden. Die Autoren deklarierten nicht einen sogenannten Fenster-Effekt, sondern assoziierten die Wirkung mit der Pulsfrequenz. Hier ist wiederum die Dosimetrie zu hinterfragen, da es sich um ein wässriges System handelt.

Die zweite Untersuchung mit diesem Modell verwendete ebenfalls eine Frequenz von 0,130 THz [91]. Die Messungen wurden über zwei Minuten während der Bestrahlung durchgeführt, wobei die Bestrahlung bereits etwa eine Minute vor Beginn der Messungen begonnen wurde. Es wurden drei verschiedene Pulsfrequenzen (5, 7 und 10 Hz) untersucht und zu jeder dieser Frequenzen wurden je vier verschiedene Leistungsflussdichten im Bereich von 5,2 bis 17,1 mW/cm² angewendet. Ein hochsignifikanter Effekt konnte für alle Leistungsflussdichten bei der mittleren Pulsfrequenz von 7 Hz beobachtet werden. Alle anderen Bestrahlungen (mit Ausnahme von 7,5 mW/cm² bei 5 Hz) zeigten keine deutlichen Änderungen. Zusätzlich wurde noch mit un gepulster Strahlung bei 0,150 THz mit 6,2 mW/cm² bestrahlt, wobei keine Änderungen gezeigt wurden. Das Resümee der Studie lautete, dass der Effekt von der Pulsfrequenz abhängt und dass thermische Wirkungen ausgeschlossen werden können. Die abgebildeten Temperaturmessungen sind jedoch fraglich. Es werden Temperaturen an 37 verschiedenen Zeitpunkten gezeigt, wobei jeder Messpunkt mit Fehlerbalken versehen ist, so dass von mehreren gemittelten Messungen ausgegangen werden kann. Die dargestellten Fehlerbalken sind jedoch für alle Werte absolut identisch, was keine realistische Messung vermuten lässt. Außerdem wurden die Expositionen bei Raumtemperatur durchgeführt, allerdings schwanken die Werte um nicht mehr als 0,03 °C, eine extrem geringe Variabilität. Unabhängig von der Frage der Temperatur ist die erste

Schlussfolgerung bezüglich der Abhängigkeit von der Pulsfrequenz offensichtlich zutreffend und sollte tiefergehend untersucht werden. Besonders von Interesse ist hier, die Experimente vom Modell auf reale Membranen zu übertragen.

Insgesamt sind die Auswirkungen auf die Proteinfunktion unklar. Einige Studien beobachteten einen klaren Effekt, andere hingegen konnten diesen selbst bei ähnlichen Versuchsdurchführungen nicht beobachten. Die von der Pulsfrequenz abhängige Auswirkung auf die Stabilität künstlicher Liposomen konnte klar belegt werden und sollte weiter analysiert werden.

4.1.2.2. Mikroorganismen

Die Mehrheit der Studien zu Wirkungen auf Mikroorganismen analysierte *Escherichia coli* (*E. coli*), wobei eine neuere Untersuchung auch den Hefeorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) betrachtete.

Bereits in den 1960er Jahren beschäftigten sich Forscher mit Effekten auf *E. coli* [105]. Hier wurde das Wachstumsverhalten der Bakterien nach Bestrahlung bei 0,136 THz mit geschätzten 7 μ W für vier Stunden beobachtet. Messungen wurden alle 30 Minuten durchgeführt. Eine starke Hemmung des Wachstums konnte nach 2 Stunden beobachtet werden, wenn die Zellen in der lag-Phase bestrahlt wurden. Diese Hemmung trat bereits nach 1,5 Stunden auf, wenn die Bestrahlung in der log-Phase erfolgte. Die Autoren diskutieren eine Hemmung der Zellteilung oder auch der metabolischen Prozesse als möglichen Wirkmechanismus, liefern jedoch keine weiteren Nachweise dafür.

Später versuchte eine andere Gruppe, diese Experimente zu wiederholen [106]. Auch hier wurde Strahlung mit 0,136 THz für vier Stunden auf *E. coli* angewendet. Im Gegensatz zu der früheren Studie [105] konnte keine Wachstumshemmung beobachtet werden. Eine genaue Messung der Leistungsflussdichte war nach

Auskunft der Autoren nicht möglich, so dass aus ihrer Sicht das gesamte Experiment ergebnislos blieb.

Im selben Jahr präsentierte die erste Gruppe wieder eine Untersuchung, bei der nicht nur Auswirkungen auf das Wachstum, sondern auch auf die Synthese von DNA, RNA und Proteinen bestimmt wurden. *E.-coli*-Kulturen wurden neben mehreren Frequenzen unterhalb von 0,100 THz auch mit 0,126, 0,129, 0,136, 0,141 und 0,143 THz bestrahlt. Die Leistungsflussdichten betragen etwa 10 bis 50 mW/cm². Die Expositionszeit wurde nicht angegeben, aufgrund der ersten Publikation kann aber von vier Stunden ausgegangen werden. Je nach verwendeter Frequenz verminderte sich das Wachstum auf 6 - 53 %, die DNA-Synthese auf 8 - 53 % und die Protein-Synthese auf 9 - 52 %. Einzig die RNA-Synthese blieb unverändert (79 - 106 %). Da die Hemmung für alle Frequenzen unterschiedlich stark ausfiel und keine lineare Korrelation gefunden wurde, diskutierten die Autoren Resonanzeffekte als mögliche Mechanismen.

Wachstum wurde auch in einer weiteren Studie, allerdings bei *S. cerevisiae*, untersucht [107]. Hier wurden die Mikroorganismen mit verschiedenen Frequenzen von 0,192 bis 0,341 THz jeweils für 2,5 Stunden bestrahlt. Die Leistung reichte von 0,4 bis 30 mW, nähere Angaben zu Leistungsflussdichte oder Strahlcharakteristika fehlen. Keine Änderung des Wachstums konnte bei den elf niedrigsten Frequenzen beobachtet werden, es zeigte sich aber eine klare Zunahme bei 0,341 THz. Die Autoren proklamierten einen Fenster-Effekt, wobei die Frequenz die höchste der untersuchten war, so dass in diesem Fall nicht von einem Fenster gesprochen werden kann. Anschließend wurde diese Frequenz näher untersucht. Es wurden Expositionszeiten von 30, 60, 90, 120 und 150 Minuten und eine Leistungsflussdichte von 57,8 µW/cm² eingesetzt. Eine signifikante Zunahme wurde für alle Expositionszeiten außer 150 Minuten beschrieben. Allerdings zeigten die beigefügten Abbildungen eine Wachstumszunahme nur nach Exposition für 30 Minuten, für die anderen Zeiten war keine Veränderung erkennbar. Es bleibt weiterhin unklar, warum gerade eine Exposition für 150 Minuten im zweiten Teil keinen Effekt zeigte, wohingegen im ersten Teil bei genau dieser Expositionszeit ein klarer Effekt beobachtet wurde. Die Autoren gingen auf diesen Widerspruch nicht ein. Obwohl die

Ergebnisse dieser Arbeit von den Autoren selbst im Titel als „vorläufig“ bezeichnet wurden, ist bislang keine weitere Publikation erschienen, die diese Effekte näher untersuchen würde.

Die Datenlage zu Mikroorganismen ist insgesamt nicht eindeutig. Wachstumshemmung bei *E. coli* wurde gezeigt, konnte in anderen Experimenten aber nicht bestätigt werden. Es gibt Hinweise auf eine Änderung von DNA- und Protein-Synthese. Untersuchungen zu *S. cerevisiae* zeigen keinen klaren Befund.

4.1.2.3. Säugerzellsysteme

Studien zu Effekten auf Säugerzellsysteme verwendeten hauptsächlich immortalisierte Säugerzelllinien, allerdings kamen auch Primärzellen oder Gewebeausschnitte zum Einsatz.

Eine der ersten Studien bestimmte den Effekt von Strahlung einer Frequenz von 1,5 THz auf PTK2-Zellen, eine Zelllinie, die von Zellen des Rattenkängurus stammt [85]. Es wurden 10, 20 bzw. 100 Pulse zu jeweils 100 W/cm² angewendet, die resultierenden Expositionszeiten waren 0,5 - 1, 1 - 2 bzw. 5 - 10 Minuten. Die durchschnittliche Leistungsflussdichte betrug etwa 0,1 mW/cm². Unterschiede in der Zellmorphologie wurden weder direkt nach der Exposition noch nach drei Stunden Postinkubation festgestellt. Nach einer Postinkubationszeit von 20 Stunden wurde eine sehr geringe Änderung in der Morphologie beobachtet. Es wurde eine verminderte DNA-Synthese nach der langen Expositionszeit, jedoch nicht nach den beiden kürzeren Zeiten festgestellt. Da die Auswirkungen nur bei einem Teil der Zellpopulation beobachtet wurden, diskutierten die Autoren eine genetische Prädisposition oder eine Abhängigkeit vom Zellzyklus im Zusammenhang mit möglichen Wirkmechanismen.

Die gleiche Gruppe untersuchte auch Auswirkungen auf Zellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), sowohl in der S-Phase synchronisierte als auch nicht synchronisierte [86]. Es wurde wieder die DNA-Synthese nach langer Expositionszeit (wiederum 1,5 THz mit durchschnittlich 0,1 mW/cm²), d. h. 100 Pulse entsprechend etwa 5 bis 10 Minuten, untersucht. Es konnte erneut eine Hemmung der DNA-Synthese beobachtet werden, die in synchronisierten Zellen stärker auftrat. Aus diesem Grund schlossen die Autoren auf eine direkte Wirkung auf die DNA.

Einige Jahre später wurde eine weitere Publikation veröffentlicht, die genau diese Ergebnisse der letzten beiden Studien beschrieb [87].

Die erste von zwei sehr ausführlichen Studien verwendete zwei verschiedene, gepulste Strahlungsquellen (0,2 - 3,0 THz und 0,1 - 2,7 THz) und untersuchte Effekte auf primäre humane Keratinozyten [101]. Diese sind als Hautzellen ein besonders interessantes Untersuchungsobjekt, da bei THz-Expositionen des menschlichen Körpers aufgrund starker Absorption die Haut am stärksten betroffen wäre. Die Zellen wurden mit 2,5 mW/cm² für 10, 20 und 30 Minuten exponiert. Auswirkungen auf die Differenzierung und die Vitalität wurden nach verschiedenen Postinkubationszeiten untersucht. Es wurden keine Effekte beobachtet. Die Autoren beschrieben eine hohe Variabilität zwischen den verschiedenen Zellspendern, allerdings wird die Variabilität zwischen den einzelnen Expositionen nicht erwähnt.

In einer zweiten Studie untersuchte die gleiche Gruppe gepulste Strahlung einer Frequenz von 0,140 THz mit Leistungsflussdichten von 0,1 bis 0,25 mW/cm² bei einer Expositionszeit von 24 Stunden [100]. Keratinozyten wurden wieder auf Veränderungen bei Differenzierung und Vitalität untersucht. Außerdem wurden Morphologie und die Expression von Hitzeschockproteinen betrachtet. Zusätzlich wurden humane Kornea-Zellen exponiert und hinsichtlich Vitalität, Expression von Hitzeschockproteinen und Barrierefunktion überprüft. Schließlich wurden noch ND7/23-Zellen, eine neuronale Zelllinie, verwendet. Hier wurden die Vitalität und der Glutathiongehalt untersucht. Alle beschriebenen Parameter wurden durch die Exposition nicht beeinflusst.

Nur eine Studie beschäftigte sich mit Zellen, die nicht von einem Säugetier stammen [108]. Isolierte Neuronen von *Lymnaea stagnalis*, der Spitzschlammschnecke, wurden exponiert und beobachtet. Nach einer Exposition mit 3,678 THz (keine Angaben zu Expositionszeit oder Leistungsflussdichte) waren bei 12 - 15 % der Neuronen oberflächliche Heterogenitäten, sowie nicht näher charakterisierte Wachstumsstörungen zu beobachten. Nach Exposition mit 0,717 THz zeigte sich bei 70 - 80 % der Neuronen eine gestörte Anhaftung an die Oberfläche. Abschließend wurde eine detailliert beschriebene Exposition durchgeführt (2,498 THz; 0,3, 1 - 10 und 30 mW/cm²; 60, 120 und 180 Minuten). Hier zeigte sich ein verändertes Membranpotential der Zellen. Insgesamt ist die Beschreibung der Methoden sehr lückenhaft und entsprechend schwer interpretierbar.

Die erste Arbeit einer Dreier-Serie von Studien untersuchte Auswirkungen von Strahlung einer Frequenz von 2,52 THz auf humane primäre Hautfibroblasten [88, 89]. Die Zellen wurden für 5, 10, 20, 40 und 80 Minuten mit 84,8 mW/cm² exponiert. Anschließend wurden die Vitalität und die Transkription von Hitzeschock- und mit DNA-Schaden assoziierte Proteine untersucht. Die Transkription blieb unbeeinflusst, aber die Vitalität sank auf etwa 90 %. Da die verwendete Leistungsflussdichte sehr hoch war, wurden Temperaturmessungen durchgeführt, die zeigten, dass die Temperatur während der Exposition um 3 °C stieg. Daher wurde nun als zusätzliche Kontrollen nicht nur unbehandelte Zellen, sondern auch um 3 °C erwärmte Zellen eingesetzt. Hier zeigte sich die gleiche Verminderung der Vitalität auf 90 %.

In einer zweiten Studie wurden ebenfalls primäre Hautfibroblasten nach Exposition mit 2,52 THz untersucht [109]. Nach Bestrahlung mit 227 mW/cm² für 1 bzw. 2 Minuten wurde eine mRNA-Untersuchung durchgeführt, wobei mehr als 400 Gene (mit Verbindung zu Apoptose, Proteolyse, Metabolismus, DNA-Schaden etc.) analysiert wurden. Es konnte kein Muster erkannt werden, d. h. einige Gene waren hoch-, andere herunterreguliert. Große Änderungen konnten nicht beobachtet werden. Darüber hinaus wurde eine Apoptose-spezifische Färbung nach einer Expositionszeit von 15 Sekunden (wahrscheinlich wiederum 227 mW/cm²) eingesetzt und zeigte programmierten Zelltod hauptsächlich direkt an der Expositionsstelle, nicht jedoch in umliegenden Arealen. Schließlich wurden Jurkat-Zellen, eine Lymphozyten-

Zelllinie, für 5, 10, 20, 30 und 40 Minuten exponiert. Ab einer Expositionszeit von 20 Minuten konnte auftretender Zelltod beobachtet werden. Genauere durchflusszytometrische Messungen ergaben, dass hierbei sowohl apoptotische als auch nekrotische Prozesse beteiligt waren.

Die dritte Studie untersuchte Gewebeschäden [110]. Im ersten Teil wurden Gewebestücke der Gämse im Frequenzbereich von 0,1 bis 1,0 THz für 2 Sekunden mit Leistungsflussdichten von 2.000 bis 14.000 mW/cm² exponiert. Der entstandene Gewebeschaden wurde analysiert und eine ED₅₀ von 7.160 mW/cm² wurde bestimmt. Diese lag in der Nähe eines vorher modellierten Wertes von 5.000 mW/cm². Im zweiten Teil wurden Schweinehaut und Eiweiß bei 1,89 THz für 10 Minuten exponiert. Angaben zur Leistungsflussdichte sind nicht schlüssig, liegen aber im Bereich um 190 mW/cm². In der Schweinehaut konnte kein Gewebeschaden beobachtet werden. Auch in den Eiweiß-Proben traten nur in einigen Proben kleine Veränderungen auf.

Insgesamt zeigte die Mehrheit der Studien keinen Effekt auf zelluläre Systeme. Es gab Hinweise auf eine Hemmung der DNA-Synthese und Veränderungen bei Neuronen. Vitalität, Differenzierung, Morphologie und Protein-Synthese wurden nicht beeinflusst. Bei sehr hohen Leistungsflussdichten von mehreren Hundert bzw. Tausend mW/cm² wurden Gewebeschäden und verminderte Vitalität aufgrund erhöhter Temperatur beobachtet.

4.1.2.4. Blut(-zellen)

Die Mehrheit der Studien in diesem Bereich wurde im Rahmen des THz-Bridge-Projektes durchgeführt, hier wurden hauptsächlich gentoxische Effekt in Lymphozyten untersucht. Zwei weitere Arbeiten beschäftigten sich auch mit Erythrozyten und untersuchten andere Endpunkte wie Membranstabilität, DNA-Synthese und Thrombozytenaggregation.

Die erste Studie untersuchte Zellproliferation und Mikrokernfrequenz, ein Biomarker für chromosomale DNA-Schäden [92]. Lymphozyten von sechs Spendern wurden mit gepulster Strahlung bei 0,120 THz mit 0,05 mW/cm² exponiert. Ein zweiter Satz von Lymphozytenproben von drei Spendern wurde bei 0,130 THz mit 0,03 mW/cm² exponiert. Expositionszeit war in beiden Fällen 20 Minuten. Signifikante Veränderungen konnten weder für die Proliferation noch für die Mikrokernfrequenzen beobachtet werden.

Ähnliche Experimente wurden von der gleichen Gruppe in Hinblick auf unterschiedliche Pulsfrequenzen durchgeführt [99]. Zunächst wurden Proliferation und Mikrokernfrequenz in Lymphozyten von fünf Spendern nach gepulster Exposition bei 0,130 THz für 20 Minuten untersucht. Die verwendeten Pulsfrequenzen von 5 und 7 Hz ergaben durchschnittliche Leistungsflussdichten von 0,15 bzw. 0,25 mW/cm². Es konnte kein DNA-Schaden beobachtet werden. Zusätzlich wurde noch eine weitere Methode verwendet, der Comet Assay. Dieser untersucht Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA. Die Expositionen (wiederum für 20 Minuten bei 0,130 THz) wurden hier in zwei Expositionsaufbauten durchgeführt, in der ersten mit 2 mW/cm² und in der zweiten mit 5 mW/cm². Im ersten Aufbau verursachte die Exposition keinen DNA-Schaden, aber im zweiten Aufbau konnte eine kleine, aber signifikante Erhöhung des DNA-Schadens beobachtet werden. Die Autoren spekulierten, dass der verwendete Metallkonus zu Resonanzeffekten führte und so der aufgetretene Schaden erklärt werden könnte. Im Allgemeinen ist die Dosimetrie wiederum schwer zu beurteilen, da es sich um wässrige Systeme handelt. Allerdings trifft dies nicht für den letzten Teil zu, bei dem erhöhter DNA-Schaden beobachtet wurde, da hier nur Lymphozyten ohne Kulturmedium exponiert wurden.

In einer ähnlichen Studie wurde wiederum der Mikrokerntest in Lymphozyten nach gepulster Exposition bei 0,120 THz mit 0,05 mW/cm² für 20 Minuten durchgeführt [93]. Zusätzlich wurden noch 20-minütige gepulste Expositionen bei 0,130 THz mit 0,03, 0,16 und 0,23 mW/cm² durchgeführt. Die letzten beiden Expositionen wurden zusätzlich mit Hilfe des Comet Assays ausgewertet. Alle Auswertungen zeigten, dass kein DNA-Schaden auftrat. Interessanterweise beschrieben die Autoren die Arbeit als

„Pilotstudie“ bzw. als „die erste Studie ... von ... gentoxischen Effekten“, obwohl bereits zwei Publikationen [92, 99] analoge Experimente beschrieben.

Die letzte Arbeit des THz-Bridge-Projektes verwendete auch Lymphozyten, untersuchte allerdings das Auftreten von Aneuploidie und assoziierten Effekten (Verlust oder Gewinn eines Chromosoms, asynchrone Replikationszeit der Chromosomen) in den Chromosomen 1, 10, 11 und 17 mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Technologie (FISH) [94]. Die Zellen wurden bei 0,1 THz mit 0,031 mW/cm² für 1, 2 und 24 Stunden exponiert. Aneuploidie wurde nach Expositionen für 2 und 24 Stunden für die Chromosomen 11 und 17, aber nicht für 1 und 10 beobachtet. Asynchrone Replikation trat nach 2 (Chromosomen 1, 11 und 17) bzw. nach 24 Stunden (alle Chromosomen) Expositionszeit auf. Dieser Befund ist wichtig, da Aneuploidie im Menschen potentiell zu Krebserkrankungen führen kann. Die Untersuchungen sollten daher unabhängig wiederholt werden, wobei einige Nachteile der Auswertung verbessert werden sollten. Beispielsweise wurden Beobachtungen von Nullisomie (d. h. ein Chromosomenpaar fehlt vollständig) nicht in die Auswertung mit einbezogen, obwohl dies von großem Interesse gewesen wäre. Weiterhin wurden in die Auswertung nur Zellen mit einer Fläche von mehr als 50 µm² eingeschlossen, anscheinend um nur PHA-stimulierte Zellen auszuwerten. Allerdings wurden dadurch alle Zellen, die bereits durch die Mitose und noch nicht durch die nächste S-Phase gegangen sind, ausgeschlossen, wodurch viele potentiell interessante Zellen für die Auswertung verloren wurden.

Eine weitere Untersuchung verwendete Strahlung einer Frequenz von 3,678 THz mit 25 mW [111]. Nach Exposition für 30 Minuten wurden Vitalität und DNA-Synthese in Lymphozyten untersucht. Erythrozyten wurden für 30 und 90 Minuten exponiert und auf Membranstabilität untersucht, indem der Hämoglobin-Export aus den Zellen überwacht wurde. Vitalität und DNA-Synthese wurden durch die Exposition vermindert. Die Membranstabilität war nur unter hypoosmotische Bedingungen eingeschränkt, nicht bei osmotisch normaler Umgebung. Die Autoren deklarierten einen Einfluss von Monozyten auf den beobachteten Effekt in Lymphozyten, allerdings untermauern die präsentierten Daten dies nicht. Weiterhin behaupteten die Autoren, dass die untersuchten Parameter unter dem Einfluss von Terahertzstrahlung

einen hohen diagnostischen Wert haben. Worin dieser Wert genau besteht und auf welche Art von Diagnose Bezug genommen wird, bleibt jedoch unklar.

Eine weitere Studie untersuchte Blutproben von Angina-pectoris-Patienten [112]. Einige Blutproben wurden mit ISDN, d. h. Isosorbiddinitrat (Isoket), einem NO-Donor-Medikament zur Behandlung der Angina pectoris, behandelt. Die Exposition der Blutproben und/oder des Medikaments erfolgte bei 0,240 THz mit 1 mW/cm² für 15 Minuten. Es ist nicht klar ersichtlich, ob zusätzlich auch einzelne Patienten direkt exponiert wurden. Mit ISDN behandelte Blutproben zeigten eine deutliche verringerte Viskosität, die durch die Exposition noch weiter verringert wurde. Bei der Untersuchung von Erythrozyten konnten keine Auswirkung auf die Aggregation und fast keine Auswirkung auf die Deformierbarkeit festgestellt werden. Identische Ergebnisse wurden gefunden, wenn die Blutproben vor der ISDN-Behandlung exponiert wurden.

Die Studien des THz-Bridge-Projektes zeigten insgesamt, dass keine DNA-Schäden in Lymphozyten auftreten, wobei es Hinweise auf die Verursachung von Aneuploidie gibt. Membranstabilität, Aggregation und Deformierbarkeit in Erythrozyten blieben unverändert, aber eine Beeinflussung von DNA-Synthese und Vitalität wurde beschrieben.

4.1.2.5. Tierstudien

Studien im Tiermodell wurden erst in den letzten Jahren publiziert, eine untersuchte Auswirkungen auf Mäuse, die anderen drei auf Ratten.

In der Untersuchung mit Mäusen wurden die Tiere bei 3,6 THz mit etwa 5 mW/cm² für verschiedene Zeiträume von 5 bis 30 Minuten exponiert [113]. Die Tiere wurden in Käfigen gehalten, die ein kleines Loch enthielten, durch das die Strahlung eintrat. Die Käfige wurden durch eine transparente Barriere von einem zweiten Käfig, in dem ein

weiteres Tier gehalten wurde, abgetrennt. Während der Exposition wurde das Verhalten beobachtet. Es zeigten sich keine Veränderungen mit Bezug zu der transparenten Barriere bzw. zu dem anderen Tier. Es traten aber Veränderungen mit Bezug zum Loch auf, z. B. war die Frequenz des Schnüpperns am Loch und die Verweildauer in der Nähe des Loches vermindert. Einen Tag später wurde das Verhalten in einem Labyrinth untersucht. Im Vergleich zu Kontrolltieren wurden hier kleine, jedoch signifikante Veränderungen festgestellt, beispielsweise war die Gesamtzeit im Labyrinth leicht erhöht. Die Autoren zogen den Schluss, dass die Tiere die Exposition spüren und in der Folge ein ängstliches Verhalten zeigen. Die Dosimetrie in den frei beweglichen Tieren ist in diesem Experiment jedoch zweifelhaft.

Eine Studie mit Ratten untersuchte die Auswirkung einer Exposition bei 0,150 THz für 15 und 30 Minuten auf die Thrombozytenaggregation nach Immobilisierung [114]. Angaben zur Leistung bzw. Leistungsflussdichte fehlen. Die Aggregation der Thrombozyten war nach Immobilisierung deutlich erhöht, konnte jedoch nach einer Exposition von 15 Minuten, und noch deutlicher von 30 Minuten auf Normalhöhe (teilweise sogar darunter) verringert werden. Die Autoren beschrieben, dass die verwendete Frequenz mit einer Absorptionsbande von Stickstoffmonoxid übereinstimmt und deklarierten, dass dieses durch die Exposition endogen freigesetzt wird und so die Wirkung vermittelt.

Die nächste Studie der gleichen Gruppe verwendete die gleichen Parameter (Ratten, 0,150 THz, 15 und 30 Minuten), enthielt aber hier Angaben zur Leistungsflussdichte, die etwa $0,2 \text{ mW/cm}^2$ betrug [115]. Es wurden verschiedene Stress-Biomarker, die im Zusammenhang mit Lipidoxidation und antioxidativen Vorgängen stehen, im Blut untersucht. Wiederum verursachte Immobilisierung der Tiere eine deutliche Erhöhung aller Parameter und die Exposition konnte diese Erhöhung rückgängig machen. Zusätzlich wurde noch eine Gruppe nicht mit Terahertzstrahlung, sondern mit Strahlung einer Frequenz von 53,5 GHz exponiert. Hier konnte keine Reduktion der Parameter festgestellt werden. Wieder wurde die vermittelnde Rolle von Stickstoffmonoxid diskutiert.

Die dritte Studie dieser Gruppe verwendete erneut eine Frequenz von 0,150 THz, allerdings mit 3 mW/cm² für 15, 30 und 60 Minuten [116]. Als ein Endpunkt wurde hier das Verhalten in einem Labyrinth getestet. Die Immobilisierung führte zu einer Verringerung des Orientierungsvermögens der Tiere, allerdings trat diese Verringerung nach Exposition noch stärker auf. Weiterhin wurde wieder die Thrombozytenaggregation untersucht. Interessanterweise konnten die ersten Ergebnisse [114] nicht bestätigt werden. Es wurde gefunden, dass die Aggregation nach Immobilisierung deutlich erhöht war, jedoch konnte diese Erhöhung durch die Exposition hier nicht rückgängig gemacht werden, sondern verursachte sogar noch eine weitere Erhöhung. Überraschenderweise kommentierten die Autoren diese gegensätzlichen Befunde in keiner Weise.

Es konnten Auswirkungen auf das Verhalten von Mäusen gezeigt werden. Diese Ergebnisse sollten weiter verfolgt und reproduziert werden. Das gleiche gilt für Untersuchungen an Ratten, die verändertes Verhalten und gegensätzliche Effekte auf verschiedene Blutparameter gezeigt haben.

4.2. Mobilfunkbereich

4.2.1. Expositionen in vitro

4.2.1.1. Kurzeitexpositionen

Soweit im Einzelfall nicht anders angegeben, wurde bei allen Expositionen im Mobilfunkbereich mit Cytochalasin B inkubiert und die Mikrokernfrequenz in doppelkernigen Zellen bestimmt. Neben der Mikrokernfrequenz wurde auch bei allen Expositionen der Anteil der ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen registriert und daraus der Proliferationsindex berechnet. Weiterhin wurde ausgewertet, wie viele Zellen sich in der Mitose und in der Apoptose befanden. Bei diesen Parametern traten keine Veränderungen bei den Expositionen im Vergleich zu den jeweiligen Sham-Expositionen auf. Lediglich in den Positivkontrollen zeigten die Zellen eine leicht erniedrigte Proliferation.

Zunächst wurde der mögliche Einfluss elektromagnetischer Strahlung auf humane HaCaT-Zellen untersucht. Hierzu wurden die Zellen für 30 Minuten unterschiedlich starker Strahlung ausgesetzt, die elektrische Feldstärke variierte zwischen 5 und 90 V/m (Abb. 4.2). Zusätzlich wurde bei der höchsten Feldstärke auch für 60 Minuten exponiert. Es zeigte sich keine signifikante Erhöhung der Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit von der Feldstärke.

4. Ergebnisse

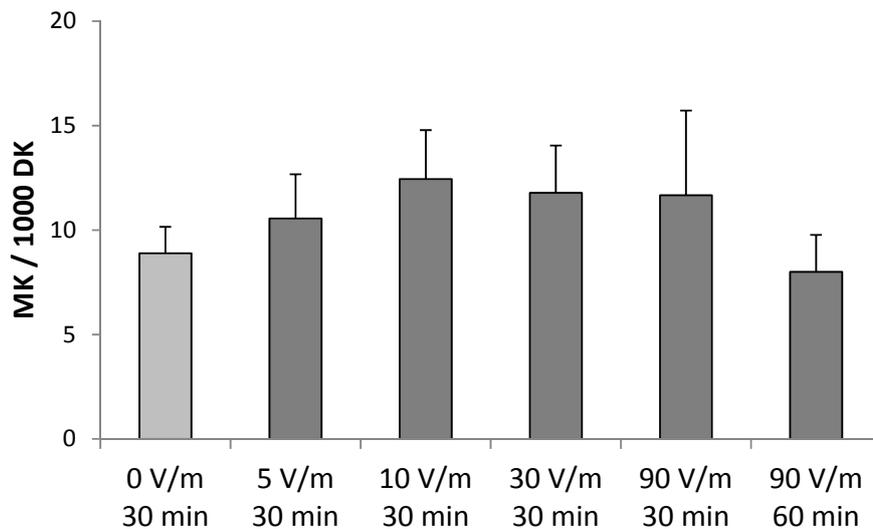


Abb. 4.2: Anzahl der Mikrokerne pro 1.000 doppelkernige Zellen in HaCaT-Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Expositionen. Ausgewertet wurden 3.000 Zellen pro Exposition. Befeldung bei 900 MHz (CW) für 30 Minuten und einer Postinkubationszeit von 22 Stunden.

Weiterhin wurde der mögliche Einfluss der Strahlung auf A_L-Zellen untersucht, da in diesen Zellen in früheren Untersuchungen Mitosestörungen als Folge von Bestrahlungen im Mobilfunkbereich festgestellt wurden. Dazu wurden die Zellen für 30 Minuten einem GSM-modulierten Feld ausgesetzt (Abb. 4.3). Diese Modulation wird auch beim Mobilfunk verwendet. Die eingesetzten Feldstärken waren wiederum 5, 10, 30 und 90 V/m. Es zeigte sich keine Erhöhung der Mikrokernfrequenz im Vergleich zur Sham-Exposition (0 V/m). Parallel wurden Zellen als Positivkontrolle für 4 Stunden mit Methylmethansulfonat (MMS) behandelt. Hier zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Mikrokernfrequenz in doppelkernigen Zellen.

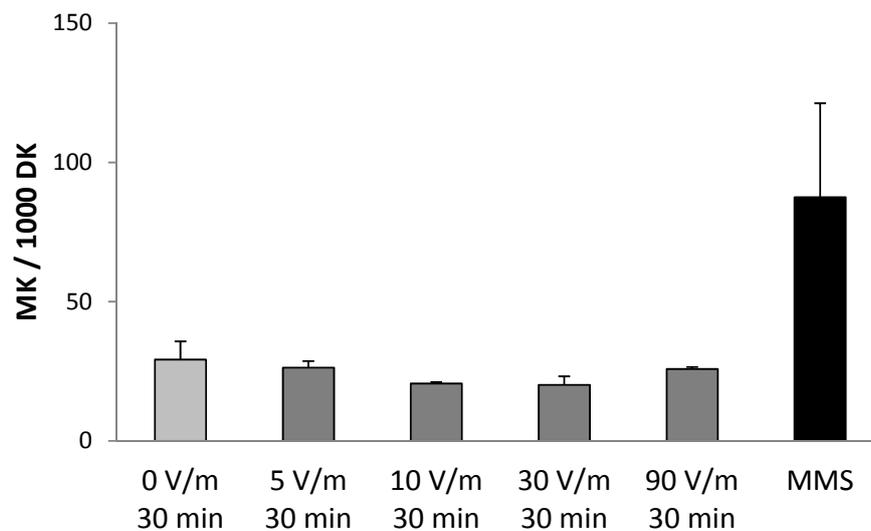


Abb. 4.3: Anzahl der Mikrokerne pro 1.000 doppelkernige Zellen in A_1 -Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Expositionen. Ausgewertet wurden 3.000 Zellen pro Exposition. Befeldung bei 900 MHz (GSM) für 30 Minuten und einer Postinkubationszeit von 22 Stunden.

Die gleichen Expositionen wurden auch unter Verwendung eines CW-Signals (Continuous Wave) anstelle der GSM-Modulation durchgeführt. Dies bedeutet, dass die elektromagnetische Strahlung ohne periodische Veränderungen kontinuierlich agiert. Auch hier zeigte sich keine Veränderung der Mikrokernelfrequenz (Abb. 4.4). Zusätzlich wurde bei der höchsten Feldstärke von 90 V/m auch für 60 Minuten exponiert. Auch hier war keine Zunahme der Mikrokerne zu beobachten.

4. Ergebnisse

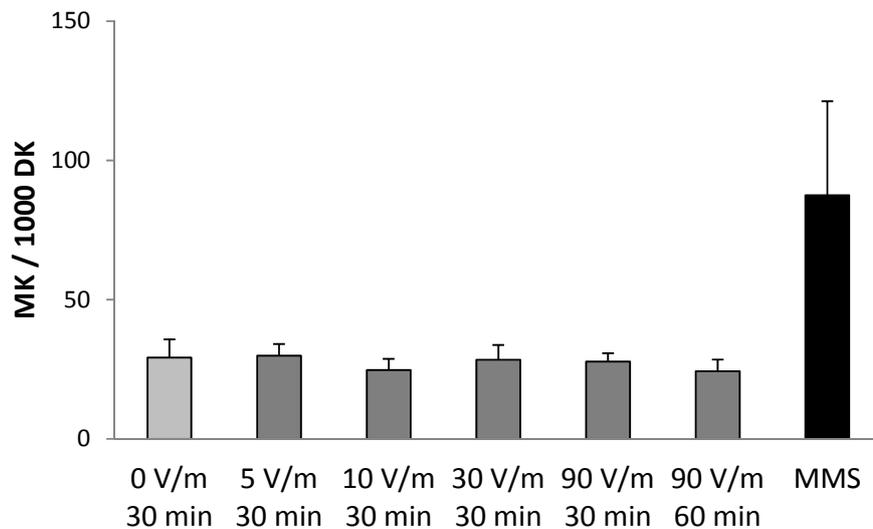


Abb. 4.4: Anzahl der Mikrokerne pro 1.000 doppelkernige Zellen in A_L -Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Expositionen. Ausgewertet wurden 3.000 Zellen pro Exposition. Befeldung bei 900 MHz (CW) für 30 Minuten und einer Postinkubationszeit von 22 Stunden.

Um die unterschiedlichen Befunde bezüglich der Induktion von Mitosestörungen und Mikrokerneln näher zu untersuchen, wurde das Protokoll des Mikrokerntests leicht abgeändert. Zur Untersuchung der Mitosestörungen wurden die Zellen direkt nach der Exposition fixiert, dies ist jedoch beim Mikrokerntest nicht möglich, da eine Mikrokernelnbildung so ausgeschlossen wäre. Daher wurde die Postinkubationsperiode auf 4 Stunden, zunächst ohne Cytochalasin B, begrenzt. Exponiert wurde jeweils nur mit der höchsten Feldstärke (90 V/m) für 30 und 60 Minuten. Es zeigte sich keine Erhöhung der Mikrokernelnfrequenz in einkernigen Zellen (Abb. 4.5).

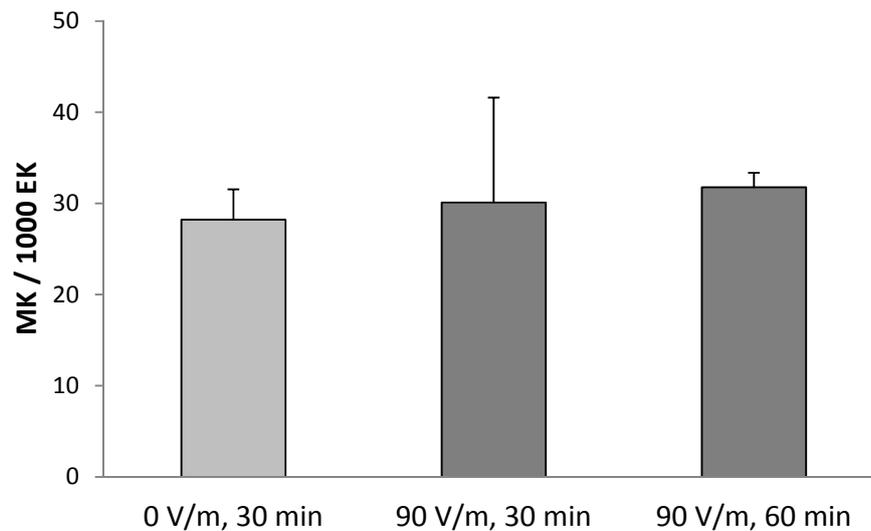


Abb. 4.5: Anzahl der Mikrokerne pro 1.000 einkernige Zellen in A_L-Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Expositionen. Ausgewertet wurden 3.000 Zellen pro Exposition. Befeldung bei 900 MHz (CW) für 30 Minuten und einer Postinkubationszeit von 4 Stunden ohne Cytochalasin B.

Da ohne die Verwendung von Cytochalasin B nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Proliferation der Zellen verändert war, wurde die kurze Expositionszeit mit einer Postinkubation mit Cytochalasin B wiederholt. Zusätzlich wurde das Protokoll für die Positivkontrolle angepasst. Die Zellen wurden für 4 Stunden mit MMS behandelt und anschließend für weitere 4 Stunden mit Cytochalasin B inkubiert. Wiederum zeigte sich keine Erhöhung der Mikrokernfrequenz, wogegen die mit MMS behandelten Zellen deutlich mit einer Zunahme der Mikrokerne reagierten (Abb. 4.6).

4. Ergebnisse

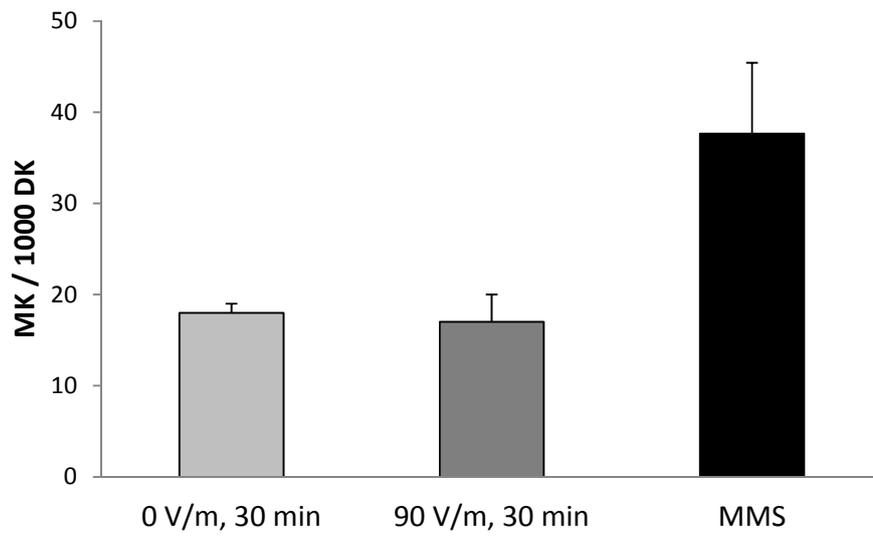


Abb. 4.6: Anzahl der Mikrokerne pro 1.000 doppelkernige Zellen in A_L-Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Expositionen. Ausgewertet wurden 3.000 Zellen pro Exposition. Befeldung bei 900 MHz (CW) für 30 Minuten und einer Postinkubationszeit von 4 Stunden mit Cytochalasin B.

4.2.1.2. Langzeitexpositionen

Da eine Anpassung der Postinkubationsperiode keine anderen Befunde in Bezug auf die Mikrokerninduktion ergab, bestanden weiterhin die teilweise widersprüchlichen Ergebnisse zur Induktion von Mitosestörungen und Mikrokernen. Eine weitere Verkürzung der Postinkubationsperiode war nicht möglich. Aus diesem Grund wurden Langzeitexpositionen als weitere Variation des Versuchsprotokolls durchgeführt. Hierzu wurden Zellen für 21 Stunden mit einer Feldstärke von 90 V/m exponiert. Dabei wurde Cytochalasin B bereits vor der Exposition zugegeben. Auch hier zeigte sich keine Erhöhung der Mikrokernfrequenz in doppelkernigen Zellen (Abb. 4.7).

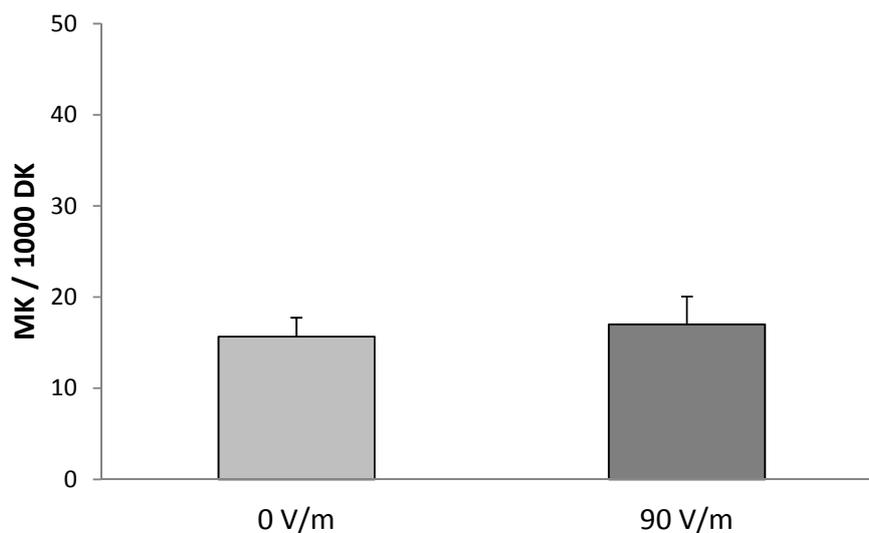


Abb. 4.7: Anzahl der Mikrokerne pro 1.000 doppelkernige Zellen in A_L-Zellen. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Expositionen. Ausgewertet wurden 3.000 Zellen pro Exposition. Befeldung bei 900 MHz (CW) für 21 Stunden.

4.2.2. Biomonitoring

4.2.2.1. Probandenbefragung

Insgesamt konnten 131 Probanden in die Studie eingeschlossen werden. Tabelle 4.3 zeigt die wichtigsten Charakteristika dieser Kohorte. Das Durchschnittsalter betrug 26,1 Jahre bei einer Spanne von 19 bis 84. Das Alter der Wenig- ($0 \leq t < 1$ h/Woche), Mittel- ($1 \leq t \leq 2$ h/Woche) und Vieltelefonierer ($t > 2$ h/Woche) war jeweils 30,2, 22,9 und 24,4 Jahre. Die Studienpopulation bestand aus 41,2 % Männern und 58,8 % Frauen. Der Body-Mass-Index der Teilnehmer reichte von 17,0 bis 31,2 kg/m² (Durchschnitt 22,0 kg/m²). 22,1 % der Teilnehmer lagen unter, 64,9 % innerhalb und 13,0 % über dem Normbereich (20 - 25 kg/m²). 7,6 % waren starke Raucher (zehn oder mehr Zigaretten täglich), 7,6 % schwache Raucher (weniger als zehn Zigaretten täglich) und 84,8 % Nichtraucher. Die häufigste berichtete Medikation war orale Kontrazeption (26,7 %). Einige Teilnehmer berichteten von Allergien oder gelegentlicher Einnahme von Analgetika (6,9 %). Es wurden keine Behandlungen mit Chemotherapeutika oder kürzlich zurückliegende Röntgenuntersuchungen berichtet. Die Mehrheit der Teilnehmer nannte keine besonderen Ernährungsgewohnheiten. 7,6 % ernährten sich vegetarisch. 21,4 % nutzten ein Headset zum Telefonieren, 78,6 % taten dies nicht. Ein Anteil von 9,9 % hatte nie ein Mobiltelefon benutzt. Die Mobiltelefonnutzer hatten das Handy zu 18,8 % seit 5 Jahren oder weniger, zu 64,3 % seit fünf bis zehn Jahren und zu 16,3 % seit mehr als zehn Jahren in Gebrauch. Hauptparameter war die wöchentliche Zeit des Mobiltelefongebrauchs. 9,9 % waren Nichtnutzer, 64,9 % telefonierten bis zu drei Stunden, 13,7 % mehr als drei und bis zu sechs Stunden und 11,5 % mehr als sechs Stunden wöchentlich.

Tabelle 4.3: Charakteristika der Studienpopulation (Durchschnitt und [Minimum - Maximum]) .
Modifiziert nach [29].

		Gesamt	Männlich	Weiblich
Geschlecht			41,2 %	58,8 %
		26,1 [19 - 84]	27,4 [19 - 84]	25,2 [20 - 64]
Alter [Jahre]	19 - 24	67,2 %	63,0 %	70,1 %
	25 - 39	26,7 %	29,6 %	24,7 %
	40 - 84	6,1 %	7,4 %	5,2 %
		22,0 [17,0 - 31,2]	23,0 [17,6 - 31,2]	21,3 [17,0 - 30,5]
Body-Mass-Index [kg/m²]	< 20	22,1 %	5,6 %	33,8 %
	20 - 25	64,9 %	77,8 %	55,8 %
	> 25	13,0 %	16,6 %	10,4 %
Rauchen	Nichtraucher	84,8 %	81,5 %	87,0 %
	< 10 Zigaretten / d	7,6 %	11,1 %	5,2 %
	≥ 10 Zigaretten / d	7,6 %	7,4 %	7,8 %
Headset	Nichtnutzer	78,6 %	78,3 %	78,9 %
	Nutzer	21,4 %	21,7 %	21,1 %
Gesamtnutzungs- Dauer [Jahre]	< 5	18,8 %	20,5 %	17,6 %
	5 - 10	64,3 %	63,6 %	64,8 %
	≥ 10	16,3 %	15,9 %	17,6 %
Nutzung pro Woche [h]	0	9,9 %	14,8 %	6,5 %
	0 - 3	64,9 %	66,7 %	63,6 %
	3 - 6	13,7 %	11,1 %	15,6 %
	6 - 9	9,2 %	4,0 %	10,4 %
	9 - 12	1,5 %	0,0 %	2,6 %
	12 - 15	0,8 %	0,0 %	1,3 %

4.2.2.2. Mikrokerntest

Die Positivkontrollen (Tabelle 4.4) zeigten einen extrem hohen Anstieg an Mikrokernen als Reaktion auf die Behandlung mit ionisierender Strahlung. Die Mundschleimhautzellen dieser Patienten enthielt regelmäßig mehr als einen Mikrokern, daher ist sowohl die Frequenz der Mikrokerne als auch die Frequenz der mikrokernhaltigen Zellen angegeben.

Tabelle 4.4: Mikrokernelnfrequenz von Patienten nach Strahlentherapie sowie der zugehörigen Kontrollen. Auswertung in jeweils 1.000 Zellen. * $p \leq 0,05$. Modifiziert nach [29].

	Alter	Geschlecht	Strahlendosis	Mikrokernhaltige Zellen	Mikrokerne
Kontrollen					
# 1	29	männlich	-	1.0	1.0
# 2	21	männlich	-	1.5	1.5
# 3	20	weiblich	-	0.4	0.4
# 4	23	weiblich	-	0.5	0.5
Durchschnitt				<u>0.8 +/- 0.3</u>	<u>0.8 +/- 0.3</u>
+/- SEM					
Patienten					
# 1	64	männlich	28 x 2.0 Gy	166.0	226.0
# 2	61	männlich	25 x 2.3 Gy	190.7	279.8
# 3	68	männlich	27 x 2.3 Gy	107.0	130.0
# 4	70	männlich	29 x 2.2 Gy	61.5	78.5
Durchschnitt				<u>131.3 +/- 29.1 *</u>	<u>178.6 +/- 45.5 *</u>
+/- SEM					

Tabelle 4.5: Mikrokerne und fragmentierte Kerne in Abhängigkeit von verschiedenen Faktoren.
 * $p \leq 0,05$. Modifiziert nach [29].

		Mikrokerne	Fragmentierte Kerne
Geschlecht	Männlich (n = 54)	1.27 (+/- 0.15)	0.44 (+/- 0.12) *
	Weiblich (n = 77)	1.44 (+/- 0.15)	0.12 (+/- 0.03) *
Alter [Jahre]	19 - 24 (n = 88)	1.38 (+/- 0.13)	0.29 (+/- 0.07)
	25 - 39 (n = 35)	1.34 (+/- 0.19)	0.16 (+/- 0.06)
	40 - 84 (n = 8)	1.38 (+/- 0.59)	0.22 (+/- 0.13)
Body-Mass-Index [kg/m²]	< 20 (n = 29)	1.47 (+/- 0.30)	0.29 (+/- 0.17)
	20 - 25 (n = 85)	1.26 (+/- 0.11)	0.22 (+/- 0.05)
	> 25 (n = 17)	1.76 (+/- 0.36)	0.34 (+/- 0.14)
Rauchen	Nichtraucher (n = 111)	1.45 (+/- 0.12)	0.26 (+/- 0.06)
	< 10 Zigaretten (n = 10)	1.05 (+/- 0.26)	0.25 (+/- 0.17)
	≥ 10 Zigaretten (n = 10)	0.83 (+/- 0.25)	0.15 (+/- 0.11)
Headset	Nichtnutzer (n = 92)	1.38 (+/- 0.13)	0.30 (+/- 0.07)
	Nutzer (n = 25)	1.26 (+/- 0.25)	0.08 (+/- 0.04)
Gesamtnutzungs-Dauer [Jahre]	< 5 (n = 21)	1.13 (+/- 0.25)	0.25 (+/- 0.08)
	5 - 10 (n = 72)	1.42 (+/- 0.15)	0.22 (+/- 0.08)
	≥ 10 (n = 19)	1.18 (+/- 0.28)	0.26 (+/- 0.12)

Tabelle 4.5 zeigt Mikrokernfrequenzen in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern, die im Fragebogen abgefragt wurden. Signifikante Änderungen in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter, Body-Mass-Index oder Rauchen konnten nicht festgestellt werden. Die Anzahl der fragmentierten Kerne war ebenfalls unverändert mit Ausnahme des Parameters Geschlecht, hier zeigte sich eine signifikant ($p \leq 0,05$) erhöhte Frequenz bei Männern im Vergleich zu Frauen. Die Mikrokernfrequenz war unverändert zwischen Headset-Benutzern und -Nichtnutzern, während sich ein nicht signifikanter Trend zu erhöhter Frequenz fragmentierter Kerne bei Nichtnutzern zeigte. Zwischen Personen, die das Mobiltelefon seit bis zu fünf, seit fünf bis zehn oder seit mehr als zehn Jahren verwendeten, konnte kein Unterschied festgestellt werden.

Abbildung 4.8 zeigt die Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit von der Dauer der wöchentlichen Mobiltelefonnutzung. Beide Grafiken enthalten den gleichen Datensatz, die Gruppierung der Probanden wurde jedoch unterschiedlich vorgenommen. Zuerst wurden die Probanden so gruppiert, dass konstante Zeitintervalle vorlagen (immer 3 Stunden), allerdings führte dies zu großen Unterschieden in den Stichprobengrößen, was einen Vergleich erschwerte. Daher wurden die Probanden so gruppiert, dass ähnliche Stichprobengrößen vorlagen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Die statistische Analyse wurde außerdem nach Ausschluss aller Raucher und auch nach separater Untersuchung der beiden Auswerter wiederholt. Auch hier konnte kein Einfluss der Mobiltelefonnutzung auf die Mikrokernfrequenz festgestellt werden.

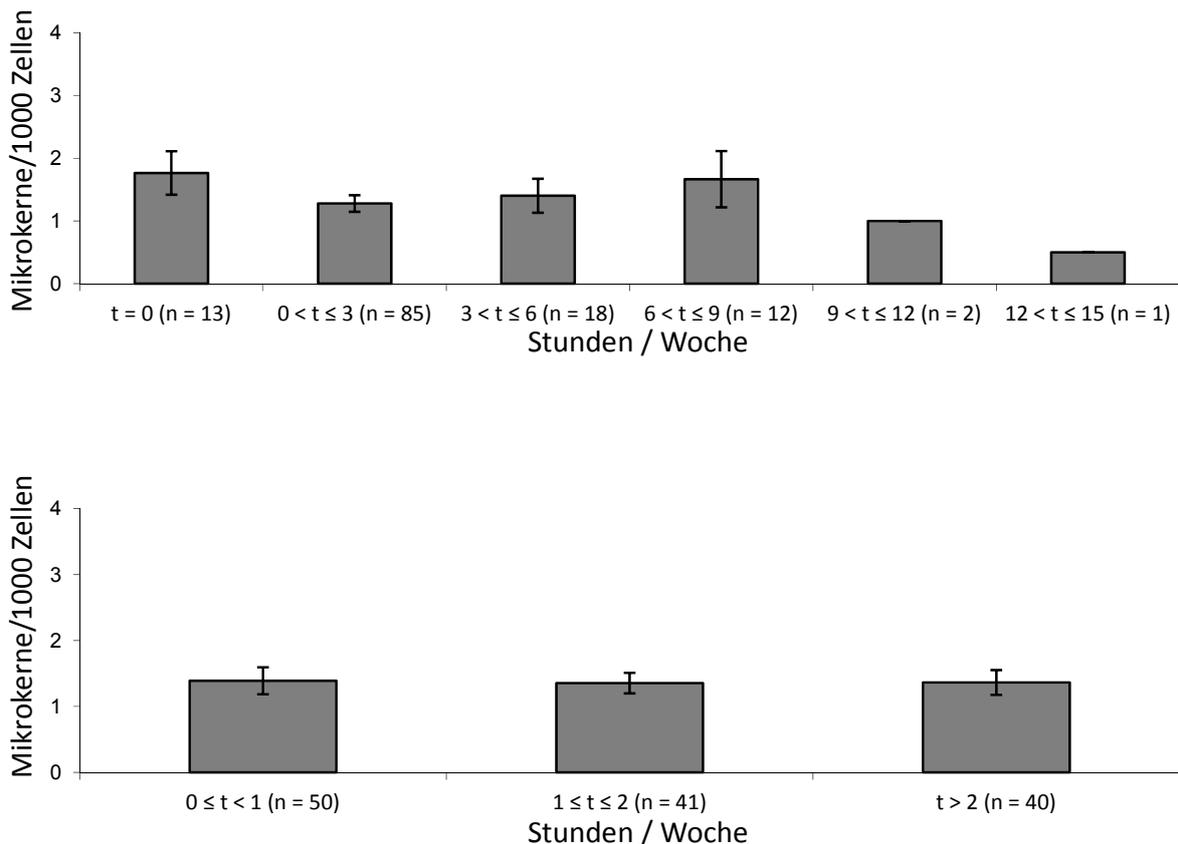


Abb. 4.8: Mikrokernfrequenzen in Abhängigkeit von der wöchentlichen Mobiltelefonnutzung. Probanden wurden unterschiedlich gruppiert. Oben: Vergleichbare Zeitintervalle. Unten: Vergleichbare Stichprobengrößen. Modifiziert nach [29].

Die Anzahl fragmentierter Kerne zeigte einen abnehmenden Trend mit längerer Nutzung. Die alternative Gruppierung zeigte, dass die Gruppe der mittleren Nutzer ($1 \leq t \leq 2$) eine erhöhte Frequenz fragmentierter Kerne zeigte (Tab. 4.6).

Tabelle 4.6: Frequenz fragmentierter Kerne pro 1.000 Zellen in Abhängigkeit von der Mobiltelefonnutzung. Modifiziert nach [29].

Mobilfunknutzung [Stunden pro Woche]		Fragmentierte Kerne
t = 0	(n = 13)	0,38 (+/- 0,19)
0 < t ≤ 3	(n = 85)	0,31 (+/- 0,07)
3 < t ≤ 6	(n = 18)	0,08 (+/- 0,06)
6 < t ≤ 9	(n = 12)	0,04 (+/- 0,04)
9 < t ≤ 12	(n = 2)	0,00 (+/- 0,00)
12 < t ≤ 15	(n = 1)	0,00
0 ≤ t < 1	(n = 50)	0,24 (+/- 0,06)
1 ≤ t ≤ 2	(n = 41)	0,43 (+/- 0,14) *
t > 2	(n = 40)	0,09 (+/- 0,04) *

4.3. Terahertzbereich

Die Expositionen fanden bei verschiedenen Leistungsflussdichten für 2 bzw. 8 Stunden statt. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen als Negativkontrolle und mit Chemikalien behandelte Zellen als Positivkontrolle eingesetzt. Da die Kontrollen nicht immer parallel zu spezifischen Expositionen durchgeführt wurden, sind diese Kontrollen als gemittelte historische Kontrollen dargestellt. Die Sham-Expositionen wurden jedoch immer in zeitlichem Zusammenhang zu den Expositionen durchgeführt. Exponiert wurde jeweils mit 0,04 mW/cm², 0,4 mW/cm² und 0,9 mW/cm². Die längere Exposition wurde jeweils nur mit der höchsten Leistungsflussdichte durchgeführt. Bei den Expositionen bei 0,380 THz waren die Leistungsflussdichten aufgrund unterschiedlicher Strahlcharakteristika leicht unterschiedlich. Bei 2,520 THz wurden bei den kurzen Expositionszeiten zusätzlich auch Leistungsflussdichten von 0,1 mW/cm² und 0,2 mW/cm² verwendet. Die langen Expositionen erfolgten hier nur mit 0,2 mW/cm².

4.3.1. Comet Assay

Die HaCaT-Zellen zeigten insgesamt keine signifikante Erhöhung des DNA-Schadens als Folge der Exposition. Dagegen zeigten die mit Methylmethansulfonat (MMS) behandelten Zellen einen deutlich erhöhten DNA-Schaden. Bei 0,106 THz war eine leichte Erhöhung bei der langen Expositionszeit zu beobachten, jedoch war dieser Trend nicht signifikant (Abb. 4.9 - 4.11). Die hohe Standardabweichung deutete auf einen einzelnen Ausreißer hin. Bei 0,380 THz zeigte sich bei den langen Expositionszeiten ein gegenläufiger Trend, hier war die Sham-Exposition leicht gegenüber den restlichen Expositionen erniedrigt, die eigentliche Exposition wies eine sehr niedrige Schadensrate auf. Bei allen Expositionen bei 2,520 THz zeigte sich wie bei den

zweistündigen Expositionen der anderen Frequenzen, dass die Schadenshöhe der Expositionen denen der Kontrollen entsprach.

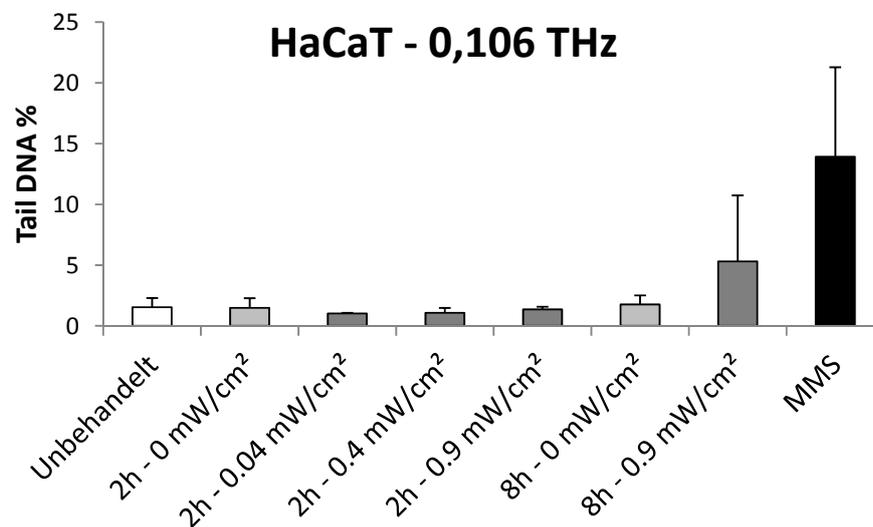


Abb. 4.9: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

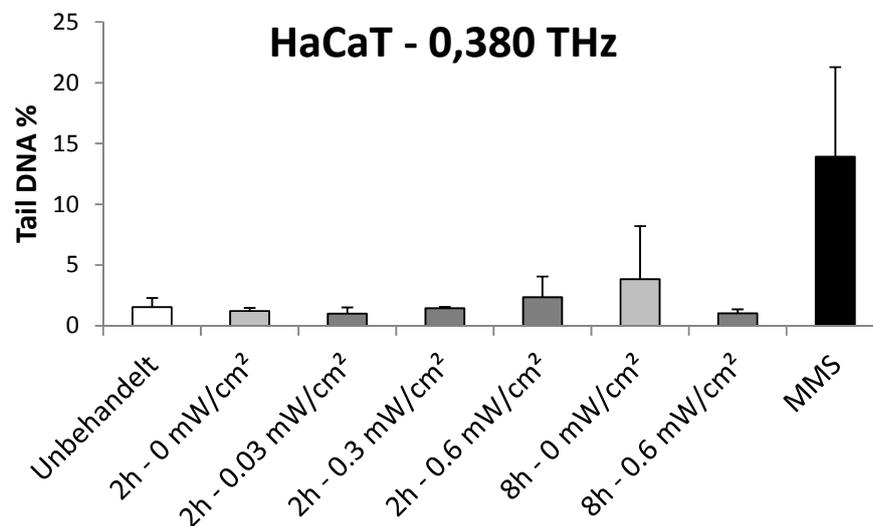


Abb. 4.10: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,380 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

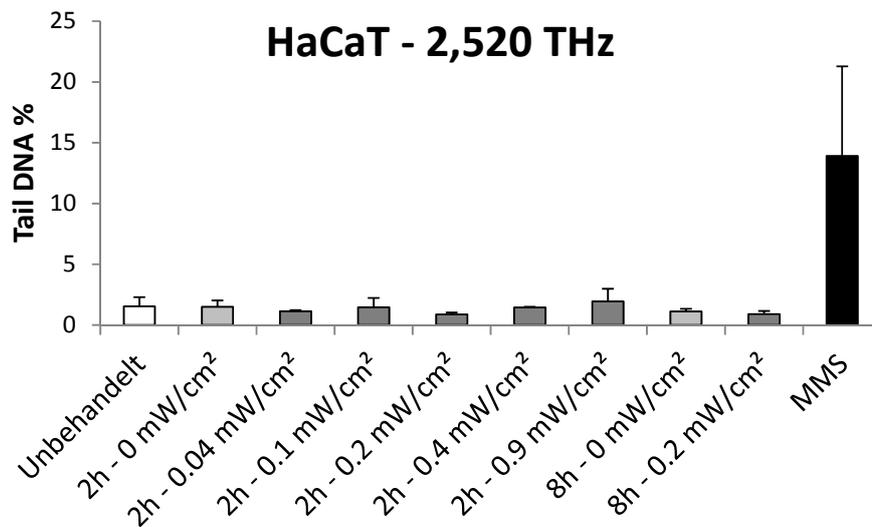


Abb. 4.11: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 2,520 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

Auch die Fibroblasten zeigten insgesamt keinen signifikanten DNA-Schaden als Folge der Expositionen (Abb. 4.12 - 4.14). Die Behandlung mit MMS verursachte einen klaren Anstieg des DNA-Schadens. Dieser war deutlich höher als in den HaCaT-Zellen. Bei 0,106 THz waren leicht schwankende Ergebnisse zu beobachten. So waren die Werte der Sham-Expositionen und der kurzen Exposition mit 0,4 mW/cm² leicht höher als die übrigen Expositionen. Allerdings waren diese Veränderungen nicht signifikant. Bei 0,380 THz traten diese Schwankungen nicht auf, hier war eine leichte Erhöhung bei 0,4 mW/cm² zu verzeichnen, allerdings wiederum nicht signifikant. Auch bei 2,520 THz war auf den ersten Blick keine Veränderung des DNA-Schadens zu beobachten. Es zeigte sich jedoch, dass der DNA-Schaden der kurzen Exposition mit 0,4 mW/cm² statistisch signifikant höher war als die zugehörige Sham-Exposition. Der Wert der Exposition (2,9 %) war jedoch nur marginal höher als der der Sham-Exposition (1,4 %). Die Signifikanz ist hauptsächlich durch die sehr niedrigen Standardabweichungen dieser Exposition und der Sham-Exposition zu erklären. Der Wert der Exposition mit 0,9 mW/cm² beispielsweise lag deutlich höher (5,9 %), war aber nicht statistisch signifikant erhöht.

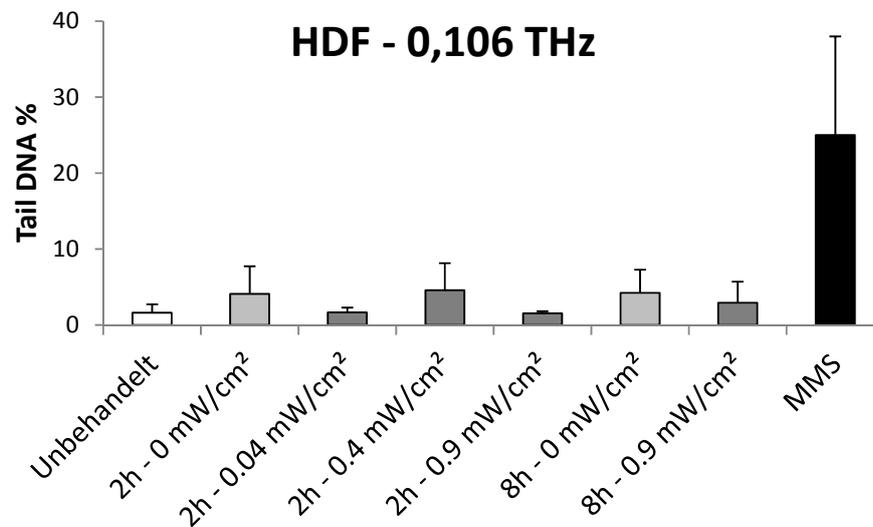


Abb. 4.12: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

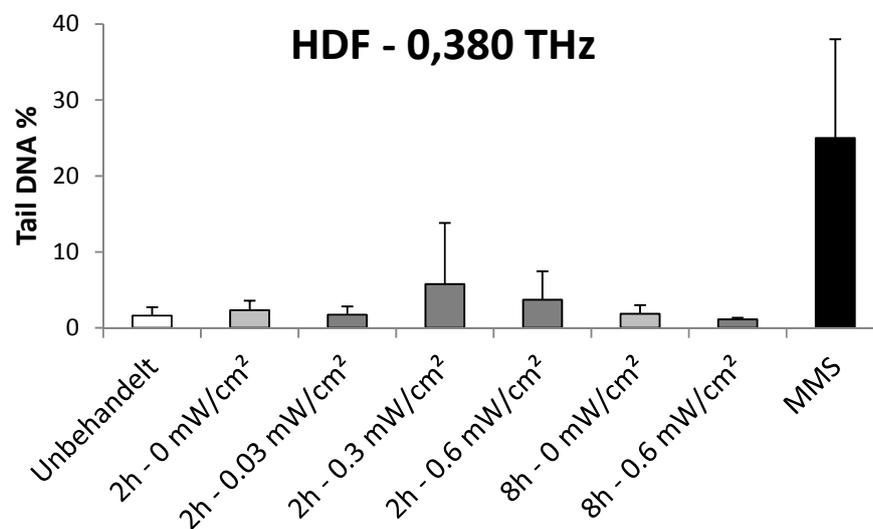


Abb. 4.13: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,380 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

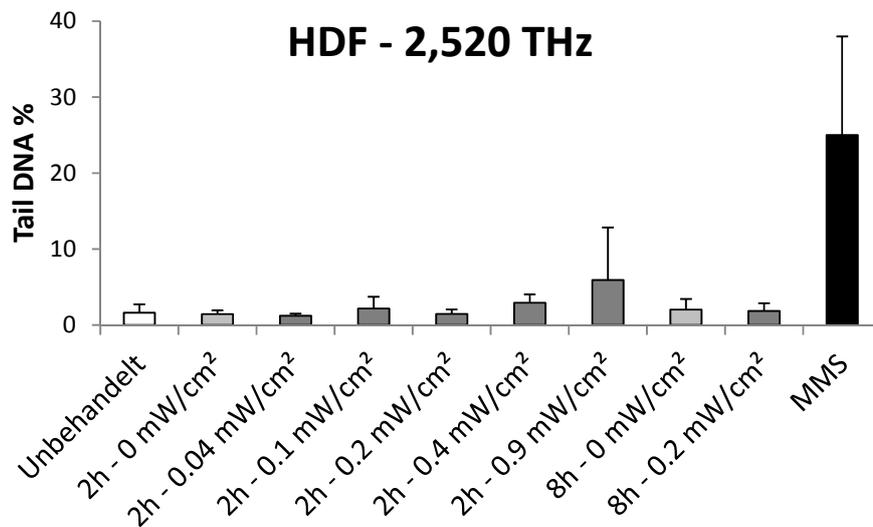


Abb. 4.14: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 2,520 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat. Der Wert der kurzen Exposition bei 0,4 mW/cm² ist signifikant höher als die zugehörige Sham-Exposition ($p \leq 0,05$). Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

4.3.2. Mikrokerntest

Beim Mikrokerntest in HaCaT-Zellen zeigte sich insgesamt, dass keine Erhöhung der Mikrokernelnfrequenz auftrat (Abb. 4.15 - 4.17). Dies gilt für alle drei untersuchten Frequenzen. Mitomycin C (MMC) als Positivkontrolle zeigte eine sehr deutliche Zunahme der Mikrokerne. Dagegen zeigte Vinblastin (VIN) keine vergleichbar starke aber doch eine klare Zunahme. Die beim Comet Assay beobachteten Schwankungen der Werte waren beim Mikrokerntest nicht zu beobachten, die Ergebnisse waren insgesamt stabiler.

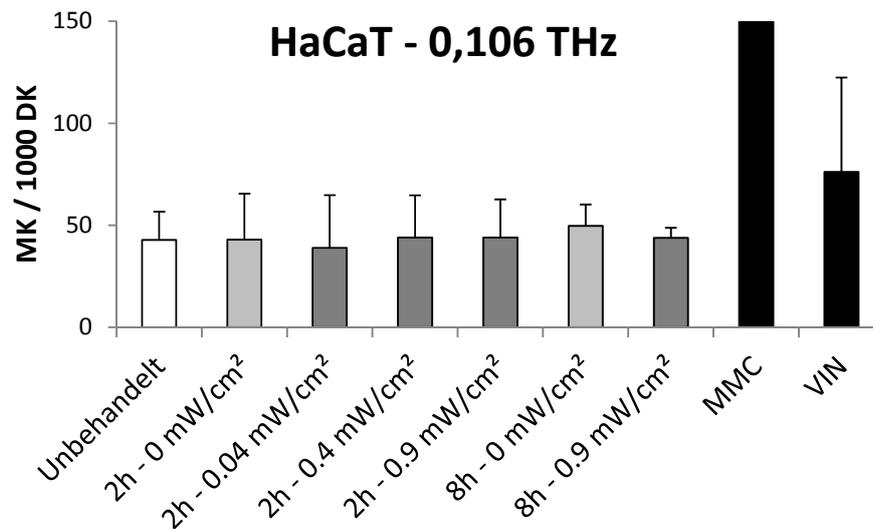


Abb. 4.15: Mikrokernfrequenz in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 doppelkernige Zellen je Exposition bzw. mindestens 1.000 doppelkernige Zellen je Positivkontrolle. MMC-Behandlung: 495 ± 369 MK / 1.000 DK. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

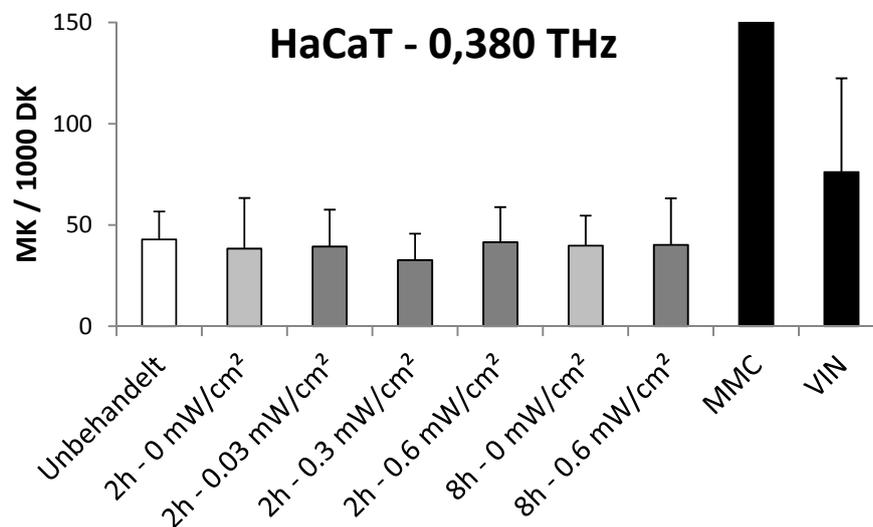


Abb. 4.16: Mikrokernfrequenz in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,380 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 doppelkernige Zellen je Exposition bzw. mindestens 1.000 doppelkernige Zellen je Positivkontrolle. MMC-Behandlung: 495 ± 369 MK / 1.000 DK. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

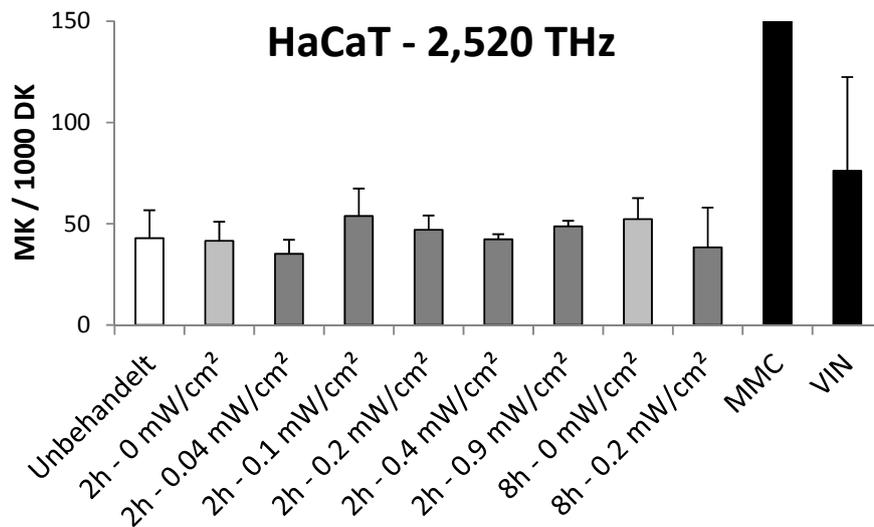


Abb. 4.17: Mikrokernfrequenz in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 2,520 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 doppelkernige Zellen je Exposition bzw. mindestens 1.000 doppelkernige Zellen je Positivkontrolle. MMC-Behandlung: 495 ± 369 MK / 1.000 DK. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

Auch die Proliferation der Zellen war bei den Expositionen unverändert im Vergleich zu den jeweiligen Sham-Expositionen bzw. den unbehandelten Kontrollen (Abb. 4.18 - 4.20). Mit MMC behandelte Zellen proliferierten dagegen deutlich schlechter, bei Vinblastin war die Proliferation sogar noch weiter vermindert.

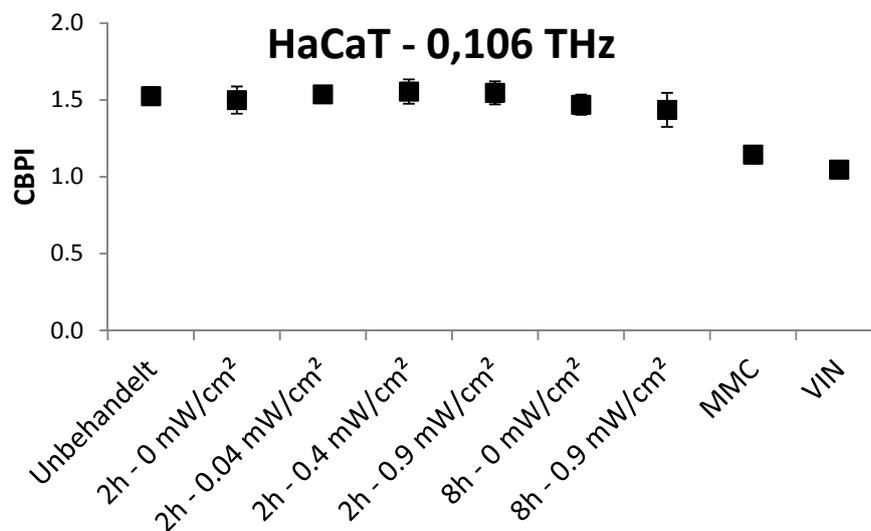


Abb. 4.18: Cytochalasin-B-Proliferationsindex in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

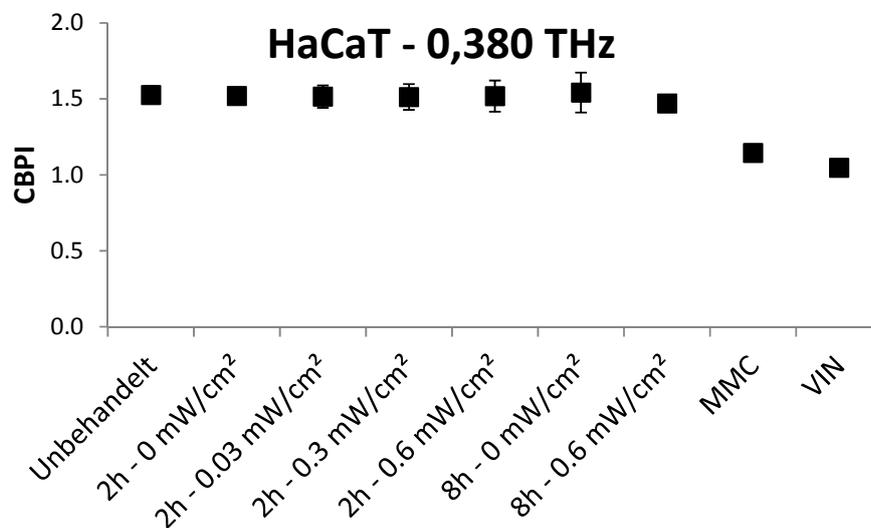


Abb. 4.19: Cytochalasin-B-Proliferationsindex in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,380 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

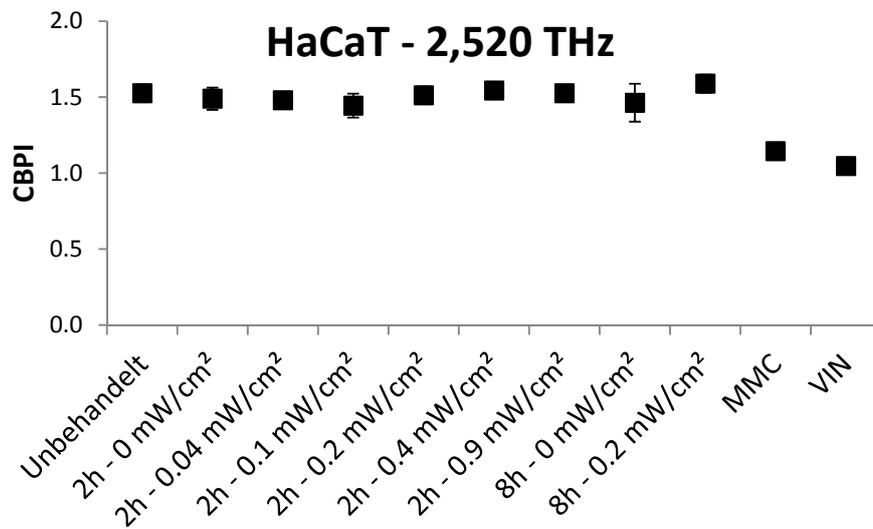


Abb. 4.20: Cytochalasin-B-Proliferationsindex in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 2,520 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

Bei den Fibroblasten war ebenfalls zu beobachten, dass die Mikrokernfrequenz bei den Expositionen nicht erhöht war im Vergleich zu den Sham-Expositionen und den unbehandelten Kontrollen (Abb. 4.21 - 4.23). Sowohl MMC als auch VIN führten zu einer erhöhten Mikrokernfrequenz, allerdings zeigte sich hier im Gegensatz zu den HaCaT-Zellen nur eine moderate Erhöhung nach Behandlung mit MMC.

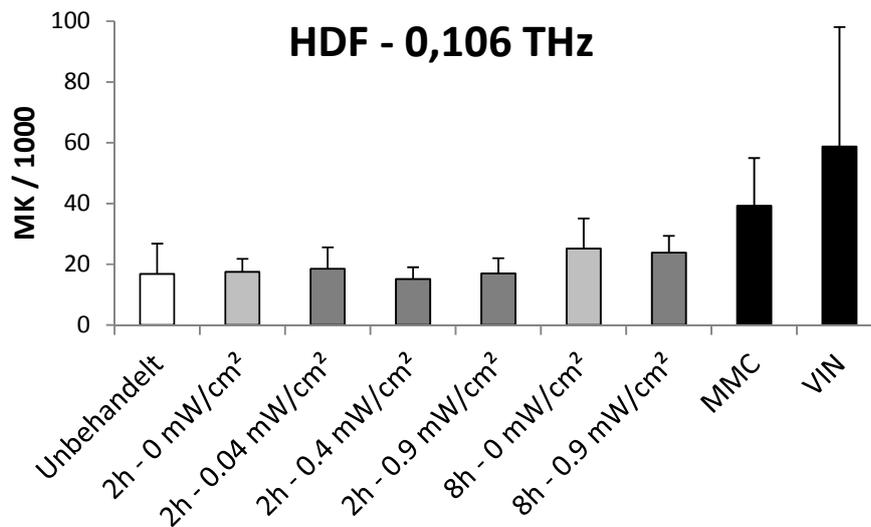


Abb. 4.21: Mikrokernfrequenz in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Exposition bzw. mindestens 1.000 Zellen je Positivkontrolle. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

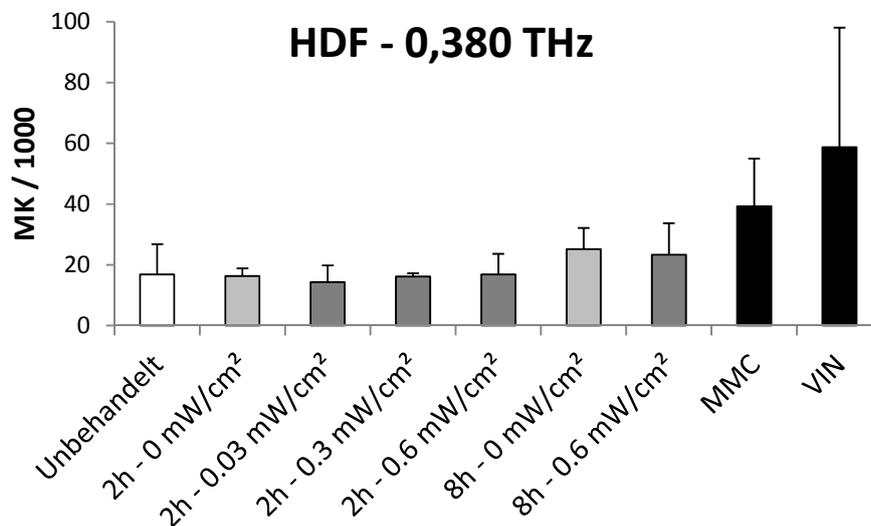


Abb. 4.22: Mikrokernfrequenz in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,380 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Exposition bzw. mindestens 1.000 Zellen je Positivkontrolle. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

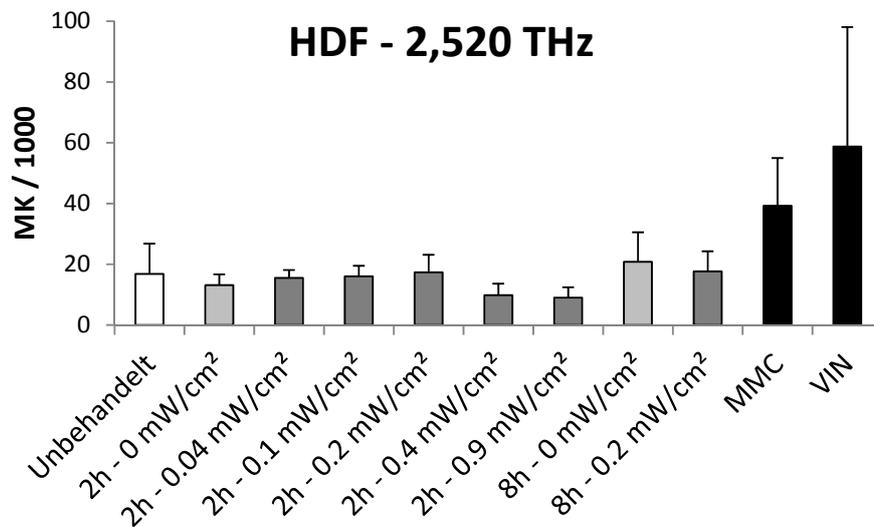


Abb. 4.23: Mikrokernfrequenz in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 2,520 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Exposition bzw. mindestens 1.000 Zellen je Positivkontrolle. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

Der Anteil der EdU-positiven Zellen als Maß für die Proliferation zeigte eine deutlich höhere Variabilität als der Cytochalasin-B-Proliferationsindex bei den HaCaT-Zellen (Abb. 4.24 - 4.26). Es war jedoch keine Abhängigkeit vom Expositionsprotokoll zu erkennen. Die Positivkontrollen zeigten keinen deutlichen Effekt, jedoch war bemerkenswerterweise zu erkennen, dass die mit MMC behandelten Zellen tendenziell einen höheren Anteil an EdU-positiven Zellen enthielten.

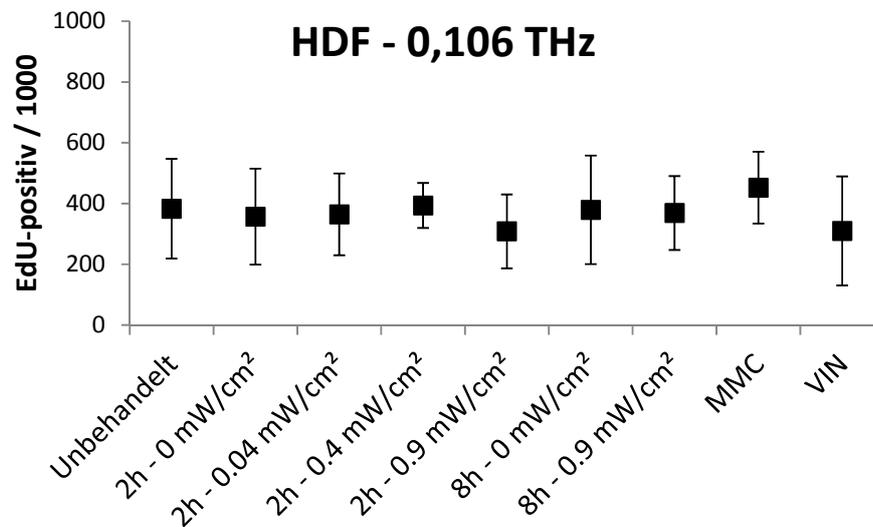


Abb. 4.24: Anteil EdU-positiver Zellen pro 1.000 Zellen in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

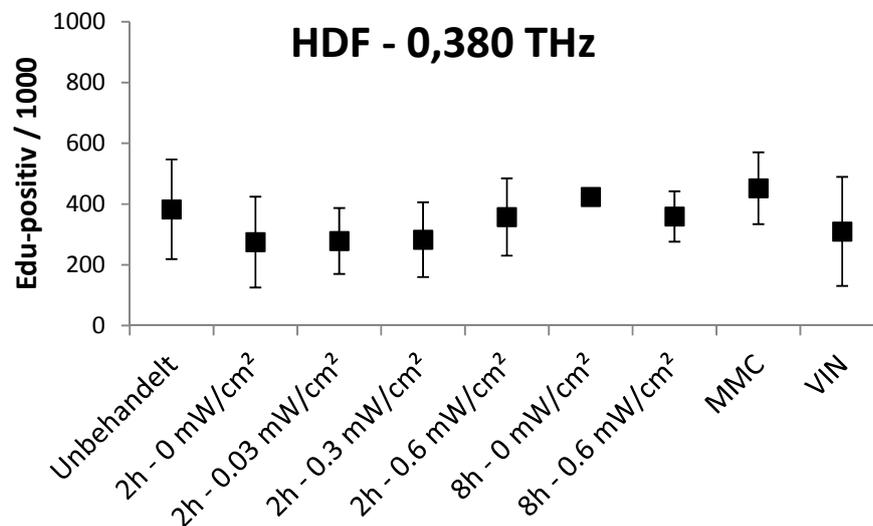


Abb. 4.25: Anteil EdU-positiver Zellen pro 1.000 Zellen in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,380 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

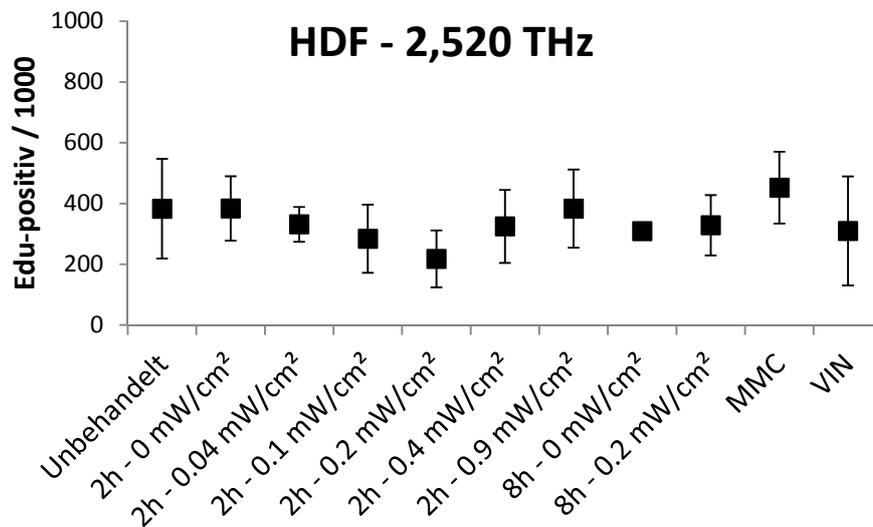


Abb. 4.26: Anteil EdU-positiver Zellen pro 1.000 Zellen in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 2,520 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

4.3.3. Mitosestörungen

Zur Untersuchung der Mitosestörungen wurden Expositionen mit Leistungsflussdichten von 0,04, 0,43 und 4,3 mW/cm² durchgeführt. Für jedes Leistungsflussdichtenniveau inklusive der zugehörigen Kontrollen, d. h. Sham-Expositionen, unbehandelte Kontrolle und Positivkontrolle, wurden zwei Replikate separat exponiert bzw. behandelt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu demonstrieren. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Tabelle 4.7 dargestellt. Insgesamt wurden 6.365 Mitosen ausgewertet. Die Anzahl der Mitosen variierte zwischen 339 und 886, allerdings unabhängig von den Expositionsbedingungen. Störungen in der Metaphase waren bei allen Expositionsbedingungen unverändert und werden daher hier nicht gesondert betrachtet. Tabelle 4.8 zeigt die gemittelten Daten der beiden Replikatexperimente für die Störungen der Ana- und Telophase. Diese Mittelung war gerechtfertigt, da sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Replikaten zeigte

(Tab. 4.9). Tabelle 4.10 zeigt, dass der Anteil an Mitosestörungen der Ana- und Telophase bei den Positivkontrollen und den Expositionen bei 4,3 und 0,43 mW/cm² signifikant erhöht war. Die Exposition bei 0,04 mW/cm² führte nicht zu einer erhöhten Rate an Mitosestörungen. Dieser Zusammenhang wird in Abbildung 4.27 illustriert.

Tabelle 4.7: Anzahl der normalen und gestörten Mitosen in A_L-Zellen nach Exposition für 0,5 h bei 0,106 THz bzw. Inkubation für 6 h mit Trichlorfon (TCF).

mW/cm ²	0	0,04	0,43	4,3	TCF
Ausgewertete Zellen	1061	1188	1529	1225	1362
Normale Mitosen	1050	1173	1496	1202	1327
Prophasen	293	341	424	294	337
Metaphasen	372	464	586	597	600
Ana- und Telophasen	385	368	486	311	390
Mitosestörungen	11	15	33	23	35
Metaphase					
Initiale C-Mitose	0	1	0	2	0
Typische C-Mitose	1	0	1	1	1
Non-congression	0	0	1	0	2
Ana- und Telophase					
Multipolar	0	2	0	0	1
Zurückbleibend	7	6	16	12	15
Non-disjunction	3	6	15	8	16

4. Ergebnisse

Tabelle 4.8: Anzahl der normalen und gestörten Mitosen bzw. Ana- und Telophasen (Mittelwert aus zwei Replikaten).

Exposition	Mitosen	Ana- und Telophasen gesamt	Normale Ana- und Telophasen	Gestörte Ana- und Telophasen	Anteil gestörter Ana- und Telophasen
0 mW/cm ²	1061	395	385	10	0,025
0,04 mW/cm ²	1188	382	368	14	0,037
0,43 mW/cm ²	1529	517	486	31	0,060
4,3 mW/cm ²	1225	331	311	20	0,060
Trichlorfon	1362	422	390	32	0,076

Tabelle 4.9: Z-Test-Statistik zum Vergleich der beiden Replikatexperimente.

Expositionen	Gestörte Ana- und Telophasen	Gestörte Ana- und Telophasen	Z-Wert	p-Wert
	Replikat 1	Replikat 2		
0 mW/cm ²	0,0337	0,0160	1,113	0,133
0,04 mW/cm ²	0,0446	0,0333	0,536	0,296
0,43 mW/cm ²	0,0722	0,0442	0,908	0,092
4,3 mW/cm ²	0,0641	0,0593	0,156	0,438
Trichlorfon	0,0952	0,0601	1,356	0,087

Tabelle 4.10: Z-Test-Statistik zum Vergleich der befeledeten Proben bzw. der Positivkontrollen mit der Sham-Exposition.

Exposition	Gestörte Ana- und Telophasen der Expositionen	Gestörte Ana- und Telophasen der Sham-Exposition	Z-Wert	p-Wert
0,1 mW/cm ²	0,0366	0,0253	0,913	0,181
1 mW/cm ²	0,0600	0,0253	0,994	0,006
10 mW/cm ²	0,0604	0,0253	0,991	0,009
Trichlorfon	0,0758	0,0253	0,999	0,001

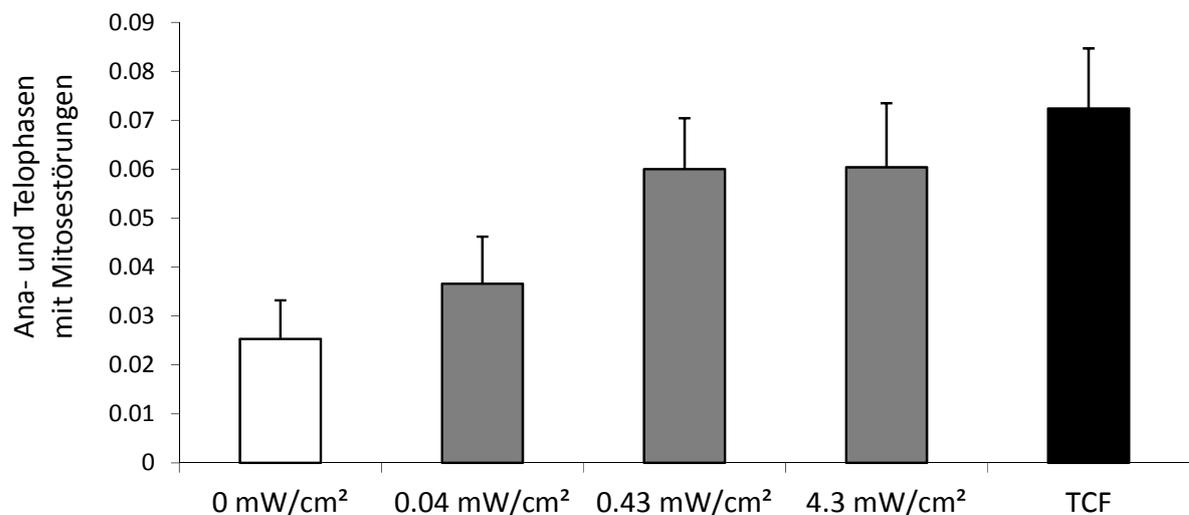


Abb. 4.27: Ana- und Telophasen mit Mitosestörungen nach Exposition bei 0,106 THz mit verschiedenen Leistungsflussdichten bzw. Inkubation mit Trichlorfon (TCF). Es sind jeweils Mittelwert und Standardfehler dargestellt.

5. Diskussion

5.1. Literaturrecherche

Im Rahmen der Literaturrecherche konnten 37 englischsprachige Publikationen, die sich mit Auswirkungen von Terahertzstrahlung auf biologische Systeme beschäftigten, identifiziert werden. Davon waren 8 Arbeiten theoretische Erörterungen, 29 waren experimentelle Studien. Von diesen wurden wiederum 27 genauer analysiert, da zwei der Veröffentlichungen Doppelpublikationen darstellten. In einem Fall wurde die entsprechende Arbeit zunächst als ausführliche Konferenzpräsentation veröffentlicht und anschließend in einer Fachzeitschrift publiziert [88, 89]. In dem anderen Fall handelt es sich um eine tatsächliche Doppelpublikation, bei der zunächst verschiedene Experimente in zwei Artikeln in Fachzeitschriften veröffentlicht wurden [85, 86]. Einige Jahre später wurden dann die gleichen Ergebnisse zusammengefasst in einem weiteren Artikel publiziert ohne die ersten Veröffentlichungen als Referenzen anzugeben [87].

Die Publikationen wurden hinsichtlich verschiedener Kriterien analysiert. Hierzu gehörten u. a. Publikationsdatum, verwendetes Testsystem, Expositionszeit, Frequenz und Ergebnisse. Auffallend war, dass die überwiegende Mehrheit der Studien innerhalb der letzten zehn Jahre durchgeführt wurde. Dies ist damit zu erklären, dass es früher technisch kaum möglich war, geeignete Strahlungsquellen und Detektoren zu konstruieren, die kontrollierte Versuchsbedingungen ermöglicht hätten [4]. Weiterhin zeigte sich deutlich, dass nur 14 % der Arbeiten Tierstudien waren, alle anderen waren in-vitro-Versuche. Dies ist teilweise damit zu begründen, dass die Dosimetrie, die in diesem Frequenzbereich bereits bei in-vitro-Experimenten mit Schwierigkeiten verbunden ist, bei Tierstudien sehr komplex ist. Dennoch sind Tierstudien dringend notwendig, da eine Risikobeurteilung für den Menschen alleine auf Basis von Daten aus in-vitro-Versuchen wegen der sehr unsicheren Extrapolationen nahezu unmöglich ist. Aus dem gleichen Grund sind auch

Experimente, die Expositionen von Menschen direkt untersuchen, notwendig. Zum jetzigen Zeitpunkt können dies nur Provokationsexperimente im Labor sein. Sobald jedoch technische Anwendungen breit eingesetzt werden, sind auch epidemiologische Untersuchungen und Biomonitoring-Studien durchzuführen. Schließlich zeigte sich, dass die meisten Studien bei niedrigen Frequenzen im Terahertzbereich durchgeführt wurden, d. h. unterhalb von 0,150 THz. Nur wenige Arbeiten untersuchten Frequenzen oberhalb von 1 THz, bisher sind keine Studien bei Frequenzen über 4 THz bekannt. In diesem Bereich besteht klarer Forschungsbedarf.

Da die Gesamtzahl der Arbeiten nach wie vor relativ klein ist und sich die Untersuchungsmethoden der einzelnen Studien stark voneinander unterscheiden, war eine vergleichende Analyse der Ergebnisse im Sinne einer Meta-Analyse nicht möglich. Es handelt sich somit lediglich um eine Auflistung der verfügbaren Arbeiten. Alle bisher veröffentlichten Literaturübersichten bzw. Originalarbeiten, die eine solche Übersicht beinhalteten, umfassten nur eine begrenzte Anzahl von Arbeiten. Daher ist die hier vorgelegte Übersicht die erste umfassende Literaturübersicht zu diesem Thema.

Die zukünftige Forschung sollte sich einerseits auf Tierstudien und andererseits auf höhere Frequenzen von 1 bis 10 THz konzentrieren. Es sollte untersucht werden, ob die beobachteten Effekte von anderen Gruppen reproduziert werden können. Weitere Studien zu isolierten Systemen oder Mikroorganismen sollten keine hohe Priorität haben, außer es gilt, die Mechanismen klar gezeigter Wirkungen zu studieren. Studien zu zellulären Systemen sollten sich auf höhere Frequenzen konzentrieren und hier gentoxische und zytotoxische Effekte abklären. Ein Einsatz moderner Omics-Technologien ist erstrebenswert. Weiterhin sind Tierstudien mit aussagekräftigen Endpunkten (wie z. B. akute und chronische Toxizität, Gentoxizität, Mutagenität, Teratogenität) notwendig, um die Datenbasis für eine Risikobeurteilung zu vergrößern und verbessern. Schließlich sollten auch Studien zu Auswirkungen auf den menschlichen Organismus durchgeführt werden.

5.1.1. Übersichtsarbeiten

Reine Literaturübersichten konzentrierten sich bisher auf chinesische Studien zu Auswirkungen auf Pflanzen [36], russische Originalstudien [37] und die Arbeiten, die im Rahmen des THz-Bridge-Projektes entstanden [38, 81]. Weitere Arbeiten beschäftigten sich theoretisch mit dem Thema, indem sie mögliche Wirkmechanismen, hauptsächlich durch mathematische Berechnungen oder in-silico-Modellierungen, untersuchten. Meistens wurden hier bestimmte Effekte vorhergesagt. Diese Wirkungen sind jedoch bisher experimentell nicht gefunden bzw. untersucht wurden.

5.1.2. Originalarbeiten

Es ist nicht möglich, aus den experimentellen Untersuchungen eine allumfassende Schlussfolgerung zu ziehen, da zu viele Parameter zwischen den Studien variieren und die Gesamtzahl der Untersuchungen sehr gering ist.

Auswirkungen auf Proteinfunktionen sind unklar, trotz teilweise sehr ähnlichem Versuchsaufbau liegen hier unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse vor. Die meisten dieser Studien sind bereits relativ alt, unter Umständen sind die Inkonsistenzen auf technische Unzulänglichkeiten zurückzuführen, hierfür gibt es jedoch bisher keine Belege. Pulsfrequenz-abhängige Effekte auf die Stabilität von Liposomen konnten jedoch klar gezeigt werden [91]. Diese Wirkungen wurden mit dem gleichen Testsystem auch bei niederfrequenten Feldern bzw. niederfrequent modulierten Radiowellen gefunden.

Die Ergebnisse von Studien mit Mikroorganismen sind widersprüchlich und erlauben bisher keine abschließende Bewertung. Es wurde sowohl von Wachstumshemmung

als auch Wachstumsbeschleunigung berichtet. Beide Befunde zusammen deuten entweder auf einen extrem komplexen Wirkmechanismus oder aber auf fehlerhafte Experimente. Nach heutiger Datenlage erscheint letzteres wahrscheinlicher. Das Gleiche gilt für Befunde zu veränderter DNA-, RNA- und Proteinsynthese.

Studien zu zellulären Systemen einschließlich Blutzellen zeigten, dass gentoxische und zytotoxische Effekte nicht auftreten. Auch Membranstabilitäten und Veränderungen der Morphologie und der Differenzierung konnten nicht gezeigt werden. Es gibt einzelne Hinweise auf eine Hemmung der DNA-Synthese, Veränderungen an Neuronen und Verursachung von Aneuploidie. Sollten diese Effekte bestätigt werden, müsste der Wirkmechanismus auch im Hinblick auf Leistungs-, Expositionszeit- und Frequenzabhängigkeit genauer untersucht werden. Gewebeschaden konnte bei sehr hohen Leistungsflussdichten verursacht durch Temperaturzunahme deutlich gezeigt werden.

Die methodische Beschreibung der Tierstudien ist unzureichend, die Ergebnisse sind teilweise widersprüchlich. Die Studien beschäftigten sich mehrheitlich mit der Beobachtung von Verhaltensänderungen. Nötig wären hier Studien, die aussagekräftige toxikologische Endpunkte untersuchen. Hierzu gehören unter anderem akute und chronische Toxizität, Gentoxizität, Mutagenität und Teratogenität.

5.2. Mobilfunkbereich

Die Frage, ob Hochfrequenzstrahlung neben den gut dokumentierten und akzeptierten Wärmeeffekten andere Auswirkungen auf biologische Systeme haben kann, wird seit langem kontrovers diskutiert und ist beinahe so alt wie die technische Nutzung elektromagnetischer Felder [10]. Obwohl eine Vielzahl an Studien auf allen biologischen Ebenen durchgeführt wurde, ist diese Frage nach wie vor nicht abschließend beantwortet. Die Mehrzahl der Untersuchungen zeigt keine Auswirkungen unterhalb der Schwelle zu thermischen Effekten, allerdings ist die wissenschaftliche Gemeinschaft immer noch weit davon entfernt, einen übergreifenden Konsens zu erreichen [11, 12]. Die Hypothese, dass nichtionisierende Strahlung keine Effekte bei sehr niedrigen Intensitäten ausübt, wird durch biophysikalische Überlegungen zu Interaktionen zwischen der Strahlung und biologischen Systemen gestützt. Es ist derzeit kein möglicher Mechanismus denkbar, der solche Wirkungen erklären könnte. Sogenannte nicht-thermische Effekte werden immer wieder zur Diskussion gestellt. Es ist jedoch zu beachten, dass dieser Ausdruck zwei mögliche Bedeutungen haben kann. Einerseits kann damit gemeint sein, dass Wirkungen nicht durch Erwärmung, sondern auf anderem Wege vermittelt werden. Solche Wirkungen sind tatsächlich experimentell bestätigt worden, allerdings nur bei extrem hohen Intensitäten, so dass diese Wirkungen immer mit thermischen Wirkungen einhergehen und im Falle von biologischen Systemen in der Regel von diesen überdeckt werden. Die zweite Bedeutung des Begriffs umfasst schlicht solche Effekte, die bei sehr niedrigen Intensitäten beobachtet werden, bei denen keine Temperaturerhöhung gemessen wird oder nicht angenommen werden kann. Die Beobachtung solcher Effekte wurde immer wieder behauptet, allerdings konnten sie bisher nicht konsistent und reproduzierbar bewiesen werden [77].

5.2.1. Expositionen in vitro

In einem ersten Experiment wurden humane Zellen mit einer Frequenz von 900 MHz exponiert. Diese Frequenz wird bei dem international verbreiteten Mobilfunkstandard GSM verwendet und somit sind große Teile der Weltbevölkerung dieser Strahlung durch Basisstationen und Mobiltelefone ausgesetzt. Es wurde für 30 Minuten exponiert, da aus vorangegangenen Experimenten mit einer sehr ähnlichen Expositionsapparatur bekannt war, dass nach diesem Zeitraum bereits Mitosestörungen auftreten [22, 23]. Exponiert wurde mit Feldstärken von 0 V/m als Sham-Exposition über 5, 10 und 30 bis zu 90 V/m. Letztere wurde gewählt, da dieser Wert der von der ICNIRP empfohlene Grenzwert für beruflich exponierte Personen ist. Dieser Wert wurde mit der 26. Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes auch in Deutschland in die gesetzlichen Regularien aufgenommen. Es zeigte sich keine Erhöhung der Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit von der Feldstärke. Um festzustellen, ob eventuell doch längere Expositionszeiten nötig sind, wurde bei 90 V/m auch für 60 Minuten exponiert, jedoch zeigte sich auch hier keine Erhöhung der Mikrokernfrequenz (Abb. 4.2.).

Dieser Befund scheint im Gegensatz zu den Ergebnissen der Untersuchungen zu Mitosestörungen zu stehen. Die gängige Vorstellung von der Mikrokernentstehung geht davon aus, dass diese entweder durch Chromosomenfragmente oder aber durch fehlverteilte Chromosomen entstehen. Die zweite Möglichkeit bedeutet jedoch im Umkehrschluss, dass Mitosestörungen im weiteren Verlauf zu Mikrokernen führen sollten. Dies passiert sicherlich nicht in allen Fällen, da als alternative Möglichkeit denkbar wäre, dass Mitosestörungen noch während der Mitose repariert werden oder aber, dass die fehlverteilten Chromosomen nicht zwischen den Tochterkernen liegen bleiben, sondern auf den „falschen“ Kern verteilt werden. Dies würde zu aneuploiden Zellen, aber nicht zu detektierbaren Mikrokernen führen. Dennoch ist davon auszugehen, dass ein bestimmter Anteil der Mitosestörungen zu Mikrokernen führen sollte. Daher war es das Bestreben der folgenden Experimente, die Diskrepanz der vorliegenden Befunde aufzuheben bzw. aufzuklären.

Hierzu wurden die weiteren Experimente mit den A_L-Zellen durchgeführt, in denen auch die Mitosestörungen beobachtet wurden. Wiederum wurde mit verschiedenen Feldstärken exponiert, in diesem Fall sowohl mit kontinuierlichen Signalen als auch mit GSM-modulierten Wellen. Analog zu den Ergebnissen mit den HaCaT-Zellen konnte kein DNA-Schaden beobachtet werden (Abb. 4.3 und 4.4). Neben den Expositionen wurden die Zellen auch mit MMS als Positivkontrolle behandelt, wobei sich eine deutliche Zunahme der Mikrokernfrequenz zeigte. Dies zeigte, dass das verwendete Protokoll des Mikrokerntests geeignet ist, einen DNA-Schaden zu detektieren. Diese Befunde stimmen mit zahlreichen anderen Untersuchungen überein, die ähnliche Expositionsbedingungen und Endpunkte untersuchten [31-33].

Somit bestanden weiterhin die gegensätzlichen Befunde bezüglich Mitosestörungen und Mikrokerninduktion. Für eine mögliche Erklärung wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Strahlung ausschließlich auf mitotische Zellen wirkt. Dies würde bedeuten, dass die Analyse der Mitosestörungen alle potentiell betroffenen Zellen untersucht, während der Mikrokerntest zwar ähnlich viele Zellen betrachtet, jedoch von diesen Zellen nur ein Bruchteil potentiell betroffen sein kann, da sich während der Befeldung nur ein gewisser Anteil aller Zellen in der Mitose befindet. Die weiteren Experimente, die ausschließlich mit der höchsten Feldstärke von 90 V/m durchgeführt wurden, hatten daher zum Ziel, das Versuchsprotokoll des Mikrokerntests dem der Mitosestörungen anzupassen bzw. den Mikrokerntest sensitiver für in der Mitose entstandenen Schaden zu gestalten.

Dazu wurde zunächst die Postinkubationsperiode verkürzt. Eine direkte Fixierung nach der Exposition wie bei den Mitosestörungen war nicht möglich, da somit eine Mikrokerninduktion praktisch ausgeschlossen worden wäre. Daher wurde eine Postinkubationsperiode von 4 Stunden ohne Cytochalasin B gewählt. Es zeigte sich jedoch keine Erhöhung der Mikrokernfrequenz, weder bei einer Expositionszeit von 30 Minuten noch von 60 Minuten (Abb. 4.5). Unter diesen Bedingungen konnte jedoch nicht sichergestellt werden, dass die Proliferation der Zellen unverändert blieb und eine Entstehung von Mikrokernen überhaupt möglich war. Aus diesem Grund wurde die 30-minütige Exposition mit anschließender Inkubation mit Cytochalasin B für 4 Stunden wiederholt. Es zeigte sich, dass es bezüglich der Proliferation keinen

Unterschied zwischen der Exposition und der Sham-Exposition gab. Auch die Mikrokernfrequenz blieb unverändert (Abb. 4.6).

Da bereits die Postinkubationsperiode von 4 Stunden zu sehr geringen Anteilen an doppelkernigen Zellen führte, war eine weitere Reduzierung nicht möglich. Daher wurde in einem weiteren Experiment ein anderer Ansatz in Form von Langzeitexpositionen verfolgt. Hierzu wurden die Zellen für 21 Stunden unter Zugabe von Cytochalasin B exponiert. Diese Zeitspanne entspricht ungefähr der Verdoppelungszeit der A_L -Zellen. Einerseits erleichterte dieses Vorgehen die Auswertung, da durch die lange Cytochalasin-B-Inkubation genügend doppelkernige Zellen für die Analyse zur Verfügung standen. Andererseits gewährleistete dieses Protokoll, dass sich alle doppelkernigen Zellen während der Exposition in der Mitose befanden. Auch unter diesen Bedingungen war keine Erhöhung der Mikrokernfrequenz zu beobachten (Abb. 4.7).

Diese Ergebnisse weisen insgesamt darauf hin, dass die „fehlende“ Mikrokerninduktion nicht mit einer geringeren Sensitivität des Testverfahrens gegenüber der Prüfung auf Mitosestörungen erklärt werden kann. Voraussetzung dafür ist auch die Annahme, dass die Strahlung nur auf mitotische Zellen, nicht aber auf solche in der Interphase wirken kann. Auch hierfür konnte bisher kein Beleg gefunden werden. Es konnte somit nicht geklärt werden, warum die beobachteten Mitosestörungen nicht zu einer Erhöhung der Mikrokernfrequenz führten. Es verbleiben zwei mögliche Erklärungen. Entweder werden die Mitosestörungen im weiteren Verlauf der Mitose repariert bzw. die Zelle wird in der Mitose arretiert und kann somit keine Mikrokerne bilden. Oder die fehlverteilten Chromosomen bleiben nicht in der Mitte liegen, sondern werden auf den falschen Tochterzellkern verteilt, so dass es zu Aneuploidie kommt. Ob und welche dieser Varianten zutrifft konnte im Rahmen dieser Arbeit bisher nicht untersucht werden und bleibt Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten.

5.2.2. Biomonitoring

Zu den größten Bedenken der Bevölkerung bezüglich der Exposition mit elektromagnetischer Strahlung gehört die mögliche Verbindung von Mobilfunkbenutzung und Krebs. Diese Verbindung kann nur durch epidemiologische Studien (und mit einigen Einschränkungen durch Studien am Tier) bestätigt oder verworfen werden. Dennoch sind in-vitro-Studien und Biomonitoring-Untersuchungen mit Genotoxizitäts-Endpunkten wertvolle Methoden um die verfügbare Datenbasis zu vergrößern und zu verbessern. Der Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen ist ein zuverlässiger und weit verbreiteter Test, der nicht nur DNA-Schaden, sondern auch chromosomale Fehlverteilungen und Zelltod bestimmen kann [58]. Die Zellentnahme ist nicht invasiv, so dass die Probenentnahme schnell und kostengünstig durchgeführt werden kann. Der Test eignet sich in besonderem Maße zur Untersuchung möglicher Effekte durch Mobiltelefone, da die untersuchten Zellen einer Region entstammen, die direkt in der Expositionszone liegt. Es ist theoretisch denkbar, Proben von linker und rechter Wange zu entnehmen und separat auszuwerten. Einige epidemiologische Untersuchungen zeigten eine Erhöhung der Hirntumorfrequenz auf der ipsilateralen Seite bezogen auf die Seite der Mobiltelefonnutzung [11]. Diese Unterscheidung wurde jedoch in dieser Untersuchung nicht vorgenommen, da die Nutzung eines Mobiltelefons in den meisten Fällen nicht auf eine einzige Seite beschränkt ist. Selbst wenn eine bevorzugte Seite existiert, werden viele Menschen die Seite von Telefonat zu Telefonat oder sogar während eines Telefonats wechseln. Darüber hinaus ist bisher nicht genau bestimmt worden, ob im Bereich der Mundschleimhaut überhaupt ein Unterschied in der Feldintensität zwischen beiden Wangenseiten besteht.

Zur Zellentnahme werden in vielen Studien Holzspatel oder kleine Bürsten eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Holzstab mit Wattebausch verwendet, da diese Methode eine hohe Zellzahl extrahiert und für die Probanden nicht unangenehm ist. Zusätzlich werden mit dieser Entnahmemethode bei der Auswertung nur differenzierte Zellen beobachtet, so dass die Auswertung vereinfacht wird, da nicht zwischen differenzierten und undifferenzierten Zellen unterschieden werden muss.

Dies ist nicht von Nachteil, da der Anteil nicht differenzierter Zellen ohnehin wahrscheinlich nur durch den ausgeübten Druck bei der Probenentnahme bestimmt wird. Es ist allgemein anerkannt, dass Mikrokern nur in differenzierten und nicht in undifferenzierten Zellen quantifiziert werden sollten.

Die Färbemethode ist einer der kritischen Schritte bei der Analyse von Mikrokernen in Mundschleimhautzellen [117]. Es ist essentiell für die Zellkernfärbung, dass DNA-spezifische Farbstoffe verwendet werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Verwendung nicht-DNA-spezifischer Farbstoffe eine Erhöhung der Mikrokernfrequenz (in diesem Beispiel von Rauchern) auf das Vierfache beobachtet werden kann, obwohl diese Erhöhung bei Verwendung von DNA-spezifischen Farbstoffen nicht gesehen wird [118]. Dies zeigt, dass eine Mikrokernzunahme bei der Verwendung nicht-DNA-spezifischer Färbungen sehr stark überschätzt werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde ein anti- α -Tubulin-Antikörper zur Färbung des Zytoplasmas [119] und Chromomycin A₃ zur Färbung des Zellkerns [120] verwendet. Diese Methode hat folgende Vorteile:

- ✓ Stabile Langzeit-Färbung, die eingedeckt werden kann
- ✓ Einfache und robuste Prozedur
- ✓ Die Kerne heben sich deutlich vom Plasma in grün ab
- ✓ DNA-spezifische Färbung

Es konnte in dieser Untersuchung kein Unterschied in der Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Body-Mass-Index oder Rauchen festgestellt werden. Diese Ergebnisse stimmen mit zahlreichen anderen Untersuchungen, die den Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen verwendeten, überein [63]. Dagegen korrelieren diese Resultate nicht mit Beobachtungen in Lymphozyten, in denen höhere Mikrokernfrequenzen bei Frauen und älteren Personen gezeigt wurden. Proben der männlichen Teilnehmer zeigten einen höheren Anteil an fragmentierten Kernen als die Proben der weiblichen Teilnehmer. Dabei ist zu beachten, dass die Frequenzen der fragmentierten Kerne insgesamt in einem sehr niedrigen Bereich liegen (< 0,5 ‰), eine hohe Variabilität aufweisen und daher schwer zu interpretieren

sind. Weitere Studien sind erforderlich um diesen Befund besser einordnen zu können.

Patienten, die eine hochdosierte Strahlentherapie erhielten, zeigten eine deutlich erhöhte Frequenz an Mikrokernen. Dies demonstriert klar, dass der Mikrokerntest in Mundschleimhautzellen geeignet ist, Genomschaden zu detektieren.

Bisher ist weltweit nur eine Studie durchgeführt worden, die DNA-Schäden in Form von Mikrokernen in Mundschleimhautzellen als Folge von Mobiltelefonnutzung untersuchte [27]. Diese Arbeit zeigte eine signifikante Erhöhung der Mikrokerne bei Nutzern gegenüber Nichtnutzern. Es wurde nicht unterschieden zwischen verschiedenen Benutzungsdauern pro Tag bzw. Woche, aber die Probanden wurden entsprechend der Zeit, seit der das Mobiltelefon verwendet wurde, gruppiert. Die Autoren deklarieren hier eine positive Korrelation, obwohl die präsentierten Daten dies nicht erkennen lassen. Im Gegensatz dazu wurde in der vorliegenden Arbeit kein Einfluss der Mobiltelefonnutzung festgestellt, weder in Bezug auf die Benutzungsdauer noch auf die Zeit, seit der das Mobiltelefon benutzt wurde. Mehrere Punkte können die gegensätzlichen Ergebnisse dieser beiden Arbeiten erklären. Im Gegensatz zu nur je 1.000 Zellen von 109 Probanden wurden in der vorliegenden Arbeit jeweils 2.000 Zellen von 131 Probanden ausgewertet, wodurch insgesamt weit mehr als das Doppelte an Zellen analysiert wurde. Dies führt zu einer wesentlich höheren statistischen Aussagekraft, kann aber alleine nicht für die verschiedenen Resultate verantwortlich sein. Weiterhin unterschieden sich die beiden Studien in der Färbetechnik. Während in der vorliegenden Arbeit Chromomycin A₃, ein DNA-spezifischer Farbstoff [120], verwendet wurde, setzen Yadav et al. [27] Orcein ein. Dieser Farbstoff ist nicht DNA-spezifisch und kann daher nicht nur DNA enthaltende Mikrokerne, sondern auch andere Artefakte, die nicht mit genomischer Instabilität assoziiert sind, anfärben [118]. Darüber hinaus ist bekannt, dass das Kauen von Betel-Zubereitungen oder ähnlichen Präparationen in Indien, wo diese Studie durchgeführt wurde, weit verbreitet und beliebt ist. Es konnte gezeigt werden, dass das Kauen zu deutlichen Erhöhungen der Mikrokernelfrequenz in Mundschleimhautzellen führen kann [121]. Unter Umständen hatten Yadav et al. nicht die Möglichkeit, diesen Confounder zuverlässig auszuschließen. Die unter-

schiedlichen Ausgangswerte der nichtexponierten Personen könnten auch durch die unterschiedlichen Färbetechniken erklärt werden. Alternativ wäre auch ein genotypischer Unterschied in der Population ein möglicher Erklärungsansatz.

5.3. Terahertzbereich

5.3.1. Comet Assay

Im Terahertzbereich wurden drei Frequenzen untersucht, 0,106 THz, 0,380 THz und 2,520 THz. Es wurden mehrere Leistungsflussdichten verwendet und jeweils für eine kurze (2 Stunden) und eine lange (8 Stunden) Expositionszeit exponiert. Zusätzlich wurden unbehandelte Kontrollen, Sham-Expositionen und Positivkontrollen durchgeführt. Weder die Fibroblasten noch die HaCaT-Zellen zeigten bei den Expositionen erhöhten DNA-Schaden im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Abb. 4.9 bis 4.14). Dagegen verursachte die Behandlung mit MMS eine deutliche Erhöhung des DNA-Schadens. Letzteres zeigt, dass der Comet Assay unter diesen Versuchsbedingungen gut geeignet ist, Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA zu detektieren.

Bei hohen Frequenzen über 0,150 THz sind bisher keine Untersuchungen auf Gentoxizität durchgeführt wurden. Als Pilotstudie lassen sich die Ergebnisse bei 0,380 THz und 2,520 THz somit nicht mit Literaturberichten vergleichen. Die Ergebnisse bei 0,106 THz sind jedoch vergleichbar mit einigen Untersuchungen im Rahmen des THz-Bridge-Projektes [93, 99]. Hier wurden Lymphozyten bei 0,130 THz für 20 Minuten bestrahlt. Dabei wurden zum überwiegenden Teil beobachtet, dass kein DNA-Schaden verursacht wurde. Nur unter bestimmten Versuchsbedingungen traten Erhöhungen des Schadens auf [99]. Dies war jedoch nur in einem von mehreren Versuchsaufbauten der Fall, hier wurde die Probe in einem metallischen

Konus exponiert. Die Autoren spekulieren über möglicherweise auftretende Resonanzeffekte in diesem Konus. Allerdings waren die Leistungsflussdichten mit 2 und 5 mW/cm² auch deutlich höher als in der vorliegenden Arbeit. Insgesamt stimmen die hier präsentierten Ergebnisse mit den bereits gefundenen, negativen Ergebnissen überein, die vereinzelt Befunde mit erhöhtem DNA-Schaden konnten nicht bestätigt werden.

Die verwendeten Zellen wurden auch in anderen Untersuchungen verwendet. So wurden in neueren Studien ebenfalls primäre humane Hautfibroblasten exponiert, bei denen festgestellt wurde, dass die Genexpression bestimmter Proteine unverändert blieb [89, 109]. Es wurde eine Verringerung der Vitalität beobachtet, die auf die Erwärmung der Proben zurückgeführt werden konnte. Primäre Keratinozyten, denen die hier verwendeten HaCaT-Zellen ähneln, wurden ebenfalls im Terahertzbereich exponiert. Hier wurde u. a. die Vitalität untersucht, die jedoch unverändert blieb [100, 101]. In allen diesen Studien wurden zwar andere Untersuchungsmethoden verwendet, sie stützen jedoch die hier beschriebenen Erkenntnisse, dass Terahertzstrahlung bei niedrigen Leistungsflussdichten keine Auswirkungen auf biologische Systeme hat.

5.3.2. Mikrokerntest

Die Expositionen für den Mikrokerntest fanden unter den gleichen Bedingungen wie für den Comet Assay statt, d. h. die Frequenzen waren 0,106 THz, 0,380 THz und 2,520 THz und es wurden verschiedene Leistungsflussdichten und Expositionszeiten verwendet. Bei den Expositionen traten keine erhöhten Mikrokernfrequenzen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen auf, auch die Proliferation war unverändert (Abb. 4.15 bis 4.26). Die Behandlungen mit Mitomycin C zeigten einen sehr deutlichen Anstieg. Die mit Vinblastin behandelten Zellen reagierten zwar nicht in diesem starken Maße, zeigten aber auch eine Erhöhung der Mikrokernfrequenz.

Diese beiden Substanzen wurden gewählt, weil Mitomycin C eine typisch klastogene, d. h. Chromosomen brechende, und Vinblastin eine typisch aneugene, d. h. Chromosomenfehlverteilungen verursachende, Substanz ist. Somit ist sichergestellt, dass der Mikrokerntest in diesem Versuchsprotokoll in der Lage ist, beide möglichen Arten der Mikrokernelntstehung zu detektieren.

Untersuchungen mit dem Mikrokerntest bei Frequenzen über 0,150 THz liegen bisher nicht vor. Somit sind bisher keine Ergebnisse publiziert, mit denen die erhaltenen Daten verglichen werden könnten. Dagegen haben drei Studien den Mikrokerntest bei Lymphozyten, die mit 0,120 bzw. 0,130 THz bestrahlt wurden, eingesetzt [92, 93, 99]. Bei allen diesen Studien war die Anzahl der Mikrokerne bei den Expositionen unverändert gegenüber den Kontrollen. Somit bestätigen diese Untersuchungen die hier vorgelegten Ergebnisse.

Ungeklärt bleibt auch hier der Zusammenhang zwischen induzierten Mitosestörungen und nicht induzierten Mikrokerneln analog zu den Untersuchungen im Mobilfunkbereich (s. 5.2.1.). Auch hier wäre eine Zunahme der Mikrokerne als Folge der Mitosestörungen zu erwarten, besonders, da hier die Expositionszeiten deutlich länger als 30 Minuten sind und somit mehr Zellen während der Mitose exponiert wurden.

Weitere Untersuchungen sollen zukünftig klären, ob eine Langzeitexposition von 24 Stunden zu einer Erhöhung der Mikrokernelanzahl führt.

5.3.3. Mitosestörungen

Außer im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zu Mitosestörungen als Folge von Terahertzstrahlung bisher nicht durchgeführt worden. Eine Studie untersuchte jedoch das Auftreten von Aneuploidie, eine Störung die unter Umständen als Folge von Mitosestörungen auftreten kann [94]. Hier wurden isolierte Lymphozyten 1 - 6 Stunden vor der Exposition mit Phytohämagglutinin (PHA) stimuliert und anschließend für 1, 2 und 24 Stunden bei 0,1 THz exponiert. Die Rate der auftretenden Aneuploidie als Marker für genomische Instabilität wurde mit Hilfe der FISH-Technik bestimmt. Als Ergebnis wurde bei verschiedenen Chromosomen Aneuploidie beobachtet. Die verwendete Frequenz von 0,1 THz liegt sehr nah bei der Frequenz von 0,106 THz, die in der vorliegenden Untersuchung eingesetzt wurde. Das Auftreten aneuploider Zellen kann jedoch nicht direkt mit den gefundenen Mitosestörungen verglichen werden, da unterschiedliche Mechanismen für die Entstehung dieser beiden Störungen verantwortlich sein können. Es ist zwar seit langem bekannt, dass Mitosestörungen zu numerischen Chromosomenabberationen führen können, die sich wiederum in Form von Aneuploidie manifestieren können, jedoch sollten dabei Beobachtungen von Kadhim et al. beachtet werden [122]. Hier wurde durch Messung des DNA-Gehalts in Lymphozyten beobachtet, dass sich fast alle Zellen selbst 6 Stunden nach Zugabe von PHA noch in der G_0/G_1 -Phase des Zellzyklus befanden. Eine weitere Studie untersuchte allgemein die Zellzyklusdauer von mit PHA stimulierten Lymphozyten. Es wurde festgestellt, dass sich die Zellen nach bis zu 6 - 8 Stunden in der G_1 -Phase, nach bis zu 24 - 30 Stunden in der S-Phase und nach bis zu 45 - 48 Stunden in der G_2 -Phase befanden. Die ersten Mitosen traten nach 48 - 52 Stunden auf. Daher muss davon ausgegangen werden, dass sich die Lymphozyten bei PHA-Stimulation für 1 - 6 Stunden und anschließender Exposition für 1, 2 und 24 Stunden in der G_1 - bzw. S-Phase befanden. Dies bedeutet, dass die Terahertzstrahlung nicht auf Mitosen wirken konnte. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Untersuchung nur Zellen ausgewertet, die während der Mitose exponiert waren. Die kurze Expositionszeit von

30 Minuten, d. h. etwa der Hälfte der Mitosedauer, stellt sicher, dass von einem direkten Effekt auf mitotische Zellen ausgegangen werden kann.

Untersuchungen zu Mitosestörungen nach Befeldungen mit nichtionisierender Strahlung sind bisher nur sehr selten durchgeführt worden. Die vorliegenden Ergebnisse im Terahertzbereich sind jedoch konsistent mit früheren Arbeiten im Mobilfunkbereich [22, 23]. Hier wurden ebenfalls erhöhte Raten an Mitosestörungen nach 30-minütiger Exposition festgestellt. Dies wurde auch bei weiteren Frequenzen des Mobilfunkbereichs beobachtet [70]. Es sollte jedoch festgehalten werden, dass diese Auswertungen nur funktionelle Änderungen erfassen, strukturelle Störungen können mit diesen Testverfahren nicht untersucht werden.

Die beobachteten Mitosestörungen könnten als spätere Folge zu aneuploiden Zellen führen. Diese Endpunkte sind von großer Bedeutung, da Aneuploidie eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese spielt. Daher ist es wichtig, die beobachteten Störungen weiter zu untersuchen und zu charakterisieren.

6. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob nichtionisierende elektromagnetische Strahlung verschiedener Frequenzbereiche Genomschaden hervorrufen kann.

Elektromagnetischen Feldern im Bereich von 900 bis 2.100 MHz ist die Bevölkerung durch den Mobilfunk in weiterhin steigendem Maße ausgesetzt. Die deutlich höhere Exposition findet hierbei durch die Mobiltelefone selbst statt, dagegen ist die Strahlenbelastung durch die Basisstationen sehr gering. Dafür findet diese kontinuierlich statt und betrifft die gesamte Bevölkerung unabhängig von der Mobiltelefonnutzung. Es sind bereits zahlreiche Studien zu möglichen Auswirkungen dieser Strahlung auf biologische Systeme durchgeführt worden. Die Wirkungen bei hohen Leistungsflussdichten entstehen durch Erwärmung, diese wird jedoch beim Mobilfunk und anderen Anwendungen durch bestehende Grenzwerte ausgeschlossen. Wirkungen unterhalb der thermischen Schwelle konnten bisher nicht konsistent nachgewiesen werden. Allerdings wird immer wieder vereinzelt von derartigen Wirkungen berichtet, so dass derzeit noch nicht von einem wissenschaftlichen Konsens gesprochen werden kann.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine Biomonitoring-Studie zu dieser Thematik konzipiert und durchgeführt. Es wurden 131 Probanden detailliert zu ihrer Mobilfunknutzung befragt. Anschließend wurden Mundschleimhautzellen entnommen und für eine mikroskopische Untersuchung aufbereitet und angefärbt. In den Zellen wurden Mikrokerne und andere Kernanomalien quantifiziert. Es zeigte sich keine Erhöhung der Mikrokernfrequenz in Abhängigkeit von der Dauer der Mobiltelefonnutzung. Auch die anderen abgefragten Parameter hatten keinen Einfluss auf die Höhe des Genomschadens. Als Positivkontrollen wurden vier Patienten, die eine lokale Strahlentherapie (ionisierende Strahlung) erhielten, eingeschlossen. Hier zeigte sich eine deutliche Erhöhung der Mikrokernfrequenz.

Um festzustellen, ob die Mikrokerninduktion erst bei höheren Leistungsflussdichten als denen, die beim Mobilfunk verwendet werden, auftritt, wurden in-vitro-Versuche durchgeführt, bei denen verschiedene Zelllinien einer Strahlung von 900 MHz ausgesetzt wurden. Nach Exposition und einer Postinkubationsperiode wurden die Zellen fixiert und die Mikrokernfrequenz bestimmt. Neben den Leistungen wurden hier auch die Expositionszeiten und die Postinkubationsperioden variiert. In keinem Fall konnte eine Erhöhung der Mikrokernfrequenz festgestellt werden.

Insgesamt konnte ein Einfluss elektromagnetischer Strahlung auf das Genom weder am Menschen im Rahmen einer Biomonitoring-Studie noch an verschiedenen Zelllinien im Rahmen von in-vitro-Versuchen festgestellt werden.

Terahertzstrahlung ist elektromagnetische Strahlung im Bereich von 0,1 bis 10 THz, d. h. sie liegt zwischen Mikrowellen und Infrarotlicht. Derzeit wird sie hauptsächlich für spektroskopische Untersuchungen und zur Qualitätskontrolle im Herstellungsprozess verschiedener Produkte verwendet. Anwendungen in der Sicherheitstechnik (z. B. Ganzkörperscanner) und in der Medizintechnik (z. B. Bildgebung) stehen kurz vor der Markteinführung bzw. sind bereits etabliert. Diese Anwendungen bringen eine Exposition der betroffenen Menschen mit sich. Außerdem wird an weiteren Techniken wie etwa der Datenübertragung gearbeitet. Die Wirkungen auf biologische Systeme sind im Gegensatz zum Mobilfunkbereich bisher nur unzureichend untersucht.

Da bisher keine vollständigen Literaturübersichten vorlagen, wurde eine umfassende Literaturrecherche durchgeführt. Ziel war es, alle bisher durchgeführten Studien zu diesem Thema aufzulisten. Es wurden 37 Publikationen identifiziert, dabei handelte es sich bei 8 Arbeiten um theoretische Studien, 29 waren experimentelle Untersuchungen. Es zeigte sich, dass nur sehr wenige dieser Studien qualitativ hochwertig durchgeführt wurden. Insgesamt ist die Datenbasis in diesem Frequenzbereich (besonders oberhalb von 0,3 THz) sehr klein und für eine Risikobeurteilung nicht ausreichend.

Um diese Datenbasis zu verbreitern wurden in-vitro-Versuche bei verschiedenen Frequenzen durchgeführt. Als Strahlungsquellen wurden eine Frequenzvervielfacher-

kaskade (0,106 THz), ein Rückwärtswellen-Oszillator (0,380 THz) und ein Ferninfrarot-Laser (2,520 THz) eingesetzt. Die Strahlung wurde in einen modifizierten Inkubator geführt, so dass die Expositionen bei definierter Temperatur und konstantem CO₂-Gehalt durchgeführt werden konnten. Da Terahertzstrahlung durch Wasser sehr stark absorbiert wird, sind bei einer Exposition des Menschen primär die obersten Hautschichten betroffen. Aus diesem Grund wurden primäre Hautfibroblasten und HaCaT-Zellen, eine Keratinozyten-Zelllinie, als biologische Systeme verwendet. Die Zellen wurden für unterschiedliche Zeitperioden mit verschiedenen Leistungsflussdichten exponiert. Anschließend wurden die Zellen für den Comet Assay aufbereitet und analysiert. Der Comet Assay ist eine Methode zur Quantifizierung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen der DNA. Weiterhin wurden die Zellen nach einer Postinkubationsperiode für den Mikrokerntest aufbereitet. Neben unbehandelten Kontrollen und Sham-Expositionen wurden auch Positivkontrollen durchgeführt. Es konnte keine Erhöhung der Anzahl der DNA-Strangbrüche bzw. der Mikrokernfrequenz festgestellt werden.

Da bekannt war, dass im Mobilfunkbereich unter bestimmten Bedingungen Störungen der Mitose, nicht aber Erhöhungen der Mikrokernfrequenz, auftreten, wurden Mitosestörungen nach Exposition bei 0,106 THz untersucht. Hierzu wurden A_L-Zellen für 30 Minuten exponiert und anschließend ohne Postinkubation direkt fixiert. Analysiert wurden Störungen in allen Phasen der Mitose. Es zeigte sich, dass die Frequenz der Störungen in der Pro- und Metaphase unverändert blieb. Die Störungen in der Ana- und Telophase nahmen dagegen mit steigender Leistungsflussdichte zu.

Insgesamt konnte im Terahertzbereich unter den gewählten Expositionsbedingungen kein DNA-Schaden beobachtet werden. Bei 0,106 THz konnten Mitosestörungen als Folge der Exposition gezeigt werden. Der Zusammenhang zwischen diesen Mitosestörungen und DNA-Schäden, insbesondere der Mikrokerninduktion, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden und bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

7. Summary

The aim of the present study was to investigate whether non-ionizing radiation of different frequencies can cause genomic damage.

The population is increasingly exposed to electromagnetic fields in the range from 900 to 2,100 MHz because of the widespread use of mobile phones. The mobile phones themselves clearly cause higher exposure values, whereas exposure by base stations only contributes a very small amount. However, the latter exposure occurs permanently and affects the whole population independently of the mobile phone use. A lot of studies investigating the effect of this type of radiation have been performed. The effects at high power densities are caused by heating but this phenomenon is excluded in mobile telephony and other applications by implementation of safety limits. Effects below the thermal threshold have not been proven consistently. However, these effects are being described time and again and thus currently no scientific consensus is achieved.

Within the course of the present work, a biomonitoring study was designed and performed. 131 participants were interviewed and asked for their mobile phone use customs. Subsequently buccal mucosa cells were retrieved, prepared and stained for microscopy analysis. Micronuclei and other nuclear anomalies indicating genomic damage were quantified. No increase in micronucleus frequency depending on mobile phone use or other retrieved parameters were observed. Four patients receiving radiation therapy (ionizing radiation) were included as positive controls. A clear increase in micronucleus frequency was observed here.

To determine whether micronucleus induction only occurs at higher power densities, in vitro investigations with different cell lines exposed to 900 MHz radiation were carried out. After exposition and post-incubation, cells were fixed and the micronucleus frequency was determined. Besides power density also exposition times and post-incubation periods were varied. In no case an increase in micronucleus frequency could be observed.

All in all, no influence of electromagnetic radiation on the genome could be observed, neither on humans in the biomonitoring study nor on cell lines in the in vitro study.

Terahertz radiation is electromagnetic radiation in the range from 0.1 to 10 THz, i. e. between microwaves and infrared light. Currently it is used in spectroscopy and for quality control procedures in manufacturing processes. Application in security technology (e. g. full body scanners) and medical technology (e. g. medical imaging) have recently been established or are about to enter the market. These applications also involve exposure of humans. Furthermore, other technologies such as data transfer are being developed. So far the effects on biological systems of this frequency range are investigated only insufficiently.

A thorough literature search was conducted because no comprehensive literature review was available. The aim was to completely list all available studies on this topic. 37 publications were identified, out of which 8 were theoretical considerations and 29 were experimental studies. Only a minority of these studies can be considered to be high quality studies. Thus the data basis in this frequency range (especially above 0.3 THz) is very small and not sufficient for adequate risk assessment.

To enlarge this data basis, in vitro studies at different frequencies were conducted. Radiation sources were a frequency multiplier chain (0.106 THz), a backward wave oscillator (0.380 THz) and a far infrared laser (2.520 THz). The radiation beam was led into a modified incubator in order to perform expositions under controlled temperature and CO₂ concentration conditions. Terahertz radiation is strongly absorbed by water, thus in case of exposure of humans the skin will be affected primarily. This is the reason why primary dermal fibroblasts and HaCaT cells, a keratinocyte cell line, were used as biological systems. The cells were exposed to different power densities for different time periods. Subsequently cells were prepared and analyzed using the comet assay which quantifies DNA single and double strand breaks. Also, after a post-incubation period cells were prepared for the micronucleus test. Besides untreated controls and sham expositions also positive controls were

performed. No induction of DNA damage, neither as strand breaks nor as micronucleus frequency elevation, was observed.

Because it was known that under certain experimental conditions mitotic disturbances but not micronucleus formation occur after exposition to mobile phone radiation, these mitotic disturbances were analyzed after terahertz exposition. A_L cells were exposed for 30 minutes with 0.106 THz and fixed directly after the exposition. All phases of mitosis were analyzed, but it turned out that primarily ana- and telophase were affected. These disturbances increased with increasing power density.

All in all, no DNA damage could be observed under the applied experimental conditions. After exposition to 0.106 THz mitotic disturbances occurred in A_L cells. The link between these mitotic disturbances and the DNA damage, particularly the micronucleus formation, could not be resolved completely and remains subject of further investigations.

8. Literaturverzeichnis

1. Ahlbom, A. and M. Feychting, *Electromagnetic radiation*. Br Med Bull, 2003. **68**: p. 157-65.
2. EITO. http://www.eito.com/pressinformation_20090807.htm (18.09.2009). 2009 18.09.2009].
3. ICNIRP, *Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz)*. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection. Health Phys, 1998. **74**(4): p. 494-522.
4. Kimmitt, M.F., *Reststrahlen to T-rays - 100 years of terahertz radiation*. Journal of Biological Physics, 2003. **29**(2-3): p. 77-85.
5. Davies, A.G., E.H. Linfield, and M.B. Johnston, *The development of terahertz sources and their applications*. Physics in Medicine and Biology, 2002. **47**(21): p. 3679-3689.
6. Siegel, P.H., *Terahertz technology in biology and medicine*. Ieee Transactions on Microwave Theory and Techniques, 2004. **52**(10): p. 2438-2447.
7. Brun, M.A., et al., *Terahertz imaging applied to cancer diagnosis*. Phys Med Biol, 2010. **55**(16): p. 4615-23.
8. Berry, E., *Risk perception and safety issues*. Journal of Biological Physics, 2003. **29**(2-3): p. 263-267.
9. Berry, E., et al., *Do in vivo terahertz imaging systems comply with safety guidelines?* Journal of Laser Applications, 2003. **15**(3): p. 192-198.
10. d'Arsonval, J.-A. and Charrin, *Influence de l'électricité sur la cellule microbienne*. Arch de Physiol Norm et Path, 1893. **25**: p. 6.
11. Khurana, V.G., et al., *Cell phones and brain tumors: a review including the long-term epidemiologic data*. Surg Neurol, 2009. **72**(3): p. 205-14; discussion 214-5.
12. Moulder, J.E., et al., *Mobile phones, mobile phone base stations and cancer: a review*. Int J Radiat Biol, 2005. **81**(3): p. 189-203.
13. Schuz, J., S. Lagorio, and F. Bersani, *Electromagnetic fields and epidemiology: An overview inspired by the fourth course at the International School of Bioelectromagnetics*. Bioelectromagnetics, 2009. **30**(7): p. 511-524.
14. Interphone, *Brain tumour risk in relation to mobile telephone use: results of the INTERPHONE international case-control study*. Int J Epidemiol, 2010. **39**(3): p. 675-694.
15. Ammari, M., et al., *Exposure to GSM 900 MHz electromagnetic fields affects cerebral cytochrome c oxidase activity*. Toxicology, 2008. **250**(1): p. 70-4.
16. Friedman, J., et al., *Mechanism of short-term ERK activation by electromagnetic fields at mobile phone frequencies*. Biochem J, 2007. **405**(3): p. 559-68.
17. Huang, T.Q., et al., *Characterization of biological effect of 1763 MHz radiofrequency exposure on auditory hair cells*. Int J Radiat Biol, 2008. **84**(11): p. 909-15.

18. Capri, M., et al., *In vitro exposure of human lymphocytes to 900 MHz CW and GSM modulated radiofrequency: studies of proliferation, apoptosis and mitochondrial membrane potential*. Radiat Res, 2004. **162**(2): p. 211-8.
19. Lee, K.S., et al., *Mobile phone electromagnetic radiation activates MAPK signaling and regulates viability in Drosophila*. Bioelectromagnetics, 2008. **29**(5): p. 371-9.
20. Guney, M., et al., *900 MHz radiofrequency-induced histopathologic changes and oxidative stress in rat endometrium: protection by vitamins E and C*. Toxicol Ind Health, 2007. **23**(7): p. 411-20.
21. Hoyto, A., et al., *Proliferation, oxidative stress and cell death in cells exposed to 872 MHz radiofrequency radiation and oxidants*. Radiat Res, 2008. **170**(2): p. 235-43.
22. Schmid, E. and T. Schrader, *Different biological effectiveness of ionising and non-ionising radiations in mammalian cells*. Advances in Radio Science, 2007. **5**: p. 1-4.
23. Schrader, T., et al., *Spindle disturbances in human-hamster hybrid (AL) cells induced by mobile communication frequency range signals*. Bioelectromagnetics, 2008. **29**(8): p. 626-39.
24. Schrader, T., et al., *Spindle disturbances in human-hamster hybrid (A(L)) cells induced by the electrical component of the mobile communication frequency range signal*. Bioelectromagnetics, 2010.
25. McNamee, J.P. and V. Chauhan, *Radiofrequency radiation and gene/protein expression: a review*. Radiat Res, 2009. **172**(3): p. 265-87.
26. Luukkonen, J., et al., *Enhancement of chemically induced reactive oxygen species production and DNA damage in human SH-SY5Y neuroblastoma cells by 872MHz radiofrequency radiation*. Mutat Res, 2009. **662**(1-2): p. 54-8.
27. Yadav, A.S. and M.K. Sharma, *Increased frequency of micronucleated exfoliated cells among humans exposed in vivo to mobile telephone radiations*. Mutat Res, 2008. **650**(2): p. 175-80.
28. Speit, G., P. Schutz, and H. Hoffmann, *Genotoxic effects of exposure to radiofrequency electromagnetic fields (RF-EMF) in cultured mammalian cells are not independently reproducible*. Mutat Res, 2007. **626**(1-2): p. 42-7.
29. Hintzsche, H. and H. Stopper, *Micronucleus frequency in buccal mucosa cells of mobile phone users*. Toxicol Lett, 2010. **193**(1): p. 124-30.
30. Verschaeve, L., *Genetic damage in subjects exposed to radiofrequency radiation*. Mutat Res, 2009. **681**(2-3): p. 259-70.
31. Verschaeve, L., *Genetic effects of radiofrequency radiation (RFR)*. Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **207**(2 Suppl): p. 336-41.
32. Verschaeve, L. and A. Maes, *Genetic, carcinogenic and teratogenic effects of radiofrequency fields*. Mutation Research-Reviews in Mutation Research, 1998. **410**(2): p. 141-165.
33. Vijayalaxmi and T.J. Prihoda, *Genetic damage in mammalian somatic cells exposed to radiofrequency radiation: a meta-analysis of data from 63 publications (1990-2005)*. Radiat Res, 2008. **169**(5): p. 561-74.
34. Mileva, K., B. Georgieva, and N. Radicheva, *About the biological effects of high and extremely high frequency electromagnetic fields*. Acta Physiol Pharmacol Bulg, 2003. **27**(2-3): p. 89-100.

35. Pakhomov, A.G., et al., *Current state and implications of research on biological effects of millimeter waves: a review of the literature*. Bioelectromagnetics, 1998. **19**(7): p. 393-413.
36. Mi, Z.Y., *Biological-Research by Optically Pumped Far Infrared-Lasers*. Infrared Physics, 1989. **29**(2-4): p. 631-636.
37. Fedorov, V.I., S.S. Popova, and A.N. Pisarchik, *Dynamic effects of submillimeter wave radiation on biological objects of various levels of organization*. International Journal of Infrared and Millimeter Waves, 2003. **24**(8): p. 1235-1254.
38. Ramundo-Orlando, A. and G.P. Gallerano, *Terahertz Radiation Effects and Biological Applications*. Journal of Infrared Millimeter and Terahertz Waves, 2009. **30**(12): p. 1308-1318.
39. Olive, P.L. and J.P. Banath, *The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 23-9.
40. Ostling, O. and K.J. Johanson, *Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1984. **123**(1): p. 291-8.
41. Singh, N.P., et al., *A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells*. Exp Cell Res, 1988. **175**(1): p. 184-91.
42. Tice, R.R., et al., *Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing*. Environ Mol Mutagen, 2000. **35**(3): p. 206-21.
43. OECD, *Guideline For The Testing Of Chemicals: 487 In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test*, in 487, OECD, Editor 2010.
44. Stopper, H. and S.O. Müller, *Micronuclei as a Biological Endpoint for Genotoxicity: A Minireview*. Toxicology in Vitro, 1997. **11**: p. 8.
45. Boller, K. and W. Schmid, *[Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon]*. Humangenetik, 1970. **11**(1): p. 35-54.
46. Fenech, M. and A.A. Morley, *Measurement of micronuclei in lymphocytes*. Mutat Res, 1985. **147**(1-2): p. 29-36.
47. Bonassi, S., et al., *HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei*. Environ Mol Mutagen, 2001. **37**(1): p. 31-45.
48. Fenech, M., et al., *Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project*. Mutat Res, 2003. **534**(1-2): p. 45-64.
49. Fenech, M., et al., *HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures*. Mutat Res, 2003. **534**(1-2): p. 65-75.
50. Reifferscheid, G., et al., *Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the in vitro micronucleus test: results of a round-robin study in the context of standardisation according to ISO*. Mutat Res, 2008. **649**(1-2): p. 15-27.
51. von der Hude, W., et al., *In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances*. Mutat Res, 2000. **468**(2): p. 137-63.

52. Bonassi, S., et al., *An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans*. *Carcinogenesis*, 2007. **28**(3): p. 625-31.
53. Murgia, E., et al., *Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study*. *Mutat Res*, 2008. **639**(1-2): p. 27-34.
54. Murgia, E., et al., *Micronuclei, genetic polymorphisms and cardiovascular disease mortality in a nested case-control study in Italy*. *Mutat Res*, 2007. **621**(1-2): p. 113-8.
55. Fenech, M., *Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death*. *Mutat Res*, 2006. **600**(1-2): p. 58-66.
56. Fenech, M., *The in vitro micronucleus technique*. *Mutat Res*, 2000. **455**(1-2): p. 81-95.
57. Majer, B.J., et al., *Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials*. *Mutat Res*, 2001. **489**(2-3): p. 147-72.
58. Thomas, P., et al., *Buccal micronucleus cytome assay*. *Nat Protoc*, 2009. **4**(6): p. 825-37.
59. Titenko-Holland, N., L.E. Moore, and M.T. Smith, *Measurement and characterization of micronuclei in exfoliated human cells by fluorescence in situ hybridization with a centromeric probe*. *Mutat Res*, 1994. **312**(1): p. 39-50.
60. Stich, H.F., J.R. Curtis, and B.B. Parida, *Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers*. *Int J Cancer*, 1982. **30**(5): p. 553-9.
61. Stich, H.F., W. Stich, and B.B. Parida, *Elevated frequency of micronucleated cells in the buccal mucosa of individuals at high risk for oral cancer: betel quid chewers*. *Cancer Lett*, 1982. **17**(2): p. 125-34.
62. Bonassi, S., et al., *State of the art survey of the buccal micronucleus assay--a first stage in the HUMN(XL) project initiative*. *Mutagenesis*, 2009. **24**(4): p. 295-302.
63. Holland, N., et al., *The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps*. *Mutat Res*, 2008. **659**(1-2): p. 93-108.
64. Benner, S.E., et al., *Micronuclei, a biomarker for chemoprevention trials: results of a randomized study in oral pre-malignancy*. *Int J Cancer*, 1994. **59**(4): p. 457-9.
65. Bortoli, G.M., M.B. Azevedo, and L.B. Silva, *Cytogenetic biomonitoring of Brazilian workers exposed to pesticides: Micronucleus analysis in buccal epithelial cells of soybean growers*. *Mutat Res*, 2009. **675**(1-2): p. 1-4.
66. El-Setouhy, M., et al., *Genotoxic effects of waterpipe smoking on the buccal mucosa cells*. *Mutat Res*, 2008. **655**(1-2): p. 36-40.
67. Walczak, C.E., S. Cai, and A. Khodjakov, *Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010. **11**(2): p. 91-102.
68. Gisselsson, D., *Classification of chromosome segregation errors in cancer*. *Chromosoma*, 2008. **117**(6): p. 511-9.
69. Pellman, D., *Cell biology: aneuploidy and cancer*. *Nature*, 2007. **446**(7131): p. 38-9.

70. Tkalec, M., et al., *Effects of radiofrequency electromagnetic fields on seed germination and root meristematic cells of Allium cepa L.* Mutat Res, 2009. **672**(2): p. 76-81.
71. Angerer, J., U. Ewers, and M. Wilhelm, *Human biomonitoring: state of the art.* Int J Hyg Environ Health, 2007. **210**(3-4): p. 201-28.
72. Au, W.W., *Usefulness of biomarkers in population studies: from exposure to susceptibility and to prediction of cancer.* Int J Hyg Environ Health, 2007. **210**(3-4): p. 239-46.
73. Ceppi, M., et al., *Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues.* Mutat Res, 2010. **705**(1): p. 11-19.
74. Schwan, H.P. and G.M. Piersol, *The absorption of electromagnetic energy in body tissues.* Am J Phys Med, 1954. **33**(6): p. 371-404.
75. Cook, H.J., et al., *Early research on the biological effects of microwave radiation: 1940-1960.* Ann Sci, 1980. **37**(3): p. 323-51.
76. Steneck, N.H., et al., *The origins of U.S. safety standards for microwave radiation.* Science, 1980. **208**(4449): p. 1230-7.
77. Foster, K.R., *Thermal and nonthermal mechanisms of interaction of radio-frequency energy with biological systems.* IEEE Transactions on Plasma Science, 2000. **28**(1): p. 15-23.
78. Dasenbrock, C., *Animal carcinogenicity studies on radiofrequency fields related to mobile phones and base stations.* Toxicol Appl Pharmacol, 2005. **207**(2 Suppl): p. 342-6.
79. Koch, M., *Terahertz-Technologie: Quo Vadis?* Photonik, 2005. **4**: p. 2-5.
80. Koch, M., *Terahertz Technology: A Land to Be Discovered.* OPN, 2007. **3**: p. 21-25.
81. Gallerano, G.P., *Tera-Hertz radiation in Biological Research, Investigations on Diagnostics and study on potential Genotoxic Effects,* 2004, EU. p. 72.
82. Waldren, C., C. Jones, and T.T. Puck, *Measurement of mutagenesis in mammalian cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(3): p. 1358-62.
83. Boukamp, P., et al., *Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line.* J Cell Biol, 1988. **106**(3): p. 761-71.
84. Kazmier, L.J. and N.F. Pohl, *Testing The Difference Between Two Population Proportions,* in *Basic Statistics For Business And Economics* 1984. p. 254-6.
85. Berns, M.W. and W. Bewley, *Inhibition of Nucleic-Acid Synthesis in Cells Exposed to 200 Micrometer Radiation from the Free-Electron Laser.* Photochemistry and Photobiology, 1987. **46**(2): p. 165-167.
86. Berns, M.W., et al., *Free-Electron Laser Irradiation at 200 Mu-M Affects DNA-Synthesis in Living Cells.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990. **87**(7): p. 2810-2812.
87. Berns, M.W., et al., *Free-Electron Laser Irradiation at 200-Mu-M Inhibits DNA-Synthesis in Living Cells.* Journal of Laser Applications, 1994. **6**(3): p. 165-169.
88. Wilmink, G.J., et al. *Quantitative investigation of the bioeffects associated with terahertz radiation.* 2010. SPIE.
89. Wilmink, G.J., et al., *In vitro investigation of the biological effects associated with human dermal fibroblasts exposed to 2.52 THz radiation.* Lasers Surg Med, 2010.

90. Govorun, V.M., et al., *Far-Infrared Radiation Effect on the Structure and Properties of Proteins*. International Journal of Infrared and Millimeter Waves, 1991. **12**(12): p. 1469-1474.
91. Ramundo-Orlando, A., et al., *Permeability changes induced by 130 GHz pulsed radiation on cationic liposomes loaded with carbonic anhydrase*. Bioelectromagnetics, 2007. **28**(8): p. 587-98.
92. Scarfi, M.R., et al., *THz exposure of whole blood for the study of biological effects on human lymphocytes*. Journal of Biological Physics, 2003. **29**(2-3): p. 171-177.
93. Zeni, O., et al., *Cytogenetic observations in human peripheral blood leukocytes following in vitro exposure to THz radiation: a pilot study*. Health Phys, 2007. **92**(4): p. 349-57.
94. Korenstein-Ilan, A., et al., *Terahertz radiation increases genomic instability in human lymphocytes*. Radiat Res, 2008. **170**(2): p. 224-34.
95. Smye, S.W., et al., *The interaction between Terahertz radiation and biological tissue*. Phys Med Biol, 2001. **46**(9): p. R101-12.
96. Zhifu, D., et al. *Analysis on interaction effect of terahertz radiation with living biology system*. 2007. SPIE.
97. Chitanvis, S.M., *Can low-power electromagnetic radiation disrupt hydrogen bonds in dsDNA?* Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics, 2006. **44**(18): p. 2740-2747.
98. Alexandrov, B.S., et al., *DNA Breathing Dynamics in the Presence of a Terahertz Field*. Phys Lett A, 2010. **374**(10): p. 1214.
99. Doria, A., et al., *THz radiation studies on biological systems at the ENEA FEL facility*. Infrared Physics & Technology, 2004. **45**(5-6): p. 339-347.
100. Bourne, N., et al., *The effects of terahertz radiation on human keratinocyte primary cultures and neural cell cultures*. Altern Lab Anim, 2008. **36**(6): p. 667-84.
101. Clothier, R.H. and N. Bourne, *Effects of THz exposure on human primary keratinocyte differentiation and viability*. Journal of Biological Physics, 2003. **29**(2-3): p. 179-185.
102. Tuengler, P., F. Keilmann, and L. Genzel, *Search for Millimeter Microwave Effects on Enzyme or Protein Functions*. Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences, 1979. **34**(1-2): p. 60-63.
103. Cherkasova, O.P., et al., *Influence of terahertz laser radiation on the spectral characteristics and functional properties of albumin*. Optics and Spectroscopy, 2009. **107**(4): p. 534-537.
104. Homenko, A., et al., *Effects of 100 GHz radiation on alkaline phosphatase activity and antigen-antibody interaction*. Bioelectromagnetics, 2009. **30**(3): p. 167-75.
105. Webb, S.J. and D.D. Dodds, *Inhibition of bacterial cell growth by 136 gc microwaves*. Nature, 1968. **218**(5139): p. 374-5.
106. Blackman, C.F., et al., *Effects of nonionizing electromagnetic radiation on single-cell biologic systems*. Ann N Y Acad Sci, 1975. **247**: p. 352-66.
107. Hadjiloucas, S., M.S. Chahal, and J.W. Bowen, *Preliminary results on the non-thermal effects of 200-350 GHz radiation on the growth rate of S-cerevisiae cells in microcolonies*. Physics in Medicine and Biology, 2002. **47**(21): p. 3831-3839.

108. Olshevskaya, J.S., et al., *Effect of terahertz electromagnetic waves on neurons systems*. Computational Technologies in Electrical and Electronics Engineering, 2008. SIBIRCON 2008. IEEE Region 8 International Conference on, 2008: p. 210-211.
109. Wilmlink, G.J., et al. *Determination of death thresholds and identification of terahertz (THz)-specific gene expression signatures*. 2010. SPIE.
110. Dalzell, D.R., et al. *Damage thresholds for terahertz radiation*. 2010. SPIE.
111. Fedorov, V.I., et al. *Investigation of possibility of submillimeter laser using as instrument for diagnostics in medicine*. 2007. SPIE.
112. Kirichuk, V.F., et al., *Use of terahertz electromagnetic radiation for correction of blood rheology parameters in patients with unstable angina under conditions of treatment with isoket, an NO donor*. Bull Exp Biol Med, 2008. **146**(3): p. 293-6.
113. Bondar, N.P., et al., *Behavioral effect of terahertz waves in male mice*. Bull Exp Biol Med, 2008. **145**(4): p. 401-5.
114. Kirichuk, V.F., et al., *Sex-specific differences in changes of disturbed functional activity of platelets in albino rats under the effect of terahertz electromagnetic radiation at nitric oxide frequencies*. Bull Exp Biol Med, 2008. **145**(1): p. 75-7.
115. Kirichuk, V.F. and A.A. Tsymbal, *Effects of terahertz irradiation at nitric oxide frequencies on intensity of lipoperoxidation and antioxidant properties of the blood under stress conditions*. Bull Exp Biol Med, 2009. **148**(2): p. 200-3.
116. Kirichuk, V.F., N.V. Efimova, and E.V. Andronov, *Effect of high power terahertz irradiation on platelet aggregation and behavioral reactions of albino rats*. Bull Exp Biol Med, 2009. **148**(5): p. 746-9.
117. Casartelli, G., et al., *Staining of micronuclei in squamous epithelial cells of human oral mucosa*. Anal Quant Cytol Histol, 1997. **19**(6): p. 475-81.
118. Nersesyan, A., et al., *Effect of staining procedures on the results of micronucleus assays with exfoliated oral mucosa cells*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2006. **15**(10): p. 1835-40.
119. Weber, K., R. Pollack, and T. Bibring, *Antibody against tubulin: the specific visualization of cytoplasmic microtubules in tissue culture cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1975. **72**(2): p. 459-63.
120. Crissman, H.A. and R.A. Tobey, *Specific staining of DNA with the fluorescent antibiotics, mithramycin, chromomycin, and olivomycin*. Methods Cell Biol, 1990. **33**: p. 97-103.
121. Kausar, A., et al., *Micronucleus and other nuclear abnormalities among betel quid chewers with or without sadagura, a unique smokeless tobacco preparation, in a population from North-East India*. Mutat Res, 2009. **677**(1-2): p. 72-5.
122. Kadhim, M.A., et al., *Long-term genomic instability in human lymphocytes induced by single-particle irradiation*. Radiat Res, 2001. **155**(1 Pt 1): p. 122-6.

9. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner erkläre ich, dass ich nicht anderweitig mit oder ohne Erfolg versucht habe, diese Dissertation in gleicher oder ähnlicher Form einzureichen.

Ich habe keine Doktorprüfung an einer anderen Hochschule abgelegt oder endgültig nicht bestanden.

Würzburg, Januar 2011

Henning Hintzsche