



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT


Auswirkungen elektromagnetischer Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften neuronaler und kardialer Zellnetzwerke

vom Fachbereich Biologie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des Grades
Doctor rerum naturalium
(Dr. rer. Nat.)

**Dissertation
von Tim Köhler**

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerhard Thiel
Zweitgutachter: Prof. Dr. Ralf Galuske

Darmstadt 2019



Köhler, Tim: Auswirkungen elektromagnetischer Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften neuronaler und kardialer Zellnetzwerke
Darmstadt, Technische Universität,
Jahr der Veröffentlichung der Dissertation auf TUpriints: 2019
URN: urn:nbn:de:tuda-tuprints-85441
Tag der mündlichen Prüfung: 27.02.2019

Veröffentlicht unter CC BY-SA 4.0 International
<https://creativecommons.org/licenses/>



Fang nie an aufzuhören, hör nie auf anzufangen.

Marcus Tullius Cicero
Römischer Redner und Staatsmann
(106 – 43 v. Chr.)

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Abstract	4
3. Allgemeine Einleitung	6
3.1. Substrat-integrierte Mikroelektroden Arrays	6
3.2. Ionisierende und nicht-ionisierende elektromagnetische Strahlung	8
3.3. Nutzung von elektromagnetischen Frequenzbereichen	9
3.4. Aktionspotentiale von Neuronen	10
3.5. Aktionspotentiale von Kardiomyozyten	13
4. Material und Methoden	18
4.1. Materialienliste	18
4.2. Reinigung der MEA-Chips	20
4.3. Aussaat und Kultivierung kortikaler Rattenneurone	21
4.4. Aussaat und Kultivierung humaner Kardiomyozyten	22
4.5. Elektrophysiologische Ableitungen	23
4.6. TETRA-Expositionsbedingungen	23
4.7. Bedingungen der photothermischen Stimulation	24
4.8. Datenanalyse	25
4.9. Test auf Normalverteilung und statistische Signifikanz	26
4.10. Numerische Simulation	26
5. TETRA-Bestrahlung von in vitro Netzwerken aus kortikalen Rattenneuronen und humanen Kardiomyozyten	28
5.1. Motivation und Zielsetzung	28
5.2. Einleitung	29
5.2.1. Der digitale Bündelfunkstandard Terrestrial Trunked Radio	29
5.2.2. Beschriebene biologische Effekte des Mobilfunks am Beispiel von TETRA	31
5.2.3. Expositionsgrenzwerte für den Mobilfunk	33
5.2.4. Inkubator-basierter offener TEM-Wellenleiter	34
5.2.5. Dielektrische Erwärmung	35
5.3. Ergebnisse zur TETRA-Bestrahlung von neuronalen und kardialen in vitro Netzwerken	35
5.3.1. Bestimmung der spezifischen Absorptionsraten für Zellversuche	35
5.3.2. Bestimmung des Temperaturanstiegs während der TETRA-Exposition	39
5.3.3. Thermische Effekte auf kortikale Neurone	41
5.3.4. Auswirkung von TETRA-Bestrahlung auf kortikale Neurone	42
5.3.5. Thermische-Effekte auf humane Kardiomyozyten	52
5.3.6. Auswirkung von TETRA-Bestrahlung auf humane Kardiomyozyten	53
6. Photothermische Stimulation von in vitro Netzwerken aus humanen Kardiomyozyten	56
6.1. Motivation und Zielsetzung	56
6.2. Einleitung	57
6.2.1. Nahe Infrarotstrahlung	57
6.2.2. Oberflächenplasmonresonanz von Gold-Nanopartikeln und ihre Anwendung	58

6.2.3.	Die inhibierende Wirkung von Fluoxetin auf TREK-1 und weitere Membranproteine	60
6.3.	Ergebnisse zur photothermischen Stimulation von humanen Kardiomyozyten	64
6.3.1.	Bestimmung der Flächenleistungsdichte der NIR-Laser-Diode	64
6.3.2.	Bestimmung des Temperaturanstieges im Medium durch photothermische Stimulation	65
6.3.3.	Auswirkung photothermischer Stimulation auf humane Kardiomyozyten	66
7.	Diskussion	72
8.	Quellenverzeichnis	93
9.	Abbildungsverzeichnis	108
10.	Tabellenverzeichnis	110
11.	Eigene Arbeiten	111
12.	Ehrenwörtliche Erklärung	112
13.	Publikationen	113
14.	Poster- und Konferenzbeiträge	114
15.	Betreute Arbeiten	115
16.	Curriculum Vitae	116
17.	Danksagung	117

1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung von nicht-ionisierender elektromagnetischer Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften neuronaler und kardialer Zellnetzwerke untersucht. Die Zellkulturen wurden hierfür auf Mikroelektroden-Arrays (MEAs) kultiviert, wodurch nicht-invasive extrazelluläre Ableitungen der Zellnetzwerke über einen mehrwöchigen Zeitraum möglich waren.

In den Versuchen wurde die Auswirkung des Digitalfunk-Standards *Terrestrial Trunked Radio* (TETRA) in Kurz- und Langzeit-Experimenten auf neuronale und kardiale *in vitro* Netzwerke untersucht. Ferner wurde die direkte Auswirkung photothermischer Stimulation auf die elektrischen Eigenschaften von Netzwerken aus Kardiomyozyten untersucht.

Die Messungen und Analysen der TETRA-bestrahlten neuronalen und kardialen Kulturen zeigten ein einheitliches Bild, aus dem hervorgeht, dass unter den gegebenen Bedingungen die TETRA-Bestrahlung keinerlei Auswirkung auf die überprüften elektrophysiologischen Parameter der verwendeten Zellkulturen hatte.

Weder Spike- und Burstrate, noch Burstdauer oder der Parameter der Netzwerk-Synchronität waren nach der TETRA-Kurzzeit-Bestrahlung bei den neuronalen Netzwerken statistisch signifikant verändert. Das Gleiche gilt für TETRA-Langzeitversuche mit den neuronalen Netzwerken, bei denen über mehrere Wochen alle 2 Stunden für 15 Minuten die TETRA-Bestrahlung erfolgte. Auch hier zeigten die bereits genannten Parameter keine statistisch signifikanten Änderungen durch die Bestrahlung.

In den gleichartig durchgeführten TETRA-Kurzzeit-Versuchen, bei denen Netzwerke aus Kardiomyozyten für 15 Minuten mit TETRA bestrahlt wurden, konnten ebenfalls keine Auswirkungen auf die Kulturen festgestellt werden. Die untersuchten elektrophysiologischen Parameter der Schlagfrequenz und der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale, zeigten keinerlei statistisch signifikante Änderungen durch die TETRA-Bestrahlung.

Im Rahmen der kontroversen Debatte, ob diese nicht-ionisierende Strahlung einen Einfluss auf neuronale und kardiale Zellen hat, argumentieren die hier systematisch gewonnenen Daten gegen einen solchen Effekt.

Die Exposition mit TETRA-Strahlung hatte zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften der Zellen durch thermische oder nicht-thermische Effekte der Strahlung geführt.

Es ist nicht auszuschließen, dass mögliche Effekte während der TETRA-Bestrahlung auftraten. In diesem Falle wären diese Effekte jedoch vollkommen reversibel gewesen und hätten daher keine nachhaltigen Veränderungen auf die Funktion der untersuchten Zellen gehabt. Aufgrund der Dimensionierung des Expositionssetups bzw. des Messkopfes für die extrazellulären

Ableitungen, konnten keine Messungen während der TETRA-Bestrahlung durchgeführt werden. Insgesamt unterstreichen die vorliegenden Messungen und Analysen, dass der Digitalfunkstandard TETRA keine Auswirkung auf die Funktion von Netzwerken aus kortikalen Neuronen und humanen Kardiomyozyten hat.

Darüber hinaus wurden Netzwerke von Kardiomyozyten hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber photothermischer Stimulation untersucht. Dazu wurden die Zellnetzwerke in An- oder Abwesenheit von Gold-Nanostäbchen (Gold-Nanorods, GNRs) mit nahem Infrarot (NIR) bestrahlt, was zu einem hohen Wärmeeintrag bei den Zellen führte, welcher durch die Ausnutzung der Oberflächenplasmonresonanz der GNRs noch weiter verstärkt wurde.

Die Ableitung der elektrischen Potentialänderungen der Zellnetzwerke zeigte, dass die alleinige Bestrahlung mit NIR eine massive Erhöhung der Schlagrate und eine Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale hervorruft.

Die kombinierte Behandlung mit NIR und GNRs und der damit höhere lokale Wärmeeintrag bewirkte komplexere Reaktionen der Zellnetzwerke. Hinsichtlich der gezeigten unterschiedlichen Veränderungen der Schlagrate ließen sich die Zellkulturen in zwei Populationen unterteilen. Während bei einer Population mit dem Einsetzen der Bestrahlung die Schlagrate unmittelbar abnahm, bis hin zu einer Inhibierung der Feldpotentiale, reagierten die Kulturen der zweiten Population mit einem massiven Anstieg der Schlagrate.

Dieses gegenläufige Verhalten konnte hinsichtlich der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale nicht beobachtet werden. Hier zeigten beide Populationen eine Verringerung der Signal-Propagation über das Netzwerk, welche jedoch wesentlich stärker bei der Population ausfiel, die auch schon bei der Schlagrate eine massive Verringerung zeigte.

Die Frage nach der Ursache für die unterschiedlichen Reaktionen der zwei Populationen bzgl. ihrer Schlagrate kann nicht exakt beantwortet werden. Sie könnte jedoch mit einer Kardiomyozyten Poly-layer-Bildung in Verbindung gebracht werden, durch die möglicherweise die elektrodennahe unterste Kardiomyozyten-Schicht einen zeitlich verzögerten und auch geringeren Temperatureintrag erfahren hat.

In weiteren Experimenten konnte festgestellt werden, dass durch die Zugabe von Fluoxetin, ein Blocker des temperaturabhängigen K^+ -Auswärtsgleichrichters TREK-1, sowohl der massive Einbruch der Schlagrate, als auch die Inhibierung der Feldpotentiale verhindert werden konnte. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Aktivität der TREK-1 Kanäle entscheidend durch die induzierten Temperaturänderungen moduliert wird und höchstwahrscheinlich einen größeren Einfluss auf die elektrische Erregbarkeit von Kardiomyozyten hat. Jedoch sind auch weitere, komplexere Wirkmechanismen von Fluoxetin auf die Zellnetzwerke denkbar.

Diese gezielte und direkte Regulation der Schlagrate, wie auch der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale, zeigt das große medizinische Potential der

photothermischen Stimulation von Kardiomyozyten. So ist generell mit dem hier gezeigten Ansatz auch eine biomedizinische Anwendung denkbar, welche eine Alternative zur elektrischen Stimulation von Kardiomyozyten über Elektroden darstellen könnte.

2. Abstract

In this thesis the impact of non-ionizing electromagnetic radiation on the electrophysiological properties of neuronal and cardiac cell networks was investigated. Cells were cultured on microelectrode arrays (MEA) for non-invasive extracellular recordings for a period of up to several weeks.

In experiments the impact of the Terrestrial Trunked Radio (TETRA) – a standard in professional mobile radio – on neuronal and cardiac *in vitro* networks was investigated in short- and long-term experiments. Furthermore, the direct impact of photothermal stimulation on the electrical properties of cardiomyocyte networks was examined.

The measurements and analyses of TETRA-irradiated neuronal and cardiac cultures presents a uniform picture which shows that under given conditions TETRA-irradiation has no effect on the examined electrophysiological parameters of the cell cultures used.

Neither the parameters of spike rate, burst rate, burst duration nor the parameter of network synchrony showed any statistically significant changes in neuronal networks after TETRA short-term irradiation. Same applies to TETRA long-term experiments with neuronal networks, in which TETRA-irradiation was performed every 2 hours for 15 minutes for a period of several weeks. Again, the parameters already mentioned did not show any statistically significant changes due to irradiation.

In similar TETRA short-term experiments in which networks of cardiomyocytes were irradiated with TETRA for 15 minutes, no effects on the cultures were observed either. The investigated electrophysiological parameters of the beat frequency and the conduction velocity of the field potentials did not show any statistically significant changes due to TETRA-irradiation.

In the controversial debate on whether this non-ionising radiation has an effect on neuronal and cardiac cells, the data systematically obtained here argues against such an effect.

Exposure to TETRA-radiation did not lead to statistically significant changes in the electrophysiological properties of the cells due to thermal or non-thermal effects of the radiation.

It cannot be excluded completely that possible effects occurred during TETRA-irradiation. However these effects would have been completely reversible and would not have caused any lasting changes on the functions of the investigated cells. Due to the size of the recording and exposure setup no measurements could be performed during TETRA-irradiation.

Overall, the available measurements and analyses underline that the standard in professional mobile radio TETRA has no effect on the functions of cortical rat neurons and human cardiomyocyte networks.

In addition, cardiomyocyte networks were investigated with respect to their sensitivity to

photothermal stimulation. The cell networks were irradiated with near infrared (NIR) in the presence or absence of gold nanorods (GNRs), resulting in local heating of the cells, which was further enhanced by the use of the surface plasmon resonance of the GNRs. The extracellular recordings of the electrical potential changes of cardiomyocyte networks showed that a single irradiation with NIR causes a massive increase of the beat rate and a decrease in conduction velocity of the field potentials.

The combined NIR and GNRs treatment and thus the higher local heat input causes complex reactions of the cells. With regard to the different changes in the beat rate, the cell cultures were subdivided into two populations. While in one population the beat rate decreases immediately with the onset of irradiation, up to inhibition of field potentials, the cultures of the second population responded with a massive increase in the beat rate.

This opposing behaviour could not be observed in terms of conduction velocity of the field potentials. Here, both populations showed a reduction in signal propagation across the network. However, this was much stronger in the population which already showed a massive reduction in the beat rate. The question behind the different reactions of the two populations with respect to their beat rate cannot be answered exactly. However, it could be associated with cardiomyocyte polylayer formation. The lowermost cardiomyocyte layer near the electrodes may have received a delayed and also lower temperature input.

Further experiments showed that the application of fluoxetine, a blocker of the temperature-dependent K^+ outward rectifier TREK-1, prevented the massive decrease of the beat rate as well as the inhibition of the field potentials. These results suggest that the activity of the TREK-1 channels are modulated by induced temperature changes and most likely has a major impact on cardiomyocyte electrical excitability. However, other more complex mechanisms of fluoxetine action on the cell networks are also imaginable.

This targeted and direct regulation of the beat rate as well as the conduction velocity of the field potentials shows that there is great medical potential for photothermal stimulation of cardiomyocytes. Thus, a biomedical application is generally conceivable with the approach shown here, which could represent an alternative to the electrical stimulation of cardiomyocytes via electrodes.

3. Allgemeine Einleitung

3.1. Substrat-integrierte Mikroelektroden Arrays

Eine der klassischen Methoden in der Elektrophysiologie ist die Methode der Substrat-integrierten Mikroelektroden Arrays (MEAs), mit der eine extrazelluläre Ableitung elektrochemischer Signale von Zellnetzwerken möglich ist. Hierzu sind planare Elektroden in ein Substrat eingebettet, dem sogenannten Elektrodenfeld, auf dem Zellnetzwerke kultiviert werden können [Spira *et al.*, 2013; Taketani *et al.*, 2006].

Mit dieser Methode ist es seit 1972 möglich Feldpotentiale von Kardiomyozyten abzuleiten, nachfolgend konnten auch neuronale Aktionspotentiale abgeleitet werden, die eine geringere Amplitudengröße aufweisen [Gross *et al.*, 1977; Pine, 1980; Thomas *et al.*, 1972].

Der große Vorteil von Substrat-integrierten MEAs ist, dass nicht invasive und simultane extrazelluläre Langzeitableitungen von Aktions- und Feldpotentialen von Zellnetzwerken durchgeführt werden können. Das weltweit wohl verbreitetste System ist das MEA1060 System der Multi Channel Systems GmbH aus Deutschland, welches auch für die extrazellulären Ableitung im Rahmen dieser Dissertation verwendet wurde. Ein 60-Kanal-Verstärker ermöglicht die simultanen Ableitungen von Aktions- oder Feldpotentialen an den Elektroden und bietet eine Temperaturregelung für die auf den MEA-Chips kultivierten Zellen [Gross *et al.*, 1977; Spira *et al.*, 2013; Taketani *et al.*, 2006].

Parallel zu dieser elektrophysiologischen Methode ist die ebenfalls stark verbreitete Patch-Clamp-Technik zu nennen, die erstmals 1976 durch Erwin Neher und Bert Sakmann beschrieben wurde [Neher *et al.*, 1976].

Diese Messtechnik erlaubt es unter anderem Ionenströme durch einzelne Ionenkanäle zu messen, als auch den zeitlichen Verlauf von intrazellulär gemessenen Membranpotentialen einzelner Zellen zu detektieren. Im Vergleich zur Methode der MEAs kommt es bei der Patch-Clamp-Technik in den meisten Fällen, abhängig von der Messkonfiguration, zur Zerstörung der Zellmembran und somit zu Veränderung des intrazellulären Milieus. Weitere elektrophysiologische Methoden, die hier nicht weiter erörtert werden, sind die Techniken Voltage-Clamp, Elektroenzephalografie (EEG) und Elektrokardiogramm (EKG) [Bear *et al.*, 2015; Lüttge *et al.*, 2010; Molleman, 2002].

Die am besten geeignete Methode um neuronale und kardiale Zellnetzwerke bezüglich ihrer elektrophysiologischen Eigenschaften über einen längeren Zeitraum nicht invasiv zu untersuchen ist die MEA-Technik [Spira *et al.*, 2013].

In der Regel wird auf MEA-Chips mit dissoziierten Zellen gearbeitet, die sich auf dem Elektrodenfeld vernetzen, alternativ werden auch die elektrischen Signale von Gewebeschnitten oder Sphäroiden auf den Chips abgeleitet [Daus *et al.*, 2011; Jimbo *et al.*, 2000a; Jimbo *et al.*,

2000b; Oka *et al.*, 1999].

Wegen des Interesses an elektrischer Aktivität von Zellnetzwerken ist diese Technik auch die Methode der Wahl für alle elektrophysiologischen Versuche im Rahmen dieser Doktorarbeit.

Die in dieser Arbeit verwendeten MEA-Chips bestanden aus Slotglas, welches bis auf die Titannitrid-Elektroden ganzflächig mit Siliziumnitrit beschichtet war, wobei die Referenzelektrode vom Elektrodenfeld separiert war. Die räumliche Distanz der Referenzelektrode zu den restlichen Elektroden, auf denen die Zellen kultiviert wurden war notwendig, um über das Elektrolyt (Zellmedium) das Bezugspotential für die Ableitungen zu bilden und somit Aktions- oder Feldpotentiale messen zu können [Multi Channel Systems MCS GmbH, 2018].

Entscheidend für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis ist die Kopplung zwischen dem Zellnetzwerk und dem Elektrodenfeld. Der Spalt zwischen dem Soma der Zelle und Elektrode muss möglichst gering gehalten werden (Abbildung 1). Durch chemische Hydrophilisierung und Beschichtung mit extrazellulären Matrix-Proteinen gelingt die notwendige

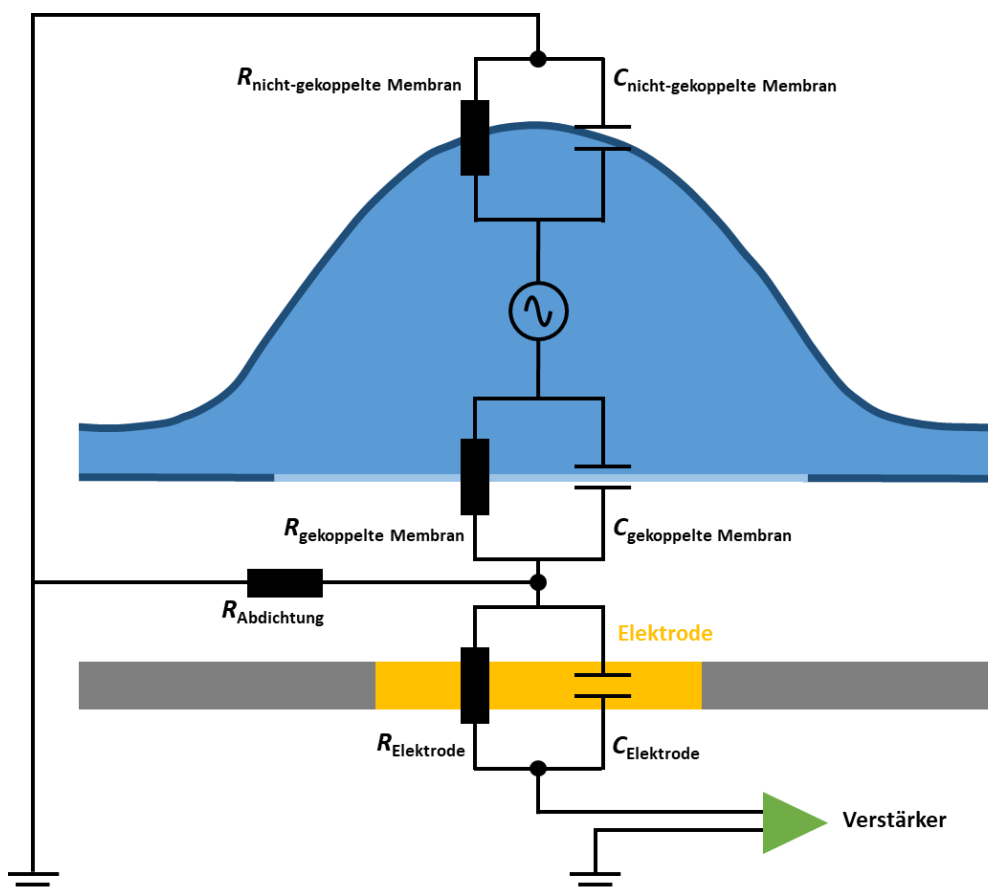


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kopplung zwischen Neuron und einer substrat-integrierten Elektrode. Das Soma des Neurons (blau) befindet sich über der Messelektrode (gelb) welche in das Substrat (grau) integriert und an einen Verstärker (grün) gekoppelt ist. Der Spalt zwischen Elektrode und Neuron ist mit Zellkulturmedium gefüllt. Die Plasmamembran der Zelle ist unterteilt in den der Elektrode direkt gegenüberliegenden Teil (gekoppelte Membran, hellblau), welche den Membran-Widerstand, sowie die Membran-Kapazität präsentiert, und in den der Elektrode nicht direkt gegenüberliegenden Teil (nicht-gekoppelte Membran, dunkelblau), welcher den nicht-gekoppelten Membran-Widerstand und die nicht-gekoppelte Membran-Kapazität repräsentiert. Modifizierte Abbildung nach Spira *et al.*, 2013.

optimale Kopplung zwischen Zellen und dem Elektrodenfeld der MEA-Chips [Multi Channel Systems MCS GmbH, 2018; Spira *et al.*, 2013; Taketani *et al.*, 2006].

Der neueste Stand der Entwicklung sind Mikroelektroden-Array-Systeme auf Basis der CMOS-Technologie. Dabei werden Zellkulturen auf Transistoren kultiviert, die es ermöglichen die elektrischen Signale der Zellen mit mehreren tausend Aufzeichnungselektroden abzuleiten. Dies bietet eine wesentlich höhere räumliche Auflösung der Zellsignale [Fromherz *et al.*, 1991; Rettinger *et al.*, 2018; Stutzki *et al.*, 2014].

3.2. Ionisierende und nicht-ionisierende elektromagnetische Strahlung

Als elektromagnetische Strahlung wird in der Physik eine Form der Energieausbreitung beschrieben. Die Strahlung hat hierbei einen Wellen- als auch einen Teilchencharakter, bezeichnet als Welle-Teilchen-Dualismus. Je kleiner die Wellenlänge bzw. je größer die Frequenz, desto mehr überwiegt der Teilchencharakter (Abbildung 2). Umgekehrt gilt, je größer die Wellenlänge bzw. je kleiner die Frequenz, desto mehr überwiegt der Wellencharakter [Krieger, 2017; Tipler *et al.*, 2015].

Die Unterteilung in ionisierende und nicht-ionisierende Strahlung erfolgt anhand der Energie der Strahlung, ist die Energie ≥ 12 eV, ist sie ionisierend. Die Energie ist dabei so groß, dass Elektronen aus Atomen oder Molekülen geschlagen werden, wodurch positiv geladene Ionen oder Moleküle zurück bleiben [Glaser, 2012; Pfützner, 2012; Tipler *et al.*, 2015].

Bei nicht-ionisierender Strahlung, wozu das Frequenzspektrum von Mobilfunksignalen (RF-EMF) und nahem Infrarotlicht gehört, erfolgt keine direkte Schädigung der DNA oder anderer Moleküle. Diese Strahlung ist nicht ausreichend energiereich um Elektronen aus ihren

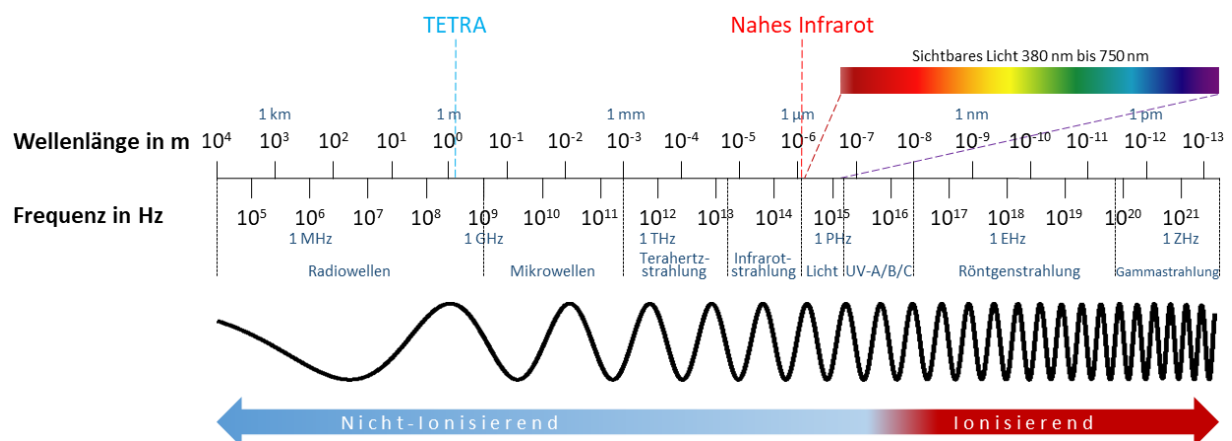


Abbildung 2: Elektromagnetisches Spektrum von Radiowellen bis zur Gammastrahlung. Im Bereich der UV-C Strahlung erfolgt die Unterteilung des elektromagnetischen Spektrums in ionisierende und nicht-ionisierende Strahlung. Der Frequenz-/Wellenlängenbereich von Radiowellen wie z.B. des Mobilfunkstandards Terrestrial Trunked Radio (TETRA) liegt im nicht-ionisierenden Bereich des elektromagnetischen Spektrums. Gleiches gilt für nahes Infrarot Licht [Glaser, 2012; Pfützner, 2012; Tipler *et al.*, 2015]. Modifizierte Abbildung nach Glaser, 2012.

Schalen herauszuschlagen. Auch führt sie nicht zur indirekten Schädigung von biologischen Materialien durch freie Radikale; die hierfür notwendige Energie ist nicht ausreichend [Lerchl *et al.*, 2015; Sheppard *et al.*, 2008].

Die unbestrittene und möglicherweise einzige Wechselwirkung von nicht-ionisierender Strahlung im Frequenzbereich von RF-EMF, ist die der dielektrischen Erwärmung von Zellen, Gewebe und Organismen. Dieses Phänomen wird als thermischer Effekt bezeichnet [Apollonio *et al.*, 2013; Independent Advisory Group on Non-ionising Radiation, 2012; International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 1998; Sheppard *et al.*, 2008].

Das Auftreten von nicht-thermischen Effekten als Reaktion auf RF-EMF wird jedoch kontrovers diskutiert. Obgleich solche Effekte in der Literatur erwähnt werden ist bisher kein physikalischer Mechanismus bekannt, der die beobachteten Effekte mit Sicherheit erklären könnte [Juutilainen *et al.*, 2011; Manna *et al.*, 2016; Sheppard *et al.*, 2008; Simko *et al.*, 2016; Valentini *et al.*, 2007].

3.3. Nutzung von elektromagnetischen Frequenzbereichen

Die Nutzung von elektromagnetischen Wellen zur Kommunikation, Navigation, Identifikation und Ortung ist aus dem täglichen Leben nicht mehr wegzudenken und wird durch verschiedene Frequenzbereiche realisiert. Die Unterteilung in entsprechende Frequenzbänder erfolgte durch die *International Telecommunication Union* (ITU) (Tabelle 1) und wurde um den Frequenz- und Wellenlängenbereich von Infrarotstrahlung nachfolgend ergänzt [Gustrau, 2013; International Telecommunication Union, 2015; Pfützner, 2012; Schiller, 2003].

Die Anwendungsbereiche der Frequenzbänder unterscheiden sich deutlich, so werden z.B. Längstwellen (VLF) international bei der U-Boot-Kommunikation eingesetzt, da sie sich im Wasser fortpflanzen und der Erdkrümmung folgen. Das Frequenzband von Dezimeterwellen (UHF) wird hauptsächlich für den Mobilfunk verwendet, so liegen unter anderem die Frequenzbereiche der Mobilfunkstandards von GSM (*Global System for Mobile Communications*), UMTS (*Universal Mobile Telecommunications System*) und TETRA in diesem Band (Tabelle 2). Ebenso liegen die Frequenzen des digitalen Antennenfernsehen in diesem Bereich [Gustrau, 2013; Schiller, 2003].

Die Zuordnung der internationalen Mobilfunkstandards auf Frequenzbereiche unterliegt nationalen Regelungen und variiert hierdurch im internationalen Vergleich. Die ITU versucht hierbei eine Harmonisierung der weltweit genutzten Frequenzbereichen zu erzielen [Schiller, 2003].

Tabelle 1: Elektromagnetische Frequenzbänder nach ITU. Für eine eindeutige Zuordnung erfolgte durch die *International Telecommunication Union (ITU)* eine Einteilung in verschiedene Frequenzbänder, welche in dieser Tabelle um den Frequenz- und Wellenlängenbereich von Infrarotstrahlung ergänzt wurde [Gustrau, 2013; International Telecommunication Union, 2015; Pfützner, 2012; Schiller, 2003].

Frequenzbereich	Wellenlänge	Internationale Bezeichnung	Deutsche Bezeichnung
3 – 30kHz	100 – 10 km	VLF – Very Low Frequency	Längstwellen
30 – 300 kHz	10 – 1 km	LF – Low Frequency	Langwellen
0,3 – 3MHz	1000 – 100 m	MF – Medium Frequency	Mittelwellen
3 – 30 MHz	100 – 10 m	HF – High Frequency	Kurzwellen
30 – 300 MHz	10 – 1 m	VHF – Very High Frequency	Ultrakurzwellen
0,3 – 3 GHz	10 – 1 dm	UHF – Ultra High Frequency	Dezimeterwellen
3 – 30 GHz	10 – 1 cm	SHF – Super High Frequency	Zentimeterwellen
30 – 300 GHz	10 – 1 mm	EHF – Extremely High Frequency	Millimeterwellen
0,3 – 385 THz	1000 – 0,78 μm	IR – Infrared Radiation	Infrarotstrahlung

Tabelle 2: Frequenzbänder bekannter Mobilfunkstandards. Die Frequenzbereiche der aufgeführten Mobilfunkstandards befinden sich in Deutschland alle im Bereich von Dezimeterwellen (UHF) und können im internationalen Vergleich variieren [European Telecommunications Standards Institute, 2002; European Telecommunications Standards Institute, 2005; European Telecommunications Standards Institute, 2006; Gustrau, 2013].

Abkürzung	Bezeichnung	Frequenzbereich
TETRA	Terrestrial Trunked Radio	380 – 395 MHz
GSM 900	Global System for Mobile Communication	880 – 960 MHz
GSM 1800	Global System for Mobile Communication	1710 – 1880 MHz
UMTS	Universal Mobile Telecommunications System	1920 – 2170 MHz

3.4. Aktionspotentiale von Neuronen

Neuronale Zellen kommunizieren durch charakteristische temporäre Veränderungen des Membranpotentials, hervorgerufen durch Änderungen der Membranleitfähigkeit für einzelne Ionen-Spezies. Diese transienten Potentialänderungen werden als Aktionspotentiale (APs) oder Spikes bezeichnet. Bei einem AP erfolgt eine kurzzeitige Ladungsumkehr zwischen Intra- und Extrazellularraum durch Öffnen und Schließen von spannungsabhängigen Ionenkanälen. Nach Inaktivierung der Kanäle stellt sich in den Zellen wieder das Ruhepotential ein. Das Ruhepotential von neuronalen Zellen liegt bei ca. -80mV (Tabelle 3) und wird durch aktiven und passiven Ionen-Transport aufrechterhalten. Dies erfolgt zum einen durch die selektive Hintergrundleitfähigkeit der Membran für Kalium-Ionen und durch die Natrium-Kalium-Pumpe, die unter ATP-Verbrauch entgegen des Konzentrationsgradienten 3 Natrium-Ionen aus

der Zelle und 2 Kalium-Ionen in die Zelle transportiert [Bear *et al.*, 2015; Campbell *et al.*, 2015; Klinke *et al.*, 2005].

Damit ein AP ausgelöst werden kann, muss ein Schwellenpotential am Axonhügel eines Neurons überschritten werden. Dies kann durch Aufsummierung exzitatorischer APs erfolgen, oder auch spontan eintreten wie bei neuronalen Schrittmacherzellen. Durch diese Potentialveränderung erfolgt die Öffnung von spannungsgesteuerten Natriumkanälen und es kommt zur vollständigen Depolarisation der Zelle durch einen schnellen Natrium-Ionen-Einstrom (Abbildung 3).

Tabelle 3: Intra- und extrazelluläre Ionenkonzentration eines Neurons. Neben der Intra- und extrazellulären Ionenkonzentration ist zusätzlich das Konzentrationsverhältnis und das Gleichgewichtspotential angegeben [Bear *et al.*, 2015].

Ion	Extrazelluläre Ionenkonzentration	Intrazelluläre Ionenkonzentration	Konzentrationsverhältnis außen : innen	E_{ion} bei 37°C
K^+	5 mM	100 mM	1:20	-80 mV
Na^+	150 mM	15 mM	10:1	62 mV
Ca^{2+}	2 mM	0,0002 mM	10.000:1	123 mV
Cl^-	150 mM	13 mM	11,5:1	-65 mV

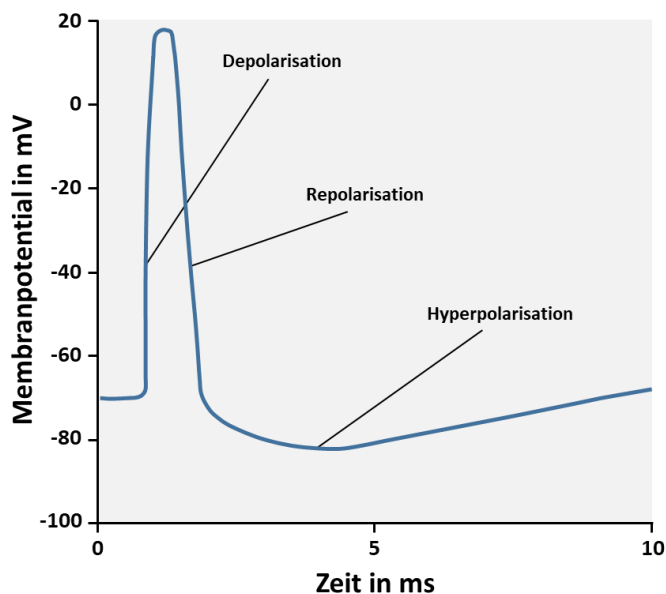


Abbildung 3: Schematischer Aktionspotentialverlauf eines Neurons. Bei einem neuronalen Aktionspotential erfolgt zunächst eine schnelle Depolarisation der Zelle, gefolgt von einer Repolarisation, die in eine Hyperpolarisation übergeht. Final kommt es zur Wiederherstellung des Ruhepotentials des Neurons. Modifizierte Abbildung nach Klinke *et al.*, 2005.

Das nachfolgende Schließen der Natriumkanäle und das spannungsabhängige Öffnen der Kaliumkanäle initiiert die Repolarisation, bei der es zu einem Ausstrom von Kalium-Ionen kommt. Dies wiederum führt zur Hyperpolarisation der Zelle. Hierbei nimmt das Membran-

potential negativere Werte an als beim Ruhepotential. Durch die Natrium-Kalium-Pumpe und selektive Hintergrundleitfähigkeit der Membran für Kalium-Ionen erfolgt die Wiederherstellung des Ruhepotentials, welches in etwa auf dem Niveau des Gleichgewichtspotentials für Kalium-Ionen liegt (Tabelle 3). Nach der Generierung eines APs bzw. von Spikes ist das Neuron für einen Zeitraum von wenigen Millisekunden nicht erregbar, da sich die Natrium-Kanäle in einem inaktiven Zustand befinden. Dieser Zeitraum wird als absolute Refraktärzeit bezeichnet. Direkt nach diesem Zeitraum ist ein Teil der Natriumkanäle durch einen höheren exzitatorischen Reiz wieder aktivierbar, dieser Zustand wird als relative Refraktärzeit bezeichnet. Kommt es zu einem langanhaltenden exzitatorischen Stimulus, erfolgt eine hochfrequente Abfolge von Spikes, die als Burst bezeichnet werden. Aufgrund der komplexen neuronalen Verknüpfungen und ihrer zeitlichen und räumlichen Summation erfolgen mitunter Synchron-Burst-Events im neuronalen Netzwerk [Bear *et al.*, 2015; Campbell *et al.*, 2015; Klinke *et al.*, 2005].

Je nachdem ob ein AP intra- oder extrazellulär abgeleitet wird erfolgt ein anderer Potentialverlauf (Abbildung 4). Bei intrazellulären Ableitungen, z.B. unter Anwendung der Patch-Clamp-Technik, erfolgt die Messung des Membranpotentials während eines AP. Dies bedeutet, dass die Ladungsdifferenz zwischen Extra- und Intrazellularraum über die Zeit detektiert wird. Erfolgt die Ableitung extrazellulär, wie es z.B. bei der Verwendung der Technik der MEAs der Fall ist, erfolgt die Messung des Potentialunterschieds zwischen einer Soma-nahen Elektrode und einer Referenzelektrode im Medium ohne Zellkontakt [Bear *et al.*, 2015; Spira *et al.*, 2013].

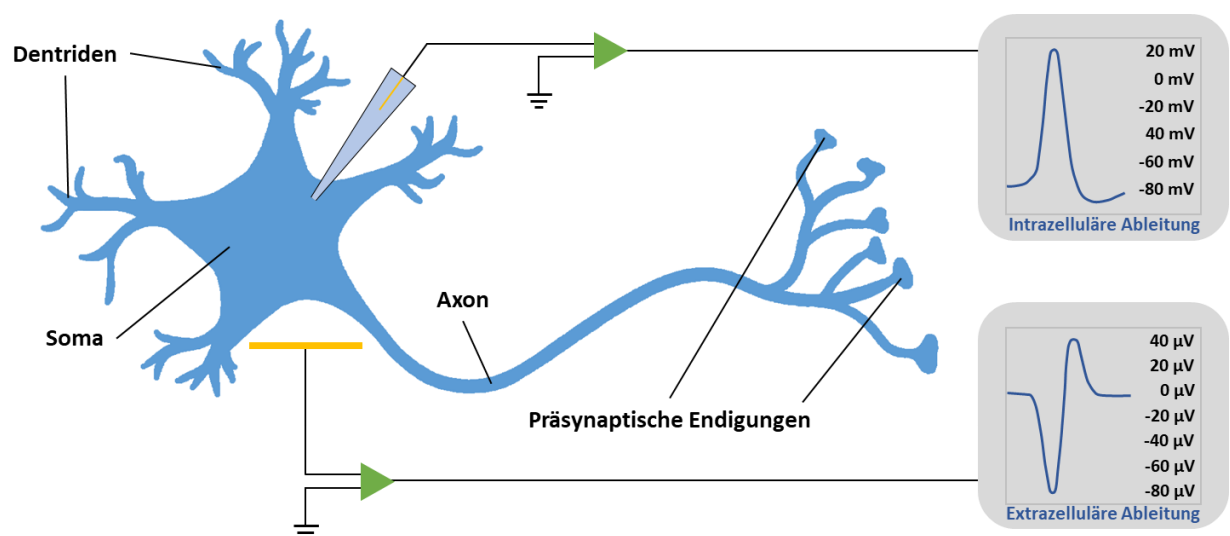


Abbildung 4: Extra- und intrazellulär gemessener Potentialverlauf eines neuronalen Aktionspotentials. Erfolgt die Ableitung eines Aktionspotentials intrazellulär, ergibt sich eine Detektion der Ladungsdifferenz zwischen Extra- und Intrazellularraum. Wird ein Aktionspotential extrazellulär abgeleitet, erfolgt eine Detektion der Ladungsdifferenz zwischen der Soma-nahen extrazellulären Elektrode und einer Referenzelektrode im Medium. Hieraus ergeben sich unterschiedliche Potentialverläufe. Modifizierte Abbildung nach Bear *et al.*, 2015 und Spira *et al.*, 2013.

3.5. Aktionspotentiale von Kardiomyozyten

Bei Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten) unterscheidet man in zwei verschiedene Aktionspotentialtypen. Ein Typ wird durch ventrikuläre Aktionspotentiale (APs) von Kardiomyozyten aus der Arbeitsmuskulatur des Herzens generiert. Die Depolarisation dieser APs wird von einem schnellen Natrium-Ionen-Einstrom getrieben (Abbildung 5A), in ihrer Gesamtheit bewirken sie die Kontraktion des Herzens. Der zweite Typ von APs wird von Schrittmacher Kardiomyozyten aus dem Sinusknoten des Herzens generiert. Deren Depolarisation wird durch einen Calcium-Ionen-Einstrom bedingt, was wiederum den Herzschlag initiiert (Abbildung 5B) [Klinke *et al.*, 2005].

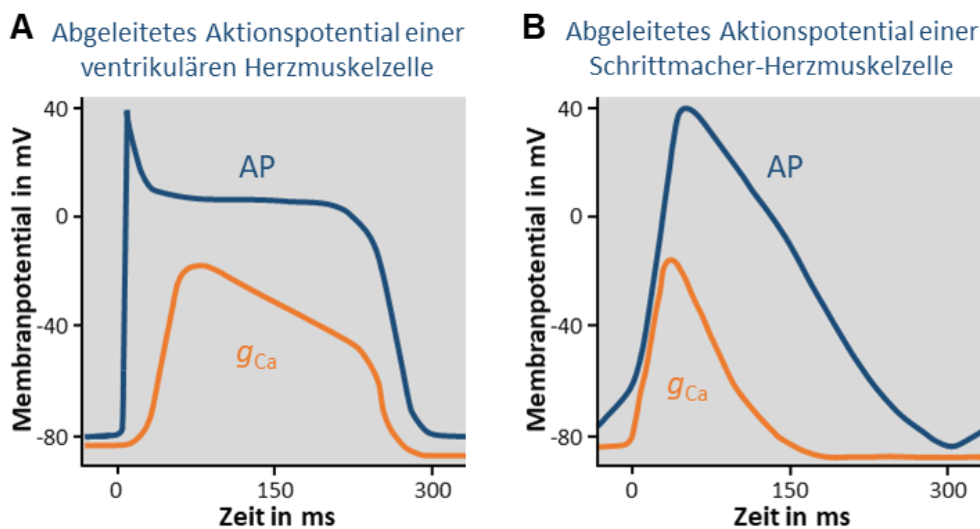


Abbildung 5: Schematische Darstellung von Kardiomyozyten-Aktionspotentialverläufen. Bei Kardiomyozyten wird in ventrikuläre Aktionspotentiale (A) und Schrittmacher-Aktionspotentiale (B) unterschieden. Die Depolarisation von Schrittmacher-Kardiomyozyten ist von der Leitfähigkeit für Calcium-Ionen (g_{Ca}) getrieben. Hingegen ist die Depolarisation von ventrikulären Kardiomyozyten primär von der hohen Leitfähigkeit für Natrium-Ionen abhängig (nicht gezeigt); die Leitfähigkeit für Calcium-Ionen (g_{Ca}) generiert die Plateauphase des Aktionspotentials. Modifizierte Abbildung nach Klinke *et al.*, 2005.

Weitere Unterschiede zwischen den Zelltypen sind, dass die Kardiomyozyten der Arbeitsmuskulatur im Vergleich zu den Kardiomyozyten des Sinusknoten einen geringeren Zelldurchmesser haben, eine größere Anzahl von Sarkosomen (Mitochondrien) besitzen und bis zu zwei Nuklei aufweisen. Beide Kardiomyozytentypen sind mit ihren Nachbarzellen durch Gap Junctions (Connexine) verbunden, die einen schnellen Austausch von Ionen und kleinen Molekülen ermöglichen und der AP-Fortpflanzung dienen [Klinke *et al.*, 2005].

Die Generierung eines APs in den Kardiomyozyten des Arbeitsmyokard erfolgt in dem das Schwellenpotential, das bei ca. -65 mV liegt, überschritten wird. Durch das spannungsabhängige Öffnen von Natriumkanälen und der hohen elektrochemischen Triebkraft (Natriumionenkonzentration: extrazellulär 145 mmol/l, intrazellulär 12 mmol/l, negatives

Membranpotential intrazellulär) kommt es zu einem schnellen Natrium-Einstrom und somit zu einer Depolarisation der Zelle bis auf ein Membranpotential von ca. +40 mV (Abbildung 6) [Klinke *et al.*, 2005].

In diesem Spannungsbereich kommt es zur Inaktivierung der Natriumkanäle. Der folgende Übergang in die Plateauphase wird von einem langsamen Calcium-Ionen-Einstrom dominiert. Dieser beruht auf einer erheblichen chemischen Triebkraft, die durch den großen Konzentrationsgradienten für Calcium begünstigt wird (Abbildung 6). Das nachfolgende Öffnen der spannungsabhängigen Kaliumkanäle bewirkt das Ausströmen von Kalium-Ionen, was wiederum die Repolarisation der Zelle bedingt. Die ursprüngliche Ionenkonzentration wird durch Membranpumpen wiederhergestellt. Die oben genannte Natrium-Kalium-Pumpe transportiert unter ATP-Verbrauch entgegen des jeweiligen Konzentrationsgradienten 3 Natrium-Ionen aus der Zelle und 2 Kalium-Ionen in die Zelle. Die Pumpe bewirkt somit indirekt die Aktivierung des Natrium-Kalium-Antiporter, der ein Calcium-Ion entgegen seines Konzentrationsgradienten aus der Zelle transportiert und im Austausch dafür 3 Natrium-Ionen in die Zelle transportiert. Auch die Calcium-ATPase trägt mit ihrem Abtransport von Calcium aus dem Sarkoplasma zur Herstellung der ursprünglichen Ionenkonzentration bei [Klinke *et al.*, 2005; Schmidt *et al.*, 2005].

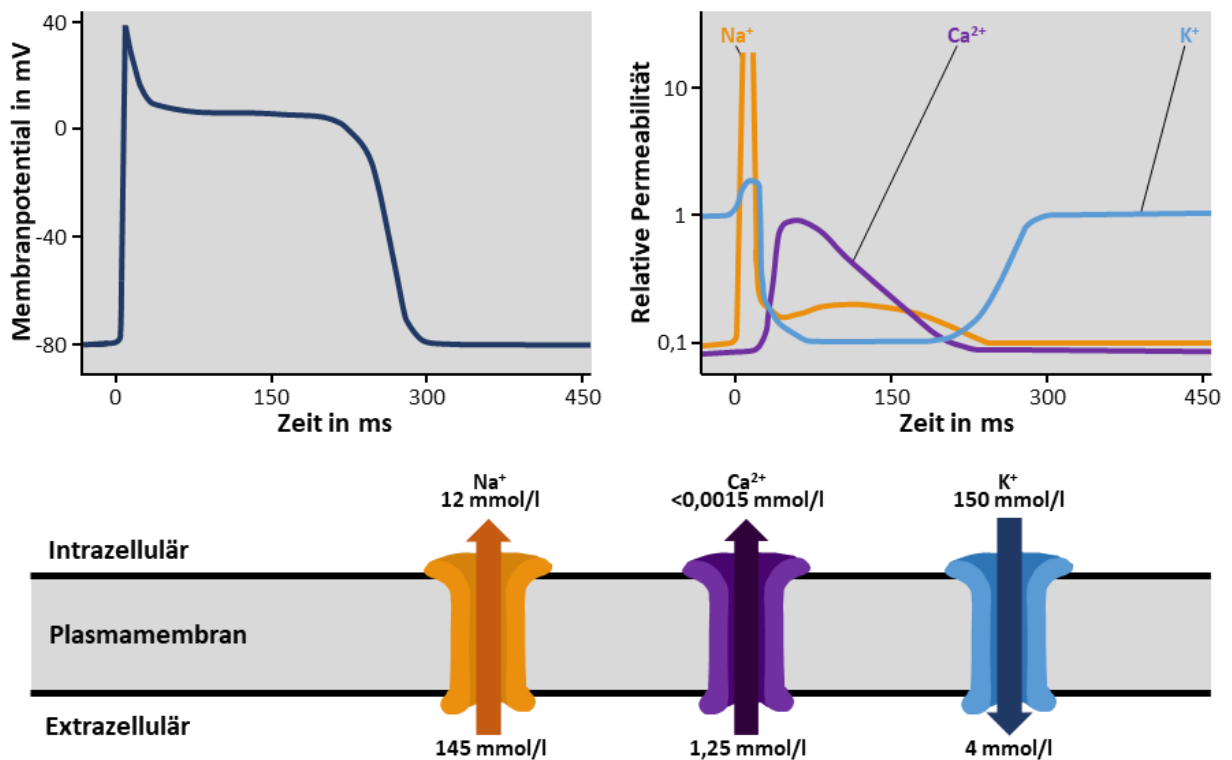


Abbildung 6: Das Aktionspotential von Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards. Die Abfolge eines Aktionspotentials von ventrikulären Kardiomyozyten kann in 3 Phasen untergliedert werden, die 3 verschiedenen Ionen-Leitfähigkeiten zuzuordnen sind: Schnelle Depolarisation (Natrium-Ionen), langanhaltende Plateauphase (Calcium-Ionen) und Repolarisation (Kalium-Ionen). Die chemische Triebkraft für die einzelnen Ionen-Spezies ergibt sich dabei aus den jeweiligen Ionen-Konzentrationen. Modifizierte Abbildung nach Klinke *et al.*, 2005.

Die Initiierung der Kardiomyozyten-Kontraktion und somit auch die Kontraktion des Herzens, erfolgt durch den Calcium-Ionen-Einstrom über die Membran und deren Einstülpungen – den Transversaltubuli (T-Tubuli) – in das Sarkoplasma. Diese geometrische Anordnung bewirkt eine schnelle Übertragung der Depolarisation auf das sarkoplasmatische Retikulum (SR) (Abbildung 7). Die resultierende Anhebung der intrazellulären Calcium-Ionen-Konzentration induziert die Öffnung von Ryanodin-Rezeptoren in der SR-Membran, was zu einer zusätzlichen Calcium-Ionen-Freisetzung aus dem im SR gespeicherten Calcium in das Sarkoplasma führt. Hierdurch erfolgt die Initiierung der Kontraktion der Kardiomyozyten. Durch die Bindung der Calcium-Ionen an Troponin C der Myofilamente kommt es zu einer Konformationsänderung des Tropomyosins. In Folge werden die Bindungsstellen des Aktins für die Myosinköpfe frei, die sich durch ATP-Hydrolyse an das Aktin anheften. Dies wird als Querbrückenbildung bezeichnet und führt zum Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente, was final zur Kontraktion führt. Durch den Natrium-Calcium-Antiporter und die Calcium-ATPase wird die ursprüngliche Calcium-Konzentration im Sarkoplasma wiederhergestellt und die Kontraktion beendet [Klinke *et al.*, 2005].

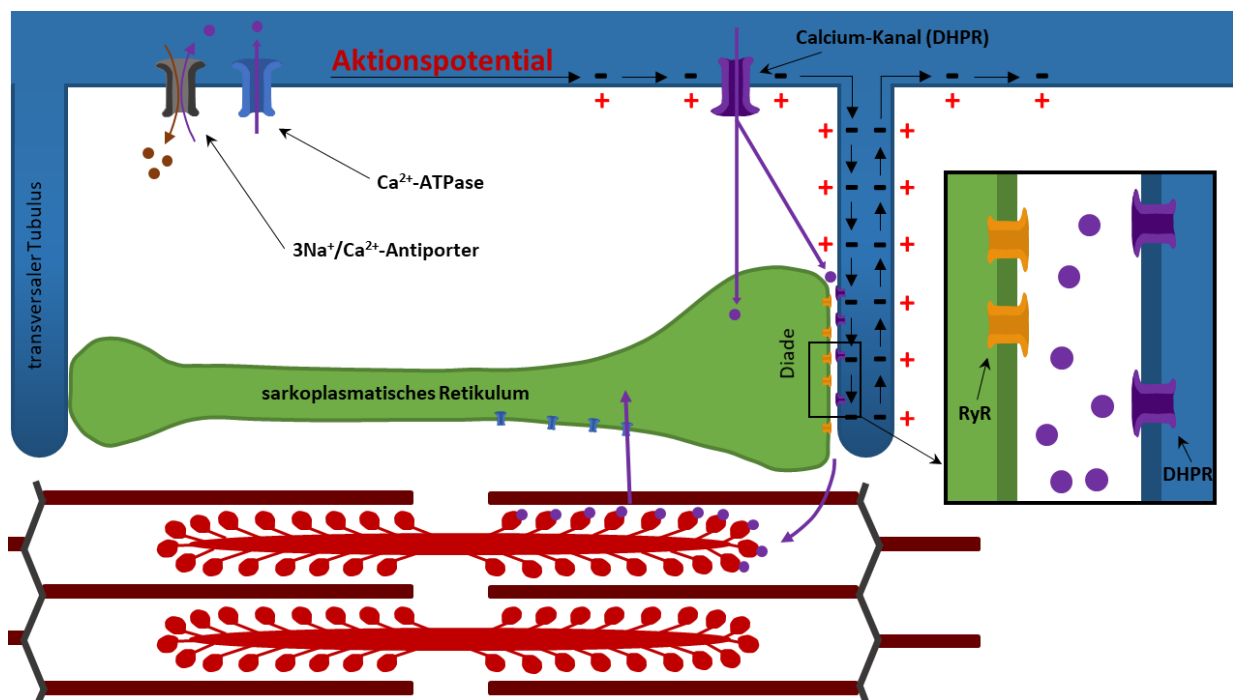


Abbildung 7: Elektromechanische Koppelung bei Kardiomyozyten. Während eines APs diffundieren Ca²⁺-Ionen durch Dihydropyridin-Rezeptoren (DHPR = L-Typ-Ca²⁺-Kanäle), sitzend in der T-Tubuli-Membran in das Sarkoplasma, dieser Übergang wird als Diade bezeichnet. Die nachfolgende Bindung von Ca²⁺-Ionen an die Ryanodin-Rezeptoren (RyR), sitzend in der SR-Membran, bewirkt die zusätzliche Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem SR in das Sarkoplasma. Durch die stark erhöhte Ca²⁺-Ionen-Konzentration und deren Bindung an Troponin C der Myofilamente und die daraus resultierende Konformationsänderung erfolgt final das Ineinandergleiten der Aktin- und Myosinfilamente und somit die Kontraktion der Kardiomyozyten. Durch Ca²⁺-ATPasen und die 3Na⁺/Ca²⁺-Antiporter erfolgt die Herstellung der ursprünglichen Calciumkonzentration im Sarkoplasma und die Kontraktion ist beendet. Modifizierte Abbildung nach Klinke *et al.*, 2005.

Anders als die Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards generieren die Schrittmacher-Kardiomyozyten aus dem Sinusknoten autonom Aktionspotentiale und leiten sie von Zelle zu Zelle an den Arbeitsmyokard weiter, was final wiederum zur Kontraktion des Herzens führt. Die Schrittmacher Zellen verfügen über kein stabiles Ruhemembranpotential, sie depolarisieren spontan und bilden damit autonom Aktionspotentiale. Eine Schlüsselrolle hierbei spielen einige Mitglieder aus der Familie der HCN-Kanäle (*Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel*). Diese einwärts gleichrichtenden Kanäle werden während der Hyperpolarisation aktiviert, was zu einem Einwärtsstrom, dem sogenannten *funny* Strom (I_f), von Na^+ - und K^+ -Ionen in die Zellen führt. Die Depolarisation, die durch den Na^+ -Einstrom bedingt wird, bewirkt das Überschreiten des Schwellenwerts der Membran der Schrittmacherzellen und initiiert das darauf folgende AP (Abbildung 8). Die HCN-Kanäle bestimmen somit entscheidend den Zeitraum zwischen zwei APs und somit die Schlagrate des Herzens [Accili *et al.*, 2002; Klinker *et al.*, 2005].

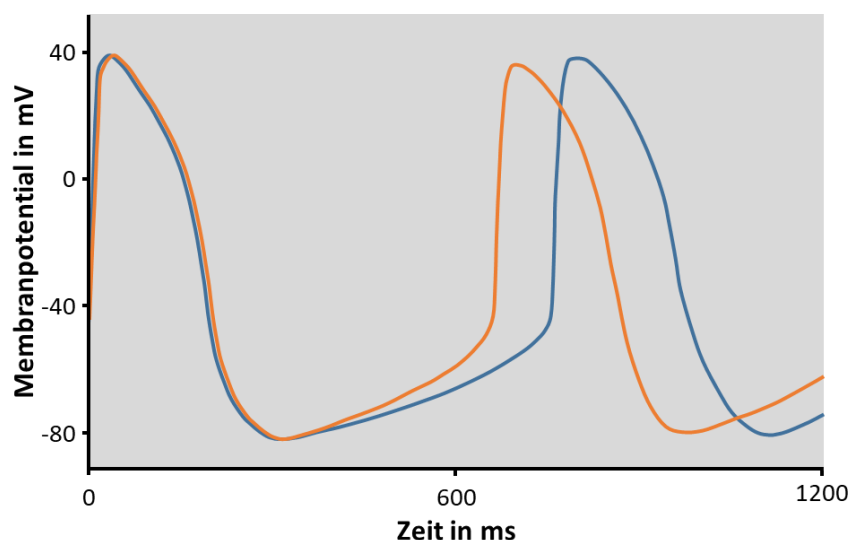


Abbildung 8 Aktionspotentiale von Schrittmacher-Kardiomyozyten. Schrittmacher Kardiomyozyten generieren autonom Aktionspotentiale und besitzen kein Ruhemembranpotential (blau). Während der Phase der diastolischen Depolarisation des Herzschlags, bei der sich die Kardiomyozyten in der Hyperpolarisation befinden, öffnen die HCN-Kanäle. Dies bewirkt einen Na^+/K^+ -Ionen-Einstrom und initiiert ein neues Aktionspotential. Durch Bindung von zyklischen Nucleotiden und Flavonoiden an die Zyklonucleotid-Bindestelle der HCN-Kanäle kommt es zur Verschiebung der Offenwahrscheinlichkeit der Kanäle. Hierdurch öffnen sie bei weniger negativen Membranpotentials, dies steigert die Frequenz der Aktionspotentiale, was zu einer erhöhten Herzschlagrate führt (orange). Modifizierte Abbildung nach Postea *et al.*, 2011.

Durch ihre Zyklonucleotid-Bindestelle auf der cytosolischen Seite des Kanalproteins können sie durch Signalmoleküle wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder zyklisches Guanosinmonophosphat cGMP moduliert werden. Dabei führt eine Zunahme in der Konzentration von cAMP in der Zelle als Resultat einer Signalkaskade zu einer Veränderung in der Spannungsabhängigkeit des Kanals. Die Offenwahrscheinlichkeit der HCN-Kanäle verschiebt sich in Anwesenheit von cAMP zu niedrigeren Spannungen, wodurch die Kanäle

bereits bei weniger negativen Membranspannungen öffnen. Dadurch steigt die Frequenz der APs an, was wiederum zu einer erhöhten Herzfrequenz führt (Abbildung 8). Aus pharmakologischen Studien ist bekannt, dass auch ein Flavonoid wie Fisetin einen cAMP ähnlichen Effekt hervorruft und die Aktivität von HCN- Kanälen moduliert [Postea *et al.*, 2011; Romanelli *et al.*, 2016; Wahl-Schott *et al.*, 2009].

4. Material und Methoden

4.1. Materialienliste

In folgendem Kapitel werden die verwendeten Geräte, Chemikalien, Proteine, Medien, Zusätze, Verbrauchsmaterialien, Zellkulturen, sowie die eingesetzte Software aufgelistet.

Tabelle 4: Verwendete Geräte und Sensoren.

Geräte / Sensoren	Hersteller
CO ₂ -Inkubator C-150	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
CO ₂ -Inkubator BC-190	SalvisLab, Renggli AG, Rotkreuz, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop, Eclipse Ti	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Laborzentrifuge, Heraeus Labofuge 400R	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Laser Dioden / Temperatur Controller ITC4005	Thorlabs Inc., Newton, USA
Leistungsmessgerät PM100USB	Thorlabs Inc., Newton, USA
Mini-Zentrifuge Rotilabo	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reinstwasseranlage, Purelab flex 3	ELGA, Veolia Environnement S.A, Paris, Frankreich
Spektrumanalysator Rigol DSA815-	Batronix GmbH & Co. KG, Preetz, Deutschland
Temperatur-Logger	Opsens Inc., Quebec, Kanada
Thermischer Leistungssensor S302C	Thorlabs Inc., Newton, USA
Vorverstärker MEA1060	Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland

Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Gold-Nanostäbchen: C12-10-808-5KAPEG-50	Nanopartz Inc. Barberry, USA
MEA-Chips 60MEA200/30iR-TiN-Gr	Multi Channel Systems MCS GmbH, Reutlingen, Deutschland
Petrischalen Ø 35 mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen Ø 60 mm	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen 100 µl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen 1000 µl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 15 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 6: Verwendete Chemikalien, Enzyme, Proteine, Medien und Zusätze.

Chemikalien, Enzyme, Proteine, Medien, Zusätze	Hersteller
B27™ Supplement	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Borax	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Borsäure	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Cardiomyocytes Maintenance-Medium™	Cellular Dynamics International Inc. - a FUJIFILM Company, Madison, USA
Cardiomyocytes Plating-Medium™	Cellular Dynamics International Inc. - a FUJIFILM Company, Madison, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Ethanol (70 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fibronectin human Protein	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
GlutaMAX™ Supplement (L-Glutamine)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Laminin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Neurobasal™ Medium	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PBS	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Penicillin-Streptomycin	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Tabelle 7: Verwendete Software.

Software	Hersteller
Comsol Multiphysics™ 3.5a,	Comsol Multiphysics GmbH, Göttingen, Deutschland
DrCell, MATLAB Add-on	BioMEMS Lab, Hochschule für angewandte Wissenschaften Aschaffenburg, Deutschland
EndNote™ X9	Clarivate Analytics, Thomson Reuters Corp., Toronto, Canada
ImageJ 1.52h	Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, USA
LabView™ 13.0.1	National Instruments, Austin, TX, USA
MATLAB™ R2016a	The MathWorks Corporation, Natick, USA
MS Excel™ 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
MS Word™ 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
NIS Elements™ 4.51.01	Nikon GmbH, Düsseldorf, Deutschland
SPSS Statistics® Version 25	IBM, Corporation, Armonk, USA
Veusz 3.0.1	Dr. Jeremy Sanders, Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik, Garching, Deutschland

Tabelle 8: Verwendete Zellkulturen.

Zellkulturen	Hersteller
Primäre kortikale Rattenneurone	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
iCell® Cardiomyocytes (hiPSC)	Cellular Dynamics International Inc. - a FUJIFILM Company, Madison, USA

Tabelle 9: Verwendete Lösungen und Puffer.

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Borsäurepuffer	3,1 g Borsäure, 4,75 g Borax, in 1 l autoklaviertem DI-H ₂ O durch erwärmen lösen, pH mit HCl auf 8,4 einstellen
Fibronektin-Lösung	Herstellung einer 50 µg/ml Fibronektin-Lösung mit autoklavierten DI-H ₂ O
Polyethylenimin-Lösung	0,1% PEI in Borsäurepuffer gelöst
Tergazym-Lösung	5 g Tergazym in 500 ml autoklaviertem DI-H ₂ O gelöst

Tabelle 10: Verwendete Temperatursensoren und Dioden.

Temperatursensoren, Dioden	Hersteller
Temperatursensor Modell OTG-F-10-62ST-1.5PTFE-XN-25PI-L Reaktionszeit: 5 ms; Auflösung: 0,05°C; Temperaturgenauigkeit: ±0,3°C	Opsens Inc., Quebec, Kanada
Temperatursensor Modell OTG-A-10-62ST-1.5PTFE-XN-4PIT-L Reaktionszeit: 0,5 s; Auflösung: 0,1°C; Temperaturgenauigkeit: ±0,3°C	Opsens Inc., Quebec, Kanada
Laser-Diode LD830-ME2W Ausgangsleistung: 2W; Wellenlänge: 829 nm	Thorlabs Inc., Newton, USA

4.2. Reinigung der MEA-Chips

MEA-Chips können mehrfach verwendet werden und müssen somit nach benutzen gereinigt und sterilisiert werden. Dies erfolgte nach folgendem Schema. Zunächst wurde die Kavität der MEA-Chips zur chemischen Desinfektion mit 70%igem Ethanol (EtOH) gefüllt und für 30 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Das EtOH wurde anschließend abgezogen und 1-mal mit deionisiertem Wasser (DI-H₂O) gewaschen. Anschließenden wurde zum Verdau von Zellresten eine 1%ige Tergazym-Lösung in die Kavität gegeben und über Nacht bei RT inkubiert. Am Folgetag wurde die Tergazym-Lösung abgezogen und 3-mal mit DI-H₂O gewaschen. Nachfolgend wurden die Chips entweder bei 121°C für 30 min autoklaviert oder einer Sterilisation mit EtOH und UV-Licht unterzogen. Bei letzterem wurden die Chips ganzflächig mit 70%igem EtOH gewaschen und EtOH in die Kavität gegeben und für 30 min bei RT

inkubiert. Anschließend wurden die Chips 3-mal mit autoklaviertem DI-H₂O gewaschen und für 45 min zur weiteren Sterilisation UV-Licht ausgesetzt.

4.3. Aussaat und Kultivierung kortikaler Rattenneurone

Für die Versuche mit neuronalen Zellen wurden kryokonservierte, dissoziierte, primäre kortikale Rattenneurone (E18) des Stamms Sprague Dawley von Thermo Fisher Scientific (Tabelle 8) verwendet und dem Protokoll entsprechend auf MEA-Chips kultiviert (Abbildung 9) [Thermo Fisher Scientific Corporation, 2014]. Die MEA-Chips (Tabelle 5) wurden vor der Zellaussaat gereinigt (Kapitel 4.2) und anschließend mit Polyethylenimin (PEI) beschichtet (0,1%ige Lösung) (Tabelle 9). Hierfür wurde die Kavität der MEA-Chips mit der PEI-Lösung befüllt und 1 h bei RT inkubiert. Danach erfolgten drei Waschschritte mit autoklaviertem DI-H₂O und die Trocknung der Chips über Nacht. Am nächsten Tag, dem Tag der Zellaussaat, wurde morgens das Elektrodenfeld der MEA-Chips mit 125 μ l Laminin (Tabelle 6) beschichtet (20 μ g/ml Laminin) und für 1 h im Zellinkubator bei 37°C inkubiert. Direkt vor der Zellaussaat (125.000 Zellen pro MEA-Chip) wurde jeweils das Laminin von den MEA-Chips abgezogen, um ein Austrocknen der Proteine zu verhindern. Die kortikalen Rattenneurone wurden in einem Volumen von 125 μ l ausgesät und für 4 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nachfolgend wurde die Kavität vorsichtig mit Neurobasal Medium (Tabelle 6) gefüllt [Thermo Fisher Scientific Corporation, 2014].

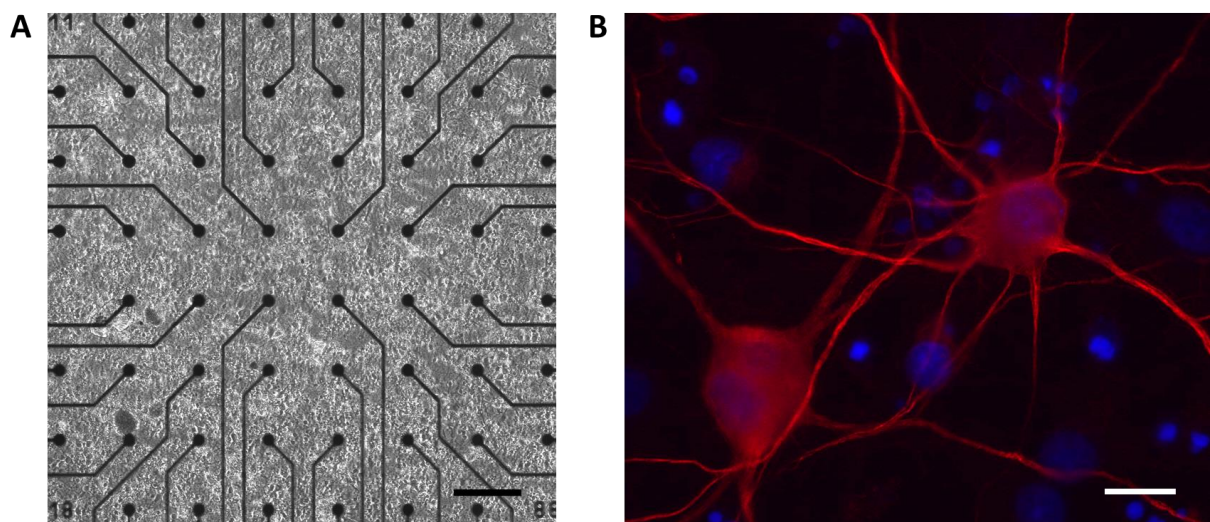


Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen kortikaler Rattenneurone. (A) Die kortikalen Rattenneurone wurden zur Ableitung der Aktionspotentiale auf dem Elektrodenfeld der MEA-Chips kultiviert. Die extrazellulären Ableitungen erfolgten an den 59 Elektroden. Der Elektrodendurchmesser beträgt 30 μ m und der Abstand zwischen den Elektroden beträgt 200 μ m. Die hier exemplarisch gezeigte Aufnahme stammt von einer Kultur an Tag 18 *in vitro* (days *in vitro*, DIV). Der Größenstandard beträgt 200 μ m. Die Abbildung stammt aus Köhler *et al.*, 2018. (B) Die Fluoreszenzaufnahme zeigt die vernetzten kortikalen Rattenneurone an DIV 16. Die MAP2-Antikörperfärbung verdeutlicht den Dendritenverlauf und das Perikaryon (rot). Durch die DAPI-Färbung wurden die Zellkerne markiert (blau). Der Größenstandard beträgt 20 μ m.

4.4. Aussaat und Kultivierung humaner Kardiomyozyten

Bei den Versuchen mit humanen Kardiomyozyten wurden kryokonservierte Zellen von Cellular Dynamics International (CDI) verwendet, die aus humanen induzierten pluripotenten Stammzellen (hiPSC) von CDI differenziert wurden (Tabelle 8). Der große Vorteil dieser Zellen im Vergleich zu embryonalen Stammzellen (ESC) ist, dass sie zu keinen ethischen Kontroversen führen und dass sie aus Patienten-eigenen somatischen Zellen erzeugt werden können und somit phänotypisch sind [Nishikawa *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2007].

Erstmals wurden hiPSC aus somatischen Fibroblasten von Shinya Yamanaka generiert, wofür er den Nobelpreis im Jahr 2012 erhielt [Takahashi *et al.*, 2007]. Dabei ist anzumerken, dass hiPSC aufgrund ihres somatischen Ursprungs einen anderen epigenetischen Hintergrund besitzen und ESCs nicht vollständig gleichen [Sullivan *et al.*, 2010].

Vor der Zellaussaat wurden die MEA-Chips gereinigt (Kapitel 4.2) und beschichtet. Dabei wurde 10 μ l einer Fibronectin-Lösung (Tabelle 9) zur Beschichtung auf die Elektrodenfelder der MEA-Chips pipettiert und die Chips in Petrischalen für 1 h bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank inkubiert (Tabelle 5). Um einem Eintrocknen der verwendeten Proteine vorzubeugen, wurde ein steriles Zellstofftuch mit autoklaviertem DI-H₂O mit in die Petrischale gelegt und erst direkt vor der Aussaat der Kardiomyozyten die Fibronectin-Lösung wieder abgezogen. Für die Aussaat wurde das Vial mit den kryokonservierten humanen Kardiomyozyten aus dem Stickstofftank geholt und für 3 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, anschließend aus dem Wasserbad genommen und mit 70%igem EtOH desinfiziert und nachfolgend in die Sterilbank überführt. Die Zellen wurden vorsichtig in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt, das Vial vorsichtig mit 1 ml vorgewärmtem Plating-Medium ausgespült und das Volumen tröpfchenweise (1 Tropfen alle 5 s) in das Reaktionsgefäß zu den Zellen gegeben. Während dieser Zugabe wurde das Reaktionsgefäß vorsichtig geschwenkt. Weitere 8 ml Plating-Medium wurden langsam tropfenweise hinzugegeben und das Reaktionsgefäß weiter vorsichtig geschwenkt und final 3-mal vorsichtig invertiert. Nachfolgend wurde die Zellzahl bestimmt und die Aussaatdichte auf 8.000.000 Zellen/ml eingestellt. 10 μ l der Zellsuspension (80.000 Zellen) wurden auf das Elektrodenfeld gegeben und für 1,5 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Abbildung 10). Nach der Inkubation wurde vorsichtig Maintenance-Medium in die Kavität zu den Zellen hinzugegeben. Der erste vollständige Medienwechsel erfolgte an Tag 3 *in vitro* (*days in vitro*, DIV), nachfolgend alle 2 Tage [Cellular Dynamics International, 2016].

Im Falle der extrazellulären Ableitungen bei den TETRA-Expositionsversuchen (Kapitel 4.6) erfolgte ein Medienwechsel 2 h vor der jeweiligen Versuchsdurchführung. Bei den photothermischen Stimulationsversuchen erfolgte der Wechsel des Zellmediums mindestens 3 h vor

den ersten extrazellulären Ableitungen. Dabei war zum Teil das Medium mit Gold-Nanostäbchen versetzt (Kapitel 4.7).

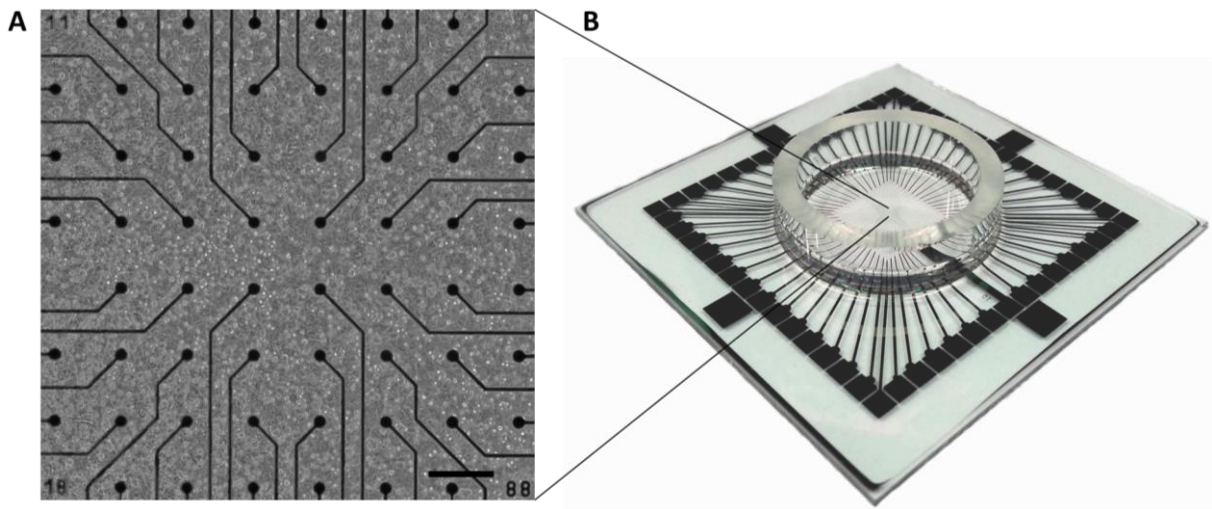


Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahme humaner Kardiomyozyten. (A) Die humanen Kardiomyozyten wurden zur extrazellulären Ableitung der Aktionspotentiale auf dem Elektrodenfeld der MEA-Chips kultiviert. Die Ableitungen erfolgten an den 59 Elektroden. Der Elektrodendurchmesser beträgt $30\ \mu\text{m}$ und der Abstand zwischen den Elektroden beträgt $200\ \mu\text{m}$. Die hier exemplarisch gezeigte Aufnahme stammt von einer Kultur an DIV 12. Der Größenstandard beträgt $200\ \mu\text{m}$. (B) Für alle elektrophysiologischen Experimente wurden MEA-Chip des Typs 60MEA200/30iR-TiN-Gr verwendet, wie hier exemplarisch gezeigt.

4.5. Elektrophysiologische Ableitungen

Für die Ableitung der extrazellulären Aktions-/Feldpotentiale der neuronalen und kardialen Zellkulturen wurde die nicht-invasive Methode der MEAs verwendet. Die Zellen wurden dabei auf MEA-Chips des Typs 60MEA200/30iR-TiN-Gr kultiviert (Tabelle 5). Zur Ableitung der Zellsignale wurde das MEA1060-System verwendet (Tabelle 4, Kapitel 3.1). Die Datenaufzeichnung erfolgte mit der Software LabView 13.0.1 (Tabelle 7) bei einer Sampling Rate von 8 kHz.

Bei den TETRA-Expositionsversuchen erfolgten die extrazellulären Ableitungen der neuronalen Netzwerke zwischen DIV 14 bis 34. Die extrazellulären Ableitungen der humanen Kardiomyozyten Netzwerke erfolgte für die TETRA-Expositionsversuche zwischen DIV 4 und DIV 20 (Kapitel 4.6). Bei den photothermischen Stimulationsversuchen erfolgte die extrazellulären Ableitungen zwischen DIV 4 und DIV 13 (Kapitel 4.7).

4.6. TETRA-Expositionsbedingungen

Das durch Oster *et al.* 2016 charakterisierte Expositionssetup ermöglicht eine homogene Exposition aller Proben [Oster *et al.*, 2016]. Die Signalgenerierung erfolgte mit einer mobilen TETRA-Basisstation (TETRA-TMO 2022-A) des industriellen Kooperationspartners, der KaiTec GmbH [KaiTec GmbH, 2018].

Die TETRA-Basisstation erzeugt eine Trägerfrequenz von 395 MHz mit spezifischen Absorptionsraten (SARs) von 1,17 W/kg, 2,21 W/kg und 2,66 W/kg (Kapitel 5.3.1). Die generierte Trägerfrequenz entspricht einer Wellenlänge (λ) von 75,89 cm, welche das Produkt der Division von Lichtgeschwindigkeit (c) und der Frequenz (f) ist (Gleichung 1).

$$\lambda = \frac{c}{f} = \frac{299.792.458 \text{ m/s}}{395.000.000 \text{ Hz}} = 0,758 \text{ m} \quad (\text{Gleichung 1})$$

Bei den neuronalen und kardialen TETRA-Expositionsversuchen und den Experimenten zur Bestimmung des maximalen Temperaturanstiegs während der TETRA-Exposition (5.3.2), erfolgte die Pulsung (17,64 MHz) und Modulation ($\pi/4$ DQPSK) der Trägerfrequenz für die drei Leistungslevel mit den SARs von 1,17 W/kg, 2,21 W/kg und 2,66 W/kg. In den Abbildungen angegeben mit: 395 MHz, der jeweiligen SAR: 17,64 Hz gepulst, $\pi/4$ DQPSK moduliert (n).

Bei den TETRA-Kurzzeit-Expositionsexperimenten erfolgte eine 15-minütige Exposition der Zellkulturen in der *Stripline*. Die Sham-Expositionen erfolgten an gleicher Position mit ausgeschalteter mobiler Basisstation. Die extrazellulären Ableitungen der Zellkulturen erfolgten dabei unmittelbar vor und nach der Exposition. Die Zellkulturen der mehrwöchigen TETRA-Langzeit-Expositionsexperimente wurden mit Beginn der Zellaussaat alle 2 Stunden für 15 Minuten befördert. Mit dem autonomen Einsetzen von Aktionspotentialen wurden für die nachfolgenden 18 Tage extrazelluläre Ableitungen der Zellkulturen durchgeführt. Die Sham-Exposition erfolgte in einem Faraday'schen Käfig im gleichen Zellinkubator, die Zellkulturen der Kontrolle wurden in einem separaten Zellinkubator unter gleichen Temperatur- und CO₂-Bedingungen kultiviert.

4.7. Bedingungen der photothermischen Stimulation

Die photothermischen Stimulationen der humanen Kardiomyozyten erfolgten durch alleinige NIR-Bestrahlung oder durch die kombinierte Behandlung mit Gold-Nanorods (Gold-Nanostäbchen, GNRs) und NIR. Die Zellenkulturen wurden dabei wie zuvor beschrieben auf MEA-Chip kultiviert (Kapitel 4.4). Vor der kombinierten Behandlung mit NIR/GNR wurde das gesamte Zellmedium abgezogen und die Kavität der MEA-Chips mit 1,5 ml GNR-angereichertem Zellmedium (GNR-Konzentration 10 $\mu\text{g/ml}$) aufgefüllt. Die photothermischen Stimulationen gepaart mit den extrazellulären Ableitungen der Kardiomyozyten erfolgten in einem Zeitfenster von 3 bis 9 Stunden nach der Behandlung mit GNRs, um ein ausreichendes Absetzen der GNRs auf den Plasmamembranen der Zellen sicherzustellen. Die mit der NIR-Laser-Diode (Tabelle 10) bestrahlte Fläche lag bei 14 mm² und wurde mit einer Wellenlänge von 829 nm exponiert und war auf das 1,96 mm² große Elektrodenfeld fokussiert, auf dem die

Kardiomyozyten im Zentrum der MEA-Chips kultiviert wurden (Abbildung 11). Die maximale Flächenleistungsdichte betrug $42,57 \text{ mW/mm}^2$ und wurde ungepulst angewendet. Die verwendeten GNRs der Firma Nanopartz (Tabelle 5) waren mit Aminogruppen-terminiertem Polyethylenglycol ($\text{NH}^2\text{-PEG}$) funktionalisiert und ermöglichten somit durch die kationische Ladungsdichte an ihrer Oberfläche eine gute Bindung an die Plasmamembran der Kardiomyozyten. Der Durchmesser der GNRs betrug 10 nm , die Länge lag bei 41 nm . Die für die Versuche genutzte maximale transversale Resonanzwellenlänge der GNRs lag bei 808 nm .

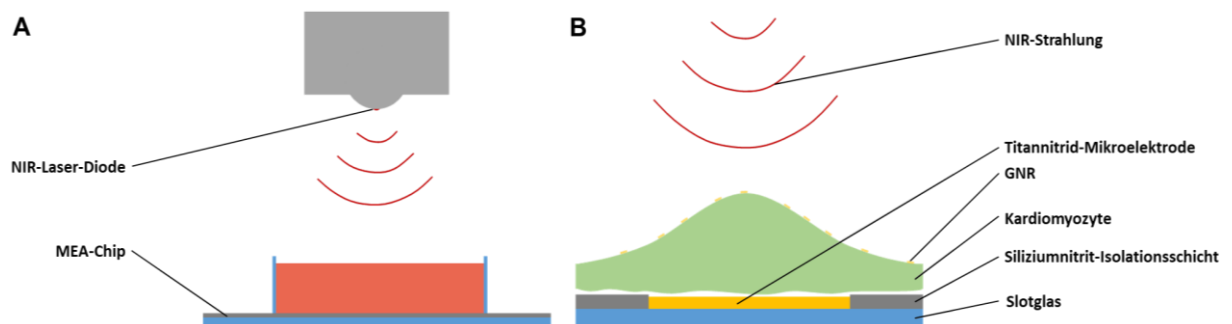


Abbildung 11: Schematische Darstellung des NIR-Bestrahlungssetups. (A) Die auf das Elektrodenfeld des MEA-Chips fokussierte Laser-Diode emittierte nahe Infrarotstrahlung mit einer Wellenlänge von 829 nm . Die dabei abgedeckte Fläche betrug 14 mm^2 , die des Elektrodenfelds $1,96 \text{ mm}^2$. (B) Die verwendeten GNRs waren mit Aminogruppen-terminiertem Polyethylenglycol ($\text{NH}^2\text{-PEG}$) funktionalisiert und wiesen so eine äußere kationische Ladungsverteilung auf. Ihr longitudinales Absorptionsmaxima lag bei 808 nm . Die Dimensionierung der GNRs lag bei 41 nm in der Länge und 10 nm in der Breite. Die verwendeten MEA-Chips bestanden aus transparenten Titanitrid-Mikroelektroden, die Isolationsschicht bestand aus Siliziumnitrit.

4.8. Datenanalyse

Die Analyse der neuronalen und kardialen Messdaten, welche aus den extrazellulären Ableitungen gewonnen wurden, erfolgte jeweils mit DrCell, einer auf Matlab basierenden Software [Nick *et al.*, 2013]. Im Falle einer Störkopplung (50 Hz Rauschen des Stromnetzes) während der Aufnahme von extrazellulären Ableitungen, war es nachfolgend unter Verwendung eines Hochpassfilters der Software möglich das Rauschen zu eliminieren.

Bei der Analyse von neuronalen Daten wurden Spikes und Bursts, sowie die Burstdauer durch in die Software implementierte Algorithmen detektiert [Baker *et al.*, 2006; Nick *et al.*, 2013]. Ein Burst ist demnach definiert als eine Abfolge von mindestens 3 Spikes mit einem maximalen Interspikeintervall von 100 ms . Um die Synchronität von neuronalen Zellnetzwerken quantifizieren zu können, wurde ein ebenfalls in DrCell implementierter Algorithmus verwendet. Hierbei wurden zunächst die Spike-Trains der einzelnen Elektroden transformiert, in dem die Spikezeitpunkte in ein Raster bestehend aus Zeitfenstern von 40 ms (bin size) eingeordnet und die Anzahl der Spikes pro Zeitfenster summiert wurden. Anschließend erfolgte die ebenfalls implementierte Berechnung der Kreuzkorrelationen zwischen allen Spike-Train-

Paaren, sowie die Berechnung des hiervon gebildeten Mittelwertes, welcher als finaler Synchronitätswert ausgegeben wurde [Jimbo *et al.*, 2000b]. Bei der Analyse der kardialen Daten bietet DrCell ebenso implementierte Algorithmen mit denen die Schlagrate und die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale über das Zellnetzwerk bestimmt wurden [Nick *et al.*, 2013].

4.9. Test auf Normalverteilung und statistische Signifikanz

Die zu analysierenden Daten wurden durch Anwendung des Shapiro-Wilk-Tests auf Normalverteilung überprüft. Der Shapiro-Wilk-Test ist gut geeignet für kleine Stichprobenanzahlen. Die Nullhypothese H_0 nimmt an, dass eine Normalverteilung der Daten vorliegt, wenn der Signifikanzwert $p > 0,05$ [Shapiro *et al.*, 1965].

Zur Überprüfung auf statistische Signifikanz wurde der studentische t-Test und die einfaktorielle Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) verwendet. Hierfür müssen die zu vergleichenden Daten normalverteilt vorliegen. Bei einem Vergleich von zwei Versuchsgruppen, erfolgte die Überprüfung mit dem Zweistichproben-t-Test. Der Vergleich innerhalb einer Versuchsgruppe erfolgte mit dem gepaarten-t-Test. Dabei wird jeweils untersucht, ob sich die Mittelwerte statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Der ANOVA-Test erlaubt hingegen den Vergleich der Mittelwerte mehrerer Versuchsgruppen mit einer geringeren Fehlerwahrscheinlichkeit im Vergleich zu einem mehrfach durchgeführten t-Test und wurde zur Überprüfung auf statistische Signifikanz bei Experimenten mit drei oder mehr Versuchsgruppen verwendet. Dabei identifiziert der ANOVA-Test ob generell ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen vorliegt, trifft dabei jedoch keine Aussage zwischen welchen Gruppen dies der Fall ist. Deshalb wurde zur genauen Bestimmung der statistischen Signifikanz der konservative Scheffé Post-hoc-Test verwendet, welcher auch für ungleiche Stichprobenumfänge geeignet ist. In den Abbildungen sind die Signifikanzniveaus wie nachfolgend beschrieben gekennzeichnet: $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ sehr signifikant; $p \leq 0,001$ hoch signifikant.

4.10. Numerische Simulation

Die numerischen Simulationen der SARs, erfolgten auf der Grundlage des Modells von M. Eng. Stefan Oster, Dr. Michael Goldhammer und M. Eng. Christian Erbes unter Verwendung der Software zur Simulation physikalischer Vorgänge Comsol Multiphysics (Tabelle 7). Das numerische Äquivalent des realen Expositionssetups mit Inkubator und *Stripline* (Streifenleitung) ist im Modell geometrisch nachgebildet. Die metallischen Strukturen des Expositionssetups waren dabei als perfekte elektrische Leiter ausgewiesen und der

Wellenwiderstand der homogenen Hochfrequenzleitung auf 50Ω determiniert. Unter Verwendung der Finite-Elemente-Methode (FEM) wurden die SARs unter Anpassung der Frequenz und Spannung bestimmt. Die Simulation wurde mit 600.000 Gitter-Elementen realisiert, was einem Freiheitsgrad von 4 Millionen entsprach [Erbes, 2011; Goldhammer, 2009; Oster, 2014; Oster *et al.*, 2016].

5. TETRA-Bestrahlung von *in vitro* Netzwerken aus kortikalen Rattenneuronen und humanen Kardiomyozyten

5.1. Motivation und Zielsetzung

Seit der weltweit voranschreitenden Digitalisierung, wächst die globale Infrastruktur von mobilen Kommunikationssystemen und die Anzahl der verwendeten Endgeräte in einem rasanten Tempo. Der Datentransfer von mobilen Endgeräten steigt dabei stetig, was unwillkürlich mit einer zunehmenden elektromagnetischen Exposition von Mensch und Umwelt verknüpft ist [Cisco Systems Inc., 2017; International Telecommunication Union, 2016; Lin, 2016; Rennhoff *et al.*, 2016; Valentini *et al.*, 2007].

Die Diskussion über mögliche gesundheitliche Auswirkungen der elektromagnetischen Exposition von Mobilfunk auf den Menschen und seine Umwelt hat dabei seit Dekaden eine hohe Relevanz und ist nach wie vor noch nicht abschließend geklärt [Ahlbom *et al.*, 2003; Apollonio *et al.*, 2013; Frey, 1961].

Dies gilt auch für den europaweit implementierten digitalen Bündelfunkdienst für Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben *Terrestrial Trunked Radio* (TETRA). Durch den neuen Frequenzbereich und die niederfrequente Signalpulsung, gab es Bedenken über mögliche Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit seitens der Bevölkerung und den beruflichen Nutzergruppen. Die Anzahl von Berichten über mögliche nachteilige Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit stieg mit der schrittweisen Errichtung der TETRA-Netzinfrastruktur und der zunehmenden Verwendung der mobilen TETRA-Endgeräte [Wallace *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2012].

Die bisher veröffentlichten Publikationen zu möglichen gesundheitlichen Auswirkungen durch TETRA sind in ihrer Gesamtheit stark widersprüchlich und nicht konsistent. Dies macht weitere Untersuchungen zu einer spannenden und notwendigen Aufgabe. Die große Mehrheit der bisher durchgeführten Studien erfolgte direkt am Menschen, was die Gefahr einer Einflussnahme durch äußerliche Faktoren birgt. Hierbei sind unter anderem unterschiedliche Erwartungshaltungen der Probanden und psychologische Effekte wie z.B. der Placebo-Effekt zu nennen [Di Blasi *et al.*, 2001; Finniss *et al.*, 2010; Price *et al.*, 2008].

Durch *in vitro* Versuche würden sich die Versuchsbedingungen besser kontrollieren lassen, weshalb sie im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet wurden, um die Auswirkungen von TETRA-Strahlung auf die electrophysiologischen Eigenschaften neuronaler und kardialer Zellnetzwerke zu untersuchen. Dies soll darüber hinaus dazu beitragen den generellen Einfluss von nicht-ionisierenden elektromagnetischen Feldern auf neuronale und kardiale Systeme weiter zu klären.

5.2. Einleitung

5.2.1. Der digitale Bündelfunkstandard Terrestrial Trunked Radio

Der digitale Bündelfunk Standard TETRA wurde 1995 vom Europäischen Institut für Telekommunikationsnormen (ETSI) standardisiert und ist seit seiner Einführung am 20. Juni 2007 der digitale Funkstandard in Deutschland. Bezeichnet wird er als Digitalfunk der Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben (BOS). Seine Nutzer sind z.B. die Bundes- und Landespolizei, die Feuerwehren, die Rettungsdienste, die Katastrophen- und Zivilschutzbehörden des Bundes und der Länder und das Technische Hilfswerk. Der TETRA-Standard dient dabei als universelles Sprach- und Datenfunksystem, welches die Kommunikation all seiner Nutzer bundesweit vereint und vereinheitlicht. Der wesentliche Unterschied im Vergleich zu kommerziellen Mobilfunkstandards ist die Verschlüsselung der Kommunikation und die Möglichkeit der Gruppenkommunikation. Dabei werden Funkprüche an alle Mitglieder einer definierten Gruppe gesendet. Dies erleichtert vor allem die Kommunikation bei komplexen Einsatzszenarien, wenn zum Beispiel verschiedene BOS Nutzergruppen, wie Polizei, Feuerwehr und der Rettungsdienst beteiligt sind [Bundesanstalt für den Digitalfunk der Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben, 2008; Bundesanstalt für den Digitalfunk der Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben, 2018b].

Bundesweit sind bisher 4.590 Basisstationen errichtet worden, die eine Netzabdeckung von 99% des Bundesgebietes gewährleisten; dabei sind 770.000 Teilnehmer registriert (Stand Januar 2018) [Bundesanstalt für den Digitalfunk der Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben, 2018a].

TETRA bietet generell die Möglichkeit zweier verschiedener Betriebsarten. Die Kommunikation über die bundesweite Netzarchitektur bezeichnet als Trunked Mode Operation (TMO) und die Kommunikation direkt von mobilem Endgerät zu mobilem Endgerät, bezeichnet als Direct Mode Operation (DMO). Die DMO-Kommunikation erfolgt vor allem dann, wenn im Innen- oder Außeneinsatz keine Verbindung zur Netzarchitektur besteht. Der Frequenzbereich für die TMO-Kommunikation (Abbildung 12) liegt für den Uplink, also für die Sprach- und Datenübermittlung der Endgeräte zu den Basisstationen bei 380 bis 385 MHz, und für den Downlink bei 390 bis 395 MHz, bei dem die Sprach- und Datenübermittlung von den Basisstationen zu den Endgeräten stattfindet. Dabei erfolgt eine $\pi/4$ DQPSK-Modulation (*Differential Quaternary Phase-Shift Keying*) und Pulsung des Signals durch das Zeitmultiplexverfahren (Time-Division-Multiple Access, TDMA), bei dem 4 Zeitschlitze mit einer Dauer von 14,74 ms zur Verfügung stehen, die in einem TDMA-Rahmen von 56,67 ms zusammengefasst werden. Wird ein Zeitschlitz durch einen Nutzer belegt und die 3 anderen bleiben frei,

TETRA-TMO

Downlink 390-395 MHz
Uplink 380-385 MHz

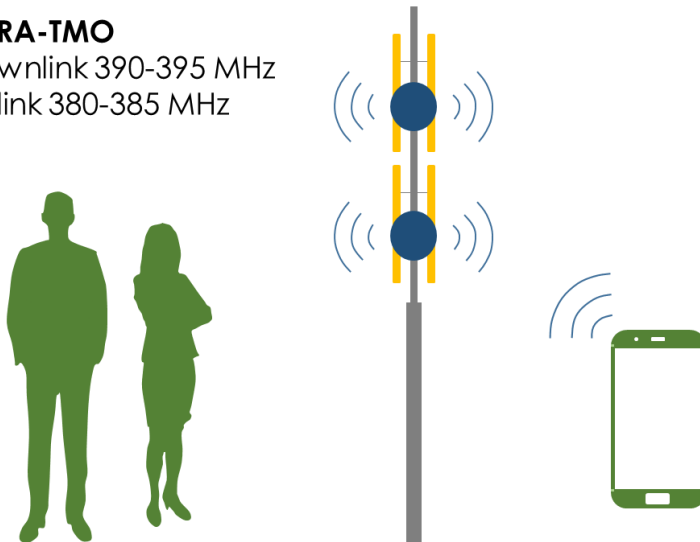


Abbildung 12: TETRA-TMO-Frequenzen. In Deutschland liegt der Frequenzbereich für den Digitalfunk für Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben (BOS) der über die TETRA-Netzinfrastruktur erfolgt für den Downlink bei 390 bis 395 MHz, was dem Datentransfer von Basisstationen zu mobilen Endgeräten entspricht. Der Frequenzbereich des Uplinks liegt bei 380 bis 385 MHz, was dem Datentransfer von den mobilen Endgeräten zur den Basisstationen dient.

kommt es zu einer niederfrequenten Pulsung des Signals mit 17,64 Hz (1000 ms / 56,67 ms) (Abbildung 13) [Bundesanstalt für den Digitalfunk der Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben, 2018b; European Telecommunications Standards Institute, 2002; European Telecommunications Standards Institute, 2005; European Telecommunications Standards Institute, 2006; Stavroulakis, 2007].

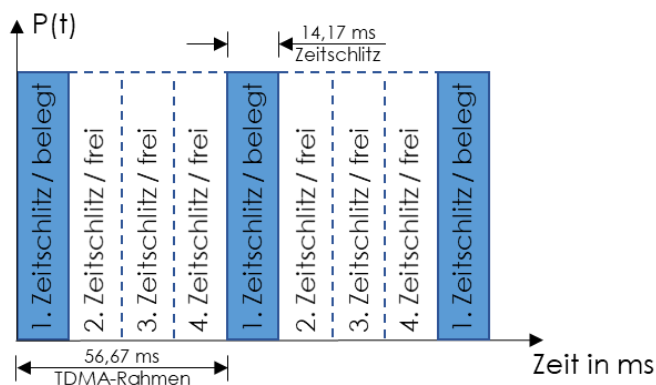


Abbildung 13: TETRA-Zeitmultiplexverfahren. Durch das Zeitmultiplexverfahren (*Time-Division-Multiple Access*, TDMA) von TETRA stehen 4 Zeitschlitze mit einer Dauer von jeweils 14,17 ms pro TDMA-Rahmen (56,67 ms) zur Verfügung. Kommt es zu einer Belegung des 1. Zeitschlitzes und die 3 nachfolgenden bleiben unbelegt, kommt es zu einer Pulsfrequenz von 17,64 Hz [Stavroulakis, 2007]. Modifizierte Abbildung nach Köhler *et al.*, 2018.

Insgesamt 16 europäische Staaten (Belgien, Dänemark, Estland, Finnland, Großbritannien, Ungarn, Island, Litauen, die Niederlande, Portugal, Schweden, Irland, Bulgarien, Montenegro, Norwegen und Deutschland) verfügen über ein Digitalfunknetz basierend auf dem TETRA-

Standard. Weitere europäische Staaten bauen landesweite TETRA-Netze auf [Bundesanstalt für den Digitalfunk der Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben, 2018b].

5.2.2. Beschriebene biologische Effekte des Mobilfunks am Beispiel von TETRA

Mit der Erfindung der Funktelegraphie, wofür beide 1909 den Nobelpreis für Physik erhielten, lieferten die beiden Europäer Karl Ferdinand Braun und Guglielmo Marconi den Startschuss für den heutigen Mobilfunk [Braun, 1909; Marconi, 1922].

Parallel zur rasant voranschreitenden Digitalisierung steigt auch seit Jahrzehnten die elektromagnetische Exposition von Mensch und Umwelt durch den digitalen Mobilfunk [Cisco Systems Inc., 2017; International Telecommunication Union, 2016; Lin, 2016; Rennhoff *et al.*, 2016; Valentini *et al.*, 2007].

Dabei ist unbestritten, dass die elektromagnetische Exposition im Wellenlängenbereich des Mobilfunks zum nicht-ionisierenden Teil des elektromagnetischen Spektrums gehört. Es kommt somit zu keiner direkten Schädigung der DNA und auch zu keiner indirekten Schädigung der DNA durch freie Radikale, da die Quantenenergie in diesem Wellenlängenbereich nicht groß genug ist, um Elektronen von Atomen oder Molekülen auszuschlagen [Sheppard *et al.*, 2008]. Die möglicherweise einzige Interaktion zwischen nicht-ionisierenden elektromagnetischen Feldern (EMF) und biologischen Zellen und Geweben basiert auf dem Mechanismus der dielektrischen Erwärmung und wird als thermischer Effekt deklariert. Bei diesem wissenschaftlich gesicherten Effekt kommt es, unter Einwirkung von Strahlung wie sie im Mobilfunk benutzt wird, zu einer Temperaturerhöhung in Zellen und Gewebe [Apollonio *et al.*, 2013; Independent Advisory Group on Non-ionising Radiation, 2012; International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 1998; Sheppard *et al.*, 2008].

Das mögliche Auftreten von nicht-thermischen Effekten wird hingegen kontrovers diskutiert. Zu den nicht-thermischen Effekten auf Zellen und Gewebe in Folge einer Mobilfunk Exposition werden alle diejenigen Effekte gezählt, die nicht auf thermische Effekte zurück zu führen sind. Bislang ist jedoch kein Mechanismus bekannt der diese Effekte, die in der Literatur beschrieben sind, mit Sicherheit erklärt [Apollonio *et al.*, 2013; Juutilainen *et al.*, 2011; Manna *et al.*, 2016; Sheppard *et al.*, 2008; Simko *et al.*, 2016; Valentini *et al.*, 2007].

Dennoch wurden durch die *International Agency for Research on Cancer* der Weltgesundheitsorganisation (WHO), elektromagnetische Felder im Bereich der Mobilfunkfrequenzen als möglicherweise krebserzeugend für den Menschen beurteilt (*Group 2B, Possibly carcinogenic to humans*) [Baan *et al.*, 2011; International Agency for Research on Cancer - World Health Organization, 2013].

Bei der Einführung eines neuen Frequenzbereichs mit einer niederfrequenten Signalpulsung im

Rahmen des europaweit implementierten digitalen Bündelfunkdienstes für Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben TETRA, gab es massive Bedenken über eine mögliche Auswirkungen von TETRA auf die menschliche Gesundheit seitens der Bevölkerung und den beruflichen Nutzergruppen. Die Anzahl von Berichten über mögliche nachteilige Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit stieg mit der schrittweisen Errichtung der TETRA-Netzinfrastruktur und der zunehmenden Verwendung der mobilen TETRA-Endgeräte [Wallace *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2012]. Schon in früheren Studien wurde berichtet, dass gepulste Signale im Bereich von 16 Hz den Ca^{2+} -Ionen-Efflux in neuronalen Zellen beeinflusst [Bawin *et al.*, 1976; Blackman *et al.*, 1980]. Nachfolgende Veröffentlichungen konnten die Effekte nicht bestätigen [Merritt *et al.*, 1982; Shelton *et al.*, 1981]. Die erzielten Ergebnisse dieser Publikationen wurden kontrovers diskutiert und gaben weiter Anlass zur Sorge, da TETRA mit einer vergleichbaren Pulsfrequenz von 17,64 Hz arbeitet [Blackwell *et al.*, 1986; Myers *et al.*, 1981; National Radiological Protection Board, 2001]. Es erfolgten weitere Untersuchungen, die den Einfluss der TETRA-spezifischen Exposition auf den Calcium-Efflux bei Ratten-Kardiomyozyten und -Neuronen erforschten. Auch in diesen Studien konnten keine Wirkungen beobachtet werden [Green *et al.*, 2005]. Nachfolgende Studien untersuchten ebenfalls den möglichen Einfluss einer TETRA-Exposition auf den Menschen und seine Gesundheit. In diesem Rahmen konnte gezeigt werden, dass es keine Hinweise für Kurzzeiteffekte von mobilen TETRA-Endgeräten auf die kognitive Leistung und das Wohlbefinden bei Menschen gibt und dass die TETRA-Exposition ebenso keinen Effekt auf die langsam veränderlichen kortikalen Potentialschwankungen (*slow cortical potentials*) hat [Eggert *et al.*, 2015; Sauter *et al.*, 2015]. Weiter konnte festgestellt werden, dass TETRA-Mobiltelefone die Herzfrequenz und den Blutdruck nicht beeinflussen und dass eine TETRA-Kurzzeit-Exposition durch mobile Endgeräte die Gehirnleistung des Menschen nicht beeinflusst. Es wurde auch kein Beleg für subjektive Symptome durch die Exposition gefunden [Barker *et al.*, 2007; Riddervold *et al.*, 2010]. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass TETRA-Basisstationssignale keine Wirkung auf die Herzfrequenz, den Blutdruck, die kognitive Leistung und die Hautleitfähigkeit von elektrosensiblen Personen und Kontrollteilnehmern zweier Studien hatte [Wallace *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2012].

Auch eine erst kürzlich veröffentlichte epidemiologische Studie an britischen Polizeibeamten fand keinen Beleg, dass die Verwendung von TETRA mit einem Krebsrisiko verbunden ist [Gao *et al.*, 2018].

Gegensätzlich hierzu wurde jedoch auch festgestellt, dass es zu einer Zunahme von Kopfschmerzen bei Versuchsteilnehmern kam, die einer TETRA ähnlichen Strahlung ausgesetzt waren, bei der eine ungepulste Befeldung nur mit der Trägerfrequenz erfolgte. Wurde die

Trägerfrequenz zusätzlich mit 16 Hz gepulst, konnte paradoxerweise kein Effekt beobachtet werden [Nieto-Hernandez *et al.*, 2011].

Bei Elektrokardiogramm (EKG) und Elektroenzephalogramm (EEG) Untersuchungen an britischen Polizeibeamten wurde festgestellt, dass Signale von mobilen TETRA-Endgeräten die Herzfrequenz und neurophysiologische Parameter der Beamten beeinflusst hat [Burgess *et al.*, 2016]. In diesem Zusammenhang ist jedoch anzumerken, dass die TETRA-Exposition möglicherweise zu Artefakten in EEG-Signalen führen kann [Fouquet *et al.*, 2013].

Aus dem bisher dargelegten geht hervor, dass die beschriebenen Studien in ihrer Gesamtheit widersprüchliche Resultate aufweisen und nicht konsistent sind, was hierzu weitere Untersuchungen erforderlich machte.

5.2.3. Expositionsgrenzwerte für den Mobilfunk

Für die elektromagnetische Exposition im Bereich der Mobilfunkfrequenzen gibt es keinen global gültigen Grenzwert, aber Grenzwertempfehlungen in Form einer Richtlinie der Internationalen Kommission für den Schutz vor nicht-ionisierender Strahlung (*International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection*, ICNIRP) aus dem Jahr 1998 [International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 1998].

Als Maß für die Absorption der elektromagnetischen Strahlung dient dabei die SAR, welche in Watt (W) pro Masse in Kilogramm (kg) angegeben wird. Die ICNIRP verwendet die SAR um eine Unterteilung in Grenzwerte vorzunehmen. Dabei wird unterschieden in beruflich exponierte Personen und in die Gruppe der Allgemeinbevölkerung. Eine weitere Unterteilung erfolgt in Ganzkörper-Befeldung bzw. Teilkörper-Befeldung von Kopf/Rumpf und Gliedmaßen (Tabelle 11). Die Grenzwerte für die Exposition der allgemeinen Bevölkerung sind mit einem Faktor von 5 wesentlich niedriger als für die beruflichen Personengruppen [International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 1998].

Tabelle 11: Grenzwerte für den Frequenzbereich von 10 MHz – 10 GHz. Die Grenzwerte der Internationalen Kommission für den Schutz vor nicht-ionisierender Strahlung (*International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection*, ICNIRP) werden zunächst in eine berufsbedingte Expositionsgruppe und in eine Expositionsgruppe der Bevölkerung unterteilt. Nachfolgend wird unterschieden in Ganzkörper, Kopf/Rumpf und Gliedmaßen Exposition. Die Grenzwerte für die berufliche Exposition sind im Vergleich zu den Grenzwerten für die Exposition der Bevölkerung weniger strikt [International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 1998].

Grenzwert	Ganzkörper	Kopf/Rumpf	Gliedmaßen
Beruflich	0,4 W/kg	10 W/kg	20 W/kg
Bevölkerung	0,08 W/kg	2 W/kg	4 W/kg

Die Empfehlungen der ICNIRP wurden zum Teil in nationale Empfehlungen oder rechtsverbindliche Regelungen übertragen. So hat die Europäische Union (EU) in der Richtlinie 2013/35/EU des Europäischen Parlaments und des Europäischen Rates generelle Expositionsgrenzwerte für die Bevölkerung festgelegt, die auf den Grenzwertempfehlungen der ICNIRP für die berufliche Exposition beruhen [The European Parliament and of the Council, 2013]. Die Grenzwerte in Deutschland haben sich an den Grenzwertempfehlungen der ICNIRP orientiert [Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz, 2013; International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 1998].

5.2.4. Inkubator-basierter offener TEM-Wellenleiter

Eine Streifenleitung (*Stripline*) – welche in den TETRA-Experimenten zur Bestrahlung der Zellen verwendet wurde – ist ein offener Wellenleiter für transversale elektromagnetische Wellen. Sie besteht aus Septum und einer Masseplatte, zwischen denen sich die TEM-Wellen ausbreiten. Dabei umläuft das magnetische Feld (H) das Septum und das elektrische Feld (E) erstreckt sich vom Septum zur Massenplatte (Abbildung 14) [Gustrau, 2013].

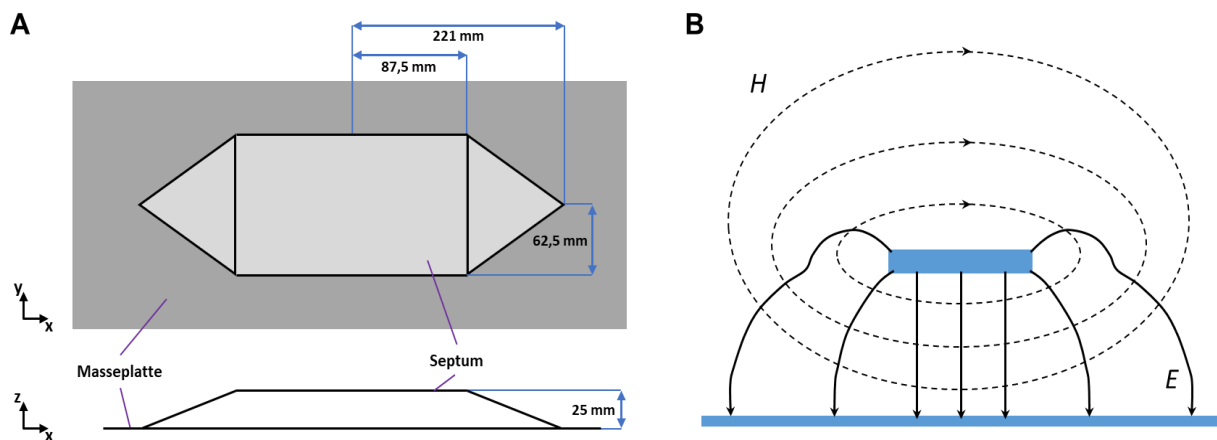


Abbildung 14: Schematisch dargestellte Feldverteilung und Streifenleitungsgeometrie. (A) Die Abbildung zeigt die geometrische Form und Dimension der verwendeten Streifenleitung. (B) Die gezeigte Feldverteilung in der Querschnittsebene der Streifenleitung zeigt, dass das magnetische Feld (H) das Septum umläuft und sich das elektrische Feld (E) im Dielektrikum vom Septum zur Massenplatte erstreckt. Modifizierte Abbildungen nach (A) Oster *et al.*, 2016, (B) Gustrau, 2013.

Die Verwendung einer *Stripline* zur Exposition von Zellkulturen hat den großen Vorteil, dass alle verwendeten Zellkulturen homogen bestrahlt und somit die Versuchsbedingungen gleich gehalten werden. Für die TETRA-Expositions-Experimente mit Zellkulturen wurde die Streifenleitung zentral in einem CO₂-Inkubator für Zellkulturen installiert. Der Abstand von Septum und Masseplatte betrug 25 mm (Abbildung 14A). Die charakteristische Impedanz der

Streifenleitung wurde mittels Höhen- und Breite-Verhältnis auf 50Ω determiniert [Erbes, 2011; Goldhammer, 2009; Oster, 2014; Oster *et al.*, 2016]. Um Interferenzen durch Reflexionen zu vermeiden wurde ein Abschlusswiderstand von ebenfalls 50Ω verwendet [Gustrau, 2013; Oster *et al.*, 2016].

5.2.5. Dielektrische Erwärmung

Durch Radiowellen wie sie im Mobilfunk verwendet werden kommt es zur Erwärmung von Zellen, Gewebe und Organismen. Polare Moleküle wie z.B. Wasser-Moleküle richten sich dabei am elektromagnetischen Feld aus, wobei sie oszillieren (Abbildung 15). Durch die molekulare Reibung kommt es zu einem Wärmeeintrag. Dabei gilt, je höher die Frequenz, desto größer ist der hervorgerufene Wärmeeintrag durch die gesteigerte Oszillation der Moleküle. Dies gilt jedoch nur bis zu einem gewissen Punkt, denn wenn die Frequenz zu hoch ist, können die polaren Moleküle aufgrund ihrer Trägheit den Feldwechseln nicht mehr folgen und es findet kein Wärmeeintrag mehr statt [Apollonio *et al.*, 2013; Independent Advisory Group on Non-ionising Radiation, 2012; International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 1998; Persch, 1997; Pfeifer, 2007; Sheppard *et al.*, 2008].

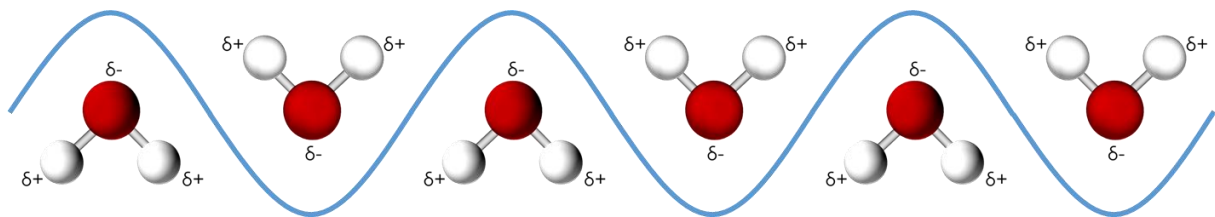


Abbildung 15: Dielektrische Erwärmung durch Radiowellen. Polare Moleküle wie Wasser (H_2O) können durch Radiowellen wie sie im Mobilfunk eingesetzt werden zur Oszillation angeregt werden. Dabei entsteht molekulare Reibung und es kommt zu einem Wärmeeintrag in Zellen oder Gewebe [Apollonio *et al.*, 2013; Independent Advisory Group on Non-ionising Radiation, 2012; International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 1998; Persch, 1997; Pfeifer, 2007; Sheppard *et al.*, 2008].

5.3. Ergebnisse zur TETRA-Bestrahlung von neuronalen und kardialen *in vitro* Netzwerken

5.3.1. Bestimmung der spezifischen Absorptionsraten für Zellversuche

Die SAR wird im Bereich der nicht ionisierenden elektromagnetischen Strahlung als Referenz-Maßeinheit verwendet. Um die SAR für die drei verwendeten Expositionslevel der mobilen TETRA-Basisstation verifizieren zu können, wurden zunächst numerische Simulationen durchgeführt und nachfolgend anhand des Temperaturanstiegs während den Befeldungen, die SARs bestimmt.

Um die numerischen Simulationen durchführen zu können, war es zuvor notwendig die Leistungspegel für die drei Expositionslevel zu bestimmen. Der Leistungspegel gibt in der

Elektrotechnik die Leistung in der logarithmischen Einheit Dezibel Milliwatt (dBm) an. Hierfür wurde so wie bei den Zellversuchen die mobile Basisstation über ein geschirmtes Koaxialkabel zur Einspeisung des Signals mit der Streifenleitung verbunden.

Durch den nachfolgend an die Streifenleitung angeschlossenen Spektrumanalysator wurden die Leistungspegel der 3 Leistungslevel der mobilen Basisstation bestimmt. In aufsteigender Reihenfolge ergaben sich dabei folgende Werte: 39,24 dBm (Abbildung 16A), 42,23 dBm (Abbildung 16B) und 43,03 dBm (Abbildung 16C).

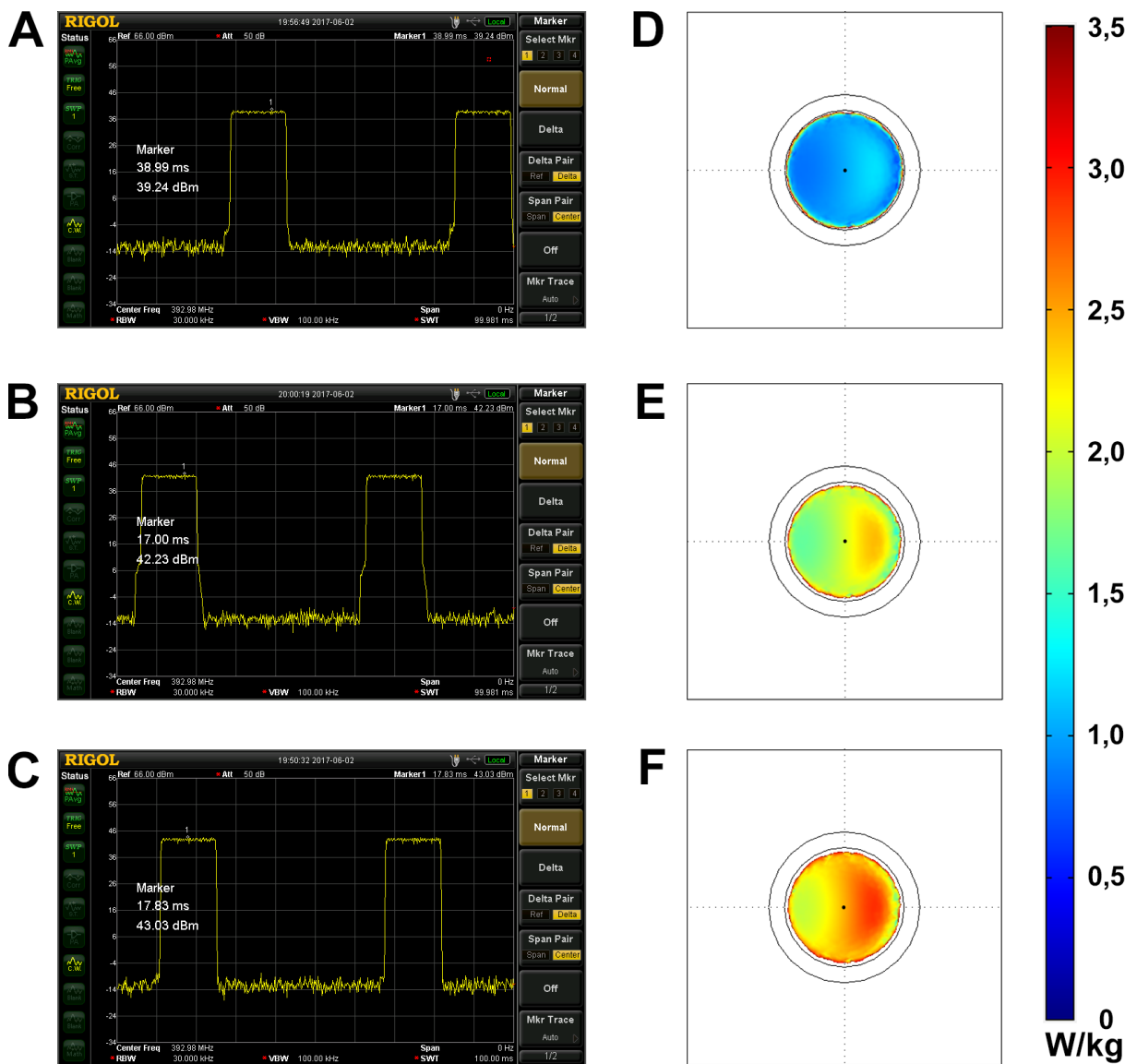


Abbildung 16: Bestimmung des Leistungspegels und numerische Simulation der spezifischen Absorptionsrate. Zur numerischen Bestimmung der SARs (D,E,F) der drei Expositionselevel, wurden zuvor die notwendigen Leistungspegel mittels Spektrumanalysators gemessen (A,B,C). Die Leistungspegel der drei Expositionselevel betragen 39,24 dBm (A), 42,23 dBm (B) und 43,03 dBm (C). Die aus den numerischen Simulationen resultierenden SARs im Zentrum des Mikroelektroden-Array-Chips wurden 1 μm über dem Chipboden auf Zellohne bestimmt und betragen 1,01 W/kg (D), 2,05 W/kg (E) und 2,46 W/kg (F). Die Position, an der die SAR bestimmt wurde ist mit einem schwarzen Kreis im Zentrum des MEA-Chips markiert.

Aus den 3 Leistungspegeln ergibt sich die daraus resultierende Leistung (Gleichung 2) und die angelegte Spannung (Gleichung 3) (Tabelle 12), anhand der die numerische Simulationen zur Bestimmung der SARs durchgeführt wurden.

$$P(mW) = 10^{\frac{L_p(dBm)}{10}} \times 1 mW \quad \text{(Gleichung 2)}$$

$$U = \sqrt{P \times R} \quad \text{(Gleichung 3)}$$

Die Leistung in Milliwatt, ergibt sich als Zehnerpotenz zum Exponenten eines Zehntels des Leistungspegels (L_p) in Dezibel Milliwatt (Gleichung 2). Die Spannung (V) ist das Produkt der Wurzel aus der Leistung (P) und dem Widerstand (R) (Gleichung 3).

Tabelle 12: Bestimmung der spezifischen Absorptionsraten durch numerische Simulationen. Die Leistungspegel der elektromagnetischen Exposition wurden mit dem Spektrumanalysator Rigol DSA815 der Firma Batronix bestimmt.

Gemessener Leistungspegel	Berechnete Leistung	Berechnete Spannung	Spezifische Absorptionsrate
39,24 dBm	8.394,60 mW	20,48 V	1,01 W/kg
42,23 dBm	16.710,91 mW	28,91 V	2,05 W/kg
43,03 dBm	20.090,93 mW	31,69 V	2,46 W/kg

Die numerischen Simulationen der SARs der drei Leistungslevel erfolgten auf Basis des Modells von Dr. Michael Goldhammer, M. Eng. Stefan Oster und M. Eng. Christian Erbes unter Verwendung der Software *Comsol Multiphysics* (Tabelle 7). Dabei ist das numerische Äquivalent des Expositionsetups mit Inkubator und *Stripline* im Modell nachgebildet. Durch Verwendung der Finite-Elemente-Methode (FEM) wurden die SARs anhand der Frequenz von 395 MHz und den verwendeten Spannungen von 20,48 V, 28,91 V und 31,69 V (Tabelle 12) bestimmt. Die Simulation wurde mit 600.000 Gitter-Elementen realisiert, was einem Freiheitsgrad von 4 Millionen entspricht [Erbes, 2011; Goldhammer, 2009; Oster, 2014; Oster *et al.*, 2016].

Die daraus resultierenden SARs, wurden auf einer Zellhöhe von 1 μm im Zentrum des MEA-Chips bestimmt und betragen 1,01 W/kg (Abbildung 16D), 2,05 W/kg (Abbildung 16E) und 2,46 W/kg (Abbildung 16F) (Tabelle 12).

Zur genauen Bestimmung der SARs wurden nach den numerischen Simulationen Temperaturmessungen durchgeführt (Abbildung 17). Die Berechnung der SARs für die drei Leistungslevel erfolgte unter Verwendung von Gleichung 4. Dabei ist die SAR das Produkt der

spezifischen Wärmekapazität (c_i) des Zellmediums ($c_i = 4186 \text{ J/kg K}$) und der Ableitung der Temperatur des Zellmediums auf Elektrodenhöhe nach der Zeit [Kühn *et al.*, 2006; Merla *et al.*, 2011; Oster *et al.*, 2016].

$$SAR = c_i \times \frac{\Delta T}{\Delta t} \quad (\text{Gleichung 4})$$

Anhand der Steigung – Ableitung der Temperatur nach der Zeit – wurden die SARs bestimmt. Da die Steigung zu Beginn jeder Exposition ihr Maximum hat und nachfolgend abnimmt, wurde für jedes Leistungslevel die Steigung innerhalb der ersten zwei Minuten der Exposition anhand eines linearen Fits bestimmt (Abbildung 17). Die Steigungen der drei Expositionslevel beträgt bei 39,24 dBm 0,00028032, bei 42,23 dBm 0,00052837 und bei 43,03 dBm 0,00063601. Daraus ergaben sich SARs für die drei Leistungslevel von 1,17 W/kg, 2,21 W/kg und 2,66 W/kg (Tabelle 13).

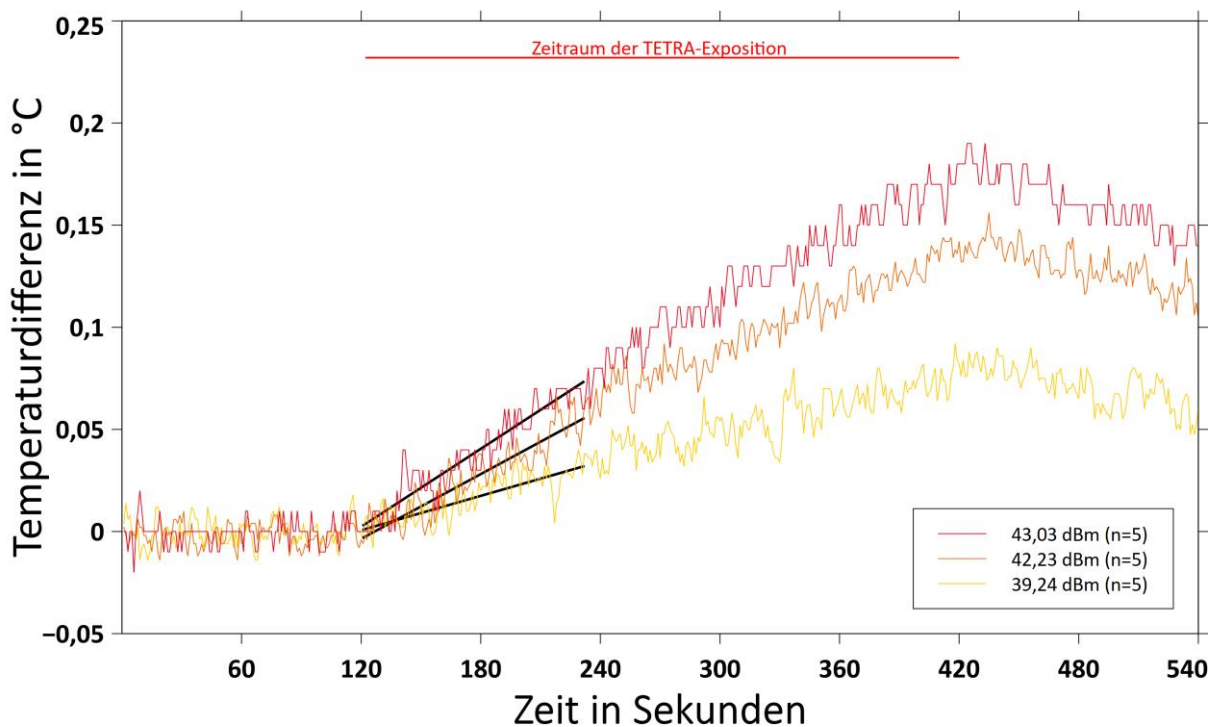


Abbildung 17: Temperaturmessung zur Bestimmung der spezifischen Absorptionsraten der TETRA-Exposition. Nach einer Vorlaufzeit von 120 s erfolgte jeweils die TETRA-Exposition der drei Leistungslevel über einen Zeitraum von 300 s, gefolgt von einem Nachlauf ohne Exposition von 120 s. Zur späteren Bestimmung der SARs, erfolgte jeweils ein linearer Fit der ersten zwei Minuten der verschiedenen Expositionslevel, die aus den gemessenen Leistungspegeln 39,24 dBm, 42,23 dBm und 43,03 dBm hervorgingen. Aus den daraus resultierenden Steigungen, erfolgte die Quantifizierung der verschiedenen SARs unter Verwendung von Gleichung 4. Die jeweiligen Steigungen betragen 0,00028 bei 39,24 dBm, 0,00052 bei 42,23 dBm und 0,00063 bei 43,03 dBm. Die Mittelwerte der drei Leistungslevel wurden aus der Anzahl der jeweils durchgeführten Temperaturmessungen gebildet. Zuvor wurden die einzelnen Messdaten durch Anwendung der Methode des gleitenden Mittelwertes geglättet. Dabei erfolgte die Bildung des arithmetischen Mittelwertes durch die Auswahl der einzelnen Datenpunkte und ihrer direkt benachbarten Datenpunkte, in der Summe jeweils 3 Datenpunkte. Die Abtastrate lag bei 1 Hz. Die Temperaturveränderung wurde unter Verwendung des Temperatursensors OTG-F-10-62ST-1.5PTFE-XN-25PI-L unmittelbar über dem Elektrodenfeld gemessen.

Tabelle 13: Berechnung der spezifischen Absorptionsrate anhand des Temperaturanstiegs während der TETRA-Exposition. Das Produkt der spezifischen Wärmekapazität des Zellmediums ($c_i = 4186 \text{ J/kg K}$) und die Ableitung der Temperatur über 2 Minuten (Steigung) ergibt die SAR des jeweiligen Leistungspegels.

Gemessener Leistungspegel	Steigung (Ableitung der Temperatur nach der Zeit)	Spezifische Absorptionsrate
39,24 dBm	0,00028032	1,17 W/kg
42,23 dBm	0,00052837	2,21 W/kg
43,03 dBm	0,00063601	2,66 W/kg

Die SARs, die aus den numerischen Simulationen hervorgehen, liegen nahe den Werten aus den Temperaturmessungen, unterschieden sich jedoch geringfügig (Tabelle 14). Dabei dienen die Daten aus den numerischen Simulationen im Vorfeld zur Abschätzung der erreichbaren SARs und dienen der Verifizierung der SARs aus den real gemessenen Temperaturanstiegen durch die TETRA-Exposition. Folglich wurden bei den nachfolgenden TETRA-Expositionsexperimenten die SARs aus den Temperaturmessungen zur Deklaration berücksichtigt.

Es ist dabei wichtig zu erwähnen, dass die hier bestimmten SARs nicht direkt mit den SARs von mobilen Endgeräten und von Mobilfunkstandards zu vergleichen sind. Bei den letztgenannten erfolgt anhand von Modellen eine Mittelung der SARs über 10 g Ersatzgewebe. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bestimmungen der SARs erfolgten hingegen auf einer zellulären Ebene und richtet sich in ihrer Berechnung nach Merla *et al.* 2011 und Oster *et al.* 2016 [Merla *et al.*, 2011; Oster *et al.*, 2016; Schmid *et al.*, 2015].

Tabelle 14: Vergleich der spezifischen Absorptionsraten aus Temperaturmessungen und numerischen Simulationen. Die Deklaration der TETRA-Expositionsexperimente erfolgt anhand der SARs die durch die realen Temperaturmessungen ermittelt und durch die SARs der numerischen Simulation verifiziert wurden.

Spezifische Absorptionsrate aus Temperaturmessung	Spezifische Absorptionsrate aus Simulation
1,17 W/kg	1,01 W/kg
2,21 W/kg	2,05 W/kg
2,66 W/kg	2,46 W/kg

5.3.2. Bestimmung des Temperaturanstiegs während der TETRA-Exposition

Um den maximalen Temperaturanstieg während der TETRA-Exposition zu quantifizieren, wurden Temperaturmessungen für den Expositionszeitraum von 15 Minuten in der *Stripline* durchgeführt (Abbildung 18). Dies ist wichtig um in nachfolgenden Zellexperimenten den Einfluss eines Temperaturanstieges (thermischer Effekt) auf die Zellkulturen beurteilen zu können. Die TETRA-Exposition in diesen und nachfolgenden Versuchen erfolgte mit einer Trägerfrequenz von 395 MHz bei SARs von 1,17 W/kg, 2,21 W/kg und 2,66 W/kg, die

$\pi/4$ DQPSK moduliert und mit 17,64 MHz gepulst wurden.

Aus den Temperaturmessungen geht hervor, dass nach 15-minütiger Exposition für das geringste Leistungslevel mit einer SAR von 1,17 W/kg ein Anstieg der Temperatur um 0,047°C (Abbildung 18, gelb) erfolgte. Für das mittlere Leistungslevel mit einer SAR von 2,21 W/kg lag der Temperaturanstieg bei 0,089°C (Abbildung 18, orange), beim größten Leistungslevel mit einer SAR 2,66 W/kg ergab sich eine Erhöhung von 0,124°C (Abbildung 18, rot) (Tabelle 15).

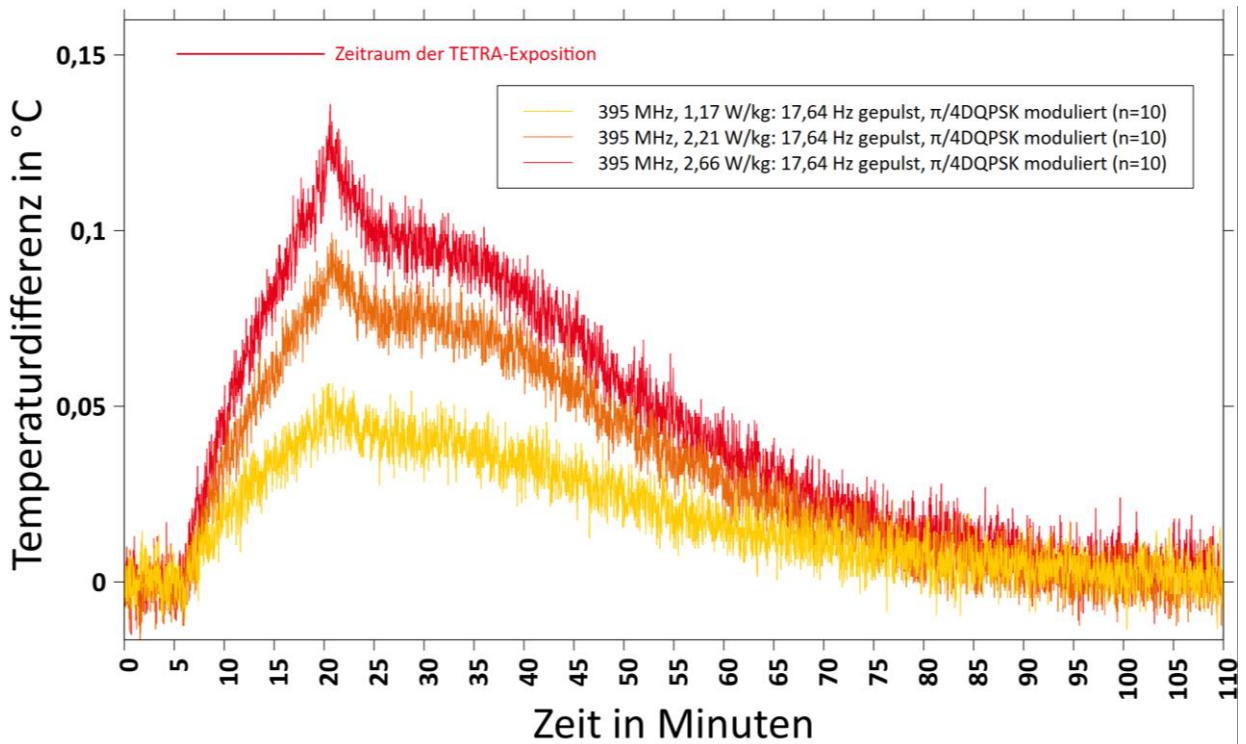


Abbildung 18: Bestimmung des maximalen Temperaturanstieges während der TETRA-Exposition. Vor der jeweiligen 15-minütigen TETRA-Exposition mit unterschiedlichen SARs (Legende), erfolgte ein 5-minütiger Vorlauf ohne Befeldung. Für die SAR von 1,17 W/kg erfolgte ein maximaler Temperaturanstieg um 0,047°C, bei einer SAR von 2,21 W/kg von 0,089°C und bei einer SAR von 2,66 W/kg ein Anstieg um 0,124°C. Die Mittelwerte der drei Leistungslevel wurden aus der Anzahl der jeweils durchgeführten Temperaturmessungen gebildet. Die Abtastrate lag bei 1 Hz. Die Temperaturveränderung wurde unter Verwendung des Temperatursensors OTG-F-10-62ST-1.5PTFE-XN-25PI-L unmittelbar über dem Elektrodenfeld gemessen.

Tabelle 15: Temperaturanstiege durch die TETRA-Exposition. Durch eine 15-minütige TETRA-Exposition kam es für die drei Leistungslevel zu verschiedenen maximalen Temperaturanstiegen.

Leistungslevel	Expositionsbedingungen	Temperaturanstieg
Niedrigstes	395 MHz, 1,17 W/kg: 17,64 Hz gepulst, $\pi/4$ DQPSK moduliert	0,047°C
Mittleres	395 MHz, 2,21 W/kg: 17,64 Hz gepulst, $\pi/4$ DQPSK moduliert	0,089°C
Höchstes	395 MHz, 2,66 W/kg: 17,64 Hz gepulst, $\pi/4$ DQPSK moduliert	0,124°C

5.3.3. Thermische Effekte auf kortikale Neurone

Um die Auswirkung thermischer Effekte durch die TETRA-Exposition auf kortikale neuronale Netzwerke beurteilen zu können, wurden separate Temperatur-Expositionsexperimente durchgeführt, bei denen in Anwesenheit von Zellen die Temperatur schrittweise pro Minute um $0,1^{\circ}\text{C}$ von 37°C auf $37,5^{\circ}\text{C}$ erhöht wurde. Hierbei wurde die Auswirkung des Temperaturanstiegs auf die Spike- und Burstrate, sowie auf die Burstdauer und Netzwerksynchronität untersucht. Dabei konnte beobachtet werden, dass es zu einem temperaturbedingten konstanten Anstieg der Spikerate, als auch der Burstrate kam (Abbildung 19A,B). Die Spikerate erreichte nach einer Erhöhung der Temperatur um $0,1^{\circ}\text{C}$ einen Anstieg um 15,62 Prozentpunkte und nach der maximalen Temperaturerhöhung von $0,5^{\circ}\text{C}$ einen Anstieg um

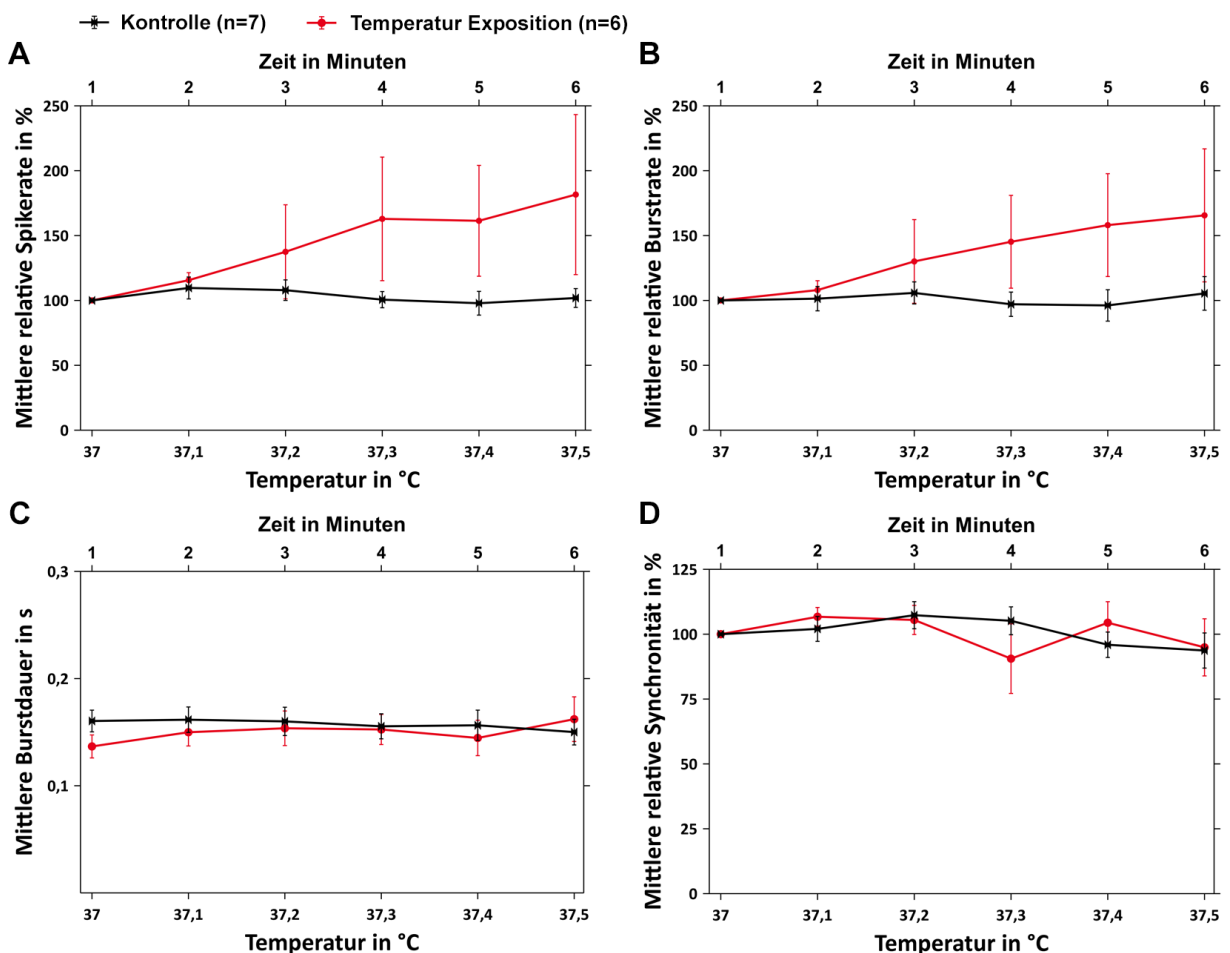


Abbildung 19: Thermische Effekte auf neuronale Netzwerke durch moderate Temperaturerhöhungen. (A, B) Die minutliche Temperaturerhöhung von 37°C auf $37,5^{\circ}\text{C}$ in Schritten von $0,1^{\circ}\text{C}$ führte zu einem Anstieg der Spike- und Burstrate, welcher jedoch statistisch nicht signifikant war. Die jeweiligen Kontrollen, die keiner Temperatur-Exposition ausgesetzt waren, zeigten im Vergleich einen stabilen Verlauf über die Zeit. (C, D) Die Parameter der Burstdauer und der Netzwerksynchronität zeigten keine temperaturabhängigen Veränderungen über die Zeit, sondern liegen auf dem gleichen Niveau mit der jeweiligen Kontrolle. Die zwei Versuchsgruppen zeigten in den 4 untersuchten Parametern keine statistisch signifikanten Veränderungen innerhalb und zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen. Die Mittelwerte $\pm\text{SEM}$ wurden aus der Anzahl der verwendeten MEA-Chips (n) jeder Versuchsgruppe berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem, heteroskedastischem t-Test überprüft. Abbildungen mit angepasstem Farbschema aus [Köhler *et al.*, 2018].

81,61 Prozentpunkte. Die Burstrate stieg nach einer Temperaturerhöhung von 0,1°C um 7,99 Prozentpunkte und erreicht ihr Maximum nach der Temperaturerhöhung um 0,5°C mit einer Steigerung von 65,58 Prozentpunkten verglichen mit dem Anfangswert. Die jeweiligen Kontrollen, die keiner Temperatur-Exposition ausgesetzt waren, zeigten einen stabilen Verlauf der Spike- und Burstrate über den gesamten Versuchszeitraum.

Die Parameter der Burstdauer und der Netzwerksynchronität wurden durch den schrittweisen Temperaturanstieg nicht beeinflusst, es waren keine Auswirkungen auf die Zellnetzwerke zu beobachten. Beide Parameter befanden sich auf dem gleichen Niveau mit der jeweiligen Kontrolle (Abbildung 19C,D). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die kortikalen Netzwerke als Reaktion auf eine moderat steigende Temperatur-Exposition in zwei der vier elektrophysiologischen Parameter Veränderungen zeigten. Bei der Spikerate als auch bei der Burstrate kam es zu einem unmittelbaren und kontinuierlichen Anstieg als Reaktion auf die schrittweise Temperaturerhöhung. Bereits ein Temperaturanstieg um nur 0,1°C zeigte eine Auswirkung auf die Spike- und die Burstrate. Beide Raten veränderten sich mit einem klaren Trend unter Einfluss der Temperaturerhöhung, die temperaturbedingten Veränderungen sind jedoch statistisch nicht signifikant.

5.3.4. Auswirkung von TETRA-Bestrahlung auf kortikale Neurone

Um die Auswirkung von TETRA-Exposition auf die elektrophysiologischen Eigenschaften kortikaler Zellnetzwerke zu untersuchen, wurden Kurz- und Langzeitexperimente durchgeführt. Die TETRA-Exposition erfolgte dabei mit einer Trägerfrequenz von 395 MHz, welche $\pi/4$ DQPSK-moduliert und mit 17,64 Hz gepulst wurde. Als erstes wird auf die Ergebnisse der TETRA-Kurzzeit-Exposition eingegangen, nachfolgend auf die Ergebnisse der TETRA-Langzeit-Exposition.

Die TETRA-Kurzzeit-Exposition der neuronalen Netzwerke erfolgte über einen Zeitraum von 15 Minuten, es wurde mit zwei verschiedenen SARs von 1,17 W/kg und 2,21 W/kg befeldet, und jeweils vor und nach der Exposition extrazelluläre Ableitungen durchführt.

Dabei hat die TETRA-Exposition zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen der Spikeraten bei Expositionen mit einer SAR von 1,17 W/kg und 2,21 W/kg geführt. Alle drei Versuchsgruppen zeigten das gleiche Niveau (Abbildung 20A). Dies verdeutlichen auch die exemplarisch gezeigten extrazellulären Ableitungen der kortikalen Neurone eines MEA-Chips (Abbildung 21). Die Messungen vor und nach der TETRA-Befeldung mit einer SAR von 2,21 W/kg zeigten typische Aktionspotentialverläufe der Neurone mit keinen auffälligen Änderungen. Die Amplituden der Messung variierten zwischen 40 μ V und -60 μ V.

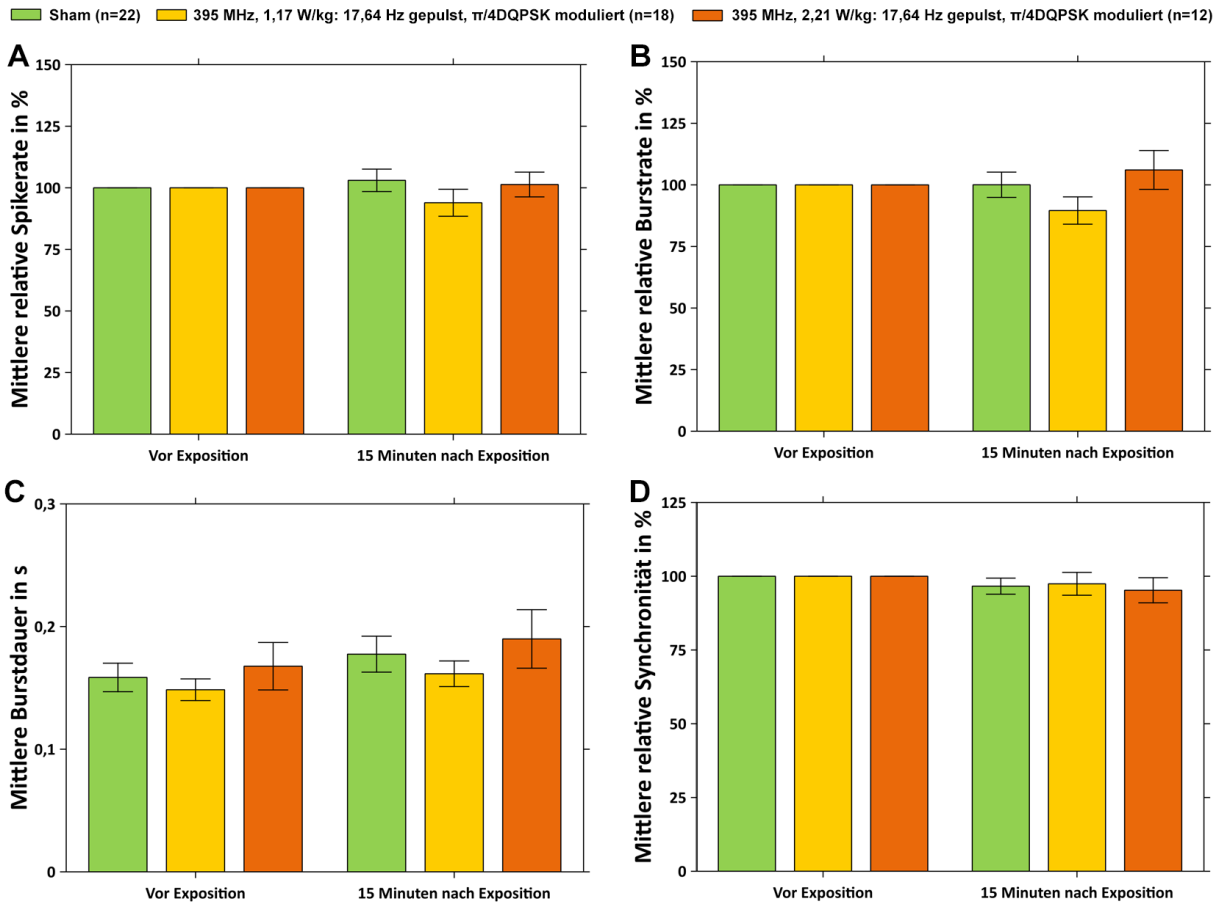


Abbildung 20: TETRA-Kurzzeit-Exposition hat keine Auswirkung auf die elektro-physiologischen Eigenschaften von neuronalen Netzwerken. Neuronale Zellnetzwerke wurden mit einer SAR von 1,17 W/kg und 2,21 W/kg für 15 Minuten befeuchtet. Jeweils direkt vor und nach der Exposition wurden extrazelluläre Ableitung der Netzwerke durchgeführt. Dabei hatte die TETRA-Kurzzeit-Exposition keine Auswirkung auf die 4 untersuchten elektro-physiologischen Parameter. (A, B) Die Spikerate, als auch die Burstrate der mit TETRA befeuchteten Zellen zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen vor und nach der Exposition. (C) Aus der Analyse des Parameters für die absolute Burstdauer, ergab sich für alle drei Versuchsgruppen eine geringfügige Zunahme im Vergleich vor und nach der Exposition, welche jedoch statistisch nicht signifikant ist. (D) Der Parameter der Netzwerksynchronität zeigt, dass alle Versuchsgruppen vor und nach den jeweiligen Expositionen Werte auf gleichem Niveau haben, die keine statistisch signifikanten Veränderungen darstellen. Die Mittelwerte \pm SEM wurden aus der Anzahl der verwendeten MEA-Chips (n) jeder Versuchsgruppe berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA-Tests überprüft. Abbildungen mit angepasstem Farbschema aus [Köhler *et al.*, 2018].

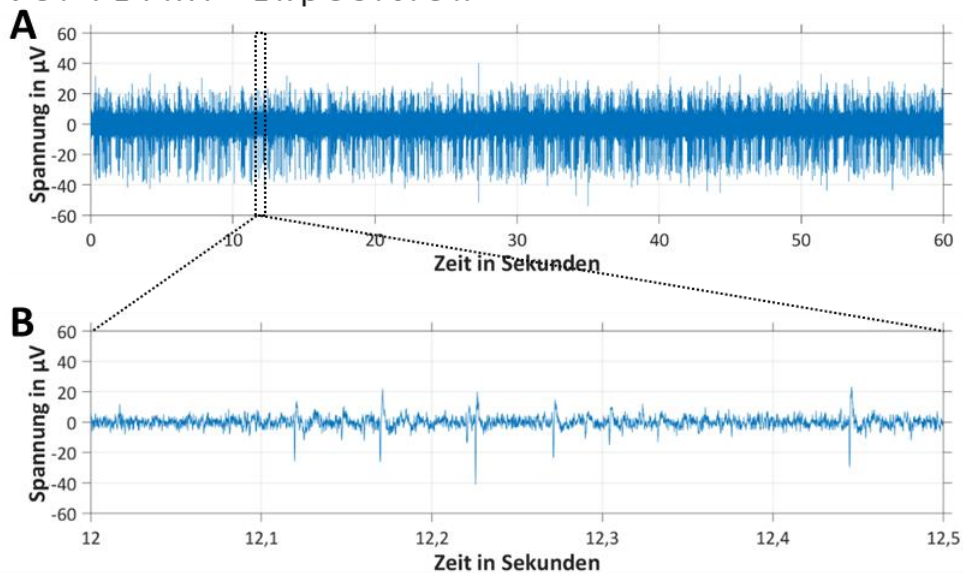
Die Analysen der Burstraten zeigten ebenfalls keine statistisch signifikanten Veränderungen durch die TETRA-Exposition. Jedoch sind hier etwas größere Variationen bei den zwei exponierten Gruppen zu sehen. Die Gruppe der Sham-Exposition zeigte ein absolut konstantes Niveau nach der TETRA-Exposition (Abbildung 20B).

Bei dem Parameter der absoluten Burstdauer ergab sich für alle drei Versuchsgruppen, d.h. für die Sham exponierten als auch die mit einer SAR von 1,17 W/kg und 2,21 W/kg exponierten Zellen, eine geringfügige Verlängerung der Burstdauer je Versuchsgruppe, für die Zeitpunkte nach der Exposition im Vergleich zu vor der Exposition (Abbildung 20C). Dabei sind auch hier die Veränderungen nicht statistisch signifikant. Die Burstdauer aller Versuchsgruppen variieren hierbei zwischen 0,15 s und 0,18 s.

Die Analyse der Netzwerksynchronität zeigte, dass die Werte aller Versuchsgruppen vor und nach der jeweiligen Exposition auf einem gleichen Niveau lagen und keine statistisch signifikanten Veränderungen aufweisen (Abbildung 20D).

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die TETRA-Kurzzeit-Exposition mit einer SAR von 1,17 W/kg und 2,21 W/kg zu keinen statistisch signifikanten Änderungen innerhalb und zwischen den jeweiligen Versuchsgruppen bei den untersuchten Parameter Spike- und Burstrate, Burstduration und Netzwerksynchronität führte.

Vor TETRA - Exposition



Nach TETRA - Exposition

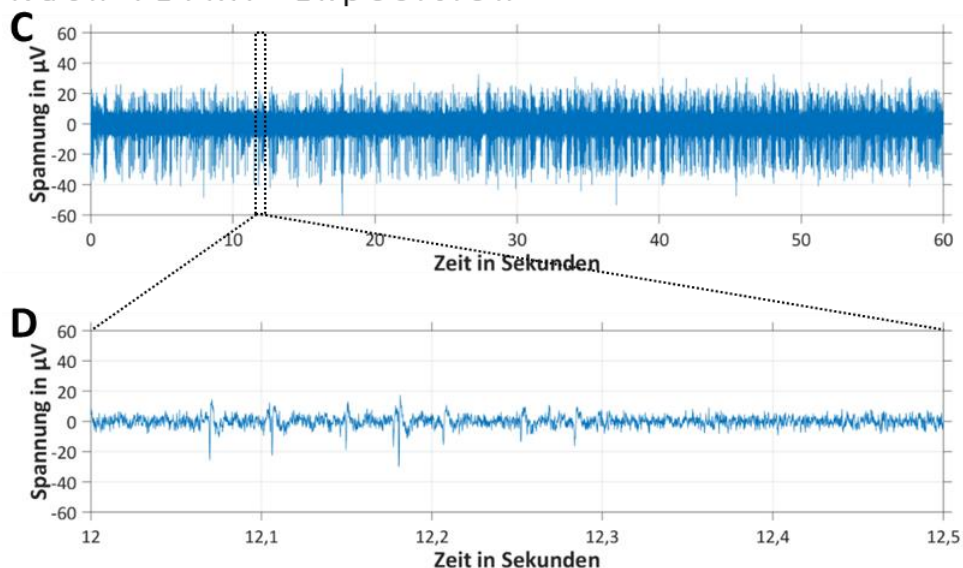


Abbildung 21: Extrazellulär abgeleitete kortikale Neurone zeigen typische Aktionspotentialverläufe vor und nach der TETRA-Kurzzeitexposition. Die exemplarisch gezeigten extrazellulären Ableitungen von neuronalen Zellkulturen wurden jeweils unmittelbar vor und nach einer 15-minütigen TETRA-Exposition für einen Zeitraum von 60 Sekunden aufgezeichnet. (A,B) Die Messung vor der Exposition zeigt typische extrazelluläre Aktionspotentialverläufe. (C,D) Gleiches gilt für die Messung nach der TETRA-Exposition. Die TETRA-Exposition erfolgte mit einer Trägerfrequenz von 395 MHz und einer SAR von 2,21 W/kg. Das Signal wurde mit 17,64 Hz gepulst und $\pi/4$ DQPSK-moduliert. Die extrazellulären Ableitungen erfolgten an DIV 26, die gezeigten Messungen stammen von einer Elektrode eines MEA-Chips.

Neben den Experimenten zur TETRA-Kurzzeit-Exposition war es von großer Bedeutung zu untersuchen, ob es bei den neuronalen Netzwerken zu Langzeit-Effekten durch die TETRA-Befeldung kommt. Bei den Langzeit-Experimenten erfolgte die TETRA-Exposition mit einer SAR von 1,17 W/kg alle 2 Stunden für 15 Minuten über den gesamten Versuchszeitraum. Hierbei wurde die niedrigste SAR von 1,17 W/kg gewählt, bei der es zu einer maximalen Temperaturerhöhung von 0,047°C kommt. Dieses Protokoll wurde gewählt um den Einfluss thermischer Effekte möglichst gering zu halten und eine mögliche Überlagerung von nicht-thermischen Effekten zu verhindern (Kapitel 5.3.3). Die extrazellulären Ableitungen der neuronalen Netzwerke erfolgte über einen Zeitraum von 18 Tagen zu unterschiedlichen Tageszeiten jeweils zwischen den Expositionszeiträumen.

Der Verlauf der Spikerate der TETRA-Versuchsgruppe, als auch der Verlauf der Kontroll- und Sham-Gruppe zeigte vom ersten bis zum 7. Tag ihrer elektrischen Aktivität einen Anstieg um das Dreifache von 100% auf 283,42% (Kontrolle), 299,73% (Sham), 308,07% (TETRA) (Abbildung 22A). An Tag 8 erfolgte ein Abfall der Kontroll- und Sham-Versuchsgruppen auf 220,18% in der Kontrolle bzw. auf 237,26% in der Sham-Gruppe. Die TETRA-Versuchsgruppe blieb stabil bei 317,26%. Nachfolgend stieg die Spikerate aller Versuchsgruppen weiter an, um anschließend in eine Plateauphase überzugehen, bevor es zum Ende der Versuchsdauer zu einer Abnahme kam. Alle Versuchsgruppen zeigten das gleiche Niveau der Spikerate über die Zeit. Zur genaueren Verdeutlichung wurden die jeweiligen Spikeraten in einer Korrelationsanalyse gegeneinander aufgetragen, um die lineare Abhängigkeit zu quantifizieren. Dabei wurde der lineare Zusammenhang der verschiedenen Versuchsgruppen ersichtlich und verifiziert (Abbildung 22B,C,D).

Der Verlauf der Burstrate ist vergleichbar mit dem der Spikerate, jedoch fiel der Anstieg der Burstrate etwas geringer aus (Abbildung 23A). So erfolgte ausgehend von Tag 1 elektrischer Aktivität bis Tag 7 ein Anstieg der Burstrate bei allen drei Versuchsgruppen auf 218,07% (Kontrolle), 285,81% (Sham) und 241,04% (TETRA-Exposition). An Tag 8 wurde ein Abfall der Burstrate der Kontroll- und Sham-Gruppe auf 185,33% (Kontrolle) und 189,69% (Sham) beobachtet. Die TETRA-Expositionsgruppe blieb hingegen weiter stabil und lag an Tag 8 bei 241,56%. Ausgehend von Tag 9 zu Tag 18 stieg bei allen drei Gruppen die Burstrate weiter an, bildete ein Plateau und zeigte darauf einen abnehmenden Trend. Die Korrelationsanalysen zeigten analog zu den Spikeraten auch bei den Burstraten einen linearen Zusammenhang. Die Daten belegen, dass die Burstraten das gleiche Niveau haben (Abbildung 23B,C,D).

Die Resultate zur Burstdauer zeigten bei der Kontroll-, Sham- und bei der TETRA-exponierten Gruppe eine geringe aber stetige Zunahme über die Zeit, auf gleichem Niveau (Abbildung 24A). Die Werte variierten dabei insgesamt zwischen 0,12 s an Tag 1 der elektrischen Aktivität bis

0,31 s an Tag 14 der elektrischen Aktivität. Durch die Korrelationsanalysen wurden die Ergebnisse verdeutlicht und bestätigt (Abbildung 24B,C,D).

Der Parameter der neuronalen Netzwerksynchronität zeigte ebenfalls über die Zeit eine kontinuierliche Zunahme der Synchronität bei allen Versuchsgruppen, mit einem zum Ende der Versuchsdauer leicht abnehmenden Trend (Abbildung 25A). Die Werte der Versuchsgruppen variierten dabei zwischen 100% und 210,01%. Dabei bestätigen die Korrelationsanalysen die Resultate und zeigen den linearen Zusammenhang zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 25B,C,D).

In der Summe verdeutlichen die Ergebnisse, dass die kortikalen Netzwerke bei allen drei Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Veränderungen innerhalb der Versuchsgruppen und zwischen den Versuchsgruppen zeigen, dies gilt für alle 4 elektrophysiologischen Parameter.

Auch die jeweils exemplarisch gezeigten extrazellulären Ableitungen von neuronalen Netzwerken aus der Kontroll-, Sham- und TETRA-Versuchsgruppe, zeigten typische Aktionspotentialverläufe mit keinen auffälligen Veränderungen zwischen den unterschiedlichen Behandlungen (Abbildung 26). Die gezeigten Ableitungen stammen jeweils von einer Elektrode eines exemplarischen MEA-Chips und erfolgten an Tag 7 der elektrischen Aktivität. Die gemessenen Amplituden lagen dabei zwischen 115 μV und -180 μV und variierten je nach neuronalem Netzwerk und MEA-Chip.

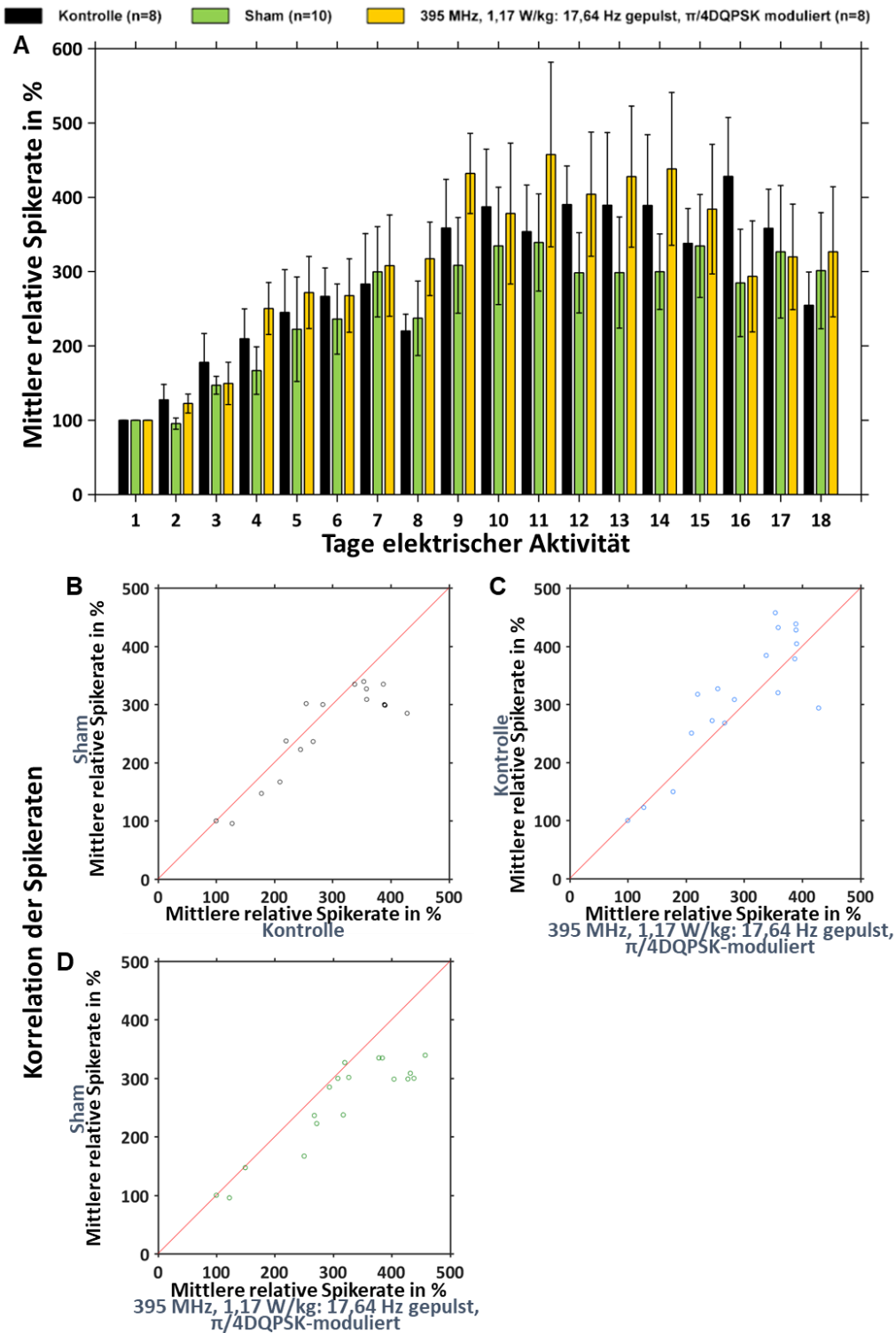


Abbildung 22: TETRA-Langzeit-Exposition hat keine Auswirkung auf die Spikerate von neuronalen Netzwerken. (A) Es konnten über den Versuchszeitraum keine statistisch signifikanten Veränderungen der Spikeraten der drei Versuchsgruppen festgestellt werden. Jede Versuchsgruppe zeigt Schwankungen über den gesamten Versuchszeitraum. Die Spikerate der Kontroll-, Sham- und der TETRA-exponierten Versuchsgruppe (SAR 1,17 W/kg) zeigen zu Beginn jeweils einen Anstieg, welcher in eine Plateauphase übergeht bevor er zum Ende der Versuchsdauer wieder leicht abnimmt. Die drei Versuchsgruppen zeigen keine statistisch signifikanten Veränderungen innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe und keine statistisch signifikanten Unterschiede untereinander. Die TETRA-Exposition erfolgte alle 2 Stunden für 15 Minuten. Die Mittelwerte \pm SEM wurden aus der Anzahl der verwendeten MEA-Chips (n) jeder Versuchsgruppe berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA-Tests überprüft. Abbildung A mit angepasstem Farbschema aus Köhler *et al.* 2018. (B,C,D) Die drei Korrelationsanalysen bei denen ein paarweiser Vergleich der drei Versuchsgruppen erfolgte, bei dem die jeweiligen Spikeraten des Versuchszeitraums gegeneinander aufgetragen wurden, zeigen jeweils eine starke Korrelationen. Die Korrelationskoeffizienten betragen: 0,88 (B), 0,86 (C), 0,90 (D).

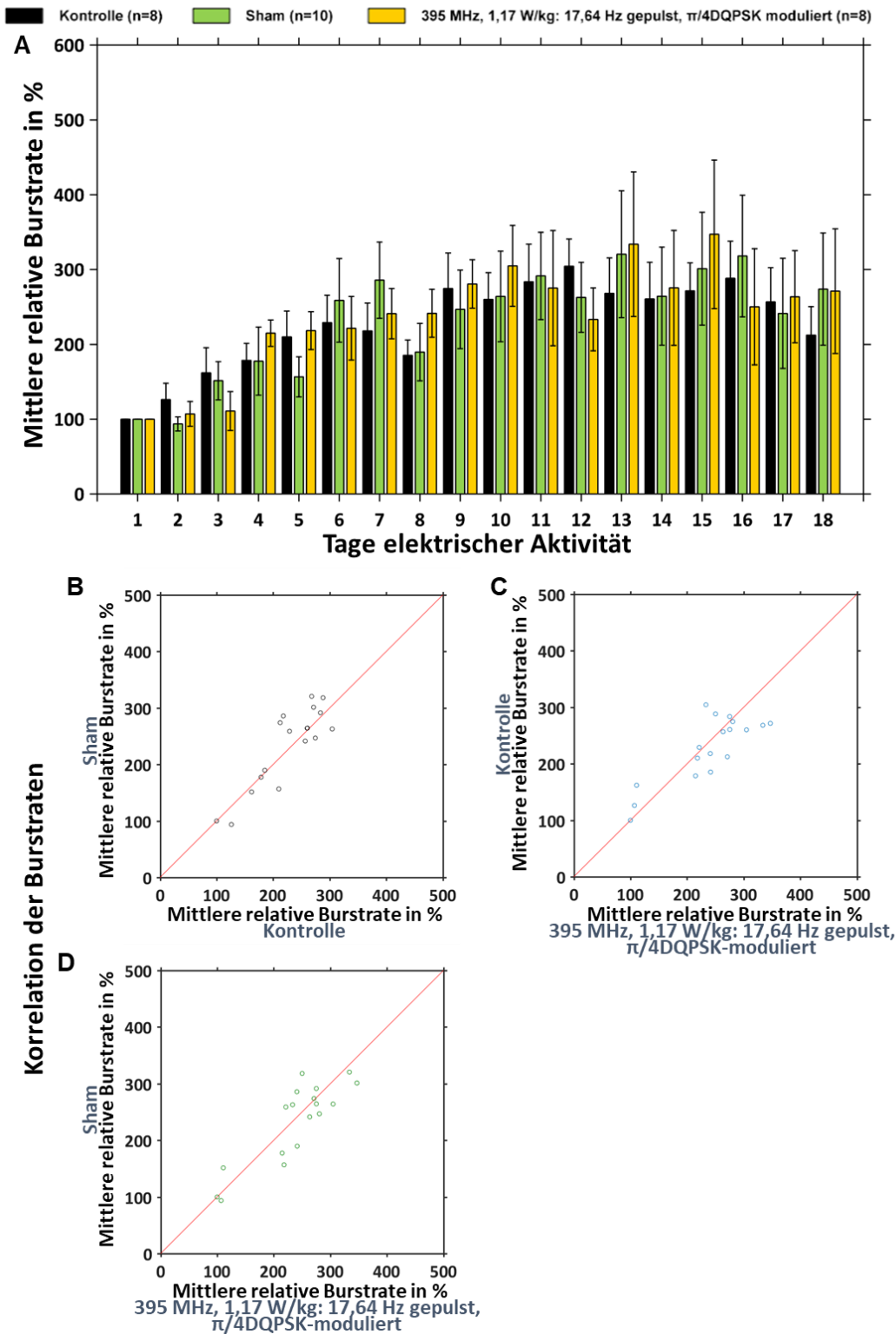


Abbildung 23: TETRA-Langzeit-Exposition hat keinen Effekt auf die Burstrate von neuronalen Netzwerken. (A) Die Burstraten der Kontroll-, Sham- und der TETRA-exponierten Versuchsgruppe (SAR 1,17 W/kg) zeigen zu Beginn jeweils einen Anstieg, welcher in eine Plateauphase übergeht und zum Ende der Versuchsdauer wieder leicht abnimmt. Jede Versuchsgruppe zeigt Schwankungen über den gesamten Versuchszeitraum. Die drei Versuchsgruppen zeigen keine statistisch signifikanten Veränderungen innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe und keine statistisch signifikanten Unterschiede untereinander. Die TETRA-Exposition erfolgte alle 2 Stunden für 15 Minuten. Die Mittelwerte \pm SEM wurden aus der Anzahl der verwendeten MEA-Chips (n) jeder Versuchsgruppe berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA-Tests überprüft. Abbildung A mit angepasstem Farbschema aus Köhler *et al.*, 2018. (B,C,D) Die drei Korrelationsanalysen bei denen ein paarweiser Vergleich der drei Versuchsgruppen erfolgte, bei dem die jeweiligen Burstraten des Versuchszeitraums gegeneinander aufgetragen wurden, zeigen jeweils eine starke Korrelationen. Die Korrelationskoeffizienten betragen: 0,88 (B), 0,81 (C), 0,86 (D).

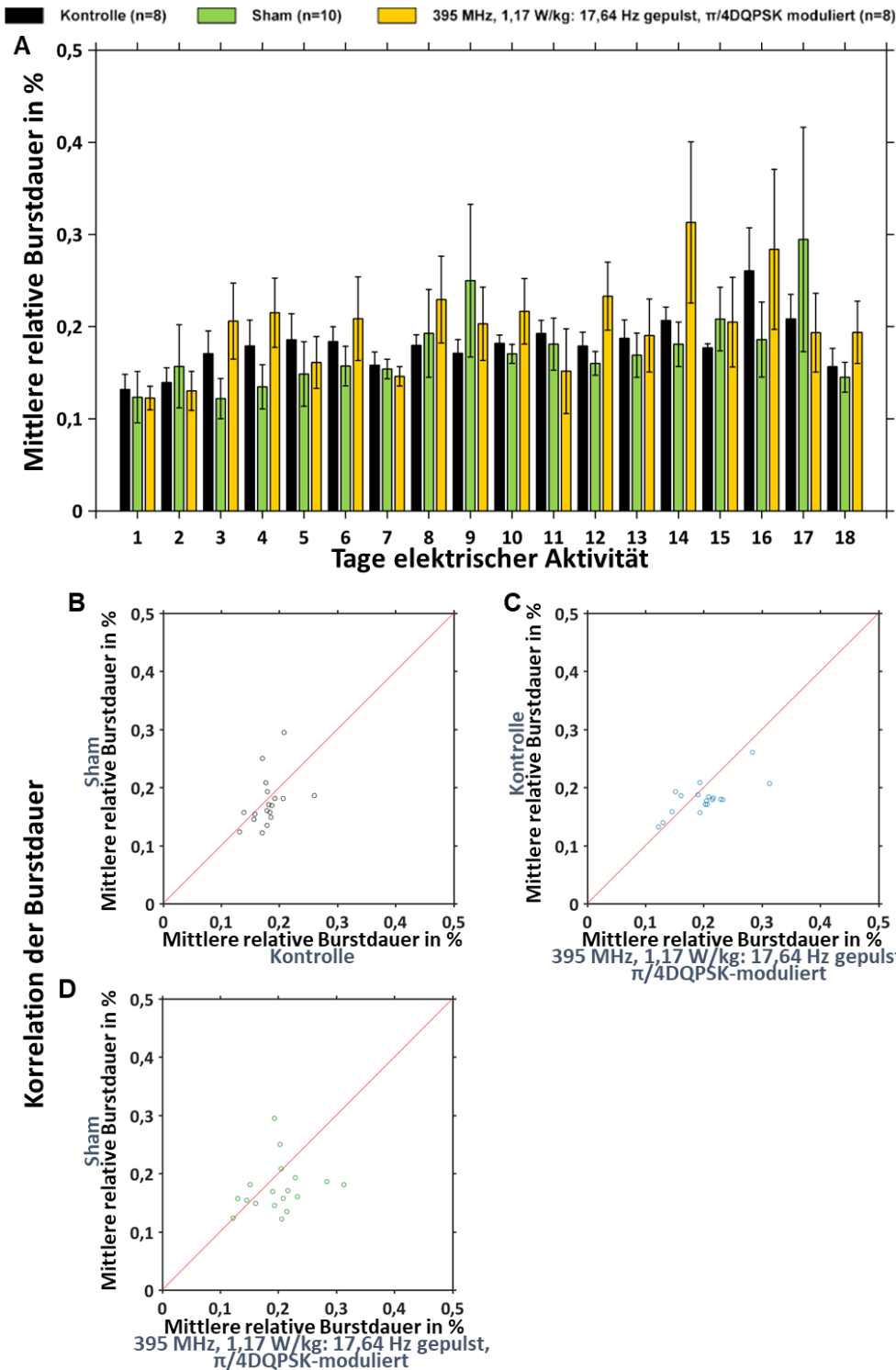


Abbildung 24: TETRA-Langzeit-Exposition hat keinen Effekt auf die Burstdauer von neuronalen Netzwerken. (A) Die Burstdauer aller Versuchsgruppen steigt über den gesamten Versuchszeitraum mit Schwankungen an. Alle Versuchsgruppen zeigen keine statistisch signifikanten Veränderungen innerhalb der jeweiligen Gruppe und keine statistisch signifikanten Unterschiede untereinander. Die TETRA-Exposition erfolgte alle 2 Stunden für 15 Minuten. Die Mittelwerte \pm SEM wurden aus der Anzahl der verwendeten MEA-Chips (n) jeder Versuchsgruppe berechnet. Abbildung A mit angepasstem Farbschema aus Köhler *et al.*, 2018. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA-Tests überprüft. (B,C,D) Die drei Korrelationsanalysen bei denen ein paarweiser Vergleich der drei Versuchsgruppen erfolgte, bei dem die jeweiligen Burstdauern des Versuchszeitraums gegeneinander aufgetragen wurden, zeigen verschiedene starke Korrelationen. (C) Die Korrelationsanalysen des Vergleichs der TETRA-Expositionsgruppe mit der Kontrollgruppe zeigt eine starke lineare Korrelation. (D) Der Vergleich der TETRA-Expositionsgruppe mit der Sham-Gruppe zeigt, dass die Daten entlang der Winkelhalbierenden gruppiert sind. Auch wenn die numerische Analyse nur eine schwache lineare Korrelation aufweist, zeigen die Daten kein Anzeichen dafür, dass die Befeldung einen Einfluss auf die Burstdauer hat. (B) Das Gleiche gilt für den Vergleich der Kontrollgruppe mit der Sham-Expositionsgruppe. Die Korrelationskoeffizienten betragen: 0,41 (B), 0,70 (C), 0,21 (D).

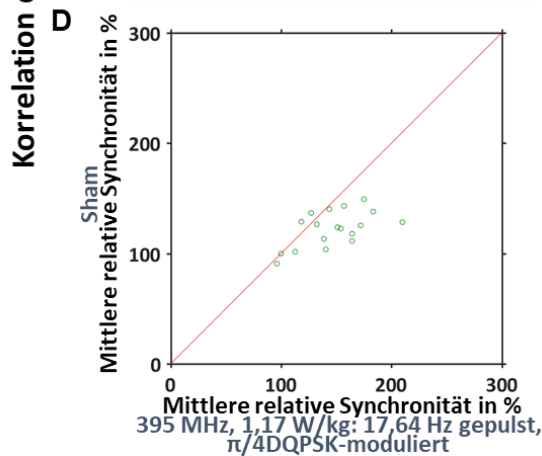
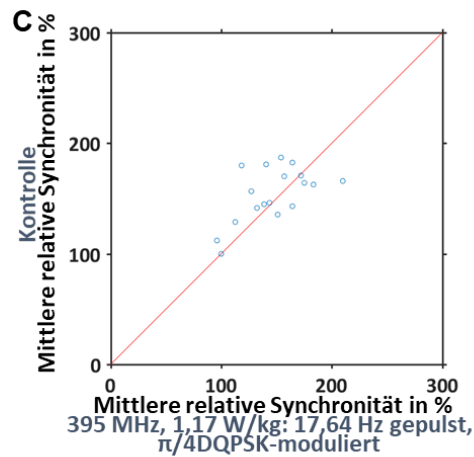
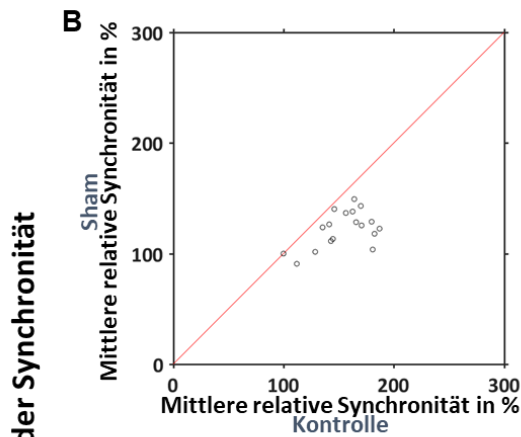
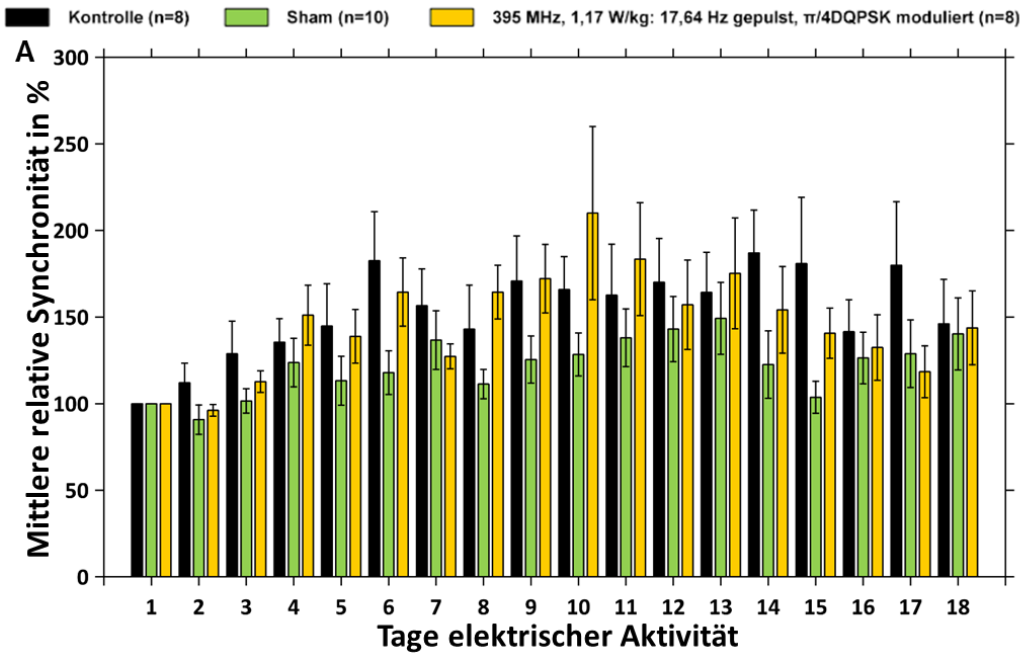
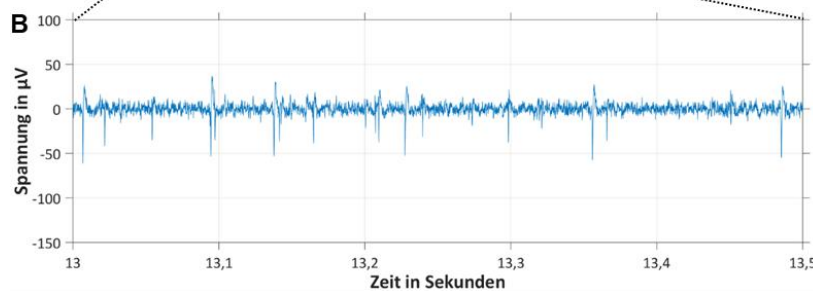
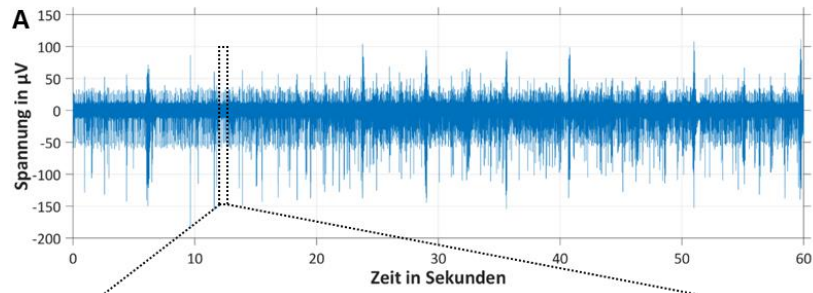
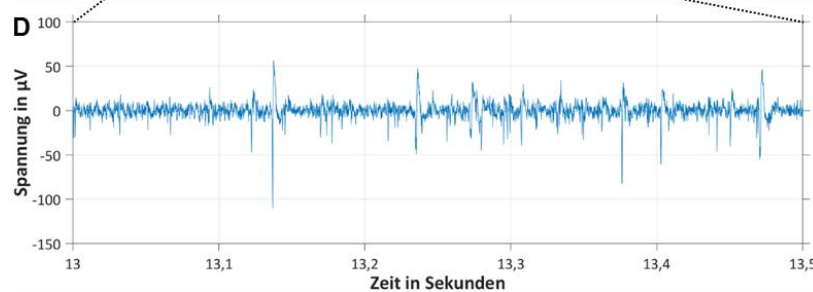
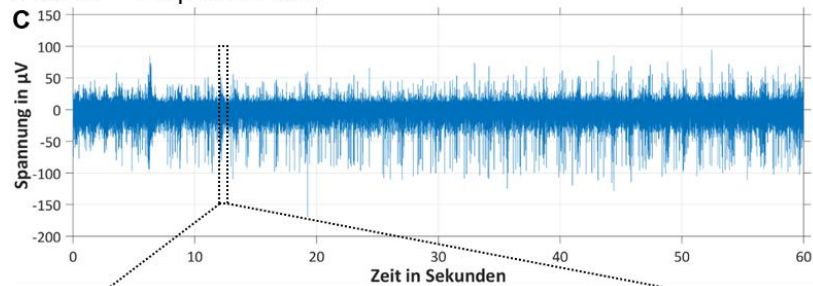


Abbildung 25: TETRA-Langzeit-Exposition hat keinen Effekt auf die Synchronität von neuronalen Netzwerken. (A) Bei allen vier Versuchsgruppen zeigt die Netzwerksynchronität einen kontinuierlichen Anstieg über die Zeit, welcher zum Ende der Versuchsdauer leicht abnimmt. Alle Versuchsgruppen zeigen keine statistisch signifikanten Veränderungen innerhalb der jeweiligen Gruppe und keine statistisch signifikanten Unterschiede untereinander. Die TETRA-Exposition erfolgte alle 2 Stunden für 15 Minuten. Die Mittelwerte \pm SEM wurden aus der Anzahl der verwendeten MEA-Chips (n) jeder Versuchsgruppe berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA-Tests überprüft. Abbildung A mit angepasstem Farbschema aus Köhler *et al.* 2018. (B,C,D) Die drei Korrelationsanalysen bei denen ein paarweiser Vergleich der drei Versuchsgruppen erfolgte, bei dem die jeweiligen Werte der Synchronität des Versuchszeitraums gegeneinander aufgetragen wurden, zeigen jeweils eine moderate lineare Korrelationen. Der Vergleich der Kontrollgruppe mit der Sham-Expositionsgruppe zeigte dabei, dass die Daten geringfügig unterhalb der Winkelhalbierenden liegen. Die Korrelationskoeffizienten betragen: 0,51 (B), 0,59 (C), 0,57 (D).

Kontrolle



Sham - Exposition



TETRA - Exposition

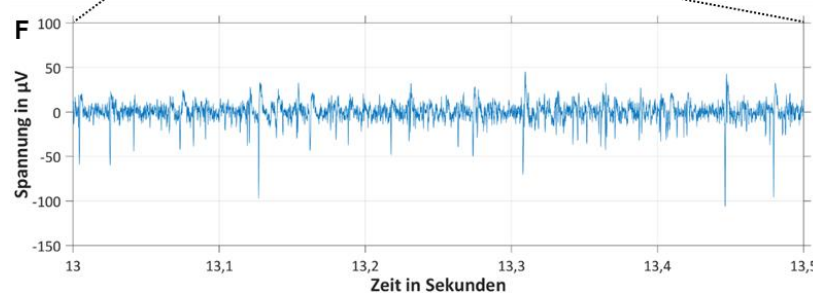
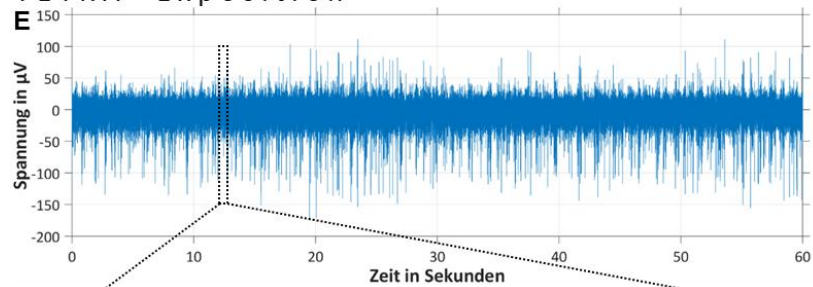


Abbildung 26: Korticale Neurone zeigen typische Aktionspotentialverläufe in TETRA-Langzeitversuchen. Die exemplarisch gezeigten extrazellulären Ableitungen der neuronalen Zellkulturen erfolgten an DIV 22. (A,B) Die Messung der Kontrollgruppe zeigt typische Aktionspotentialverläufe. (C,D) Gleiches gilt für die Ableitung der Neurone der Sham-Versuchsgruppe und (E,F) der mit TETRA befeldeten Kulturen. Die drei Versuchsgruppen befinden sich auf dem gleichen Niveau. Die TETRA-Exposition erfolgte mit einer Trägerfrequenz von 395 MHz und einer SAR von 1,17 W/kg. Das Signal wurde mit 17,64 Hz gepulst und $\pi/4$ QPSK-moduliert.

5.3.5. Thermische-Effekte auf humane Kardiomyozyten

Um die Folgen thermischer Effekte durch die TETRA-Exposition auf humane kardiale Netzwerke beurteilen zu können, wurden separate Temperatur-Expositionsexperimente durchgeführt, welche analog zu den Temperatur-Expositionsexperimenten der neuronalen Netzwerke erfolgten (Kapitel 5.3.3). Dabei wurde die Temperatur schrittweise um $0,1^{\circ}\text{C}$ pro Minute von 37°C auf $37,5^{\circ}\text{C}$ erhöht, mit dem Ziel mögliche Auswirkungen der moderaten Temperaturerhöhung auf die Schlagfrequenz und die Ausbreitungsgeschwindigkeit der kardialen Feldpotentiale zu untersuchen.

Es konnte festgestellt werden, dass eine Temperaturerhöhung um $0,5^{\circ}\text{C}$ von 37°C auf $37,5^{\circ}\text{C}$, keine Auswirkung auf die Schlagfrequenz der Kardiomyozyten-Netzwerke hat (Abbildung 27A). Die Schlagfrequenz blieb über den gesamten Versuchszeitraum stabil und war auf einem Niveau mit der Schlagfrequenz der Kontrolle, bei der die Temperatur konstant bei 37°C lag.

Die Analyse der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale über das kardiale Netzwerk, zeigte ebenfalls keine Beeinflussung der kardialen Netzwerke durch die moderate Temperaturerhöhung und ist vergleichbar mit den Werten der Kontrolle (Abbildung 27B). Beide Versuchsgruppen zeigten über den gesamten Versuchszeitraum eine Ausbreitungsgeschwindigkeit auf einem stabilen und vergleichbaren Niveau.

Es konnten bei beiden Versuchsparametern keine thermischen Effekte durch den moderaten Temperaturanstieg auf die humanen Kardiomyozyten-Netzwerke festgestellt werden. Die Kardiomyozyten erwiesen sich als robust gegenüber einem Temperaturanstieg von 37°C auf

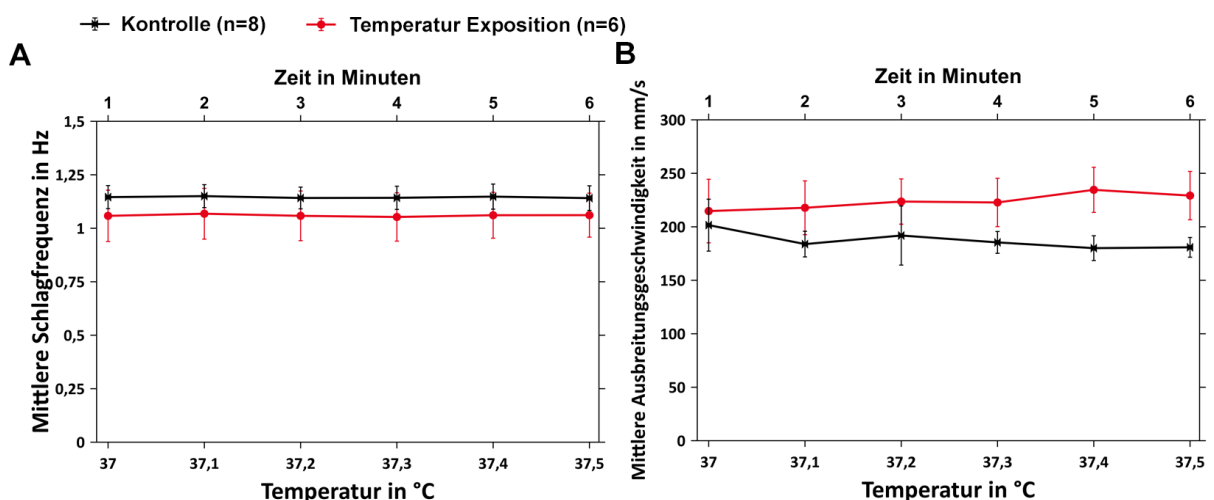


Abbildung 27: Moderate Temperaturerhöhungen induzieren keine thermischen Effekte bei kardialen Netzwerken. (A) Die moderate Temperaturerhöhung von 37°C auf $37,5^{\circ}\text{C}$ in Schritten von $0,1^{\circ}\text{C}$ pro Minute führt zu keinem Anstieg der Schlagfrequenz über den gesamten Versuchszeitraum und ist auf einem Niveau mit der Schlagfrequenz der Kontrolle. (B) Auch die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale über das Netzwerk bleibt bei der Versuchsgruppe, die einer ansteigenden Temperatur ausgesetzt ist, über den Versuchszeitraum konstant und ist vergleichbar mit den Werten der Kontrolle. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede innerhalb und zwischen den Versuchsgruppen festgestellt werden. Die Mittelwerte \pm SEM wurden aus der Anzahl der verwendeten MEA-Chips (n) jeder Versuchsgruppe berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem, heteroskedastischem t-Test überprüft.

37,5°C. Es kam zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen der Schlagfrequenzen und Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Feldpotentiale innerhalb und zwischen den beiden Versuchsgruppen.

5.3.6. Auswirkung von TETRA-Bestrahlung auf humane Kardiomyozyten

Die TETRA-Kurzzeit-Exposition der humanen kardialen Netzwerke erfolgte analog zu den TETRA-Expositionsversuchen mit den neuronalen Netzwerken. Dabei erfolgte eine 15-minütige TETRA-Exposition mit einer Trägerfrequenz von 395 MHz und SARs von 1,17 W/kg, 2,21 W/kg und 2,66 W/kg. Das Signal wurde $\pi/4$ DQPSK-moduliert und mit 17,64 Hz gepulst. Die extrazellulären Ableitungen erfolgten jeweils direkt vor und nach der Exposition.

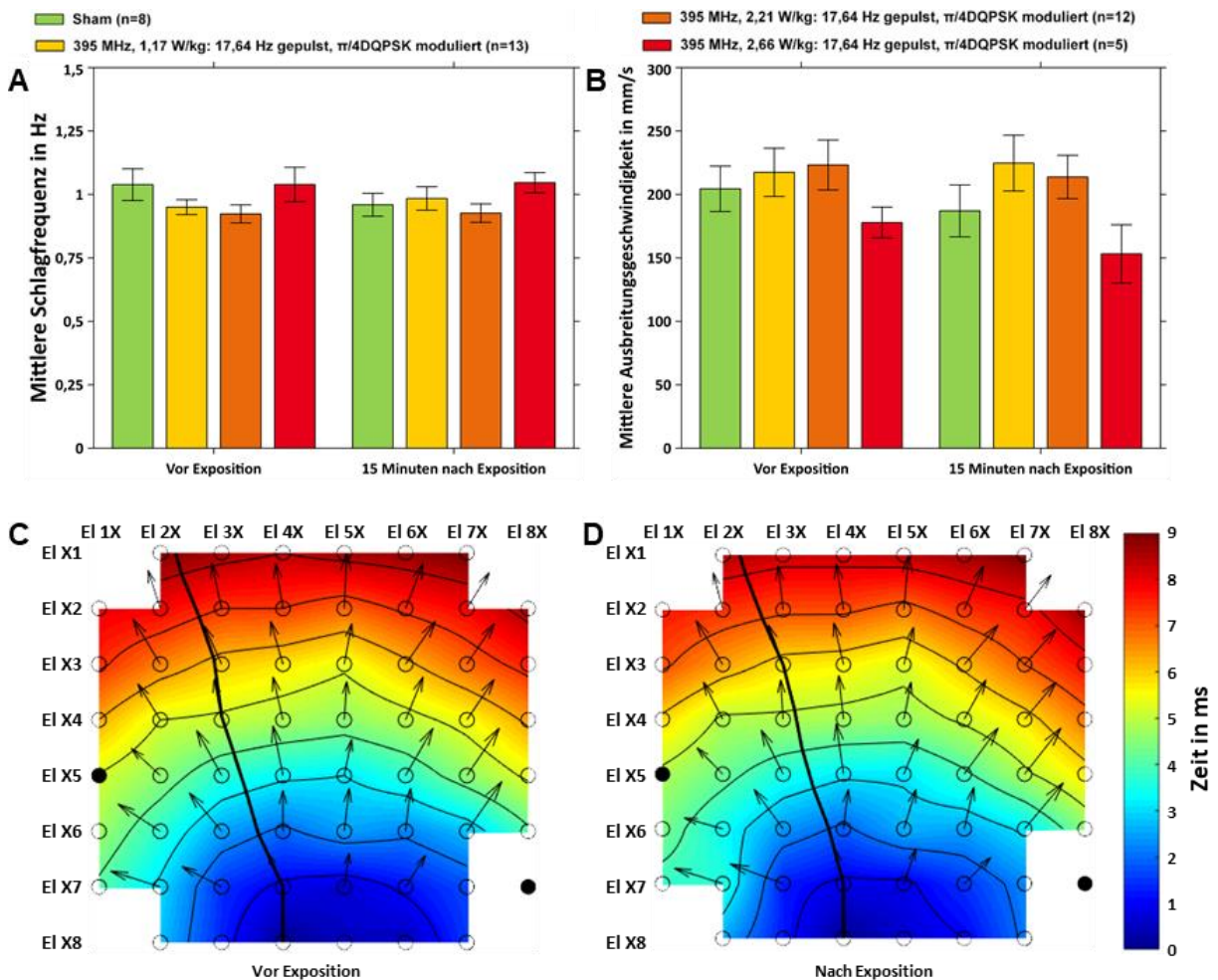
Die Analysen der TETRA-Kurzzeit-Exposition zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen der Schlagfrequenz bei allen Expositionslevel (Abbildung 28A). Dabei blieben die Versuchsgruppen, die mit einer SAR von 1,17 W/kg und 2,21 W/kg befeldet wurden, auf einem stabilen Niveau. Die Sham-Versuchsgruppe und die mit einer SAR von 2,66 W/kg exponierte Versuchsgruppe, zeigten eine geringfügige Verringerung ihrer Schlagraten. Dabei erfolgte bei der Sham-Versuchsgruppe eine minimale Verringerung der Schlagfrequenz von 1,04 Hz auf 0,96 Hz und bei der mit einer SAR von 2,66 W/kg befeldeten Versuchsgruppe eine Verringerung von 1,08 Hz auf 1,05 Hz.

Die Analysen der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale über das Netzwerk, zeigten bei allen drei TETRA-Expositionslevel ebenfalls keine statistisch signifikanten Veränderungen (Abbildung 28B). Die mit einer SAR von 1,17 W/kg und 2,21 W/kg befeldeten Versuchsgruppen zeigten eine stabile Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale vor und nach der TETRA-Kurzzeit-Exposition. Bei der mit einer SAR von 2,66 W/kg befeldeten Versuchsgruppe erfolgte eine minimale Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit um 24,71 mm/s von 177,91 mm/s auf 153,20 mm/s. Auch die Versuchsgruppe der Sham-Exposition zeigte eine geringfügige Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit um 17,88 mm/s von 204,43 mm/s auf 187,05 mm/s.

Dieses einheitliche Bild wird zusätzlich durch die exemplarisch gezeigten Feldpotential Propagationen vor und nach einer TETRA-Exposition mit einer SAR von 2,66 W/kg verdeutlicht (Abbildung 28C,D). Die mittlere Ausbreitungsgeschwindigkeit lag vor der Exposition bei 172,41 mm/s und nach der Exposition bei 171,71 mm/s. Die TETRA-Exposition hat demnach keinen erkennbaren Effekt auf diesen elektrophysiologischen Parameter.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die TETRA-Kurzzeit-Exposition der Kardiomyozyten-Netzwerke mit einer SAR von 1,17 W/kg und 2,21 W/kg zu keinen statistisch signifikanten Änderungen der untersuchten Parameter der Schlagfrequenz und der Ausbreitungs-

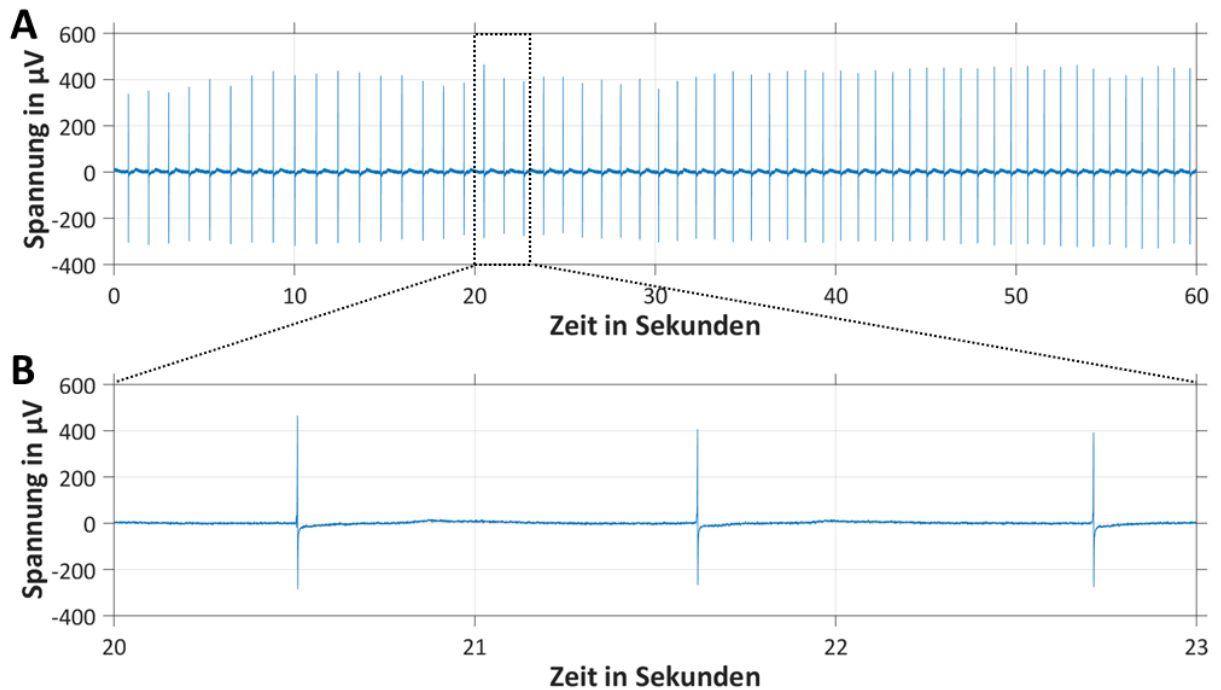
geschwindigkeit der Feldpotentiale führt, dies weder innerhalb der Versuchsgruppe, noch im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen. Dies wird auch durch die exemplarisch gezeigten extrazellulären Ableitungen der Kardiomyozyten vor und nach der TETRA-Exposition mit einer SAR von 2,66 W/kg verdeutlicht (Abbildung 29). Die Feldpotentiale waren vor und nach der TETRA-Exposition stabil und zeigten typische Amplituden der Feldpotentiale zwischen $522 \mu\text{V}$ und $-325 \mu\text{V}$.



Feldpotential Propagation humaner Kardiomyozyten vor und nach TETRA-Exposition

Abbildung 28: TETRA-Kurzzeit-Exposition hat keine Auswirkung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von humanen Kardiomyozyten-Netzwerken. Zellnetzwerke aus Kardiomyozyten wurden mit einer SAR von 1,17 W/kg, 2,21 W/kg und 2,66 W/kg für 15 Minuten befeldet. Jeweils direkt vor und nach der Exposition wurden extrazelluläre Ableitungen der Netzwerke durchgeführt. Es konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen der jeweiligen Schlagfrequenzen und Ausbreitungsgeschwindigkeiten der Feldpotentiale festgestellt werden. (A) Die Schlagfrequenzen der mit TETRA befeldeten Versuchsgruppe mit einer SAR von 2,66 W/kg und die der Sham-Exposition zeigen eine minimale Verringerung der Schlagfrequenz. Die Schlagfrequenz der mit TETRA befeldeten Versuchsgruppen mit einer SAR 1,17 W/kg und 2,21 W/kg zeigen jeweils ein stabiles Niveau. (B) Die Resultate der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale zeigen für die zwei mit TETRA befeldeten Versuchsgruppen mit einer SAR von 1,17 W/kg, 2,21 W/kg ein stabiles Niveau der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale vor und nach der TETRA-Exposition. Die Versuchsgruppe der Sham-Exposition und die der TETRA-Exposition mit einer SAR von 2,66 W/kg zeigt eine geringfügige Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit nach der jeweiligen Exposition. Die Mittelwerte \pm SEM wurden aus der Anzahl der verwendeten MEA-Chips (n) jeder Versuchsgruppe berechnet. Die statistische Signifikanz wurde mittels ANOVA-Tests überprüft. (C,D) Die beiden exemplarisch gezeigten Feldpotential Propagationen vor und nach einer TETRA-Exposition mit einer SAR von 2,66 W/kg verdeutlichen das gleiche Niveau der Messungen. Die mittlere Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale lag vor der Exposition bei 172,41 mm/s und nach der Exposition bei 171,71 mm/s.

Vor TETRA - Exposition



Nach TETRA - Exposition

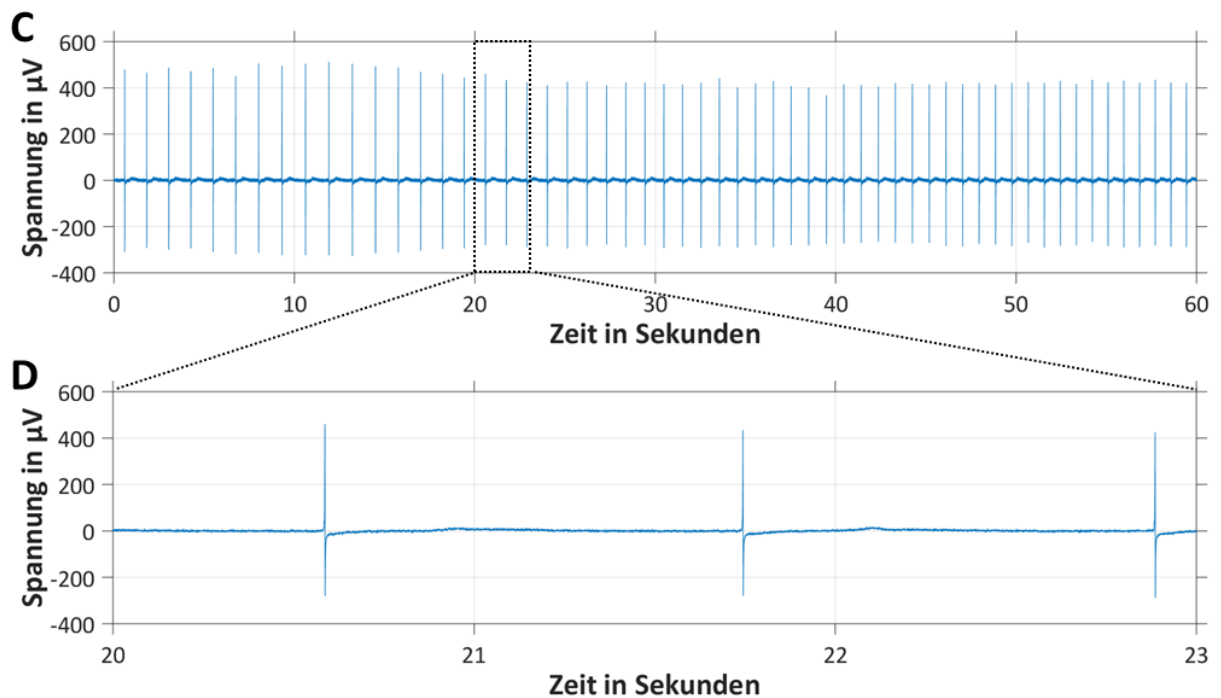


Abbildung 29: Extrazellulär abgeleitete humane Kardiomyozyten zeigen typische Feldpotentialverläufe vor und nach der TETRA-Kurzzeit-Exposition. Die exemplarisch gezeigten extrazellulären Ableitungen von humanen Kardiomyozyten wurden jeweils unmittelbar vor und nach einer 15-minütigen TETRA-Exposition für einen Zeitraum von 60 Sekunden aufgezeichnet. (A,B) Die Messung unmittelbar vor der TETRA-Exposition zeigt typische extrazelluläre Feldpotentialverläufe. (C,D) Gleiches gilt für die Messung nach der TETRA-Exposition. Die TETRA-Exposition erfolgte mit einer Trägerfrequenz von 395 MHz und einer SAR von 2,66 W/kg. Das Signal wurde mit 17,64 Hz gepulst und $\pi/4$ DQPSK-moduliert. Die extrazellulären Ableitungen erfolgten an DIV 7.

6. Photothermische Stimulation von *in vitro* Netzwerken aus humanen Kardiomyozyten

6.1. Motivation und Zielsetzung

Die elektrische Stimulation des Herzens, bzw. seiner zur Kontraktion befähigten Zellen den Kardiomyozyten, wird in der Medizin seit Jahrzehnten in Form von Herzschrittmachern und Defibrillatoren angewandt und ist etabliert. Die gezielte elektrische Stimulation über implantierte Elektroden sicherte dabei in vielen Fällen das Überleben von Patienten und verbesserte darüber hinaus deren Lebenserwartung und Lebensqualität, verglichen mit nicht behandelten Personen [Boudoulas *et al.*, 2015; Bradshaw *et al.*, 2015; Lamas *et al.*, 1998; Lemke *et al.*, 1989; Linde *et al.*, 2003].

Durch die Verwendung von neuen Technologien in der biomedizinischen Wissenschaft können immer wieder neue potentielle Behandlungsmöglichkeiten für Patienten aufgezeigt und nutzbar gemacht werden. So haben mehrere Publikationen gezeigt, dass durch die kombinierte Anwendung von Gold-Nanotransducern (Gold-Nanowandler) und naher Infrarotstrahlung, neuronale Netzwerke so stimuliert werden können, dass ihre Aktivität in Form von Aktionspotentialen gezielt erhöht oder verringert werden kann. Ein möglicher biomedizinischer Einsatz dieser photothermischen Stimulation kann möglicherweise bei Erkrankungen wie Epilepsie und Parkinson erfolgen [Eom *et al.*, 2014; Genchi *et al.*, 2017; Yoo *et al.*, 2014].

Es ist dabei naheliegend die Möglichkeiten der photothermischen Stimulation auch bei weiteren elektrisch erregbaren Zellen wie Kardiomyozyten anzuwenden und zu erproben. Die Motivation im Rahmen dieser Dissertation war es eine Alternative zur weit verbreiteten invasiven Technik der elektrischen Stimulation von Kardiomyozyten zu entwickeln. Dies auf Grundlage von photothermischer Stimulation, durch die kombinierte Anwendung von NIR-Bestrahlung und Behandlung mit Gold-Nanotransducern in Form von Gold-Nanostäbchen (Gold-Nanorods, GNRs). Das Ziel ist es mit den Analysen und Resultaten dieser Arbeit, das Potential und die Möglichkeiten dieser Technik an *in vitro* Netzwerken aus humanen Kardiomyozyten aufzuzeigen und damit einen Ausblick für eine weniger invasive Behandlungsmöglichkeit neben der herkömmlichen elektrischen Stimulation durch Elektroden zu geben. So wären auch medizinische Anwendungen bei Krankheitsbildern wie Bradykardie, Tachykardie oder bei der Behandlung von Arrhythmien des Herzens denkbar.

6.2. Einleitung

6.2.1. Nahe Infrarotstrahlung

Die um 1800 von Friedrich Wilhelm Herschel entdeckte elektromagnetische Infrarotstrahlung wird in drei Spektralbereiche unterteilt, nämlich nahe (NIR), mittlere (MIR) und ferne (FIR) Infrarotstrahlung (Tabelle 16). Die ferne Infrarotstrahlung hat einen Wellenlängenbereich von 50 μm bis 1000 μm , der Bereich der mittleren Infrarotstrahlung umfasst den Wellenlängenbereich von 3 μm bis 50 μm . Die hier verwendete nahe Infrarotstrahlung hat einen Wellenlängenbereich von 0,78 μm bis 3 μm und ist nochmal unterteilbar in den Infrarot A (0,78 μm - 1,4 μm) und Infrarot B (1,4 μm - 3 μm) Bereich. Der Infrarot C-Bereich (3 μm - 1000 μm) umfasst hingegen die mittlere und ferne Infrarotstrahlung. Die Eindringtiefe der emittierten elektromagnetischen NIR-Strahlung liegt am Beispiel von Hautgewebe bei ca. 3 mm und erreicht somit die Subcutis [Avci *et al.*, 2013; Barolet, 2008; Lyu *et al.*, 2016; Ruggiero *et al.*, 2016; Wilson *et al.*, 1986].

Diese Eindringtiefe, die je nach genutzter Wellenlänge und Gewebetyp variiert, ermöglicht in kombinierter Anwendung mit GNRs eine gezielte lokale photothermische Erhitzung von Zellen und Gewebe was ein großes Potential für ein breites Spektrum an medizinischen Anwendungen bietet (Kapitel 6.2.2) [Avci *et al.*, 2013; Genchi *et al.*, 2017; Pérez-Juste *et al.*, 2005].

Tabelle 16: Spektralbereiche der Infrarotstrahlung. Die Infrarotstrahlung wird in nahes, mittleres und fernes Infrarot unterteilt. Wobei nahes Infrarot nochmals in die Spektralbereiche Infrarot A und B unterteilt wird. Hingegen kann das mittlere und ferne Infrarot als Infrarot C zusammengefasst werden [Glaser, 2012; Pfützner, 2012].

Bezeichnung	Abkürzung	Wellenlängen in μm	
Nahes Infrarot	NIR	IR-A	0,78 – 1,4 μm
		IR-B	1,4 – 3 μm
Mittleres Infrarot	MIR	IR-C	3 – 50 μm
Fernes Infrarot	FIR	IR-C	50 – 1000 μm

Die alleinige Verwendung von NIR-Strahlung wird schon jetzt in der Medizin angewendet. Medizinische Behandlungsansätze, bei denen man sich die NIR-Strahlung – beschrieben als *Low-Level-Lasertherapie* (LLLT) – zunutze machen möchte, sind z.B. eine verbesserte Wundheilung und eine Verbesserung in der Schmerztherapie [Eells *et al.*, 2004; Hamblin *et al.*, 2006; Whelan *et al.*, 2001].

Die medizinische Wirkung von alleiniger NIR-Strahlung wird jedoch rege und kontrovers diskutiert. Die mögliche Wirkungsweise ist dabei wissenschaftlich nicht gesichert, parallel zeigen diverse Publikationen kein positives therapeutisches Ergebnis [Chen *et al.*, 2011; Chung *et al.*, 2012; Hamblin *et al.*, 2006].

Bei der medizinischen Anwendung von NIR wird angenommen, dass die Strahlung biochemische und zelluläre Effekte hervorruft. Der Fokus liegt hierbei auf den Mitochondrien, wo z.B. mögliche Auswirkung auf die Enzymaktivität, die Adenosintriphosphat-Synthese, das mitochondriale Membranpotential und die Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) angenommen werden [Amat *et al.*, 2006; König, 2016].

Die allgemeine Annahme ist, dass Enzyme aus der Superfamilie der Häm-Kupfer-Oxidase (Bsp. Cytochrom-C-Oxidase) NIR-Strahlung absorbieren und so die Enzymaktivität steigern. Die Folge davon ist eine zentrale Wirkung auf die Atmungskette der Mitochondrien, was wiederum über eine Steigerung des mitochondrialen Membranpotentials die Adenosintriphosphat-Synthese begünstigt, aber auch zur Entstehung von ROS führt [Amat *et al.*, 2006; Karu, 2008; Karu, 2010; König, 2016; Pastore, 2000; Zastrow *et al.*, 2009].

Während die Wirkungen von NIR Strahlung auf Enzyme noch nicht vollständig verstanden ist und wissenschaftlich kontrovers diskutiert wird, gilt die Wirkung von NIR-Strahlung als Ursache für lokale Temperaturerhöhungen als sicher [Barolet *et al.*, 2016; Eliasson *et al.*, 2015; Skjöldebrand, 2001; Zastrow *et al.*, 2009].

Durch Absorption der Strahlung werden die Molekülschwingungen (Molekülvibrationen/-rotationen), also die periodischen Bewegungen der benachbarten Atome in Molekülen verändert, wodurch Hitze entsteht [Eliasson *et al.*, 2015; Skjöldebrand, 2001].

6.2.2. Oberflächenplasmonresonanz von Gold-Nanopartikeln und ihre Anwendung

In der Medizin gewinnen Nanomaterialien aus Gold, wie z.B. GNRs in Verbindung mit naher Infrarotstrahlung zunehmend an Bedeutung. Sie bieten neue und effektive Werkzeuge für die potentielle Behandlung diverser Krankheitsbilder. Hierfür macht man sich die besonderen physikalischen, chemischen und optischen Eigenschaften der GNRs zunutze. Anwendungsgebiete sind dabei unter anderem die Stimulation von elektrisch erregbaren Zellen wie Neuronen, gezielter Medikamententransport und -abgabe im Körper, sowie die Zerstörung von Tumorgewebe mit GNRs welche mit Antikörpern konjugiert sind. In der Krebstherapie ermöglicht die Verwendungen von GNRs in Kombination mit NIR eine gezielte Zerstörung durch lokale photothermische Erhitzung [Genchi *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2006; Pérez-Juste *et al.*, 2005].

Bei den genannten potentiellen Anwendungsgebieten ist jeweils die Resonanzabsorption der GNRs von zentraler Bedeutung, eine optische Eigenschaft, die zur gezielten lokalen Erhitzung genutzt werden kann. Durch die Oberflächenplasmonresonanz der GNRs erfolgt dabei eine Umwandlung der NIR-Strahlungsenergie in einen lokalen Wärmeeintrag. Die elektro-

magnetische NIR-Strahlung versetzt bei diesem Prozess die Valenzelektronen der GNRs in eine kohärente Oszillation. Durch diese sogenannte Oberflächenplasmonresonanz entsteht lokale Wärme (Abbildung 30) [Baffou *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2009].

Dabei ist die Polarisierbarkeit eines bestimmten Nanopartikels abhängig von verschiedenen Faktoren mit jeweils unterschiedlich starker Wirkung. Entscheidende Faktoren sind die Geometrie, die Materialzusammensetzung und die Oberflächenbeschichtung. Im Vergleich zu sphärisch plasmonischen Nanopartikeln die genau eine Resonanzwellenlänge aufweisen die vom Radius des Teilchens abhängt, haben GNRs aufgrund ihrer geometrischen Stäbchenform zwei Resonanzwellenlängen, eine transversale und eine longitudinale (Abbildung 30). Kleine Gold-Nanopartikel (~40 nm) ermöglichen im Vergleich zu größeren eine höhere Resonanzabsorption, bei einer gleichzeitigen geringeren Streuung der NIR-Strahlung [Halas, 2005; Hu *et al.*, 2006; Jain *et al.*, 2006].

Für eine Adhäsion der GNRs an die Plasmamembran der Kardiomyozyten, werden funktionalisierte GNRs verwendet, welche eine kationische Ladungsverteilung an ihrer Oberfläche aufweisen. Häufig werden hierfür Thiol-Polyethylenglycol-Amine (HS-PEG-NH²) verwendet, welche kovalent an die GNRs binden. Diese Funktionalisierung zeichnet sich durch eine hohe Stabilität der Verbindung und durch eine hohe Biokompatibilität aus. Aufgrund der gewebedurchdringenden, aber nicht-ionisierenden Eigenschaft der NIR-Strahlung, bietet sich der Einsatz von GNRs im Gewebe an [Atcha *et al.*, 2014; Avci *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011; Lyu *et al.*, 2016; Yoo *et al.*, 2014].

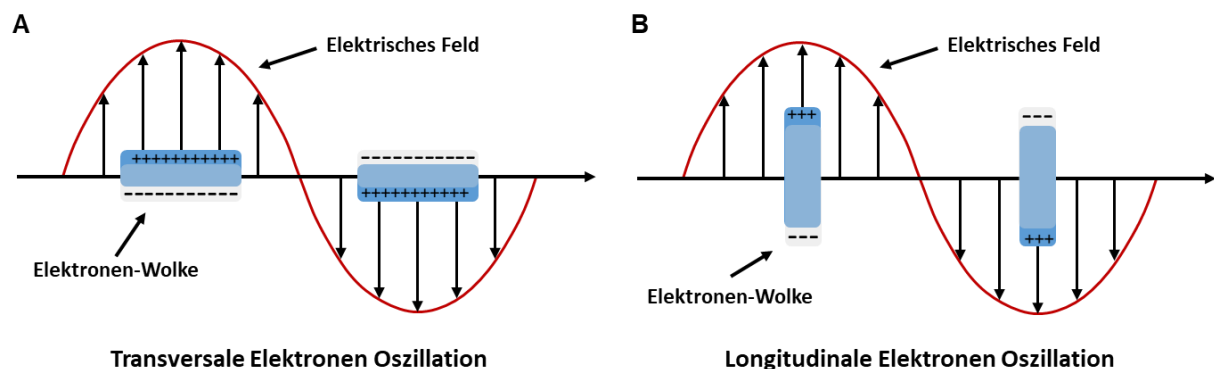


Abbildung 30: Schematische Darstellung oszillierender Elektronen-Wolken von Gold-Nanostäbchen. Das elektrische Feld (E) der nahen Infrarotstrahlung induziert eine kohärente Oszillation der Valenzelektronen der GNRs, bezeichnet als Oberflächenplasmonresonanz. GNRs haben im Vergleich zu sphärischen Nanopartikeln aufgrund ihrer geometrischen Form zwei Resonanzwellenlängen, eine transversale (A) und eine longitudinale (B). Modifizierte Abbildung nach Huang *et al.*, 2009.

6.2.3. Die inhibierende Wirkung von Fluoxetin auf TREK-1 und weitere Membranproteine

Das zur Klasse der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI) zählende Fluoxetin, ist ein in Deutschland verschreibungspflichtiges Antidepressivum, was global zur Behandlung von Depressionen eingesetzt wird. Nach der Patentierung durch *Eli Lilly and Company* und der Zulassung im Jahr 1987 durch die *Food and Drug Administration* (FDA), erfolgte die Markteinführung unter dem Handelsname *Prozac*[®] im Jahr 1988 in den USA. Nachfolgend erfolgte die Zulassung in vielen weiteren Ländern, so auch in Deutschland unter dem Namen *Fluctin*[®]. Seit dem Patentauslauf werden diverse Generika anderer Pharmahersteller vertrieben [Francisco *et al.*, 2009; Mayer, 2011].

Das breite Indikationsspektrum des Medikaments für die Behandlungen von Krankheitsbildern wie z.B. Zwangs- und Essstörungen, Panikattacken und Bulimie haben es zu einem der weltweit meistverordneten und somit meistverkauften Medikamenten gemacht [Spinks *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 1995].

Fluoxetin ist ein chirales Molekül, was in der therapeutischen Anwendung als Racemat eingesetzt wird. Dabei bindet das (S)-Enantiomer mit einer größeren Affinität an den Serotonin-Transporter als das (R)-Enantiomer (Abbildung 31) [Gompf, 2015; Wong *et al.*, 1985].

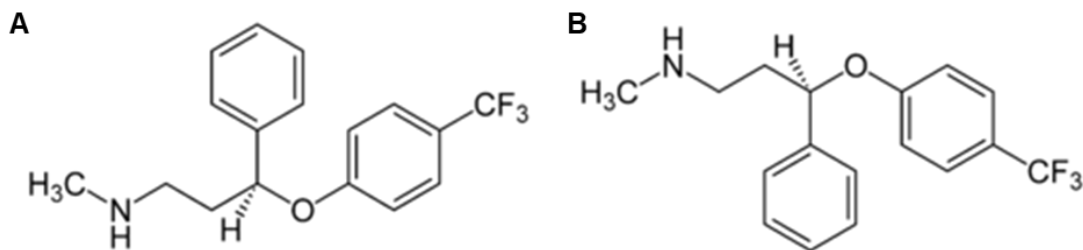


Abbildung 31: Strukturformel des Antidepressivums Fluoxetin. Das Medikament Fluoxetin ist ein chirales Molekül. Das (S)-Enantiomer (A) hat dabei eine etwas größere Affinität an den Serotonin-Rezeptor zu binden und diesen zu blockieren, als das (R)-Enantiomer (B) [Gompf, 2015; Wong *et al.*, 1985].

Die Hauptwirkungsweise von Fluoxetin bei der Behandlung von Depressionen besteht in der Inhibierung des Serotonin-Transporters (SERT, 5-HTT), welcher ungeblockt den Neurotransmitter Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) aktiv aus dem synaptischen Spalt zurück in die Präsynapse transportiert. Durch die Inhibierung der SERTs kommt es zu einem verlängerten Verbleib von Serotonin im synaptischen Spalt, was die Bindungsmöglichkeit von Serotonin an die Familie der Serotonin-Rezeptoren (5-HT₁ – 5-HT₇) der Postsynapse verlängert. Dies hat je nach Rezeptor-Subtyp eine exzitatorische oder inhibitorische neuronale Wirkung. [Hess, 2011; Hoyer *et al.*, 2002; Ni *et al.*, 1997; Rudnick, 2006].

Der selektive Rücktransport von Serotonin in die Präsynapse ist ein komplexer Prozess, wobei ein Symport an einen Antiport gekoppelt ist. Die extrazelluläre Bindung von Na^+ , Cl^- , K^+ und Serotonin an SERT – Monomer aus 12 Transmembrandomänen – induziert eine Konformationsänderung, bei dem der Symport und die Dissoziation ins Zytoplasma der Präsynapse erfolgt. Der gekoppelte Antiport transportiert das gebundene Kalium-Ion entgegen seines elektrochemischen Gradienten in den Extrazellularraum wo es dissoziiert und SERT in die ursprüngliche Konformation zurückkehrt [Rudnick, 1998; Rudnick, 2006].

Parallel zur Inhibierung der SERTs durch Fluoxetin, erfolgt die Inhibierung der Serotonin-Rezeptoren des Subtyps 5HT_{2C} . Im ungeblockten Zustand, wenn Serotonin an die 5HT_{2C} -Rezeptoren bindet, erfolgt eine Hemmung der Dopamin- und Noradrenalin-Freisetzung. Aus dieser komplexen Änderung der Neurotransmitterdynamik lässt sich die Wirkung von Fluoxetin auf das Essverhalten, welches zu Beginn angesprochen wurde, erklären [Alex *et al.*, 2005; Gobert *et al.*, 1999; Ni *et al.*, 1997].

Neben der Inhibierung dieser Transportprozesse inhibiert Fluoxetin weitere Proteine wie den K^+ -Auswärtsgleichrichter TREK-1 (*TWIK-related potassium channel-1*, $\text{K}_{2p2.1}$) der zur Familie der Kaliumkanäle mit 2 Porendomänen gehört. Das Gen *KCNK2* kodiert für unterschiedliche Isoformen des Kanals, dessen *splicing* Varianten durch Aneinanderlagerung von zwei Monomeren eine funktionale Kanalpore bilden (Homo- oder Heterodimer) (Abbildung 32). Die Kalium-Leckströme des Kanals haben einen direkten Einfluss auf das Ruhemembranpotential und somit auf die Erregbarkeit von Neuronen und Kardiomyozyten. Dabei ist TREK-1 vielseitig modulierbar durch: Spannungsänderungen, Hitze, Druck, Veränderung des pH, Lipide, Second Messenger aber auch Pharmaka wie Fluoxetin [Bockenbauer *et al.*, 2001; Goonetilleke *et al.*, 2012; Honoré, 2007; Rinné *et al.*, 2014].

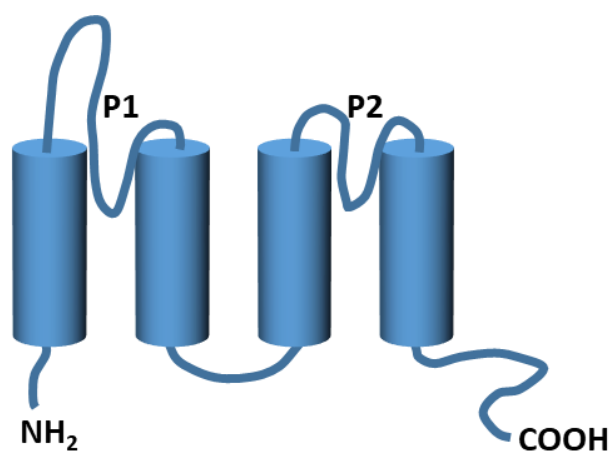


Abbildung 32: Schematische Darstellung einer TREK-1 Untereinheit. Der divers modulierbare K^+ -Auswärtsgleichrichter TREK-1 gehört zur Familie der Kaliumkanäle mit 2 Porendomänen (P1, P2). Die funktionale Ionenleitende Kanalpore wird durch eine Zusammenlagerung von zwei Untereinheiten gebildet. Das spannungsabhängige *Gating* ist über den C-Terminus steuerbar (COOH). Modifizierte Abbildung nach Honoré *et al.*, 2007.

Der Kanal wird im Gehirn, im Darm und im Herz exprimiert und spielt durch seine komplexe Modulierbarkeit in einer Reihe von Krankheitsbildern wie Depression, Epilepsie, Schmerzen und Ischämie eine Rolle. Auch in der Anästhesie ist der Kanal ein Ziel von Medikamenten [Alloui *et al.*, 2006; Decher *et al.*, 2017a; Decher *et al.*, 2017b; Fink *et al.*, 1996; Goonetilleke *et al.*, 2012; Heurteaux *et al.*, 2004; Heurteaux *et al.*, 2006; Kisselbach *et al.*, 2014; Medhurst *et al.*, 2001; Patel *et al.*, 1999; Schmidt *et al.*, 2014; Talley *et al.*, 2001].

Darüber hinaus wird TREK-1 in neueren Veröffentlichungen eine entscheidende Rolle bei der Herzrhythmuskontrolle und bei der Bildung von Arrhythmien zugewiesen [Decher *et al.*, 2017a; Goonetilleke *et al.*, 2012; Lugenbiel *et al.*, 2017].

TREK-1 zeigt ein spannungs- und zeitabhängiges *Gating*, besitzt aber anders als spannungsabhängige Kv-Kanäle keinen Spannungssensor in Form einer positiv geladenen Transmembrandomäne. In mehreren Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass die C-terminale Domäne einen Einfluss auf das spannungs- und zeitabhängige *Gating* des Kanals hat. Im Mittelpunkt steht hierbei die Phosphorylierung des C-terminal lokalisierten Serin333 durch die Proteinkinase A. Darüber hinaus wird von einem weiteren Mechanismus ausgegangen, der die Spannungsabhängigkeit beeinflusst [Bockenbauer *et al.*, 2001; Honoré, 2007; Maingret *et al.*, 2002].

Wichtig für die vorliegende Arbeit ist, dass die Offenwahrscheinlichkeit des Kanals auch durch Temperaturerhöhungen gesteigert werden kann, was zwangsläufig zu einem erhöhten Kaliumausstrom führt und somit einer neuronalen oder kardialen Erregbarkeit entgegenwirkt. Die größten Effekte wurden bei einer Temperaturerhöhung auf 42°C beobachtet. Die Temperaturabhängigkeit des Kanals scheint nicht alleine eine Funktion des Kanalproteins zu sein, sondern bedarf der Intaktheit der Zelle in der er funktioniert. Es wird angenommen, dass die Interaktion des Kanalproteins mit dem Zytoskelett für die Temperaturempfindlichkeit mitverantwortlich ist [Kang *et al.*, 2005; Lauritzen *et al.*, 2005; Maingret *et al.*, 2000].

Der Kanal ist auch durch mechanische Stimulation oder Veränderungen des intra- oder extrazellulären Drucks modulierbar. So wird durch einen extrazellulären Unterdruck oder einen intrazellulären Überdruck die Öffnung des Kanals begünstigt. Deshalb führt auch die Kontraktion von Kardiomyozyten, welche unmittelbar nach der Generierung des Aktionspotentials erfolgt, zu einer vermehrten Offenwahrscheinlichkeit des Kanals. Auch die Dicke und Zusammensetzung der Plasmamembran spielt bei der Regulation der Kanalaktivität eine Rolle und trägt zur Modulation bei. So wurde gezeigt, dass TREK-1 durch die Lipidumgebung in Form von mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder Lysophospholipide modulierbar ist. Als ein weiterer relevanter Faktor für die Modulation der Kanalaktivität wurde der cytoplasmatische pH identifiziert. Eine Verringerung des intrazellulären pH-Wertes bewirkt eine Erhöhung der

Offenwahrscheinlichkeit von TREK-1 [Decher *et al.*, 2017a; Fink *et al.*, 1996; Honoré *et al.*, 2002; Lesage *et al.*, 2000; Maingret *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 1998].

Neben der direkten Modulation des TREK-1 Kanals durch chemische und physikalische Faktoren muss an dieser Stelle auch noch die Regulation durch G-Protein-gekoppelte Membranrezeptoren genannt werden. Je nach Rezeptortyp bewirken diese Proteine eine Inhibierung oder eine Aktivierung von TREK-1, die über unterschiedliche Second Messenger-Pfade vermittelt wird [Fink *et al.*, 1996; Honoré, 2007].

Von pharmakologischer Seite kann TREK-1 durch Fluoxetin inhibiert werden, was im Rahmen dieser Arbeit erfolgt ist. Die Wirkungsweise von Fluoxetin ist nicht spannungsabhängig, weshalb davon auszugehen ist, dass der Block außerhalb der Kanalpore erfolgt [Honoré, 2007; Kennard *et al.*, 2005].

6.3. Ergebnisse zur photothermischen Stimulation von humanen Kardiomyozyten

6.3.1. Bestimmung der Flächenleistungsdichte der NIR-Laser-Diode

Vor der Durchführung der photothermischen Stimulation der Zellnetzwerke, erfolgte die Bestimmung der maximalen Flächenleistungsdichte der NIR-Strahlung, welche auf die humanen Kardiomyozyten und die GNRs wirkt.

Dabei wurde über den Laser-Dioden-Controller der Eingangsstrom der Laser-Diode von 0 bis 2000 mA in Schritten von 100 mA erhöht (Abbildung 33). Die Detektion der Leistung erfolgte durch den Sensor S302C der Firma Thorlabs und die Ausgabe der gemessenen Werte mit dem Leistungsmessgerät PM100USB der gleichen Firma (Tabelle 4). Bei einem Eingangsstrom von 2000 mA lag die maximale Leistung der Laser-Diode LD830-ME2W, der Firma Thorlabs Inc. (Tabelle 10) bei 596 mW. Dieser Wert bezieht sich auf eine Expositionsfläche von 14 mm². Nachfolgend wurde die Flächenleistungsdichte unter Verwendung von Gleichung 5 bestimmt, sie ergibt sich aus dem Quotienten der Leistung (P) und der exponierten Fläche (A). Bei allen weiteren Versuchen mit photothermischer Stimulation wurde die maximale Flächenleistungsdichte von 42,57 mW/mm² angewendet.

$$\text{Flächenleistungsdichte} = \frac{W}{A} \quad (\text{Gleichung 5})$$

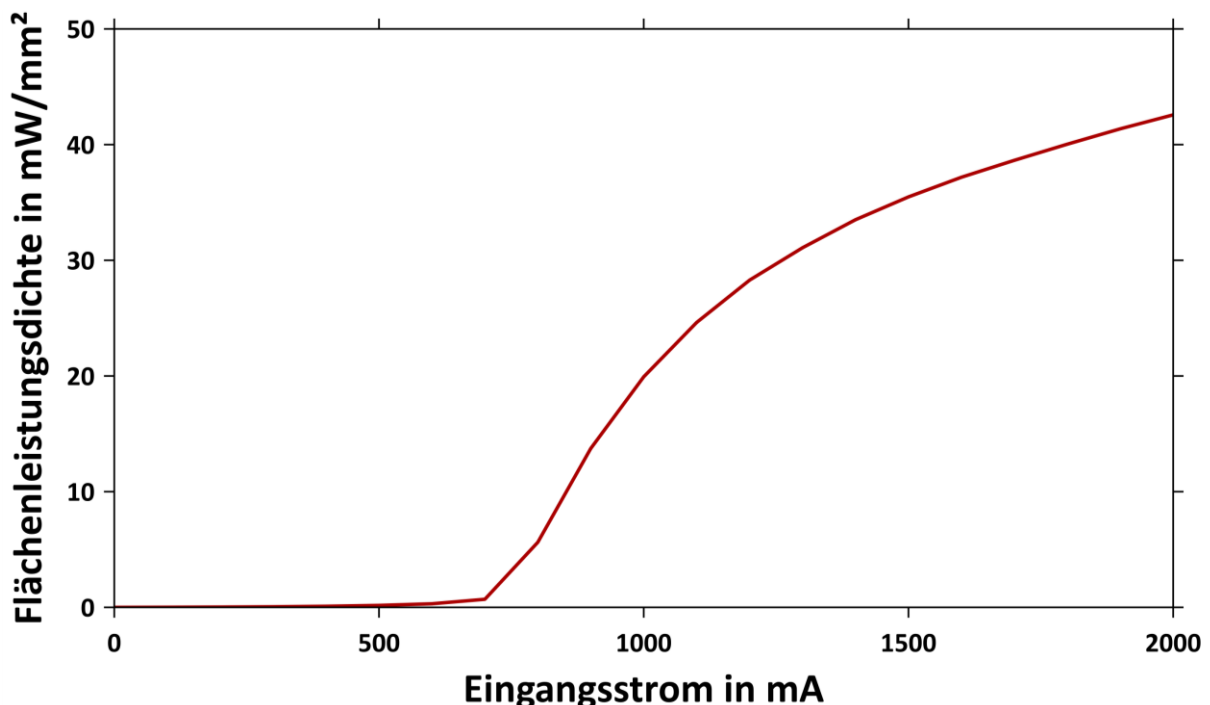


Abbildung 33: Bestimmung der maximalen Bestrahlungsleistung der NIR-Laser-Diode. Der Graph zeigt die Werte der Flächenleistungsdichte (mW/mm²) der NIR-Diode in Relation zum Eingangsstrom (mA) des Laserdioden-Controllers. Die Bestimmung der Flächenleistungsdichte anhand von Gleichung 5 ermöglichte die gewünschte Wahl der Bestrahlungsleistung durch Einstellen des Eingangsstroms über den Laserdioden-Controller. Die maximale Stromstärke lag bei 2000 mA und führt zu einer Flächenleistungsdichte von 42,57 mW/mm². Die emittierte Wellenlänge der Laser-Diode betrug 829 nm.

6.3.2. Bestimmung des Temperaturanstieges im Medium durch photothermische Stimulation

Um den Temperaturanstieg im Zellmedium im Bereich des Elektrodenfeldes auf Zellhöhe quantifizieren zu können erfolgten Temperaturmessungen über einen Zeitraum von 4 Minuten. Dabei gab es zwei verschiedene Versuchsbedingungen, bei denen zum einen die Auswirkung ausschließlich von NIR-Bestrahlung und zum anderen die Auswirkung von NIR-Bestrahlung kombiniert mit einer GNR-Behandlung ($10 \mu\text{g/ml}$) untersucht wurde. Bei der ausschließlichen Verwendung von NIR-Strahlung erfolgte bereits nach einer Expositionszeit von 5 Sekunden ein Temperaturanstieg um $2,32^\circ\text{C}$, die Temperatur-Sättigung erfolgte nach ca. 60 Sekunden, wobei der maximale Temperaturanstieg bei $4,60^\circ\text{C}$ lag (Abbildung 34).

Die kombinierte Anwendung von NIR-Strahlung und GNR-Behandlung erzielte nach 5 Sekunden NIR-Exposition einen Anstieg der Temperatur um $4,64^\circ\text{C}$, die Sättigung der Temperatur erfolgte nach ca. 120 Sekunden NIR-Exposition. Der maximale Temperaturanstieg lag bei $10,18^\circ\text{C}$. Bei beiden Versuchsbedingungen erfolgte eine rasche Abkühlung des Mediums nach Abschalten des Stimulus innerhalb von 160 Sekunden.

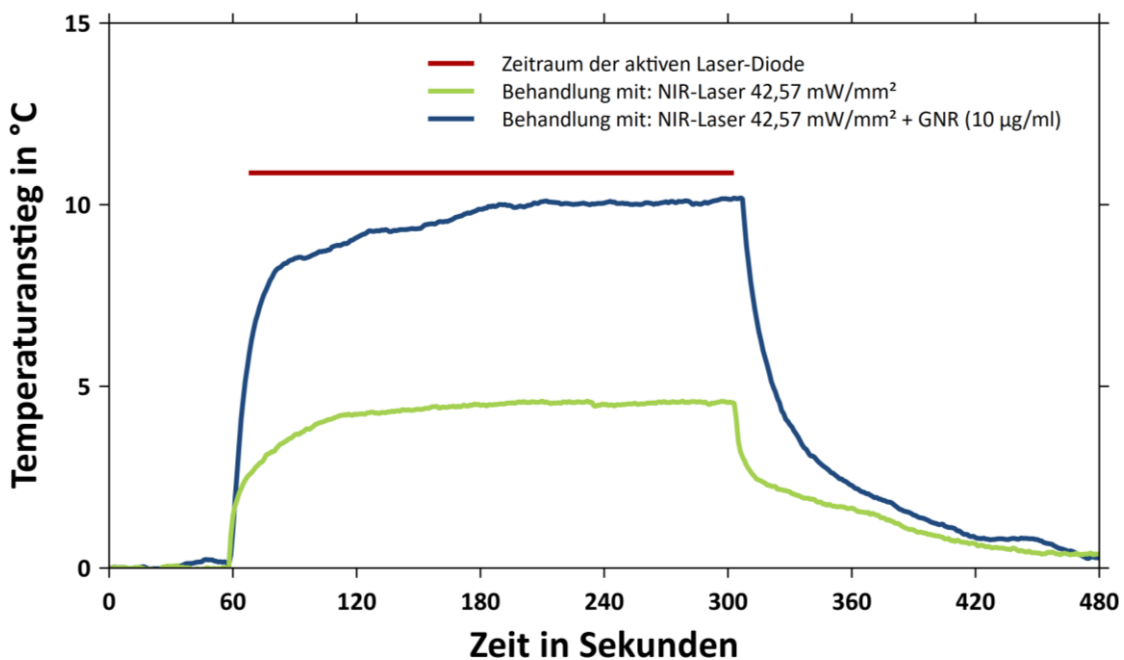


Abbildung 34: Bestimmung des Temperaturanstiegs im Zellmedium während der NIR-Exposition. Die Abbildung zeigt die Veränderung der Temperatur des Zellmediums über die Zeit. Es wurde dabei die Auswirkung alleiniger NIR-Bestrahlung und NIR-Bestrahlung kombiniert mit der Behandlung von GNR ($10 \mu\text{g/ml}$) auf die Temperatur des Mediums untersucht. Die Ausgangstemperatur lag dabei jeweils bei 37°C . Bei ausschließlicher NIR-Bestrahlung (grün), erfolgte eine Sättigung der Temperatur nach ungefähr 120 Sekunden (NIR-Bestrahlungszeit 60 s). Der maximale Temperaturanstieg beträgt dabei $4,60^\circ\text{C}$. Die Sättigung der Temperatur bei NIR-Bestrahlung kombiniert mit der GNR-Behandlung (blau), erfolgt nach ungefähr 180 Sekunden (NIR-Bestrahlungszeit 120 s). Der maximale Temperaturanstieg beträgt $10,18^\circ\text{C}$. Die kombinierte Behandlung bewirkt einen 2,2-fachen Anstieg der maximalen Temperatur im Vergleich zur ausschließlichen Behandlung mit NIR-Strahlung. Für die Messungen wurde die Kavität eines MEA-Chips (60MEA200/30iR-TiN-Gr) mit 1,5 ml Zellkulturmedium befüllt. Die emittierte Wellenlänge der Laser-Diode lag bei 829 nm, die Flächenleistungsdichte betrug $42,57 \text{ mW/mm}^2$. Die Temperaturveränderung wurde unter Verwendung des Temperatursensors OTG-A-10-62ST-1.5PTFE-XN-4PIT-L unmittelbar über dem Elektrodenfeld gemessen.

6.3.3. Auswirkung photothermischer Stimulation auf humane Kardiomyozyten

Die Resultate der photothermischen Stimulation humaner Kardiomyozyten zeigen, dass bereits durch die ausschließliche Bestrahlung mit NIR ein Anstieg der Schlagrate erfolgte (Abbildung 35B,C). Nach 2-minütiger NIR-Exposition wurde ein maximaler Anstieg der Schlagrate um 25,39 Prozentpunkte erreicht. 2 Minuten nach Ende der NIR-Bestrahlung erreichte die Schlagrate wieder den Ausgangswert von vor der Exposition. Es konnten dabei keine statistisch signifikanten Unterschiede im Vergleich mit allen weiteren Versuchsgruppen festgestellt werden.

Bei kombinierter Anwendung von NIR-Bestrahlung und der Behandlung mit GNRs, war ein gegensätzliches elektrophysiologisches Verhalten deutlich zu erkennen, was sich in zwei Muster unterteilen ließ (Abbildung 35A,B,C). Dabei reagierten 11 von 18 Kulturen bei kombinierter Exposition mit einer statistisch hoch signifikanten Verringerung der Schlagrate. Gegensätzlich hierzu verhielten sich 7 der 18 Kulturen, sie reagierten auf die gleiche Behandlung mit einer Erhöhung der Schlagrate, welche auch ebenfalls statistisch hoch signifikant war. Auf Grund dieser Gegensätzlichkeit erfolgte die Unterteilung in zwei Populationen, mit einer separaten Analyse (Abbildung 35A). Zur Population 1 wurden Kulturen gerechnet, die bei kombinierter NIR- und GNR-Behandlung eine Verringerung der Schlagrate zeigten. Dabei musste die Schlagrate über den Zeitraum der 3-minütigen Bestrahlung entweder 3-mal unter die 100% Schwelle fallen oder mindestens 1-mal einen Wert von $\leq 5\%$ angenommen haben. War dies nicht der Fall, erfolgte die Zuordnung zur Population zwei, bei der alle Zellkulturen über den Bestrahlungszeitraum Werte von $\geq 100\%$ angenommen haben.

Die Analyse der Schlagrate für die mit NIR und GNR behandelte Population 1 zeigte eine unmittelbare und massive Verringerung der Schlagrate über den gesamten Zeitraum der NIR-Bestrahlung (Abbildung 35B,C). Die maximale Verringerung der Schlagrate um 93,21 Prozentpunkte auf einen Wert von 6,79 % erfolgte nach 3 Minuten NIR-Exposition. Diese Verringerung ist im Vergleich mit allen weiteren Versuchsgruppen statistisch hoch signifikant. Zwei Minuten nach Ende der NIR-Bestrahlung erreichte die Schlagrate das gleiche Niveau wie vor der Behandlung. Eine genauere Analyse der Abnahme der Schlagrate zeigt, dass die Verringerung der Schlagrate mit dem Auftreten von Arrhythmien, als auch mit einer Verringerung der Amplitudengröße einhergeht (Abbildung 36). Bei weiterer Bestrahlung reagierte das gesamte Netzwerk aus Kardiomyozyten mit einer reversiblen Inhibierung der Feldpotentiale. Nach Beenden der NIR-Bestrahlung erholte sich die elektrische Charakteristik des Zellnetzwerkes und zeigt Schlagraten die in ihrer Frequenz wie auch in der Amplitudengröße der Feldpotentiale das gleiche Niveau erreichten wie vor der NIR-Exposition.

Gegensätzlich zur 1. Population verhielt sich die Schlagrate der 2. Population der mit NIR und

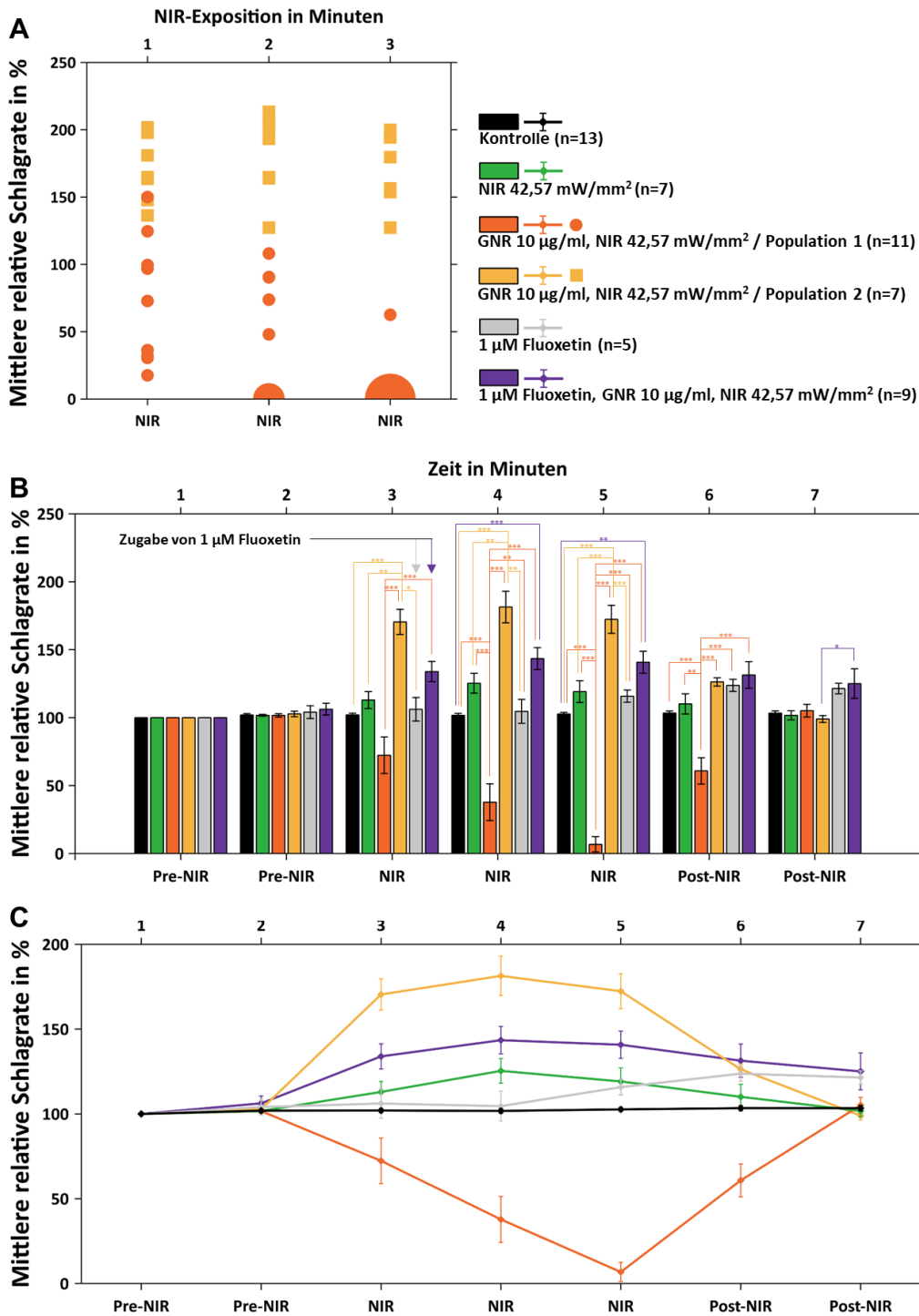


Abbildung 35: Photothermische Stimulation hat eine direkte Auswirkung auf die Schlagrate von humanen Kardiomyozyten. Die photothermische Stimulation durch ausschließliche NIR-Bestrahlung bewirkt einen geringen Anstieg der Schlagrate über den Expositionszeitraum von 3 Minuten. Die kombinierte Behandlung der Kardiomyozyten mit NIR und GNRs zeigt eine Unterteilbarkeit in zwei Populationen, die sich gegensätzlich verhalten. Population 1 zeigt unter NIR-Bestrahlung eine massive Verringerung der Schlagrate. Gegenätzlich hierzu zeigt Population 2 eine starke Zunahme der Schlagrate. Die alleinig mit Fluoxetin behandelte Versuchsgruppe, bei der keine NIR-Bestrahlung erfolgte, zeigt mit der Zugabe von Fluoxetin eine stetige Zunahme der Schlagrate. Die Versuchsgruppe bei der eine kombinierte Behandlung mit Fluoxetin, NIR, GNRs erfolgte, zeigt über den gesamten Zeitraum der NIR-Bestrahlung eine stark erhöhte Schlagrate. Die Kontrollgruppe zeigt ein konstantes Niveau über den gesamten Versuchszeitraum. Die Mittelwerte \pm SEM wurden aus der Anzahl der verwendeten MEA-Chips (n) jeder Versuchsgruppe berechnet. Die statistische Signifikanz zwischen den Versuchsgruppen wurde mittels ANOVA-Tests überprüft. Das Niveau der statistischen Signifikanz wurde durch Verwendung des Scheffé Post-hoc-Tests überprüft. Signifikanzniveaus: $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ sehr signifikant; $p \leq 0,001$ hoch signifikant. Angaben zum Niveau der statistischen Signifikanz innerhalb der Versuchsgruppen waren ebenfalls signifikant bis hoch signifikant, werden aber nicht aufgeführt.

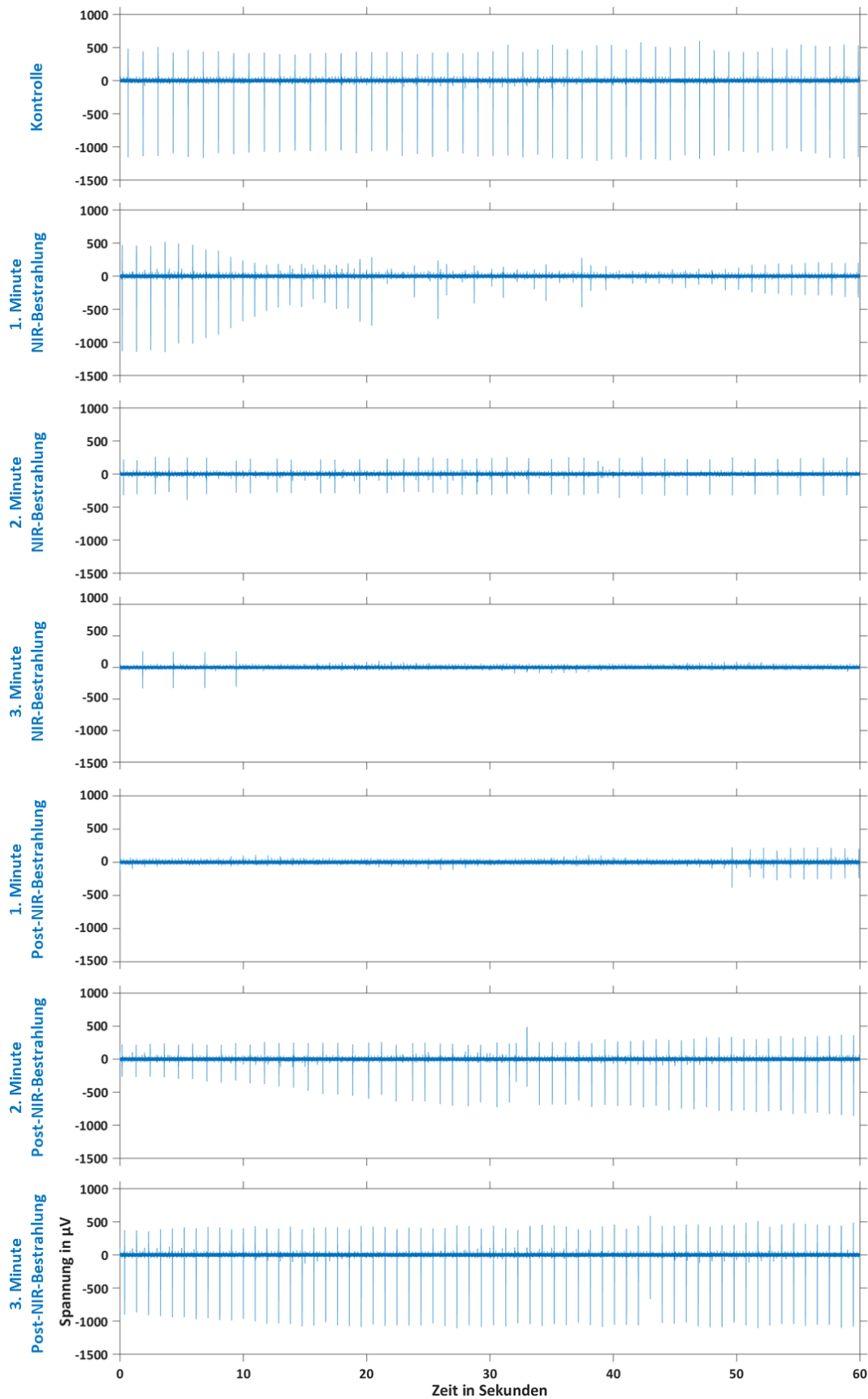


Abbildung 36: Photothermische Stimulation führt zu Arrhythmien und bewirkt die Inhibierung von Feldpotentialen bei humanen Kardiomyozyten. Die photothermische Stimulation durch NIR-Bestrahlung kombiniert mit einer GNR-Behandlung induziert reversible Arrhythmien und eine Verringerung der Amplitudengröße bei Netzwerken aus humanen Kardiomyozyten. Bei fortgeführter NIR-Bestrahlung erfolgt die reversible Inhibierung der Feldpotentiale. Nach der NIR-Bestrahlung erreichen die Amplituden das gleiche Niveau wie vor der NIR-Exposition.

GNR behandelten Kardiomyozyten. Hier erfolgte unmittelbar mit dem Einsetzen der NIR-Bestrahlung eine zeitgleiche massive Zunahme der Schlagrate über den gesamten Zeitraum der NIR-Bestrahlung (Abbildung 35B,C). Der maximale Anstieg der Schlagrate um 81,40 Prozentpunkte auf einen Wert von 181,40 % erfolgte nach 2 Minuten NIR-Bestrahlung. Auch in diesem Fall war der Effekt reversibel, schon 2 Minuten nach Beendigung der Bestrahlung erreichte das Netzwerk wieder das gleiche Niveau wie vor Beginn der Bestrahlung. Im direkten Vergleich mit den weiteren Versuchsgruppen, ausgenommen die Gruppe, welche kombiniert mit Fluoxetin, NIR und GNRs behandelt wurde, ist die Zunahme der Schlagrate unter Einfluss von kombinierter NIR/GNR Behandlung statistisch hoch signifikant.

Die Analyse der Schlagrate von Kardiomyozyten bei denen die Kulturen ausschließlich mit Fluoxetin in einer Konzentration von 10 μ M behandelt wurden, zeigte eine verzögerte Reaktion auf die Fluoxetin Behandlung (Abbildung 35B,C). Erst in der 5. Minute ergab sich ein geringer und andauernder Anstieg in der Schlagrate, welcher in der 6. Minute ein Maximum von 123,75% erreichte. Dieser Effekt ist jedoch im Vergleich mit der Kontrollgruppe statistisch nicht signifikant.

Die Versuchsgruppe bei der eine kombinierte Behandlung mit Fluoxetin, NIR und GNRs erfolgte, zeigte in der Analyse einen direkten Anstieg der Schlagrate nach Fluoxetin Zugabe und gleichzeitiger NIR-Behandlung (Abbildung 35B,C). Die größte Zunahme der Schlagrate erfolgte in Minute 4, mit einem Anstieg um 43,48 Prozentpunkte auf einen Wert von 143,48%. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe ist dieser Wert statistisch hoch signifikant. Nach Beendigung der NIR-Bestrahlung erfolgte eine direkte Annäherung auf das Wertenniveau vor der NIR-Bestrahlung.

Die Analyse der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale zeigte ein anderes Bild. In keiner der Versuchsgruppen konnte ein Anstieg in der Ausbreitungsgeschwindigkeit registriert werden. Wenn eine Veränderung erfolgte, dann eine Verringerung der Signal-Propagation.

Bei der ausschließlichen Behandlung mit NIR, erfolgte eine reversible Herabsetzung der Ausbreitungsgeschwindigkeit während der Bestrahlung, welche jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 37A,B). Die maximale Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit lag bei 17,18 Prozentpunkten und einem Wert von 82,82% in der dritten Minute der NIR-Bestrahlung.

Bei Analyse der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Feldpotentialen im Zellnetzwerk unter Einfluss von kombinierter NIR/GNRs Behandlung wurden wiederum die oben definierten zwei Populationen getrennt betrachtet. Population 1 zeigte in Folge der Behandlung eine statistisch hoch signifikante und reversible Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit im Vergleich zu allen weiteren Versuchsgruppen in der 2. und 3. Minute der NIR-Bestrahlung (Abbildung 37A,B). Die maximale Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale

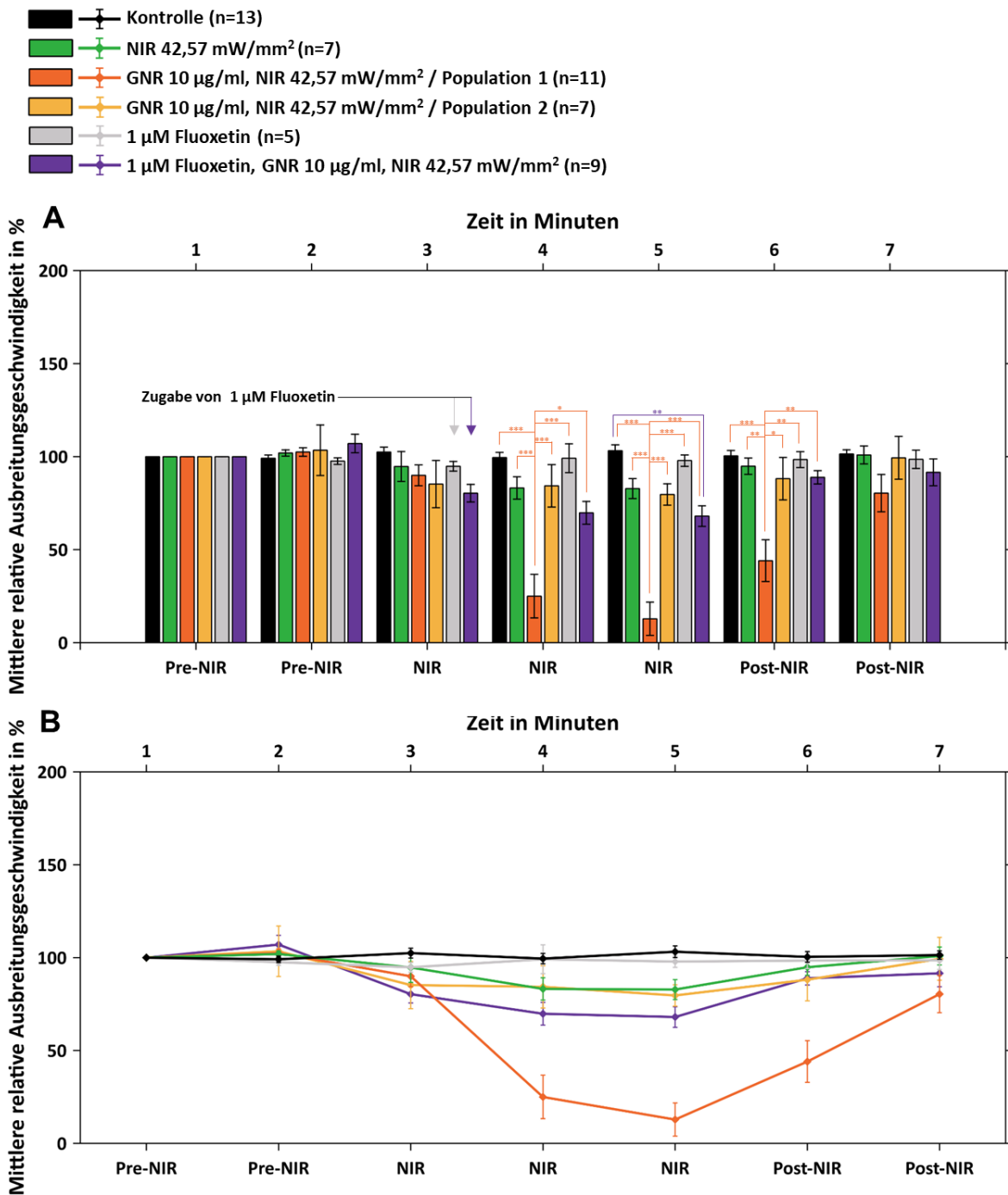


Abbildung 37: Photothermische Stimulation bewirkt eine Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Feldpotentialen bei humanen Kardiomyozyten. Die photothermische Stimulation durch ausschließliche NIR-Bestrahlung bewirkt eine geringe und reversible Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentialen über den NIR-Bestrahlungszeitraum. Bei der kombinierten Behandlung mit NIR und GNRs, wurde die anhand der Schlagratenentwicklung festgelegte Aufteilung in zwei Populationen beibehalten (Abbildung 35A). Population 1 zeigt unter NIR-Bestrahlung eine massive, aber reversible Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentialen. Die 2. Population verhält sich hierzu analog, zeigt jedoch eine deutlich abgeschwächte Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit, welche reversibel ist. Die alleinig mit Fluoxetin behandelte Versuchsgruppe, bei der keine NIR-Bestrahlung erfolgte, zeigt ein konstantes Niveau über die gesamte Messreihe und liegt damit auf einem Niveau mit der Kontrollgruppe. Die Versuchsgruppe bei der eine kombinierte Behandlung mit Fluoxetin, NIR und GNRs erfolgte, zeigt während der NIR-Bestrahlung eine geringe Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit, welche reversibel ist. Die Kontrollgruppe zeigt ein konstantes Niveau über den gesamten Versuchszeitraum. Die Mittelwerte \pm SEM wurden aus der Anzahl der verwendeten MEA-Chips (n) jeder Versuchsgruppe berechnet. Die statistische Signifikanz zwischen den Versuchsgruppen wurde mittels ANOVA-Tests überprüft. Das Niveau der statistischen Signifikanz wurde durch Verwendung des Scheffé Post-hoc-Tests überprüft. Signifikanzniveaus: $p \leq 0,05$ signifikant; $p \leq 0,01$ sehr signifikant; $p \leq 0,001$ hoch signifikant. Angaben zum Niveau der statistischen Signifikanz innerhalb der Versuchsgruppen waren ebenfalls signifikant bis hoch signifikant, werden aber nicht aufgeführt.

erfolgte in der 3. Minute der NIR-Exposition und lag bei einem Wert von 12,84 %. Auch in der 1. Minute nach Ende der NIR-Exposition ist die wieder angestiegene Ausbreitungsgeschwindigkeit im Vergleich mit den weiteren Versuchsgruppen hoch signifikant. In der 7. Minute hat sich die Ausbreitungsgeschwindigkeit mit einem Wert von 80,38 % schon an das Niveau, das vor Behandlung gemessen wurde angenähert.

Die 2. Population zeigte ebenso wie die 1. Population eine reversible Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit, welche jedoch wesentlich geringer ausfiel (Abbildung 37A,B). Dabei variierten die Werte geringfügig über den gesamten Zeitraum der NIR-Bestrahlung und lagen auf einem stabilen Niveau zwischen 85,22 % und 79,66 %.

Die ausschließliche Behandlung mit Fluoxetin hatte keine Auswirkung auf die Ausbreitungsgeschwindigkeit und lag über dem gesamten Versuchszeitraum auf einem konstanten Niveau, welches mit dem Niveau der Kontrollgruppe gleichzusetzen war (Abbildung 37A,B).

Die kombinierte Behandlung mit Fluoxetin, GNRs und NIR bewirkte eine reversible Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der humanen Kardiomyozyten-Netzwerke während der NIR-Bestrahlung (Abbildung 37A,B). Die Werte lagen während der 3-minütigen Exposition zwischen denen von Population 1 und Population 2, welche mit NIR und GNRs behandelt wurden. Der maximale Rückgang der Ausbreitungsgeschwindigkeit erfolgte unter diesen Bedingungen in der dritten Minute der NIR-Bestrahlung und lag bei 31,95 Prozentpunkten und ist im Vergleich mit der stabilen Kontrollgruppe statistisch sehr signifikant.

Insgesamt konnte festgestellt werden, dass durch photothermische Stimulation die Schlagrate, ebenso wie die Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale von Kardiomyozyten-Netzwerken statistisch signifikant moduliert werden konnten. Die Verwendung von Fluoxetin konnte dabei einer massiven Verringerung der Schlagrate und einer Inhibierung der Feldpotentiale durch photothermische Stimulation entgegenwirken.

7. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von nicht-ionisierender elektromagnetischer Strahlung auf *in vitro* Zellnetzwerke untersucht. Diese Art von Untersuchung ist von besonderer Bedeutung, da durch die fortschreitende globale Digitalisierung die Exposition der Bevölkerung durch nicht-ionisierende elektromagnetische Strahlung in Form von Mobilfunksignalen weiter zunimmt, ohne dass ihre Wirkung auf die menschliche Gesundheit vollständig geklärt ist [Cisco Systems Inc., 2017; Khoueiry *et al.*, 2018; Lin, 2016; Rennhoff *et al.*, 2016; Valentini *et al.*, 2007].

Die Anzahl der mobilen Endgeräte und deren Nutzungszeiten steigen dabei seit Jahrzehnten stetig. Dies führt unwillkürlich zum Ausbau der Netzinfrastruktur und somit zu einer dichteren Verteilung der Basisstationen, damit man dem großen Bedarf an mobiler Kommunikation gerecht werden kann. Dies führt zur Besorgnis und Verunsicherung in der Bevölkerung und bei den beruflichen Nutzergruppen von mobilen Kommunikationssystemen, wie auch im Falle von TETRA, dem Digitalfunk für Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben [Eggert, 2016; Lauff *et al.*, 2014; Wallace *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2012].

Die widersprüchliche Datenlage aus der Gesamtheit der bisherigen Publikationen in diesem Forschungsbereich trägt zur allgemeinen Verunsicherung bei. Die wissenschaftliche Diskussion über die möglichen Auswirkungen der elektromagnetischen Strahlung des Mobilfunks auf die menschliche Gesundheit wird weiter rege diskutiert und ist nach wie vor nicht abschließend geklärt [Ahlbom *et al.*, 2003; Apollonio *et al.*, 2013].

Aufgrund dieser unklaren Datenlage beschloss die *International Agency for Research on Cancer* der WHO im Jahr 2011 elektromagnetische Felder im Frequenzbereich des Mobilfunks als möglicherweise krebserzeugend für den Menschen einzustufen (*Group 2B, Possibly carcinogenic to humans*) [Baan *et al.*, 2011; International Agency for Research on Cancer - World Health Organization, 2013].

Dies verdeutlicht die Notwendigkeit und die Dringlichkeit von weiteren Untersuchungen zur Auswirkung von nicht-ionisierender elektromagnetischer Strahlung im Frequenzbereich des Mobilfunks auf zelluläre Prozesse. Und genau diese Frage steht im Zentrum dieser Arbeit.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde systematisch untersucht, ob elektromagnetische Bestrahlung mit dem digitalen Bündelfunkdienstes TETRA zu elektrophysiologischen Effekten bei neuronalen und kardialen *in vitro* Zellnetzwerken führen kann. Diese Fragestellung ist von besonderem Interesse, da auch die TETRA-Strahlung in der Diskussion steht mögliche Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit zu haben. Die Ergebnisse der bisher durchgeführten Studien werden rege diskutiert und zeichnen kein einheitliches Bild zur möglichen Auswirkung der TETRA-Strahlungen auf die menschliche Gesundheit [Barker *et al.*,

2007; Burgess *et al.*, 2016; Eggert *et al.*, 2015; Green *et al.*, 2005; Nieto-Hernandez *et al.*, 2011; Riddervold *et al.*, 2010; Sauter *et al.*, 2015; Wallace *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2012].

Der Fokus der bisher durchgeführten Studien lag häufig auf dem Gehirn und dem Herzen, also auf elektrisch stimulierbaren Organen und deren Zellen. Da bis dato keine elektrophysiologischen *in vitro* Untersuchungen erfolgt sind, bei denen mögliche Auswirkungen der TETRA-Strahlung unmittelbar auf neuronale und kardiale *in vitro* Netzwerke systematisch untersucht wurden, fand ich es erforderlich und zugleich spannend solche Versuche durchzuführen. Im Vergleich zu den vorherigen Untersuchungen, die größtenteils an ganzen Organismen durchgeführt wurden und zu widersprüchlichen Ergebnissen kamen, ist die Verwendung von *in vitro* Modellsystemen hilfreich, um mögliche Umwelt- oder Systemwirkungen zu reduzieren und somit eine klarere Analyse zu ermöglichen.

Im Zentrum der Untersuchungen in dieser Arbeit lag die Trägerfrequenz von 395 MHz von TETRA-Basisstationen. Die emittierte Strahlung von Basisstationen betrifft dabei nicht nur die Berufsgruppen die TETRA verwenden, wie z.B. die Polizei und Feuerwehr, sondern die gesamte Bevölkerung, was die besondere Relevanz der Studie unterstreicht. Die Auswirkung der Signale von mobilen TETRA-Endgeräten, welche hauptsächlich die beruflichen Nutzergruppen betrifft, wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. In den TETRA-Zellversuchen wurde die Trägerfrequenz von 395 MHz, TETRA-typisch mit 17,64 Hz gepulst. Diese Signalpulsung wurde in mehreren Publikationen mit Auswirkung auf die menschliche Gesundheit in Verbindung gebracht [Bawin *et al.*, 1976; Blackman *et al.*, 1980; Blackwell *et al.*, 1986; Green *et al.*, 2005; Merritt *et al.*, 1982; Myers *et al.*, 1981; National Radiological Protection Board, 2001; Shelton *et al.*, 1981; Wallace *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2012].

Vor den eigentlichen Zellexperimenten mussten zunächst die SARs der drei Leistungslevel durch numerische Simulationen und Temperaturmessungen bestimmt werden, welche durch die mobile TETRA-Basisstation generiert wurden. Dies war wichtig da die SARs in den Zellversuchen als zu vergleichende Maßeinheiten dienen.

Die Ergebnisse der numerischen Simulationen dienten zur Abschätzung der zu erreichenden SARs und ergaben für die drei Leistungslevel SARs von 1,01 W/kg, 2,05 W/kg und 2,46 W/kg, welche im Zentrum des MEA-Chips auf Zellhöhe bestimmt wurden (Tabelle 5, Abbildung 16D-F). Die Resultate aus Temperaturmessungen während der TETRA-Bestrahlungen, ergaben geringfügig höhere SARs von 1,17 W/kg, 2,21 W/kg und 2,66 W/kg (Abbildung 17, Tabelle 13). Die Deklaration der SARs für die Zellversuche erfolgte anhand der Ergebnisse aus den Temperaturmessungen, welche durch die real gemessenen Werte eine exaktere Bestimmung der SARs ermöglichten (Tabelle 14).

Es ist dabei wichtig zu erwähnen, dass die hier bestimmten SARs nicht direkt mit den SARs von

mobilen Endgeräten und von Mobilfunkstandards zu vergleichen sind. Bei den letztgenannten erfolgt anhand von Modellen eine Mittelung der SAR über 10 g Ersatzgewebe. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bestimmungen der SARs, erfolgte hingegen auf einer zellulären Ebene und richtete sich in ihrer Berechnung nach Merla *et al.* 2011 und Oster *et al.* 2016 [Merla *et al.*, 2011; Oster *et al.*, 2016; Schmid *et al.*, 2015].

Um die Auswirkung des Temperaturanstieges auf die neuronalen und kardialen Zellnetzwerke separat von der TETRA-Bestrahlung untersuchen zu können, wurden Messungen zur Quantifizierung des maximalen Temperaturanstiegs während der jeweiligen TETRA-Exposition durchgeführt und nachfolgend in weiteren Versuchen der alleinige Einfluss von moderaten Temperaturerhöhungen auf die Zellnetzwerke untersucht.

Die Quantifizierung des maximalen Temperaturanstiegs während den 15-minütigen TETRA-Befeldungen mit einer Trägerfrequenz von 395 MHz und SARs von 1,17 W/kg, 2,21 W/kg, 2,66 W/kg, welche mit 17,64 MHz gepulst und mit $\pi/4$ DQPSK moduliert wurden, ergaben eine Temperaturerhöhung für das geringste Leistungslevel von 0,047°C, für das mittlere Leistungslevel von 0,089°C und für das größte Leistungslevel von 0,124°C (Tabelle 15, Abbildung 18). Die gemessenen Temperaturanstiege beruhen dabei auf dem Mechanismus der dielektrischen Erwärmung (Kapitel 5.2.5). Dabei kommt es zu molekularen Reibungen durch oszillierende polare Moleküle wie z.B. Wasser-Molekülen, die sich am alternierenden elektromagnetischen Feld ausrichten und zum Wärmeeintrag durch die TETRA-Bestrahlung führen [Apollonio *et al.*, 2013; Independent Advisory Group on Non-ionising Radiation, 2012; International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, 1998; Persch, 1997; Pfeifer, 2007; Sheppard *et al.*, 2008].

Durch die erfolgten Temperatur-Expositionsversuche wurde schließlich die alleinige Auswirkung von moderaten Temperaturerhöhungen auf die neuronalen und kardialen Zellnetzwerke untersucht (Kapitel 5.3.3, Kapitel 5.3.5). Die Temperatur wurde dabei in Schritten von 0,1°C minutenweise von 37°C bis auf finale 37,5°C erhöht, um zu überprüfen, ob es zu thermischen Effekten bei den Kulturen kommt. Ist dies der Fall, muss eine entsprechende Temperaturgrenze definiert werden, um in den TETRA-Zellversuchen auch mögliche nicht-thermische Effekte untersuchen zu können. Dabei ist zu erwähnen, je höher der Energieeintrag durch die dielektrische Erwärmung ist, desto größer ist der Temperaturanstieg in den Zellnetzwerken. Hierbei kann es möglicherweise zu einer Überlagerung von möglichen nicht-thermischen Effekten, durch thermische Effekte kommen.

Die Temperatur-Expositionsversuche mit den neuronalen Netzwerken (Kapitel 5.3.3) zeigen, dass ein moderater Temperaturanstieg zu einer relativ konstanten Erhöhung der Spike- und Burstrate über die Zeit führt, welche jedoch im Vergleich mit dem konstanten Niveau der

unbehandelten Kontrolle statistisch nicht signifikant ist (Abbildung 19 A,B). Trotzdem ist eindeutig zu erkennen, dass die moderate Temperaturerhöhung im physiologischen Temperaturbereich, zu einer Steigerung der neuronalen Aktivität führt und dies bereits ab einer Erhöhung um $0,1^{\circ}\text{C}$. Somit ist festzustellen, dass ab einer Temperaturerhöhung von $\Delta T \geq 0,1^{\circ}\text{C}$ im physiologischen Temperaturbereich, thermische Effekte bei neuronalen Netzwerken zu erwarten sind. Damit war es erforderlich für die TETRA-Bestrahlungsversuche mit den neuronalen Netzwerken einen Grenzwert von $\Delta T \geq 0,1^{\circ}\text{C}$ zu deklarieren, um thermische Effekte ausschließen und alleinig auf nicht-thermische Effekte untersuchen zu können. Die Konsequenz daraus war, dass bei den neuronalen TETRA-Bestrahlungsversuchen mit den zwei Leistungslevel bzw. SARs von $1,17 \text{ W/kg}$ und $2,21 \text{ W/kg}$ gearbeitet wurde, welche beide bei einer 15-minütigen TETRA-Exposition der Kulturen unter dem gesetzten Temperaturgrenzwert blieben. Das größte Leistungslevel von $2,66 \text{ W/kg}$ wurde in diesen Versuchen nicht verwendet. Der gesetzte Grenzwert wurde bereits durch Schuderer *et al.* 2004 postuliert [Schuderer *et al.*, 2004].

Bei den untersuchten Parametern der Burstdauer und der Netzwerksynchronität konnten keine thermischen Effekte festgestellt werden, alle Werte sind auf einem Niveau mit den jeweiligen Kontrollen (Abbildung 19 C,D). Die Robustheit der Zellnetzwerke gegenüber moderaten Temperaturerhöhungen bei den Parametern der Burstdauer und der Netzwerksynchronität, macht diese Parameter ideal für Untersuchungen von nicht-thermischen Effekten, bei denen SARs verwendet werden können die Temperaturerhöhungen von mehr als $0,1^{\circ}\text{C}$ induzieren. Um bei den neuronalen TETRA-Expositionsversuchen mögliche nicht-thermische Effekte analysieren zu können, wurden hierfür das niedrigste und das mittlere Leistungslevel verwendet, bei denen es zu einer maximalen Temperaturerhöhung von $0,047^{\circ}\text{C}$ und $0,089^{\circ}\text{C}$ kommt und somit der Grenzwert von $\Delta T \geq 0,1^{\circ}\text{C}$ nicht überschritten wird (Tabelle 15). Interessanterweise verhalten sich die Kardiomyozyten-Netzwerke im Vergleich zu den neuronalen Netzwerken robust gegenüber moderaten Temperaturerhöhungen (Kapitel 5.3.5). Es konnten bei den beiden untersuchten Parametern der Schlagfrequenz und der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale keine thermischen Effekte beobachtet werden (Abbildung 27A,B). Die moderate Temperatur-Exposition führte zu keinen statistisch signifikanten Veränderungen innerhalb und zwischen den Versuchsgruppen. Eine Deklaration eines Grenzwertes für thermische Effekte war somit nicht erforderlich. Daraus ergab sich, dass bei den TETRA-Expositionsversuchen der Kardiomyozyten mit allen drei Leistungslevel befeldet werden konnte (Tabelle 15).

In den nachfolgend diskutierten TETRA-Expositionsexperimenten, bei denen die Auswirkung der TETRA-Strahlung auf *in vitro* Netzwerke aus kortikalen Neuronen und humanen

Kardiomyozyten untersucht wurde, konnten keinerlei statistisch signifikante Änderungen der elektrophysiologischen Eigenschaften festgestellt werden. Dies gilt für die Versuche der TETRA-Kurzzeit-Exposition, wie auch für Versuche der TETRA-Langzeit-Exposition (Kapitel 5.3.4, Kapitel 5.3.6). Es wurden keine thermischen oder nicht-thermischen Effekte durch die TETRA-Exposition festgestellt. Auf der Basis dieser Ergebnisse unter den beschriebenen Bedingungen kann kein Gefahrenpotential durch die Bestrahlung abgeleitet werden.

Bei den Experimenten mit den neuronalen Netzwerken sollte untersucht werden, ob die TETRA-Strahlung einen Einfluss auf Parameter wie die Spike- und Burst-Rate, die Burst-Dauer oder die Netzwerksynchronität hat. Dabei handelt es sich um gängige Parameter für die Analyse neuronaler *in vitro* Netzwerke [Chiappalone *et al.*, 2006; Jimbo *et al.*, 2000b; Mack *et al.*, 2014; Selinger *et al.*, 2004].

Der Expositionszeitraum bei den Kurzzeit-Expositionsexperimenten lag bei einmaligen 15 Minuten. Dabei wurde die festgelegte Grenzwerttemperatur für thermische Effekte von $\Delta T \geq 0,1^\circ\text{C}$ nie überschritten, da mit dem niedrigsten (SAR 1,17 W/kg) und mittleren Leistungslevel (SAR 2,21 W/kg) befeldet wurde (Tabelle 15).

Bei der Analyse der Spike- und der Burstrate konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Sham- und den TETRA-befeldeten Proben nachgewiesen werden (Abbildung 20A,B). Die marginale Abnahme der Spikerate und der Burstrate bei einer SAR von 1,17 W/kg unterliegt generellen Schwankungen der Aktivität der Zellnetzwerke. Gleiches gilt für die Ergebnisse aus den Experimenten bei denen die Netzwerke einer SAR von 2,21 W/kg ausgesetzt waren. Der geringfügige Anstieg der Spikerate und der etwas größere Anstieg der Burstrate liegt ebenfalls innerhalb des Schwankungsbereiches bei diesen Messungen und hat das gleiche Niveau wie die Gruppe der Sham-Exposition (Abbildung 20A,B). Das stabile Niveau der neuronalen Netzwerke vor und nach der TETRA-Exposition wird ebenfalls gut anhand der exemplarisch gezeigten extrazellulären Ableitung einzelner APs verdeutlicht (Abbildung 21). Beide Messungen zeigen typische neuronale Aktionspotentialverläufe, bei denen keine auffälligen Veränderungen festzustellen sind.

Bei der Analyse der Burstdauer, zeigen alle drei Versuchsgruppen, d.h. sowohl die Sham-Gruppe als auch die beiden mit TETRA befeldeten Gruppen, einen geringfügigen aber nicht statistisch signifikanten Anstieg nach der jeweiligen Exposition (Abbildung 20C). Die Burstdauer variiert hierbei zwischen Werten von 0,15 s im Minimum und 0,18 s im Maximum. Diese Werte entsprechen typischen Messwerten, wie sie auch in Kontrollmessungen in anderen Publikationen beschrieben wurden [Chiappalone *et al.*, 2006; Martinoia *et al.*, 2004].

Der Parameter der Netzwerksynchronität, zeigt von allen vergleichenden Analysen die stabilsten Werte. Alle 3 Versuchsgruppen befinden sich nach der jeweiligen Exposition auf dem

gleichen Niveau wie vor der Befeldung, auch hier kann keine statistisch signifikante Veränderung in Folge der TETRA-Bestrahlung beobachtet werden (Abbildung 20D).

Im Gegensatz hierzu haben die Ergebnisse von Moretti *et al.* 2013 gezeigt, dass es in kortikalen Rattenneuronen während einer 3-minütigen Exposition mit Signalen des *Global System of Mobile* (GSM) zu einer reversiblen Abnahme der Spike- und Burstrate kam [Moretti *et al.*, 2013]. Die Versuche erfolgten mit einer Trägerfrequenz von 1800 MHz und einer Pulsung von 217 Hz mit einer SAR von 4,6 W/kg (zuvor angegeben mit 3,2 W/kg, korrigiert in Khoueiry *et al.*, 2018). Die Autoren von Moretti *et al.*, 2013 vermuten, dass die GSM-Exposition einen unmittelbaren Effekt auf die elektrophysiologischen Eigenschaften der neuronalen Netzwerke hat. Dabei kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Verringerung der Spike- und Burstrate auf thermische Effekte zurückzuführen ist. Zum einen wird bei dem von Moretti *et al.* 2013 verwendeten Protokoll der Temperaturgrenzwert für thermische Effekte von $\Delta T \geq 0,1^\circ\text{C}$ nicht überschritten und zum anderen, führen thermische Effekte unter physiologischen Bedingungen zu einer Zunahme der Spike- und Burstrate, wie in der vorliegenden Arbeit bereits gezeigt wurde (Kapitel 5.3.3).

Zu ähnlichen Ergebnissen wie Moretti und Co-Autoren, kamen auch Khoueiry *et al.* 2018. Bei ihren Experimenten wurde die SAR von 4,6 W/kg beibehalten, aber der GSM-Expositionszeitraum der neuronalen Netzwerke von 3 auf 15 Minuten verlängert, zudem wurden zwei unterschiedliche Expositionsszenarios angewendet [Khoueiry *et al.*, 2018]. Dabei erfolgte zum einen die alleinige Exposition mit der GSM-Trägerfrequenz von 1800 MHz und zum anderen wie in Moretti *et al.* 2013 die Exposition mit der Trägerfrequenz von 1800 MHz und einer Pulsung von 217 MHz. Bei beiden Expositionsszenarios zeigte sich eine nicht reversible Verringerung der Burstrate, ein Effekt der mit dem längeren Expositionszeitraum von 15 Minuten begründet wurde. Dabei ist zu erwähnen, dass auch die Sham-Versuchsgruppe eine Verringerung der Burstrate über die Zeit zeigt, welche jedoch geringer ausfällt. Eine mögliche Erklärung für die Verringerung der Burstraten wurde nicht genannt. Durch die GSM-Exposition erfolgte im Versuchszeitraum ein Temperaturanstieg der den Grenzwert von $\Delta T \geq 0,1^\circ\text{C}$ überschritt. Ein Anstieg der Burstrate wäre somit zu erwarten gewesen (thermischer-Effekt), es erfolgte aber eine Verringerung, welche mit einer Überlagerung der thermischen Effekte durch nicht-thermische Effekte erklärt wurde. Bis dato gibt es keinen Mechanismus der nicht-thermische Effekte gesichert erklären kann, weder seitens der Autoren von Moretti *et al.* 2013 und Khoueiry *et al.*, 2018 noch von anderer Seite [Apollonio *et al.*, 2013; Juutilainen *et al.*, 2011; Khoueiry *et al.*, 2018; Manna *et al.*, 2016; Moretti *et al.*, 2013; Sheppard *et al.*, 2008; Simko *et al.*, 2016; Valentini *et al.*, 2007].

In den Studien von Moretti *et al.* 2013 und Khoueiry *et al.* 2018 wurde angegeben, dass es durch

die GSM-Exposition zu Artefakten in den extrazellulären Messungen kam, welche durch Filterung eliminiert wurden. Ähnliche Angaben wurden zu EEG-Aufzeichnungen gemacht, bei denen mit TETRA befehdet wurde [Fouquet *et al.*, 2013].

Bei der Gegenüberstellung der Ergebnisse der TETRA-Exposition mit denen von Moretti *et al.* 2013 und Khoueiry *et al.* 2018 ist anzumerken, dass es sich um nicht direkt vergleichbare Messergebnisse handelt. In beiden GSM-Expositionsversuchen wurde eine höhere SAR verwendet, sowie eine um das 4,5-fache höhere Trägerfrequenz und eine 12-fach höhere Signalpulsung, was folglich zu anderen Ergebnissen führen kann. Der größte Unterschied ist jedoch, dass während der GSM-Exposition extrazelluläre Ableitungen durchgeführt wurden, was bei den in dieser Arbeit durchgeführten TETRA-Versuchen nicht möglich war. Dies ist bis dato aus Dimensionierungsgründen des Expositionssetups bzw. des Messkopfes (Verstärkers) für die extrazellulären Ableitungen nicht möglich. Es kann somit in der hier vorliegenden Arbeit nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass es während der TETRA-Exposition zu reversiblen nicht-thermischen Effekten bei den neuronalen *in vitro* Netzwerken gekommen ist. Dies sollte möglichst in nachfolgenden Arbeiten überprüft werden. Jedoch ist klar festzustellen, sollte es während der TETRA-Kurzzeit-Exposition zu nicht-thermischen Effekten gekommen sein, haben diese zu keinen nachfolgenden Veränderungen der vier untersuchten elektrophysiologischen Parameter geführt (Abbildung 20).

Bei den Untersuchungen der TETRA-Langzeit-Expositionsexperimenten wurden ebenfalls keine statistisch signifikanten Veränderungen der elektrophysiologischen Parameter Spike- und Burst-Rate, Burst-Dauer und Netzwerksynchronität festgestellt. Es erfolgten auch keine thermischen und nicht-thermischen Effekte durch die TETRA-Langzeit-Exposition (Kapitel 5.3.4). Die Experimente wurden mit dem niedrigsten Leistungslevel, bei dem es während der Exposition zu einem Temperatureintrag von 0,047°C kommt durchgeführt (Tabelle 15). Dieses Leistungslevel wurde verwendet, um mit größtmöglicher Sicherheit nicht-thermische Effekte untersuchen zu können.

Die Analysen der Spike- und Burstrate, zeigen über einen Versuchszeitraum von 18 Tage nahezu analoge Resultate und werden daher zusammen diskutiert. Mit Beginn der elektrischen Aktivität der Netzwerke bis hin zu Tag 7 der elektrischen Aktivität, erfolgt ein kontinuierlicher Anstieg sowohl in der TETRA-exponierten Gruppe, als auch in der Kontroll- und Sham-Gruppe (Abbildung 22A, Abbildung 23A). Der Anstieg der Spike- und Burstrate ist mit Entwicklungs- und Reifeprozessen der kortikalen Neurone in ihrem Netzwerk zu begründen, was unter anderem in einer zunehmenden Anzahl von Synapsen pro Neuron resultiert [Chiappalone *et al.*, 2006; Ichikawa *et al.*, 1993]. An Tag 8 elektrischer Aktivität erfolgt ein Abfall der Spike- und Burstrate in der Kontroll- und Sham-Versuchsgruppe, die TETRA-Versuchsgruppe bleibt

hingegen stabil. Ab Tag 9 steigen Spike- und Burstrate aller Versuchsgruppen weiter an und gehen in eine Plateauphase über, bevor sie zum Ende der Versuchsdauer einen abnehmenden Trend zeigen. Die jeweilige Abnahme ist auf mögliche degenerative Prozesse der neuronalen *in vitro* Netzwerke zurückzuführen und kann sich unter anderem in einer Reduktion von Neuriten und Synapsen äußern [Chiappalone *et al.*, 2006; Ichikawa *et al.*, 1993]. Da die neuronale Netzwerkentwicklung eine große Varianz von Chip zu Chip aufweist, es also innerhalb der gleichbehandelten Versuchsgruppen zu Unterschieden kommt, ist es im Besonderen bei Langzeitversuchen wie diesem zu beobachten, dass es zu Schwankungen über den gesamten Versuchszeitraum kommt [Merla *et al.*, 2011]. Gleichwohl zeigen die Resultate der Korrelationsanalysen der Spike- und Burstraten, dass im Vergleich zwischen den Versuchsgruppen ein linearer Zusammenhang vorliegt (Abbildung 22B,C,D, Abbildung 23B,C,D). Nichtsdestotrotz kann möglicherweise eine Erhöhung der Probenanzahl, also eine größere Menge verwendeter MEA-Chips ein noch gleichmäßigeres Bild zeichnen. Dabei zeigen die exemplarischen extrazellulären Ableitungen der jeweiligen Versuchsgruppen die gegebenen natürlichen Varianzen der Netzwerke mit ihren autonomen und typischen Aktionspotentialverläufen (Abbildung 26), welche auf dem gleichen Niveau liegen wie Kontrollmessungen aus anderen Publikationen [Jimbo *et al.*, 2000a; Khoueiry *et al.*, 2018; Moretti *et al.*, 2013]. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen und innerhalb der Kontroll-, Sham- und TETRA-exponierter Gruppe festgestellt werden (Abbildung 22A, Abbildung 23A).

Die Analyse der Burstdauer der drei Versuchsgruppen zeigt eine geringe aber stetige Zunahme dieses Parameters über die Zeit, mit keinen statistisch signifikanten Veränderungen innerhalb und zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 24A). Dabei variieren die Werte der Versuchsgruppen über den Versuchszeitraum zwischen 0,12 s und 0,31 s. Auch in diesem Fall kommt es zu Schwankungen, die auf Entwicklungs- und degenerative Prozesse zurückzuführen sind. Dabei sind die Werte der Burstdauer auf einem Niveau mit üblichen Werten aus anderen Publikationen [Chiappalone *et al.*, 2006; Martinoia *et al.*, 2004]. Die ergänzend gezeigten numerischen Analysen zur Korrelation, zeigen auch hier einen linearen Zusammenhang zwischen den Versuchsgruppen und dass somit kein Einfluss durch die TETRA-Strahlung festzustellen ist (Abbildung 24B,C,D).

Die Analyse der Netzwerksynchronität, zeigt bei den Langzeitmessungen eine kontinuierliche Zunahme der Synchronität in allen Versuchsgruppen über die Zeit, mit einem final abnehmenden Trend (Abbildung 25A). Zu keinem Zeitpunkt konnten statistisch signifikante Unterschiede in der Netzwerksynchronität innerhalb und zwischen den Gruppen festgestellt werden. Diese Ergebnisse werden durch die Korrelationsanalysen weiter verdeutlicht. Alle drei

Versuchsgruppen zeigen eine moderate lineare Korrelation und somit ihr gleiches Niveau.

In der Summe zeigen diese Daten, dass die TETRA-Befeldung auch über einen langen Zeitraum keinen nennenswerten Effekt auf die Kinetik von Membranerregung in neuronalen Netzwerken hat, die über die inhärenten Schwankungen des Systems hinausgehen.

Darüber hinaus gilt für alle untersuchten Parameter, dass nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass es während der TETRA-Exposition zu reversiblen nicht-thermischen Effekten bei den neuronalen *in vitro* Netzwerken gekommen ist. Aus den Daten wird jedoch auch klar, dass etwaige nicht-thermische Effekte keinerlei anhaltende Auswirkung auf die vier untersuchten elektrophysiologischen Parameter mit sich gebracht haben.

Wie bereits angesprochen, wurde parallel zu den neuronalen TETRA-Expositionsversuchen Experimente mit humanen Kardiomyozyten durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob die TETRA-Strahlung zu Effekten bei den Kardiomyozyten-Netzwerken führt. Untersucht wurden hierbei die Parameter der Schlagfrequenz und der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale.

Wie in den Temperatur-Expositionsversuchen (Kapitel 5.3.5) gezeigt werden konnte, sind die humanen Kardiomyozyten robust gegenüber moderaten Temperaturveränderungen. Somit konnten in den TETRA-Kurzzeit-Expositionsversuchen alle drei Leistungslevel (SAR 1,17 W/kg, 2,21 W/kg, 2,66 W/kg) angewandt werden ohne dass dadurch thermische Effekte induziert werden (Tabelle 15).

In den TETRA-Kurzzeit-Experimenten konnten dabei keine statistisch signifikanten Änderungen innerhalb und zwischen den Versuchsgruppen der zwei untersuchten elektrophysiologischen Parameter durch thermische oder nicht-thermische Effekte der TETRA-Bestrahlung festgestellt werden.

Die Analyse der Schlagfrequenz der drei mit TETRA exponierten Versuchsgruppen und der Sham-Gruppe zeigte keine statistisch signifikanten Veränderungen durch die jeweilige Exposition (Abbildung 28A). Die Werte vor der TETRA-Exposition sind auf dem gleichen Niveau wie nach der jeweiligen Exposition. Die geringfügigen Unterschiede zwischen den jeweiligen Schlagfrequenzen ergeben sich aus Unterschieden innerhalb der jeweiligen Netzwerke, welche von Chip zu Chip variieren. Eine Erhöhung der Probenanzahl (n), also eine größere Anzahl der verwendeten MEA-Chips könnte wie im zuvor erwähnten Fall der neuronalen Netzwerke den inhärenten Schwankungen entgegenwirken und ein gleichmäßigeres Bild zeichnen.

Die Werte der Schlagfrequenzen der Versuchsgruppen sind auf dem gleichen Niveau mit Werten von unbehandelten Zellen bzw. Kontrollmessungen aus anderen Publikationen [Mandel *et al.*, 2012; Paci *et al.*, 2015].

Das stabile Niveau der Schlagfrequenz vor und nach der TETRA-Exposition verdeutlichen auch

die exemplarisch gezeigten extrazellulären Ableitungen der humanen Kardiomyozyten die einer Kurzzeit-Exposition des größten Leistungslevel ausgesetzt waren (Abbildung 26). Die gemessenen Feldpotentiale sind vor und nach der TETRA-Exposition stabil und zeigen den typische Amplitudenverlauf, der im Minimum und Maximum zwischen $522 \mu\text{V}$ und $-325 \mu\text{V}$ liegt.

Die Ergebnisse der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale, zeigen ebenfalls keine statistisch signifikanten Veränderungen innerhalb und zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 28B). Die mit SARs von $1,17 \text{ W/kg}$ und $2,21 \text{ W/kg}$ befeldeten Versuchsgruppen bleiben nach der Exposition stabil in der Ausbreitungsgeschwindigkeit. Die mit einer SAR von $2,66 \text{ W/kg}$ befeldete Versuchsgruppe und die Sham-Gruppe zeigen eine minimale nicht statistisch signifikante Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit, was jedoch nicht generell zu beobachten war, genauer verdeutlicht durch die exemplarisch gezeigten Feldpotential Propagationen (Abbildung 28C,D). Die Werte aller Versuchsgruppen liegen in der Norm und entsprechen einem Wertebereich wie er auch in anderen Publikationen angegeben ist [Herron *et al.*, 2016].

Wie bereits bei den neuronalen Experimenten besprochen wurde, so gilt auch hier, dass mögliche reversible Veränderung der Schlagfrequenz und der Ausbreitungsgeschwindigkeit während der TETRA-Exposition nicht ausgeschlossen werden können. Es ist jedoch festzustellen, dass diese möglichen reversiblen Veränderungen zu keinen nachfolgenden Veränderungen der untersuchten elektrophysiologischen Parametern führen.

Die TETRA-Zellexpositionsexperimente der neuronalen und kardialen Netzwerke zeigen in der Summe konsistente Ergebnisse. Die Exposition mit Signalen der mobilen TETRA-Basisstation, mit einer Trägerfrequenz von 395 MHz , der TETRA-typischen niederfrequenten Pulsung mit $17,64 \text{ Hz}$ Pulsung und die Verwendung der $\pi/4\text{DQPSK}$ Modulation führten zu keinen thermischen und nicht-thermischen Effekten.

Sollte es während der TETRA-Exposition zu möglichen Effekten gekommen sein, waren diese reversible und bewirkten keine nachfolgenden Veränderungen der untersuchten elektrophysiologischen Parametern. Nichtsdestotrotz wäre es außerordentlich interessant solche Untersuchungen in nachfolgenden Projekten durchzuführen. Dies war bisher aufgrund der Dimensionierung der *Stripline* bzw. des Messkopfes (Verstärkers) für die extrazellulären Ableitungen nicht möglich. Nach entsprechenden Anpassungen und Veränderungen des Setups, müssten neue numerische Simulationen und Temperaturmessungen zur Bestimmung der SARs durchgeführt werden.

Darüber hinaus ist es wichtig zu erwähnen, dass die in dieser Arbeit verwendeten SARs direkt auf die Zellen wirken und nicht vergleichbar sind mit den gemittelten SARs von mobilen

Endgeräten und den jeweiligen Mobilfunkstandards. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten TETRA-Expositionen, erfolgte eine homogene Bestrahlung, welche unmittelbar auf die neuronalen und kardialen Zellnetzwerke wirken konnte. In der Realität herrscht aber ein Gradient. Zellen an der Körperoberfläche sind dabei einer größeren Exposition ausgesetzt, als Zellen die weiter im Körperinneren liegen, so wie es bei neuronalen Zellen der Kortex und Kardiomyozyten des Herzens der Fall ist [Schmid *et al.*, 2015].

Das zweite Thema dieser Arbeit behandelt auch die Auswirkung von nicht ionisierender elektromagnetischer Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von Zellnetzwerken. Dies jedoch mit einer anderen Frequenz bzw. Wellenlänge, bei der das Ziel die photothermische Stimulation von Netzwerken aus humanen Kardiomyozyten war.

Bei diesem Ansatz erfolgte zum einen, eine rein elektromagnetische Stimulation in Form von NIR und zum anderen die kombinierte Anwendung von NIR-Strahlung und GNRs. Beides bewirkt eine Temperaturerhöhung in den Zellnetzwerken aus Kardiomyozyten, welche in separaten Versuchen im Vorfeld quantifiziert wurde und im nachfolgenden Abschnitt diskutiert wird. Ziel der photothermischen Stimationsversuche war die Entwicklung einer nicht invasiven Methode zur Modulation der Schlagrate von Kardiomyozyten. Dabei sollten Steigerungen und Verringerungen, sowie Inhibierungen der Feldpotentiale erzielt werden.

Vor den eigentlichen Versuchen mit Zellen, wurde zunächst die Leistung der NIR-Bestrahlung bestimmt. Hierbei fungiert die Flächenleistungsdichte als vergleichende Maßeinheiten. Die Quantifizierung der oben genannten maximalen NIR-Flächenleistungsdichte, welche im Ergebnisteil in Kapitel 6.3.1 beschrieben ist, ergab einen Wert von $42,57 \text{ mW/mm}^2$ (Abbildung 33). Der fokussierte Strahl der Laser-Diode bestrahlte dabei das Elektrodenfeld der MEA-Chips, auf dem die Kardiomyozyten kultiviert wurden. Bei allen photothermischen Stimationsversuchen wurde mit der maximalen NIR-Flächenleistungsdichte von $42,57 \text{ mW/mm}^2$ gearbeitet.

Neben der Flächenleistungsdichte wurde auch der Anstieg der Temperatur bestimmt, dem die Zellkulturen durch ausschließliche NIR-Bestrahlung und durch kombinierte Anwendung von NIR-Bestrahlung und GNR-Behandlung ausgesetzt sind. Die Quantifizierung des Temperaturanstieges erfolgte jeweils unmittelbar über dem Elektrodenfeld im Zellmedium. Daraus ergab sich eine gute Annäherung an die Temperaturerhöhungen, denen die Zellen tatsächlich ausgesetzt waren. Bei ausschließlicher NIR-Bestrahlung trat die Sättigung der Temperatur nach ca. einer Minute ein, erreichte eine maximale Temperaturerhöhung um $4,60^\circ\text{C}$ und stieg auf einen Wert von $41,60^\circ\text{C}$ (Abbildung 34). Durch die Kombination von NIR-Bestrahlung und der Verwendung von GNRs, konnte der maximale Temperaturanstieg um das 2,2-fache gesteigert

werden und ermöglichte so eine noch schnellere Änderung der Temperatur. Die Sättigung erfolgte unter diesen Bedingungen nach ca. 120 Sekunden, dabei wurde eine maximale Temperatur von 47,18°C erreicht (Abbildung 34). Nach Beendigung der NIR-Bestrahlung, erfolgte eine rasche Abkühlung des Mediums innerhalb von 160 Sekunden auf Werte im physiologischen Temperaturbereich.

Die Analyse der untersuchten elektrophysiologischen Parameter der Schlagrate und der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale der Kardiomyozyten-Netzwerke, zeigte in den hier durchgeführten Versuchen eine starke Modulierbarkeit durch photothermische Stimulation.

Die Schlagrate reagierte auf eine ausschließliche NIR-Bestrahlung mit einem reversiblen Anstieg für den Zeitraum der NIR-Exposition (Abbildung 35B,C), welcher im Vergleich mit den weiteren Versuchsgruppen nicht signifikant ist. Die Temperatur erreichte ab der 2. Minute der NIR-Bestrahlung eine Erhöhung um 4,60°C auf einen Wert von 41,60°C (Abbildung 34). In der 2. Minute nach NIR-Bestrahlung wurde das ursprüngliche Temperaturniveau, welches zu Beginn der Messreihe vorlag, wieder erreicht. Die Daten verdeutlichen, dass bereits durch alleinige direkte elektromagnetische Stimulation in Form von NIR-Bestrahlung eine reversible Erhöhung der Schlagrate zu erreichen ist. Die Reaktion des Kardiomyozyten-Netzwerkes erfolgte schon unmittelbar in der 1. Minute nach Beginn der Bestrahlung. Dieser Effekt erwies sich als vollkommen reversibel. Nach der Einstellung der Bestrahlung erfolgt eine direkte Reaktion der Netzwerke, wobei die Schlagrate rasch auf die registrierten Werte vor der Bestrahlung zurückkehrte.

Die schnelle und vollständige Rückkehr der Schlagrate nach Ende der Bestrahlung ist ein wichtiger Hinweis darauf, dass die Behandlung keine irreversiblen Schäden in den Zellen hervorruft. Solche irreversiblen Schäden sind durchaus nicht von vornherein auszuschließen, da unter diesen experimentellen Bedingungen Temperaturniveaus erreicht werden, die so hoch sind, dass sie Denaturierungsprozessen in Proteinen und damit auch einen Funktionsverlust hervorrufen könnten. Die Frage wie die Zellen solche irreversiblen Schäden durch Denaturierung in den Proteinen vermeiden oder rasch reparieren, kann hier nicht geklärt werden. Aus der zellbiologischen Forschung ist jedoch bekannt, dass Zellen auf Hitzeschocks mit einer vermehrten Bildung von speziellen Chaperonen, sogenannten *heat-shock* Proteinen, reagieren, um einer Proteindenaturierung entgegenzuwirken. Neben dem Schutz vor Denaturierung sind auch schnelle Reparaturprozesse infolge von Hitzeschocks bekannt. Zu einem gewissen Maß erfolgt nach einer Rückkehr zu physiologischen Temperaturbedingungen aufgrund der intrinsischen Eigenschaft ihrer Primärstruktur, eine Renaturierung der Proteine mit einem Wiedergewinn an Funktion [Campbell *et al.*, 2015; Klinke *et al.*, 2005].

Der Anstieg der Schlagrate bei alleiniger NIR-Bestrahlung ist höchstwahrscheinlich von mehreren Faktoren abhängig und es liegt sehr wahrscheinlich ein komplexes Zusammenspiel verschiedener biologischer Funktionen vor. Die genauen Mechanismen stehen wie auch bei der photothermischen Stimulation von neuronalen Kulturen in der wissenschaftlichen Diskussion [Duke *et al.*, 2013; Jenkins *et al.*, 2010; Shapiro *et al.*, 2012].

Eine mögliche Erklärung des Anstieges der Schlagrate könnte auf die temperaturbedingte Aktivitätserhöhung von HCN-Kanälen zurückzuführen sein, welche in Kardiomyozyten entscheidend die Schlagrate durch Verlängerung oder Verkürzung der Hyperpolarisationsphase regulieren. Bei einem Ansteigen der Temperatur zeigen HCN-Kanäle eine höhere Offenwahrscheinlichkeit, was zu einem verstärkten Na⁺-Einstrom führt und somit eine schnellere Depolarisation und Aktionspotentialabfolge bewirkt. Darüber hinaus kommt es durch die Temperaturerhöhung zu einer allgemeinen beschleunigten Aktivierungskinetik, was zu einem schnelleren Öffnen der Kanäle und somit zu einer Steigerung der Schlagrate führt [Biel *et al.*, 2002; Glaser, 2012; Korogod *et al.*, 2017; Nakamura *et al.*, 2013].

Auch mögliche direkte Effekte des Temperaturanstiegs auf die Plasmamembran wurden in verschiedenen Publikationen beschrieben, welche zunächst eine Depolarisation der Membran begünstigen könnten. So könnte der Temperatureintrag der NIR-Bestrahlung zu Ionenkanal-unabhängigen transienten Ionenströmen über die Membran geführt haben [Shapiro *et al.*, 2012]. Auch eine mögliche Destabilisierung der Phospholipide der Plasmamembran könnte zu einer transienten Bildung von Nanoporen geführt haben. Solche Phänomene wurden bereits in Oozyten-, HEK-Zellen- und Bilayer-Versuchen gezeigt [Beier *et al.*, 2014]. Auch in einer weiteren Publikation wurde ähnliches beschrieben [Heimburg, 2010]. So konnte gezeigt werden, dass Ionenströme in Abhängigkeit von Temperatur und Lipidzusammensetzungen über die Membran in Bilayer-Messungen entstehen. Die elektrische Leitfähigkeit der Membran wurde auf die transiente Bildung von Lipidkanälen durch Membranfluktuationen zurückgeführt [Heimburg, 2010].

Während die Zellkulturen auf eine einfache NIR Bestrahlung einheitlich reagieren, zeigen sie bei der kombinierten NIR-Bestrahlung und Behandlung mit GNRs, zwei gegensätzliche elektrophysiologische Verhaltensweisen. Letztere lassen sich in zwei Muster und somit in zwei Populationen unterteilen (Abbildung 35A,B,C). Die 1. Population umfasst 11 der insgesamt 18 untersuchten Zellkulturen (61 %), welche auf die kombinierte Behandlung mit einer Verringerung der Schlagrate reagierten. Die restlichen 7 Kulturen (39 %) wurden zur 2. Population zugeordnet, da sie sich gegensätzlich dazu verhielten und mit einem Anstieg der Schlagrate auf die kombinierte Behandlung reagierten (Abbildung 35A,B,C).

Die genauere Analyse der Schlagrate von Population 1 zeigt, dass es mit dem Einsetzen der

NIR-Bestrahlung zu einer unmittelbaren und massiven Verringerung der Schlagrate bereits in der 1. Minute der NIR-Bestrahlung kommt, welche reversibel ist (Abbildung 35B,C). Im weiteren Bestrahlungszeitraum verringerte sich die Schlagrate weiter bis hin zur Inhibierung der Feldpotentiale. Diese starke Verringerung der Schlagrate ging mit dem Auftreten von Arrhythmien und einer massiven Reduzierung der Amplituden einher (Abbildung 36). So rasch wie die Schlagrate beim Einsetzen der Behandlung zum Erliegen kam, so schnell stieg die elektrische Aktivität nach Ende der Behandlung auch wieder an. Schon in der 2. Minute nach NIR-Bestrahlung erreichte die Schlagrate das gleiche Niveau wie vor der Exposition. Die rasche und vollständige Regeneration der elektrischen Signale nach Beenden der Bestrahlung zeigt wiederum, dass es auch in diesem Fall zu keiner nennenswerten Denaturierung der Proteine kommt, obgleich die kombinierte NIR/GNR Exposition noch höhere Temperaturen und damit ein erhöhtes Potential zur Proteindenaturierung in sich birgt.

Die genaue Bestimmung der Ursache für die Verringerung der Schlagrate bzw. die Inhibierung der Feldpotentiale ist in komplexen Zellnetzwerken schwierig, so auch hier bei den Netzwerken aus humanen Kardiomyozyten. Die vorliegenden Messungen können keine Auskunft über die genaue Beteiligung von einzelnen Membranproteinen, Lipiden oder Signalkaskaden geben. Um zu verstehen, wie diese elektrische Reaktion durch die Funktion einzelner Membranproteine erklärt werden könnte, müsste die Aktivität der einzelnen beteiligten Proteine wie z.B. die des Kalium-Auswärtsgleichrichter TREK-1 isoliert untersucht werden. Das könnte sowohl mit Patch Clamp als auch in Bilayer-Messungen genauer untersucht werden.

Darüber hinaus ist auch nicht davon auszugehen, dass eine einzelne Protein-Spezies wie z.B. ein bestimmter Ionenkanal für die Verringerung der Schlagrate oder die Inhibierung der Feldpotentiale verantwortlich ist. Vielmehr ist von einem komplexen zellulären Zusammenspiel auszugehen. Ist jedoch eine Temperaturerhöhung so stark, dass es zu einer Überlagerung der biologischen Effekte kommt, ist die Zuordnung auf alleinige physikalische Ursachen möglich.

Auch wenn hier keine molekulare Erklärung für die beobachteten Phänomene präsentiert werden kann, so besteht dennoch die Möglichkeit realistische Erklärungsansätze für die Herabsetzung der Schlagrate und die Inhibierung der Feldpotentiale zu erörtern.

Zum einen könnte der 2,2-fach höhere Temperaturanstieg durch die Verwendung der GNRs zu einer vermehrten Bildung von Leckströmen über die Plasmamembran geführt haben. Diese Ionenströme über die Membran könnten möglicherweise durch die bereits zuvor erwähnten und in verschiedenen Publikationen beschriebene transiente Bildung von Nanoporen/Lipidkanälen entstanden sein [Beier *et al.*, 2014; Heimburg, 2010; Shapiro *et al.*, 2012].

Eine solche unspezifische und nicht-selektive Membranleitfähigkeit könnte zu einer starken

Annäherung der intra- und extrazellulären Ionenkonzentration geführt haben, die durch aktiv und passiv leitende Membranproteine nicht mehr ausreichend kompensiert werden kann. Dies könnte durchaus dazu führen, dass die Zellen nicht mehr in der Lage wären spontane Aktions- bzw. Feldpotentiale auszulösen. Möglicherweise könnten auch damit die gezeigten Arrhythmien und Verringerungen der Amplitudengröße in einem Zusammenhang stehen.

Zum anderen ist es auch denkbar, dass die temperaturbedingte Erhöhung der Offenwahrscheinlichkeit des Kalium-Auswärtsgleichrichters TREK-1 einer Depolarisation der Zellmembran entgegenwirkt. Auch die Generierung von Arrhythmien wird in der Literatur mit TREK-1 in Verbindungen gebracht [Decher *et al.*, 2017a; Urban *et al.*, 2016; Yoo *et al.*, 2014].

Nach diesen Überlegungen stellt sich nun die Frage, warum die 2. Population, bei der die gleichen Aussaat-, Kultivierungs- und Bestrahlungsbedingungen vorlagen, eine gegensätzliche Reaktion auf die photothermische Stimulation in kombinierter Behandlung mit GNRs zeigte (Abbildung 35B,C).

Ein solch gegensätzliches Verhalten durch photothermische Stimulation, wurde auch in einer Publikation anderer Autoren beschrieben, bei denen Versuche am peripheren Nervensystemen erfolgten [Duke *et al.*, 2013].

Der in dieser Arbeit berichtete massive Anstieg der Schlagrate ist möglicherweise mit einem eventuell verminderten Temperatureintrag der elektrodennahen Kardiomyozyten-Schicht in Verbindung zu bringen. Möglich wäre, dass manche Kardiomyozyten-Zellnetzwerke Polylayer bilden und somit die unterste Kardiomyozyten-Schicht, die unmittelbar an den Elektroden sitzt, einen zeitlich verzögerten und vor allem einen geringeren Temperaturanstieg erfährt. Denn ausschließlich der oberste Kardiomyozyten-Layer erfährt einen direkten und lokalen Hitzeintrag durch die Oberflächenplasmonresonanz der GNRs. Ein Grund für eine mögliche Polylayer-Bildung könnte die Protein-Coating-Fläche auf den MEA-Chips sein. Es wurde zwar auf jedem Chip die gleiche Zellzahl ausgesät, jedoch kann die mit Fibronectin behandelte Fläche für die Zelladhäsion im Zentrum der MEA-Chips variieren. Denn die Fibronectin-Lösung verteilt sich generell unterschiedlich stark auf der MEA-Oberfläche, was die Zellanordnung beeinflussen kann. Somit könnte der Anstieg der Schlagrate bei kombinierter NIR/GNR Behandlung, mit den gleichen möglichen Erklärungsansätzen wie bei der ausschließlichen NIR-Bestrahlung begründet werden.

In diesem Kontext könnte die temperaturbedingte vermehrte Offenwahrscheinlichkeit der HCN-Kanäle eine zeitlich verkürzte Hyperpolarisation bewirken, was zu einem Anstieg der Schlagrate führen kann [Biel *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2013].

Zum anderen könnte der Temperaturanstieg zu einer generell schnelleren Kinetik der

Ionenkanäle führen, was somit zu einer allgemein höheren Offenwahrscheinlichkeit führt und eine schnellere Feldpotentialabfolge bewirken kann [Biel *et al.*, 2002; Korogod *et al.*, 2017; Nakamura *et al.*, 2013].

Neben diesen Effekten die auf einer veränderten Proteinaktivität beruhen, könnten auch mögliche direkte Effekte durch die photothermische Stimulation auf die Plasmamembran wirken und eine Depolarisation der Membran begünstigen [Beier *et al.*, 2014; Shapiro *et al.*, 2012]. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass die extrazellulären Ableitungen an verschiedenen DIVs und bei unterschiedlichen GNR-Inkubationszeit erfolgten, welche zwischen 3 und 9 Stunden lag.

Auch wenn die komplexe Reaktion der Kardiomyozyten-Netzwerke auf die photothermische Stimulation mit NIR/GNRs nicht im Detail verstanden ist, wurde dennoch der Einfluss von TREK-1 auf die Netzwerkreaktionen untersucht, da in mehreren Publikationen eine auffällige Temperaturempfindlichkeit von TREK-1 beschrieben wurde. In den Veröffentlichungen wurde gezeigt, dass der Kanal bei Temperaturen von 42°C eine wesentlich höhere Offenwahrscheinlichkeit besitzt und dadurch wesentlich höhere Kalium-Auswärtsströme generiert als unter physiologischen Temperaturbedingungen von 37°C [Kang *et al.*, 2005; Maingret *et al.*, 2000]. Dies verdeutlicht der hohe Temperaturkoeffizient Q_{10} von TREK-1 welcher bei 7 liegt. Er ist ein Maß für die Änderungen der Reaktionsgeschwindigkeit bei einem Temperaturanstieg um 10°C. Ionenkanäle die als temperaturunabhängig betrachtet werden, zeigen Q_{10} -Werte im Bereich von 1 bis 4 [Glaser, 2012; Honoré *et al.*, 2002; Maingret *et al.*, 2002; Vennekens *et al.*, 2007].

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang, dass die Autoren von Yoo *et al.*, 2014 die Auswirkung von photothermischer Stimulation auf neuronale Netzwerke untersucht haben. Dabei wurde TREK-1 mit einer Verringerung der Spikerate und der Inhibierung von neuronalen Aktionspotentialen in Verbindung gebracht. In der Publikation wurde gezeigt, dass durch photothermische Stimulation mit NIR/GNR eine stufenweise und reversible Verringerung der Spikerate bis hin zu einer Inhibierung der Aktionspotentiale erfolgen kann. Besonders spannend war hierbei, dass durch die Behandlung mit Fluoxetin die photothermische Stimulation keine Verringerung der Spikerate und auch keine Inhibierung der APs bewirken konnte. Dieses Phänomen wurde mit einer Blockierung von TREK-1 durch Fluoxetin in Verbindung gebracht. Der damit verbundene Wegfall des Kalium-Ausstroms der blockierten TREK-1 Kanäle, könnte somit einer Depolarisation der Zelle nicht mehr entgegenwirken und es können trotz photothermischer Stimulation weiter APs generiert werden [Yoo *et al.*, 2014].

Diese Hypothese ist eventuell auch auf kardiale Netzwerke übertragbar. Die Behandlung mit Fluoxetin und die damit verbundene Blockierung von TREK-1 könnten möglicherweise auch bei

Kardiomyozyten die photothermisch stimulierte Verringerung der Schlagrate wie auch die Inhibierung der Feldpotentiale verhindern.

Die Analyse der Schlagrate bei ausschließlicher Behandlung mit Fluoxetin zeigte einen geringen Anstieg ab der 5. Minute der Messreihe. Der geringe Anstieg der Schlagrate war dabei nicht reversibel und blieb auf einem leicht erhöhten Niveau bis zum Ende der Messreihe (Abbildung 35B,C).

Dieser Effekt könnte eventuell mit der Inhibierung von TREK-1 durch Fluoxetin erklärt werden. TREK-1 zeigt auch unter physiologischen Temperaturbedingungen von 37°C einen Kalium-Auswärtsstrom, der potentiell einer Depolarisation entgegenwirken könnte [Kang *et al.*, 2005; Maingret *et al.*, 2000]. Ist der Kanal geblockt könnte somit die Phase der Hyperpolarisation verkürzt werden, was eine schnellere Depolarisation der Zelle und somit einen Anstieg der Schlagrate bewirken könnte.

Die kombinierte Behandlung mit Fluoxetin, NIR und GNRs resultierte in einem starken und direkten Anstieg der Schlagrate nach Zugabe von Fluoxetin und Einsetzen der NIR-Bestrahlung (Abbildung 35B,C). Die Schlagrate blieb während der 3-minütigen NIR-Bestrahlung auf einem konstant erhöhten Niveau und verringerte sich nach Beendigung der NIR-Exposition nur geringfügig. Die Ausgangswerte vor Behandlungsbeginn konnten im Rahmen des 2-minütigen Nachlaufes noch nicht erreicht werden. Dabei ist auffällig, dass der Anstieg der Schlagrate während der NIR-Bestrahlung deutlich unter dem Niveau der Schlagrate von Population 2 liegt, zugleich aber deutlich über dem Niveau der Schlagrate der Kontrollgruppe, der alleinig mit Fluoxetin behandelten Versuchsgruppe und auch über dem der ausschließlich mit NIR-bestrahlten Versuchsgruppe. Daraus könnte man schließen, dass die Fluoxetin-Behandlung einer Verringerung der Schlagrate und einer Inhibierung der Feldpotentiale durch photothermische Stimulation mit NIR/GNRs entgegenwirkt hat. Dabei konnte aber das hohe Schlagraten-Niveau von Population 2 nicht mehr erreicht werden.

Dieses Phänomen alleinig mit der Fluoxetin bedingten Inhibierung von TREK-1 zu begründen ist höchstwahrscheinlich zu vereinfacht. Vielmehr ist von einer komplexeren Wirkungsweise von Fluoxetin auf das Kardiomyozyten-Netzwerk auszugehen.

Wenn man jedoch in einem vereinfachten Erklärungsansatz die Daten in Zusammenhang mit der Wirkung von Fluoxetin auf TREK-1 Kanäle zu erklären versucht ergibt sich folgendes Bild: Durch die Blockierung von TREK-1 durch Fluoxetin könnte es dazu kommen, dass diese Kanäle einer Depolarisation nicht mehr entgegenwirken können und es zu einer verkürzten Hyperpolarisationszeit kommt, was wiederum einen Anstieg der Schlagrate bewirken würde.

Durch den Temperaturanstieg ist ebenfalls von einer erhöhten Offenwahrscheinlichkeit der

HCN-Kanäle auszugehen, wodurch es ebenfalls zu einer verringerten Hyperpolarisation kommen könnte. Auch dies würde zu dem Anstieg der Schlagrate beitragen [Biel *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2013].

Ferner ist aus einfachen thermodynamischen Überlegungen auch eine temperaturbedingte schnellere Ionenkanalkinetik zu nennen, die mit einer größeren Einzelkanalleitfähigkeit von Ionenkanälen einhergeht und zu einer Erhöhung der Schlagrate beitragen könnte [Biel *et al.*, 2002; Korogod *et al.*, 2017; Nakamura *et al.*, 2013].

Neben diesen Temperatureffekten auf Proteine könnten die bereits genannten Effekte auf Membranen ebenfalls eine Depolarisation und damit die erhöhte Schlagrate begünstigen [Beier *et al.*, 2014; Shapiro *et al.*, 2012].

Vergleicht man diese Ergebnisse der photothermischen Stimulation von Kardiomyozyten mit denen aus der Publikation von Yoo *et al.* 2014, bei der neuronale Netzwerke durch photothermische Stimulationen (NIR, GNRs) inhibiert wurden ist festzustellen, dass die neuronalen Zellen wesentlich empfindlicher auf diese Behandlung reagierten. Die neuronalen Netzwerke zeigten schon innerhalb von wenigen Sekunden und bei einer 2,7-fach geringeren Flächenleistungsdichte eine massive Verringerung der Spikerate, die bis zur Inhibierung der APs führte [Yoo *et al.*, 2014].

Die Netzwerke der Kardiomyozyten benötigten in den hier gezeigten Versuchen jedoch mehr als eine Minute für eine Inhibierung der Feldpotentiale und scheinen somit robuster gegenüber Temperaturveränderungen zu sein als neuronale Netzwerke. Der gleiche Unterschied zwischen neuronalen und kardialen Netzwerken hatte sich schon bei vorherigen Versuchen ergeben, in denen die unterschiedlichen Netzwerke moderaten Temperaturveränderungen von bis zu 0,5°C ausgesetzt waren. Die Kardiomyozyten zeigten dabei keine Veränderung der Schlagrate durch die Temperaturerhöhung (Kapitel 5.3.5). Die neuronalen Netzwerke reagierten hingegen mit einem Anstieg der Spikerate (Kapitel 5.3.3).

Hierbei ist es wichtig zu erwähnen, dass in der Publikation von Yoo *et al.*, 2014 neben einem anderen Zelltyp auch mit weiteren unterschiedlichen Parametern gearbeitet wurde. Hierbei sind die andere Dimensionierung der GNRs, eine unterschiedliche Anregungswellenlänge der Oberflächenplasmonresonanz, eine andere Wellenlänge der NIR-Strahlung, sowie eine unterschiedliche Flächenleistungsdichte zu nennen. Was somit nur einen eingeschränkten Vergleich ermöglichte [Yoo *et al.*, 2014].

Neben dem elektrophysiologischen Parameter der Schlagrate, erfolgte auch die Analyse der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale, was einem typischen Netzwerkparameter von Kardiomyozyten entspricht. Es zeigte sich, dass eine alleinige NIR-Bestrahlung zu einer reversiblen Herabsetzung der Ausbreitungsgeschwindigkeit während einer 3-minütigen NIR-

Bestrahlung führt. Der Parameter erreicht in der zweiten und dritten Minute des Bestrahlungszeitraums ein konstant niedriges Niveau (Abbildung 37A,B). Dieser Effekt war reversibel, in den Minuten nach NIR-Bestrahlung erreichte die Ausbreitungsgeschwindigkeit wieder den Ausgangswert, der vor der Behandlung gemessen wurde.

Über eine molekulare Erklärung für die Veränderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit nach NIR-Bestrahlung kann hier nur spekuliert werden. Die Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit in Folge der ausschließlichen NIR-Bestrahlung könnte wahrscheinlich auf die Funktion der *Gap Junctions* zurückgeführt werden. Diese Zell-Zell-Verbindungen sind maßgeblich an der Erregungsausbreitung über das Kardiomyozyten-Netzwerk beteiligt. Vermutlich führt der gesteigerte Ca^{2+} -Einstrom, der durch den Anstieg der Schlagrate begünstigt wird, zu einer Entkopplung der Connexine aus denen sich die *Gap Junctions* zusammensetzen. Dadurch ist mit einer verringerten gesamten Leitfähigkeit der *Gap Junctions* zu rechnen, was wiederum eine Abnahme der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale zur Folge haben könnte. Entscheidend in diesem Prozess ist das Binden von Calcium durch Calmodulin, was eine C-terminale Bindung von Calmodulin an die Connexine ermöglicht und somit eine Entkopplung der Connexin-Semikanäle bewirkt [Beier *et al.*, 2014; Firek *et al.*, 1995; Lazrak *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2012].

Die Unterteilung in zwei Populationen anhand ihrer gegensätzlich veränderten Schlagraten bei kombinierter NIR/GNRs-Behandlung, wurde auch bei der Auswertung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale beibehalten (Abbildung 37A).

Die Analyse der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Population 1 zeigte in der ersten Minute der NIR-Bestrahlung eine mäßige Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit, welche sich im weiteren Verlauf in der 2. und 3. Minute der NIR-Bestrahlung massiv verringerte (Abbildung 37A,B). Diese massive Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit ist mit der parallel hierzu gezeigten massiven Verringerung der Schlagrate zu begründen. Durch die Inhibierung der einzelnen Schlagraten der Zellkulturen erfolgt zwangsläufig auch die Inhibierung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der einzelnen Kulturen, was in der Summe betrachtet zu einer massiven Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit führt.

Die 2. Population verhielt sich nicht gegensätzlich zur 1. Population, wie es bei der Schlagrate der Fall war. Auch diese Zellkulturen zeigten eine reversible Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit durch photothermische Stimulation (NIR/GNRs), welche jedoch wesentlich geringer ausfiel. Auch hier bewirkte möglicherweise der parallel erfolgte Anstieg der Schlagrate einen vermehrten Ca^{2+} -Einstrom, der wahrscheinlich zu einer Entkopplung der Connexine führte und damit die Leitfähigkeit der *Gap Junctions* verringerte [Firek *et al.*, 1995; Lazrak *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2012].

Bei der ausschließlichen Behandlung mit Fluoxetin, konnte keine nennenswerte Veränderung der Ausbreitungsgeschwindigkeit festgestellt werden (Abbildung 37A,B). Die Werte lagen hier über den gesamten Versuchszeitraum auf einem konstanten Niveau, in einem Bereich, der dem der Kontrolle entspricht.

Durch die kombinierte Behandlung mit Fluoxetin, GNRs und NIR konnte der massive Einbruch der Ausbreitungsgeschwindigkeit, wie es bei Population 1 der Fall war, verhindert werden. Die Werte der Ausbreitungsgeschwindigkeit liegen hier während der NIR-Bestrahlung zwischen denen von Population 1 und Population 2. Nach Ende der Bestrahlung nahmen sie unmittelbar das Wertenniveau an, welches vor der Exposition registriert wurde. Diese nur geringe Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit ist vermutlich ebenfalls mit der parallel angestiegenen Schlagrate und dem daraus folgenden Ca^{2+} -Einstrom und der Entkopplung der Connexine zu erklären [Firek *et al.*, 1995; Lazrak *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2012].

Generell ist nicht auszuschließen, dass die beobachteten Effekte auch ganz oder teilweise auf eine Denaturierung von Proteinen durch photothermische Stimulation zurückzuführen sind. Eine solche Erklärung scheint jedoch eher unwahrscheinlich, da alle funktionellen Reaktionen der Netzwerke reversibel waren und schon Minuten nach Ende der Bestrahlung wieder zu dem Kontrollniveau zurückkehrten. Da auch Proteindenaturierungen in Zellen nicht so rasch repariert werden ist eher davon auszugehen, dass die NIR Behandlung gezielt zelluläre Prozesse moduliert [Campbell *et al.*, 2015; Klinke *et al.*, 2005].

In ihrer Gesamtheit zeigen diese Ergebnisse, dass durch photothermische Stimulation die Schlagrate von humanen Kardiomyozyten-Netzwerken erhöht und verringert werden kann, bis hin zur Inhibierung von Feldpotentialen. Welches jeweils mit einer Reduzierung der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale einhergeht.

Die alleinig angewandte NIR-Bestrahlung und die mit einer GNR-Behandlung kombinierte, haben verschiedene Vor- und Nachteile. Erfolgt nur eine Bestrahlung mit NIR, ist zwar der Temperatureintrag in die Zelle oder im Gewebe deutlich geringer, als bei der kombinierten Anwendung mit GNRs, bietet aber den Vorteil das kein invasiver Eingriff erforderlich ist. Es ergibt sich dabei eine Erwärmung aller bestrahlten Zellen und dies bis zu einer Eindringtiefe von 3 mm [Avci *et al.*, 2013; Barolet, 2008; Genchi *et al.*, 2017].

In der Kombination mit GNRs erfolgt ebenfalls ein flächendeckender Temperaturanstieg, welcher jedoch lokal im unmittelbaren Bereich um die GNRs aufgrund der Oberflächenplasmonresonanz um das 2,2-fache größer ist. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit einer gezielteren räumlichen Behandlung. Im Vergleich zur ausschließlichen NIR-Behandlung, ist bei der Verwendung von GNRs im Gewebe oder in Organen ein minimal invasiver Eingriff nötig. In

diesem Zusammenhang steht die Frage der Toxizität von GNRs im Raum und kann nicht eindeutig und abschließend beantwortet werden. Die wissenschaftliche Datenlage ist nicht eindeutig und eine mögliche Toxizität der GNRs steht noch in der wissenschaftlichen Diskussion [Alkilany *et al.*, 2010; Connor *et al.*, 2005; Giljohann *et al.*, 2010; Goodman *et al.*, 2004].

Trotz alledem zeigen die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse das große medizinische Potential der photothermischen Stimulation von Kardiomyozyten. Besonders durch die kombinierte Anwendung der NIR-Bestrahlung und der GNR-Behandlung sind zukünftig medizinische Anwendungen bei Krankheitsbildern wie Bradykardie, Tachykardie oder bei der Behandlung von Arrhythmien des Herzens denkbar. Die photothermische Stimulation von Kardiomyozyten könnte somit eine Alternative zur elektrischen Stimulation über Elektroden darstellen.

In nachfolgenden Studien wäre es interessant zu untersuchen, ob eine stufenweise Regulation der Schlagrate, sowie der Ausbreitungsgeschwindigkeit der Feldpotentiale bei Kardiomyozyten durch photothermische Stimulation möglich ist. Ebenso ist es von besonderem Interesse exakt zu klären wie die unterschiedlichen Reaktionen von Population 1 und 2 auf die kombinierte Anwendung von NIR-Bestrahlung und GNR-Behandlung zustande kommen. Zugleich ist es in diesem Zusammenhang höchst interessant die vielfältige Wirkungsweise von Fluoxetin genauer zu untersuchen und ob neben der Inhibierung des Kalium-Auswärtsgleichrichters TREK-1 in Kardiomyozyten weitere relevante Interaktionen mit Proteinen durch Fluoxetin erfolgen.

8. Quellenverzeichnis

- Accili EA, Proenza C, Baruscotti M, *et al.* (2002). From funny current to HCN channels: 20 years of excitation. *News Physiol Sci.* 17:32-7.
- Ahlbom A, Feychting M (2003). Electromagnetic radiation. *Br Med Bull.* 68:157-65.
- Alex KD, Yavanian GJ, McFarlane HG, *et al.* (2005). Modulation of dopamine release by striatal 5-HT_{2C} receptors. *Synapse.* 55(4):242-51.
- Alkilany AM, Murphy CJ (2010). Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? *Journal of Nanoparticle Research.* 12(7):2313-33.
- Alloui A, Zimmermann K, Mamet J, *et al.* (2006). TREK-1, a K⁺ channel involved in polymodal pain perception. *The EMBO journal.* 25(11):2368-76.
- Amat A, Rigau J, Waynant RW, *et al.* (2006). The electric field induced by light can explain cellular responses to electromagnetic energy: A hypothesis of mechanism. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 82(2):152-60.
- Apollonio F, Liberti M, Paffi A, *et al.* (2013). Feasibility for Microwaves Energy to Affect Biological Systems Via Nonthermal Mechanisms: A Systematic Approach. *Ieee T Microw Theory.* 61(5):2031-45.
- Atcha K, Wing CL, Lisa AV, *et al.* (2014). Evaluating the Efficacy of Gene Silencing in Dopaminergic Neuronal Cells In-Vitro using Gold Nanorods (GNR) with Different Surface Properties Complexed to DARPP-32 siRNA. *Journal of Advanced Pharmaceutical Science And Technology.* 1(2):36-50.
- Avcı P, Gupta A, Sadasivam M, *et al.* (2013). Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. *Semin Cutan Med Surg.* 32(1):41-52.
- Baan R, Grosse Y, Lauby-Secretan B, *et al.* (2011). Carcinogenicity of radiofrequency electromagnetic fields. *The Lancet Oncology.* 12(7):624-6.
- Baffou G, Quidant R (2013). Thermo-plasmonics: using metallic nanostructures as nano-sources of heat. *Laser Photonics Rev.* 7(2):171-87.
- Baker RE, Corner MA, van Pelt J (2006). Spontaneous neuronal discharge patterns in developing organotypic mega-co-cultures of neonatal rat cerebral cortex. *Brain Res.* 1101(1):29-35.
- Barker AT, Jackson PR, Parry H, *et al.* (2007). The effect of GSM and TETRA mobile handset signals on blood pressure, catechol levels and heart rate variability. *Bioelectromagnetics.* 28(6):433-8.
- Barolet D (2008). Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. *Semin Cutan Med Surg.* 27(4):227-38.

-
- Barolet D, Christiaens F, Hamblin MR (2016). Infrared and skin: Friend or foe. *J Photochem Photobiol B*. 155:78-85.
- Bawin SM, Adey WR (1976). Sensitivity of calcium binding in cerebral tissue to weak environmental electric fields oscillating at low frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 73(6):1999-2003.
- Bear M, Connors B, Paradiso M (2015). Neuroscience - Exploring the brain, 4. Auflage. Verlag Wolters Kluwer.
- Beier HT, Tolstykh GP, Musick JD, et al. (2014). Plasma membrane nanoporation as a possible mechanism behind infrared excitation of cells. *J Neural Eng*. 11(6):066006.
- Biel M, Schneider A, Wahl C (2002). Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc Med*. 12(5):206-12.
- Blackman CF, Benane SG, Elder JA, et al. (1980). Induction of calcium-ion efflux from brain tissue by radiofrequency radiation: effect of sample number and modulation frequency on the power-density window. *Bioelectromagnetics*. 1(1):35-43.
- Blackwell RP, Saunders RD (1986). The effects of low-level radiofrequency and microwave radiation on brain tissue and animal behaviour. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 50(5):761-87.
- Bockenhauer D, Zilberberg N, Goldstein SA (2001). KCNK2: reversible conversion of a hippocampal potassium leak into a voltage-dependent channel. *Nat Neurosci*. 4(5):486-91.
- Boudoulas KD, Borer JS, Boudoulas H (2015). Heart Rate, Life Expectancy and the Cardiovascular System: Therapeutic Considerations. *Cardiology*. 132(4):199-212.
- Bradshaw PJ, Stobie P, Knuiman MW, et al. (2015). Life expectancy after implantation of a first cardiac permanent pacemaker (1995–2008): A population-based study. *International Journal of Cardiology*. 190:42-6.
- Braun KF (1909). Electrical oscillations and wireless telegraphy. *Nobel Lecture, December*. 11(1909):226-45.
- Bundesanstalt für den Digitalfunk der Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben (2008). Ein Jahr BDBOS - Rückblick und Ausblick. URL: https://www.bdbos.bund.de/SharedDocs/Downloads/DE/Publikationen/ein_jahr_bdbos.html (Zugriffsdatum: 09.10.2018).
- Bundesanstalt für den Digitalfunk der Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben (2018a). Der Digitalfunk BOS - Ein Netz für alle. URL: https://www.bdbos.bund.de/SharedDocs/Downloads/DE/Publikationen/faltblatt_allgemein.pdf?__blob=publicationFile&v=4 (Zugriffsdatum: 09.12.2018).

-
- Bundesanstalt für den Digitalfunk der Behörden und Organisationen mit Sicherheitsaufgaben (2018b). Fragen und Antworten zum Digitalfunk BOS. URL: https://www.bdbos.bund.de/SharedDocs/Downloads/DE/Publikationen/faq_download.html?nn=8283338 (Zugriffsdatum: 09.11.2018).
- Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (2013). 26. Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes - Verordnung über elektromagnetische Felder. URL: https://www.gesetze-im-internet.de/bimschv_26/BJNR196600996.html (Zugriffsdatum: 26.10.2018).
- Burgess AP, Fouquet NC, Seri S, *et al.* (2016). Acute Exposure to Terrestrial Trunked Radio (TETRA) has effects on the electroencephalogram and electrocardiogram, consistent with vagal nerve stimulation. *Environ Res.* 150:461-9.
- Campbell NA, Reece JB, Urry LA, *et al.* (2015). Campbell Biologie, 10. Auflage. Verlag Pearson Studium.
- Cellular Dynamics International (2016). User's Guide - iCell Cardiomyocytes 2. URL: https://cellulardynamics.com/assets/CDI_iCellCardiomyocytes2_UG.pdf (Zugriffsdatum: 09.10.2018).
- Chen ACH, Arany PR, Huang Y-Y, *et al.* (2011). Low-Level Laser Therapy Activates NF-kB via Generation of Reactive Oxygen Species in Mouse Embryonic Fibroblasts. *PLOS ONE.* 6(7):e22453.
- Chiappalone M, Bove M, Vato A, *et al.* (2006). Dissociated cortical networks show spontaneously correlated activity patterns during in vitro development. *Brain Res.* 1093(1):41-53.
- Chung H, Dai T, Sharma SK, *et al.* (2012). The Nuts and Bolts of Low-level Laser (Light) Therapy. *Ann Biomed Eng.* 40(2):516-33.
- Cisco Systems Inc. (2017). Cisco Visual Networking Index: Global Mobile Data Traffic Forecast Update, 2016–2021 White Paper. URL: <https://www.cisco.com/c/en/us/solutions/collateral/service-provider/visual-networking-index-vni/mobile-white-paper-c11-520862.html> (Zugriffsdatum: 10.11.2018).
- Connor EE, Mwamuka J, Gole A, *et al.* (2005). Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity. *Small.* 1(3):325-7.
- Daus AW, Goldhammer M, Layer PG, *et al.* (2011). Electromagnetic exposure of scaffold-free three-dimensional cell culture systems. *Bioelectromagnetics.* 32(5):351-9.
- Decher N, Kiper AK, Rinné S (2017a). Stretch-activated potassium currents in the heart: Focus on TREK-1 and arrhythmias. *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* 130:223-32.

-
- Decher N, Ortiz-Bonnin B, Friedrich C, *et al.* (2017b). Sodium permeable and “hypersensitive” TREK-1 channels cause ventricular tachycardia. *EMBO Molecular Medicine*. 9(4):403-14.
- Di Blasi Z, Harkness E, Ernst E, *et al.* (2001). Influence of context effects on health outcomes: a systematic review. *Lancet*. 357(9258):757-62.
- Duke AR, Jenkins MW, Lu H, *et al.* (2013). Transient and selective suppression of neural activity with infrared light. *Scientific Reports*. 3:2600.
- Eells JT, Wong-Riley MTT, VerHoeve J, *et al.* (2004). Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion*. 4(5):559-67.
- Eggert T, Dorn H, Sauter C, *et al.* (2015). Terrestrial Trunked Radio (TETRA) exposure and its impact on slow cortical potentials. *Environ Res*. 143(Pt A):112-22.
- Eggert T (2016). Auswirkungen hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf den Menschen [Dissertation]. *Freie Universität Berlin*.
- Eliasson L, Isaksson S, Lövenklev M, *et al.* (2015). A comparative study of infrared and microwave heating for microbial decontamination of paprika powder. *Frontiers in microbiology*. 6(1071).
- Eom K, Kim J, Choi JM, *et al.* (2014). Enhanced Infrared Neural Stimulation using Localized Surface Plasmon Resonance of Gold Nanorods. *Small*. 10(19):3853-7.
- Erbes C (2011). Entwicklung eines inkubatorbasierten Expositionsaufbaus für die elektromagnetische Befeldung neuronaler Zellen [Master Thesis]. *Hochschule für angewandte Wissenschaften Aschaffenburg*.
- European Telecommunications Standards Institute (2002). Technical Specification ETSI TS 100 392-15 V1.2.1 (2002-04)
- European Telecommunications Standards Institute (2005). Technical Report ETSI TR 102 491 V1.1.1 (2005-06)
- European Telecommunications Standards Institute (2006). Technical Report ETSI TR 102 513 V1.1.1 (2006-12)
- Fink M, Duprat F, Lesage F, *et al.* (1996). Cloning, functional expression and brain localization of a novel unconventional outward rectifier K⁺ channel. *The EMBO journal*. 15(24):6854-62.
- Finniss DG, Kaptchuk TJ, Miller F, *et al.* (2010). Biological, clinical, and ethical advances of placebo effects. *Lancet*. 375(9715):686-95.

-
- Firek L, Weingart R (1995). Modification of gap junction conductance by divalent cations and protons in neonatal rat heart cells. *J Mol Cell Cardiol.* 27(8):1633-43.
- Fouquet NC, Hawken MB, Elliott P, *et al.* (2013). TETRA mobile radios interfere with electroencephalography recording equipment. *Med Eng Phys.* 35(11):1688-91.
- Francisco L-M, Cecilio A (2009). Monoaminergic Neurotransmission: The History of the Discovery of Antidepressants from 1950s Until Today. *Current Pharmaceutical Design.* 15(14):1563-86.
- Frey AH (1961). Auditory system response to radio frequency energy. Technical note. *Aerosp Med.* 32:1140-2.
- Fromherz P, Offenhausser A, Vetter T, *et al.* (1991). A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. *Science.* 252(5010):1290-3.
- Gao H, Aresu M, Vergnaud A-C, *et al.* (2018). Personal radio use and cancer risks among 48,518 British police officers and staff from the Airwave Health Monitoring Study. *British Journal of Cancer.*
- Genchi GG, Marino A, Grillone A, *et al.* (2017). Remote Control of Cellular Functions: The Role of Smart Nanomaterials in the Medicine of the Future. *Adv Healthc Mater.* 6(9).
- Giljohann DA, Seferos DS, Daniel WL, *et al.* (2010). Gold Nanoparticles for Biology and Medicine. *Angewandte Chemie International Edition.* 49(19):3280-94.
- Glaser R (2012). Biophysics, *Springer-Verlag Berlin Heidelberg.*
- Gobert A, Millan MJ (1999). Serotonin (5-HT)_{2A} receptor activation enhances dialysate levels of dopamine and noradrenaline, but not 5-HT, in the frontal cortex of freely-moving rats. *Neuropharmacology.* 38(2):315-7.
- Goldhammer M (2009). Elektromagnetische Befeldung neuronaler Zellen [Master Thesis]. *Hochschule für angewandte Wissenschaften Aschaffenburg.*
- Gompf J (2015). Der Einfluss des 5-HTT Polymorphismus auf die Emotionsverarbeitung und die Wirkung von SSRI bei Gesunden [Dissertation]. *Universität Hamburg.*
- Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, *et al.* (2004). Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjugate Chemistry.* 15(4):897-900.
- Goonetilleke L, Quayle J (2012). TREK-1 K(+) channels in the cardiovascular system: their significance and potential as a therapeutic target. *Cardiovasc Ther.* 30(1):e23-9.
- Green AC, Scott IR, Gwyther RJ, *et al.* (2005). An investigation of the effects of TETRA RF fields on intracellular calcium in neurones and cardiac myocytes. *Int J Radiat Biol.* 81(12):869-85.

-
- Gross GW, Rieske E, Kreutzberg GW, *et al.* (1977). A new fixed-array multi-microelectrode system designed for long-term monitoring of extracellular single unit neuronal activity in vitro. *Neurosci Lett.* 6(2-3):101-5.
- Gustrau F (2013). Hochfrequenztechnik - Grundlagen der mobilen Kommunikation, *Carl Hanser Verlag.*
- Halas N (2005). Playing with Plasmons: Tuning the Optical Resonant Properties of Metallic Nanoshells. *MRS Bulletin.* 30(5):362-7.
- Hamblin MR, Demidova TN (2006). Mechanisms of low level light therapy. *Proc SPIE 6140.* 6140:12.
- Heimburg T (2010). Lipid ion channels. *Biophysical Chemistry.* 150(1):2-22.
- Herron TJ, Rocha AM, Campbell KF, *et al.* (2016). Extracellular Matrix-Mediated Maturation of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiac Monolayer Structure and Electrophysiological Function. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 9(4).
- Hess M (2011). Entwicklung von MS-Bindungsassays für den Serotonin-Transporter [Dissertation]. *Ludwig-Maximilians-Universität München.*
- Heurteaux C, Guy N, Laigle C, *et al.* (2004). TREK-1, a K⁺ channel involved in neuroprotection and general anesthesia. *The EMBO journal.* 23(13):2684-95.
- Heurteaux C, Lucas G, Guy N, *et al.* (2006). Deletion of the background potassium channel TREK-1 results in a depression-resistant phenotype. *Nature Neuroscience.* 9:1134.
- Honoré E, Maingret F, Lazdunski M, *et al.* (2002). An intracellular proton sensor commands lipid- and mechano-gating of the K(+) channel TREK-1. *The EMBO journal.* 21(12):2968-76.
- Honoré E (2007). The neuronal background K2P channels: focus on TREK1. *Nat Rev Neurosci.* 8(4):251-61.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 71(4):533-54.
- Hu M, Chen J, Li Z-Y, *et al.* (2006). Gold nanostructures: engineering their plasmonic properties for biomedical applications. *Chemical Society Reviews.* 35(11):1084-94.
- Huang X, El-Sayed IH, Qian W, *et al.* (2006). Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *Journal of the American Chemical Society.* 128(6):2115-20.
- Huang X, Neretina S, El-Sayed MA (2009). Gold nanorods: from synthesis and properties to biological and biomedical applications. *Adv Mater.* 21(48):4880-910.

-
- Ichikawa M, Muramoto K, Kobayashi K, *et al.* (1993). Formation and maturation of synapses in primary cultures of rat cerebral cortical cells: an electron microscopic study. *Neurosci Res.* 16(2):95-103.
- Independent Advisory Group on Non-ionising Radiation (2012). Report RCE-20: health effects from radiofrequency electromagnetic fields. *Health Protection Agency.*
- International Agency for Research on Cancer - World Health Organization (2013). List of Classifications: Agents Classified by the IARC Monograph. URL: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/List_of_Classifications.pdf (Zugriffsdatum: 10.10.2018).
- International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (1998). Guidelines for Limiting Exposure to Time-Varying Electric, Magnetic and Electromagnetic Fields (up to 300 GHz). *Health Physics.* 74(4):494-522.
- International Telecommunication Union (2015). Nomenclature of the frequency and wavelength bands used in telecommunications V.431-8.
- International Telecommunication Union (2016). Measuring the Information Society Report.
- Jain PK, Lee KS, El-Sayed IH, *et al.* (2006). Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine. *J Phys Chem B.* 110(14):7238-48.
- Jenkins MW, Duke AR, Gu S, *et al.* (2010). Optical pacing of the embryonic heart. *Nature Photonics.* 4:623.
- Jimbo Y, Kawana A, Parodi P, *et al.* (2000a). The dynamics of a neuronal culture of dissociated cortical neurons of neonatal rats. *Biological Cybernetics.* 83(1):1-20.
- Jimbo Y, Robinson HP (2000b). Propagation of spontaneous synchronized activity in cortical slice cultures recorded by planar electrode arrays. *Bioelectrochemistry.* 51(2):107-15.
- Juutilainen J, Hoyto A, Kumlin T, *et al.* (2011). Review of possible modulation-dependent biological effects of radiofrequency fields. *Bioelectromagnetics.* 32(7):511-34.
- KaiTec GmbH (2018). TETRA-TMO 2022-A Autarke Basisstation für die Objektversorgung. URL: <http://www.kaitec-gmbh.de/wp-content/uploads/pdf/KAITEC-Prospekt-TMOa-Basisstation.pdf> (Zugriffsdatum: 09.12.2018).
- Kang D, Choe C, Kim D (2005). Thermosensitivity of the two-pore domain K⁺ channels TREK-2 and TRAAK. *The Journal of physiology.* 564(Pt 1):103-16.
- Karu TI (2008). Mitochondrial Signaling in Mammalian Cells Activated by Red and Near-IR Radiation. *Photochemistry and Photobiology.* 84(5):1091-9.

-
- Karu TI (2010). Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *Photochemistry and Photobiology*. 62(8):607 - 10.
- Kennard LE, Chumbley JR, Ranatunga KM, *et al.* (2005). Inhibition of the human two-pore domain potassium channel, TREK-1, by fluoxetine and its metabolite norfluoxetine. *Br J Pharmacol*. 144(6):821-9.
- Khoueiry CE, Moretti D, Renom R, *et al.* (2018). Decreased spontaneous electrical activity in neuronal networks exposed to radiofrequency 1,800 MHz signals. *Journal of Neurophysiology*. 120(6):2719-29.
- Kisselbach J, Seyler C, Schweizer PA, *et al.* (2014). Modulation of K2P 2.1 and K2P 10.1 K(+) channel sensitivity to carvedilol by alternative mRNA translation initiation. *Br J Pharmacol*. 171(23):5182-94.
- Klinke R, Pape H-C, Silbernagl S (2005). Physiologie, 5. Auflage. *Georg Thieme Verlag*.
- Köhler T, Wölfel M, Ciba M, *et al.* (2018). Terrestrial Trunked Radio (TETRA) exposure of neuronal in vitro networks. *Environmental Research*. 162:1-7.
- König A (2016). Einfluss von naher Infrarotstrahlung in Kombination mit ionisierender Strahlung auf Zellen der Haut [Dissertation]. *Technische Universität Darmstadt*.
- Korogod SM, Demianenko LE (2017). Temperature Effects on Non-TRP Ion Channels and Neuronal Excitability. *Opera Med Physiol*. 3(3,4):84-92.
- Krieger H (2017). Grundlagen der Strahlungsphysik und des Strahlenschutzes, *Springer-Verlag*.
- Kühn S, Kuster N (2006). Experimental EMF Exposure Assessment. In: Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields, 3rd edition. Editors: Barnes FS, Greenebaum B.
- Lamas GA, Orav EJ, Stambler BS, *et al.* (1998). Quality of Life and Clinical Outcomes in Elderly Patients Treated with Ventricular Pacing as Compared with Dual-Chamber Pacing. *N Engl J Med*. 338(16):1097-104.
- Lauff H, Wachenfeld A (2014). Differenzierte Betrachtung der Nutzung und der Wahrnehmung des Mobilfunks - Vorhaben FM8854, *Bundesamt für Strahlenschutz*.
- Lauritzen I, Chemin J, Honoré E, *et al.* (2005). Cross-talk between the mechano-gated K2P channel TREK-1 and the actin cytoskeleton. *EMBO reports*. 6(7):642-8.
- Lazrak A, Peracchia C (1993). Gap junction gating sensitivity to physiological internal calcium regardless of pH in Novikoff hepatoma cells. *Biophys J*. 65(5):2002-12.
- Lemke B, Höltnann BJ, Selbach H, *et al.* (1989). The atrial pacemaker: retrospective analysis of complications and life expectancy in patients with sinus node dysfunction. *International Journal of Cardiology*. 22(2):185-93.

-
- Lerchl A, Klose M, Grote K, *et al.* (2015). Tumor promotion by exposure to radiofrequency electromagnetic fields below exposure limits for humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 459(4):585-90.
- Lesage F, Terrenoire C, Romey G, *et al.* (2000). Human TREK2, a 2P domain mechanosensitive K⁺ channel with multiple regulations by polyunsaturated fatty acids, lysophospholipids, and Gs, Gi, and Gq protein-coupled receptors. *J Biol Chem.* 275(37):28398-405.
- Lin JC (2016). Human Exposure to RF, Microwave, and Millimeter-Wave Electromagnetic Radiation. *IEEE Microwave Magazine.* 17(6):32-6.
- Linde C, Braunschweig F, Gadler F, *et al.* (2003). Long-term improvements in quality of life by biventricular pacing in patients with chronic heart failure: results from the MULTISITE STimulation In Cardiomyopathy Study (MUSTIC). *The American Journal of Cardiology.* 91(9):1090-5.
- Liu L, Ding H, Yong K-T, *et al.* (2011). Application of Gold Nanorods for Plasmonic and Magnetic Imaging of Cancer Cells. *Plasmonics.* 6(1):105-12.
- Lugenbiel P, Wenz F, Syren P, *et al.* (2017). TREK-1 (K2P2.1) K(+) channels are suppressed in patients with atrial fibrillation and heart failure and provide therapeutic targets for rhythm control. *Basic Res Cardiol.* 112(1):8.
- Lüttge U, Kluge M, Thiel G (2010). Botanik - Die umfassende Biologie der Pflanzen, 1. Auflage. *Verlag Wiley-Blackwell.*
- Lyu Y, Xie C, Chechetka SA, *et al.* (2016). Semiconducting Polymer Nanobioconjugates for Targeted Photothermal Activation of Neurons. *J Am Chem Soc.* 138(29):9049-52.
- Mack CM, Lin BJ, Turner JD, *et al.* (2014). Burst and principal components analyses of MEA data for 16 chemicals describe at least three effects classes. *Neurotoxicology.* 40:75-85.
- Maingret F, Patel AJ, Lesage F, *et al.* (1999). Mechano- or acid stimulation, two interactive modes of activation of the TREK-1 potassium channel. *J Biol Chem.* 274(38):26691-6.
- Maingret F, Lauritzen I, Patel AJ, *et al.* (2000). TREK-1 is a heat-activated background K(+) channel. *The EMBO journal.* 19(11):2483-91.
- Maingret F, Honoré E, Lazdunski M, *et al.* (2002). Molecular Basis of the Voltage-Dependent Gating of TREK-1, a Mechano-Sensitive K⁺ Channel. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 292(2):339-46.
- Mandel Y, Weissman A, Schick R, *et al.* (2012). Human embryonic and induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes exhibit beat rate variability and power-law behavior. *Circulation.* 125(7):883-93.

-
- Manna D, Ghosh R (2016). Effect of radiofrequency radiation in cultured mammalian cells: A review. *Electromagn Biol Med.* 35(3):265-301.
- Marconi G (1922). Radio telegraphy. *Journal of the American Institute of Electrical Engineers.* 41(8):561-70.
- Martinoia S, Bonzano L, Chiappalone M, *et al.* (2004). In vitro cortical neuronal networks as a new high-sensitive system for biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics.* 20(10):2071–8.
- Mayer J (2011). Retrospektive Auswertung der Wirksamkeit und Verträglichkeit von Amitriptylin und Fluoxetin in der Kinder- und Jugendpsychiatrie [Dissertation]. *Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.*
- Medhurst AD, Rennie G, Chapman CG, *et al.* (2001). Distribution analysis of human two pore domain potassium channels in tissues of the central nervous system and periphery. *Molecular Brain Research.* 86(1):101-14.
- Merla C, Ticaud N, Arnaud-Cormos D, *et al.* (2011). Real-Time RF Exposure Setup Based on a Multiple Electrode Array (MEA) for Electrophysiological Recording of Neuronal Networks. *Ieee T Microw Theory.* 59(3):755-62.
- Merritt JH, Shelton WW, Chamness AF (1982). Attempts to alter 45Ca^{2+} binding to brain tissue with pulse-modulated microwave energy. *Bioelectromagnetics.* 3(4):475-8.
- Molleman A (2002). Patch Clamping: An Introductory Guide to Patch Clamp Electrophysiology, *Verlag Wiley-VCH.*
- Moretti D, Garenne A, Haro E, *et al.* (2013). In-vitro exposure of neuronal networks to the GSM-1800 signal. *Bioelectromagnetics.* 34(8):571-8.
- Multi Channel Systems MCS GmbH (2018). Manual Microelectrode Array (MEA). URL: https://www.multichannelsystems.com/sites/multichannelsystems.com/files/documents/manuals/MEA_Manual.pdf (Zugriffdatum: 10.08.2018).
- Myers RD, Ross DH (1981). Radiation and brain calcium: a review and critique. *Neurosci Biobehav Rev.* 5(4):503-43.
- Nakamura Y, Shi X, Numata T, *et al.* (2013). Novel HCN2 Mutation Contributes to Febrile Seizures by Shifting the Channel's Kinetics in a Temperature-Dependent Manner. *PLOS ONE.* 8(12):e80376.
- National Radiological Protection Board (2001). Report: Possible Health Effects from Terrestrial Trunked Radio (TETRA), *Advisory Group on Non-ionising Radiation.*
- Neher E, Sakmann B (1976). Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature.* 260(5554):799-802.

-
- Ni YG, Miledi R (1997). Blockage of 5HT_{2C} serotonin receptors by fluoxetine (Prozac). *PNAS*. 94(5):2036.
- Nick C, Goldhammer M, Bestel R, *et al.* (2013). DrCell – A Software Tool for the Analysis of Cell Signals Recorded with Extracellular Microelectrodes. *Signal Processing: An International Journal*. 7(2):96-109.
- Nieto-Hernandez R, Williams J, Cleare AJ, *et al.* (2011). Can exposure to a terrestrial trunked radio (TETRA)-like signal cause symptoms? A randomised double-blind provocation study. *Occupational and Environmental Medicine*. 68:339-44.
- Nishikawa S-i, Goldstein RA, Nierras CR (2008). The promise of human induced pluripotent stem cells for research and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9:725.
- Oka H, Shimono K, Ogawa R, *et al.* (1999). A new planar multielectrode array for extracellular recording: application to hippocampal acute slice. *J Neurosci Methods*. 93(1):61-7.
- Oster S (2014). Characterization of an incubator-based electro-magnetic exposition setup for human stem cells in vitro [Master Thesis]. *Hochschule für angewandte Wissenschaften Aschaffenburg*.
- Oster S, Daus AW, Erbes C, *et al.* (2016). Long-Term Electromagnetic Exposure of Developing Neuronal Networks: A Flexible Experimental Setup. *Bioelectromagnetics*. 37(4):264-78.
- Paci M, Hyttinen J, Rodriguez B, *et al.* (2015). Human induced pluripotent stem cell-derived versus adult cardiomyocytes: an in silico electrophysiological study on effects of ionic current block. *British Journal of Pharmacology*. 172(21):5147-60.
- Pastore MGSPD (2000). Specific helium-neon laser sensitivity of the purified cytochrome c oxidase. *International Journal of Radiation Biology*. 76(6):863-70.
- Patel AJ, Honoré E, Maingret F, *et al.* (1998). A mammalian two pore domain mechano-gated S-like K⁺ channel. *The EMBO journal*. 17(15):4283-90.
- Patel AJ, Honoré E, Lesage F, *et al.* (1999). Inhalational anesthetics activate two-pore-domain background K⁺ channels. *Nature Neuroscience*. 2:422.
- Pérez-Juste J, Pastoriza-Santos I, Liz-Marzán LM, *et al.* (2005). Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. *Coordination Chemistry Reviews*. 249(17):1870-901.
- Persch C (1997). Messung von Dielektrizitätskonstanten im Bereich von 0,2 bis 6 GHz und deren Bedeutung für die Mikrowellenerwärmung von Lebensmitteln [Dissertation]. *Universität Karlsruhe ehemals Universität Fridericiana Karlsruhe*.
- Pfeifer H (2007). Taschenbuch Industrielle Wärmetechnik: Grundlagen - Berechnungen - Verfahren, 4. Auflage. *Vulkan-Verlag*.

-
- Pfützner H (2012). *Angewandte Biophysik*, 2. Auflage. Springer Verlag.
- Pine J (1980). Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *J Neurosci Methods*. 2(1):19-31.
- Postea O, Biel M (2011). Exploring HCN channels as novel drug targets. *Nat Rev Drug Discov*. 10(12):903-14.
- Price DD, Finniss DG, Benedetti F (2008). A comprehensive review of the placebo effect: recent advances and current thought. *Annu Rev Psychol*. 59:565-90.
- Rennhoff A, Routon W (2016). Can you hear me now? The rise of smartphones and their welfare effects. *Telecommunications Policy*. 40(1):39-51.
- Rettinger J, Schwarz S, Schwarz W (2018). *Elektrophysiologie - Grundlagen, Methoden, Anwendungen*, 1. Auflage. Springer Spektrum.
- Riddervold IS, Kjaergaard SK, Pedersen GF, *et al.* (2010). No effect of TETRA hand portable transmission signals on human cognitive function and symptoms. *Bioelectromagnetics*. 31(5):380-90.
- Rinné S, Renigunta V, Schlichthörl G, *et al.* (2014). A splice variant of the two-pore domain potassium channel TREK-1 with only one pore domain reduces the surface expression of full-length TREK-1 channels. *Pflugers Arch*. 466(8):1559-70.
- Romanelli MN, Sartiani L, Masi A, *et al.* (2016). HCN Channels Modulators: The Need for Selectivity. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 16(16):1764-91.
- Rudnick GJ (1998). Bioenergetics of Neurotransmitter Transport. *Journal of Bioenergetics Biomembranes*. 30(2):173-85.
- Rudnick GJ (2006). Serotonin Transporters – Structure and Function. *The Journal of Membrane Biology*. 213(2):101-10.
- Ruggiero E, Alonso-de Castro S, Habtemariam A, *et al.* (2016). Upconverting nanoparticles for the near infrared photoactivation of transition metal complexes: new opportunities and challenges in medicinal inorganic photochemistry. *Dalton Trans*. 45(33):13012-20.
- Sauter C, Eggert T, Dorn H, *et al.* (2015). Do signals of a hand-held TETRA transmitter affect cognitive performance, well-being, mood or somatic complaints in healthy young men? Results of a randomized double-blind cross-over provocation study. *Environmental Research*. 140:85–94.
- Schiller J (2003). *Mobilkommunikation*, 2. Auflage. Pearson Verlag.

-
- Schmid G, Kuster N (2015). The discrepancy between maximum in vitro exposure levels and realistic conservative exposure levels of mobile phones operating at 900/1800 MHz *Bioelectromagnetics*. 36(2):133-48.
- Schmidt C, Wiedmann F, Tristram F, *et al.* (2014). Cardiac expression and atrial fibrillation-associated remodeling of K(2)p2.1 (TREK-1) K(+) channels in a porcine model. *Life Sci*. 97(2):107-15.
- Schmidt RF, Lang F, Thews G (2005). *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, 29. Auflage. *Springer Verlag*.
- Schuderer J, Spat D, Samaras T, *et al.* (2004). In vitro exposure systems for RF exposures at 900 MHz. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*. 52(8).
- Selinger JV, Pancrazio JJ, Gross GW (2004). Measuring synchronization in neuronal networks for biosensor applications. *Biosens Bioelectron*. 19(7):675-83.
- Shapiro MG, Homma K, Villarreal S, *et al.* (2012). Infrared light excites cells by changing their electrical capacitance. *Nature Communications*. 3:736.
- Shapiro SS, Wilk MB (1965). An Analysis of Variance Test for Normality. *Biometrika*. 52(3/4):591-611.
- Shelton WW, Jr., Merritt JH (1981). In vitro study of microwave effects on calcium efflux in rat brain tissue. *Bioelectromagnetics*. 2(2):161-7.
- Sheppard AR, Swicord ML, Balzano Q (2008). Quantitative evaluations of mechanisms of radiofrequency interactions with biological molecules and processes. *Health Phys*. 95(4):365-96.
- Simko M, Remondini D, Zeni O, *et al.* (2016). Quality Matters: Systematic Analysis of Endpoints Related to "Cellular Life" in Vitro Data of Radiofrequency Electromagnetic Field Exposure. *Int J Environ Res Public Health*. 13(7).
- Skjöldebrand C (2001). Infrared heating. In: *Thermal Technologies in Food Processing*, Editors: Richardson P. *Woodhead Publishing*.
- Spinks D, Spinks G (2002). Serotonin Reuptake Inhibition: An Update on Current Research Strategies. *Current Medicinal Chemistry*. 9(8):799-810.
- Spira ME, Hai A (2013). Multi-electrode array technologies for neuroscience and cardiology. *Nat Nanotechnol*. 8(2):83-94.
- Stavroulakis P (2007). *Terrestrial Trunked Radio - TETRA - A Global Security Tool*, *Springer Verlag*.

-
- Stutzki H, Leibig C, Andreadaki A, *et al.* (2014). Inflammatory stimulation preserves physiological properties of retinal ganglion cells after optic nerve injury. *Front Cell Neurosci.* 8:38.
- Sullivan GJ, Bai Y, Fletcher J, *et al.* (2010). Induced pluripotent stem cells: epigenetic memories and practical implications. *Mol Hum Reprod.* 16(12):880-5.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, *et al.* (2007). Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 131(5):861-72.
- Taketani M, Baudry M (2006). *Advances in Network Electrophysiology, Springer Verlag.*
- Talley EM, Solórzano G, Lei Q, *et al.* (2001). CNS Distribution of Members of the Two-Pore-Domain (KCNK) Potassium Channel Family. *The Journal of Neuroscience.* 21(19):7491.
- The European Parliament and of the Council (2013). Directive 2013/35/EU.
- Thermo Fisher Scientific Corporation (2014). Protocol: Primary Rat Cortex and Hippocampus Neurons. URL: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/rat_cortex_and_hippocampus_neurons.pdf (Zugriffsdatum: 08.07.2018).
- Thomas CA, Jr., Springer PA, Loeb GE, *et al.* (1972). A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Exp Cell Res.* 74(1):61-6.
- Tipler PA, Mosca G (2015). *Physik für Wissenschaftler und Ingenieure, Springer Spektrum.*
- Urban P, Kirchner SR, Mühlbauer C, *et al.* (2016). Reversible control of current across lipid membranes by local heating. *Scientific Reports.* 6:22686.
- Valentini E, Curcio G, Moroni F, *et al.* (2007). Neurophysiological effects of mobile phone electromagnetic fields on humans: a comprehensive review. *Bioelectromagnetics.* 28(6):415-32.
- Vennekens R, Nilius B (2007). Insights into TRPM4 Function, Regulation and Physiological Role. In: *Transient Receptor Potential (TRP) Channels*, Editors: Flockerzi V, Nilius B. *Springer Berlin Heidelberg.*
- Wahl-Schott C, Biel M (2009). HCN channels: structure, cellular regulation and physiological function. *Cell Mol Life Sci.* 66(3):470-94.
- Wallace D, Eltiti S, Ridgewell A, *et al.* (2010). Do TETRA (Airwave) Base Station Signals Have a Short-Term Impact on Health and Well-Being? A Randomized Double-Blind Provocation Study. *Environ Health Persp.* 118(6):735-41.
- Wallace D, Eltiti S, Ridgewell A, *et al.* (2012). Cognitive and physiological responses in humans exposed to a TETRA base station signal in relation to perceived electromagnetic hypersensitivity. *Bioelectromagnetics.* 33(1):23-39.

-
- Whelan HT, Jr. RLS, Buchman EV, *et al.* (2001). Effect of NASA Light-Emitting Diode Irradiation on Wound Healing. *J Clin Laser Med Surg.* 19(6):305-14.
- Wilson BC, Patterson MS (1986). The physics of photodynamic therapy. *Physics in Medicine & Biology.* 31(4):327.
- Wong DT, Bymaster FP, Reid LR, *et al.* (1985). Inhibition of Serotonin Uptake by Optical Isomers of Fluoxetine. *Drug Develop Res.* 6(4):397-403.
- Wong DT, Bymaster FP, Engleman EA (1995). Prozac (fluoxetine, Lilly 110140), the first selective serotonin uptake inhibitor and an antidepressant drug: twenty years since its first publication. *Life Sci.* 57(5):411-41.
- Xu Q, Kopp RF, Chen Y, *et al.* (2012). Gating of connexin 43 gap junctions by a cytoplasmic loop calmodulin binding domain. *Am J Physiol Cell Physiol.* 302(10):C1548-56.
- Yoo S, Hong S, Choi Y, *et al.* (2014). Photothermal inhibition of neural activity with near-infrared-sensitive nanotransducers. *ACS Nano.* 8(8):8040-9.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, *et al.* (2007). Induced Pluripotent Stem Cell Lines Derived from Human Somatic Cells. *Science.* 318(5858):1917-20.
- Zastrow L, Groth N, Klein F, *et al.* (2009). The Missing Link – Light-Induced (280–1,600 nm) Free Radical Formation in Human Skin. *Skin Pharmacology and Physiology.* 22(1):31-44.

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Kopplung zwischen Neuron und einer substrat-integrierten Elektrode.....	7
Abbildung 2: Elektromagnetisches Spektrum von Radiowellen bis zur Gammastrahlung.	8
Abbildung 3: Schematischer Aktionspotentialverlauf eines Neurons.	11
Abbildung 4: Extra- und intrazellulär gemessener Potentialverlauf eines neuronalen Aktionspotentials.	12
Abbildung 5: Schematische Darstellung von Kardiomyozyten-Aktionspotentialverläufen.	13
Abbildung 6: Das Aktionspotential von Kardiomyozyten des Arbeitsmyokards.	14
Abbildung 7: Elektromechanische Koppelung bei Kardiomyozyten.	15
Abbildung 8 Aktionspotentiale von Schrittmacher-Kardiomyozyten.	16
Abbildung 9: Mikroskopische Aufnahmen kortikaler Rattenneurone.	21
Abbildung 10: Mikroskopische Aufnahme humaner Kardiomyozyten.	23
Abbildung 11: Schematische Darstellung des NIR-Bestrahlungssetups	25
Abbildung 12: TETRA-TMO-Frequenzen.....	30
Abbildung 13: TETRA-Zeitmultiplexverfahren.	30
Abbildung 14: Schematisch dargestellte Feldverteilung und Streifenleitungsgeometrie.....	34
Abbildung 15: Dielektrische Erwärmung durch Radiowellen.	35
Abbildung 16: Bestimmung des Leistungspegels und numerische Simulation der spezifischen Absorptionsrate.	36
Abbildung 17: Temperaturmessung zur Bestimmung der spezifischen Absorptionsraten der TETRA-Exposition.....	38
Abbildung 18: Bestimmung des maximalen Temperaturanstieges während der TETRA-Exposition.....	40
Abbildung 19: Thermische Effekte auf neuronale Netzwerke durch moderate Temperaturerhöhungen.	41
Abbildung 20: TETRA-Kurzzeit-Exposition hat keine Auswirkung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von neuronalen Netzwerken.....	43
Abbildung 21: Extrazellulär abgeleitete kortikale Neurone zeigen typische Aktionspotentialverläufe vor und nach der TETRA-Kurzzeitexposition.	44
Abbildung 22: TETRA-Langzeit-Exposition hat keine Auswirkung auf die Spikerate von neuronalen Netzwerken.....	47
Abbildung 23: TETRA-Langzeit-Exposition hat keinen Effekt auf die Burstrate von neuronalen Netzwerken.	48
Abbildung 24: TETRA-Langzeit-Exposition hat keinen Effekt auf die Burstdauer von neuronalen Netzwerken.....	49

Abbildung 25: TETRA-Langzeit-Exposition hat keinen Effekt auf die Synchronität von neuronalen Netzwerken.....	50
Abbildung 26: Kortikale Neurone zeigen typische Aktionspotentialverläufe in TETRA-Langzeitversuchen.	51
Abbildung 27: Moderate Temperaturerhöhungen induzieren keine thermischen Effekte bei kardialen Netzwerken.....	52
Abbildung 28: TETRA-Kurzzeit-Exposition hat keine Auswirkung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von humanen Kardiomyozyten-Netzwerken.	54
Abbildung 29: Extrazellulär abgeleitete humane Kardiomyozyten zeigen typische Feldpotentialverläufe vor und nach der TETRA-Kurzzeit-Exposition.....	55
Abbildung 30: Schematische Darstellung oszillierender Elektronen-Wolken von Gold-Nanostäbchen.	59
Abbildung 31: Strukturformel des Antidepressivums Fluoxetin.	60
Abbildung 32: Schematische Darstellung einer TREK-1 Untereinheit.	61
Abbildung 33: Bestimmung der maximalen Bestrahlungsleistung der NIR-Laser-Diode.....	64
Abbildung 34: Bestimmung des Temperaturanstiegs im Zellmedium während der NIR-Exposition.....	65
Abbildung 35: Photothermische Stimulation hat eine direkte Auswirkung auf die Schlagrate von humanen Kardiomyozyten.	67
Abbildung 36: Photothermische Stimulation führt zu Arrhythmien und bewirkt die Inhibierung von Feldpotentialen bei humanen Kardiomyozyten.	68
Abbildung 37: Photothermische Stimulation bewirkt eine Verringerung der Ausbreitungsgeschwindigkeit von Feldpotentialen bei humanen Kardiomyozyten. ...	70

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Elektromagnetische Frequenzbänder nach ITU.....	10
Tabelle 2: Frequenzbänder bekannter Mobilfunkstandards.....	10
Tabelle 3: Intra- und extrazelluläre Ionenkonzentration eines Neurons.....	11
Tabelle 4: Verwendete Geräte und Sensoren.....	18
Tabelle 5: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	18
Tabelle 6: Verwendete Chemikalien, Enzyme, Proteine, Medien und Zusätze.....	19
Tabelle 7: Verwendete Software.....	19
Tabelle 8: Verwendete Zellkulturen.....	20
Tabelle 9: Verwendete Lösungen und Puffer.....	20
Tabelle 10: Verwendete Temperatursensoren und Dioden.....	20
Tabelle 11: Grenzwerte für den Frequenzbereich von 10 MHz – 10 GHz.....	33
Tabelle 12: Bestimmung der spezifischen Absorptionsraten durch numerische Simulationen.....	37
Tabelle 13: Berechnung der spezifischen Absorptionsrate anhand des Temperaturanstiegs während der TETRA-Exposition.....	39
Tabelle 14: Vergleich der spezifischen Absorptionsraten aus Temperaturmessungen und numerischen Simulationen.....	39
Tabelle 15: Temperaturanstiege durch die TETRA-Exposition.....	40
Tabelle 16: Spektralbereiche der Infrarotstrahlung.....	57

11. Eigene Arbeiten

Die Experimente, die Datenanalyse und -darstellung, sowie das Verfassen dieser Arbeit erfolgte durch mich, mit Ausnahme von:

- Die gezeigte Fluoreszenzfärbung (Kapitel 4.3, Abbildung 9B) von kortikalen Rattenneuronen wurde mit Unterstützung von Dr. Margot Mayer durchgeführt.
- Die Bestimmung der Leistungspegel für die Berechnung der spezifischen Absorptionsraten (Kapitel 5.3.1, Abbildung 16A,B,C) erfolgte mit Unterstützung von Dr. Maximilian Wölfel.
- Ein Teil der extrazellulären Ableitungen von humanen Kardiomyozyten bei den TETRA-Kurzzeit-Expositionsversuchen (Kapitel 5.3.6, Abbildung 28) und ein Teil der Messungen bei den Versuchen zu thermischen Effekten (Kapitel 5.3.5, Abbildung 27) erfolgten unter meiner Anleitung durch Jonas Krenz.
- Die Messungen zur Bestimmung des Temperaturanstieges im Zellmedium durch photothermische Stimulation (Kapitel 6.3.2, Abbildung 34) erfolgten unter meiner Anleitung durch Jonas Krenz.
- Ein Teil der extrazellulären Ableitungen von humanen Kardiomyozyten der photothermischen Versuche (Kapitel 6.3.3, Abbildung 35, Abbildung 37) erfolgte unter meiner Anleitung durch Jonas Krenz.

Teile von Kapitel 5 in denen die Auswirkung von TETRA-Bestrahlung auf neuronale *in vitro* Zellkulturen untersucht wurden, wurden bereits in ähnlicher Form in Köhler *et al.*, 2018 publiziert. Dies gilt für den textlichen Inhalt, als auch für die Abbildung 13, Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 22A, Abbildung 23A, Abbildung 24A und Abbildung 25, sowie für Abbildung 9A in Kapitel 4.3.

12. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den 09.01.2019
Tim Köhler

13. Publikationen

Flachs D, Köhler T, Thielemann C (2018). Transparent poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-based microelectrodes for extracellular recording. *Biointerphases*. 13(4):041008

Köhler T, Wölfel M, Ciba M, Bochtler U, Thielemann C (2018). Terrestrial Trunked Radio (TETRA) exposure of neuronal in vitro networks. *Environmental Research*. 162:1-7.

Wennmann J, Köhler T, Aletti G, Jehle J (2015). Mortality of Cutworm Larvae Is Not Enhanced by *Agrotis segetum* Granulovirus and *Agrotis segetum* Nucleopolyhedrovirus B Coinfection Relative to Single Infection. *Appl. Environ. Microbiol.* 81(8):2893-2899.

Karnik R, Grefen C, Bayne R, Honsbein A, Köhler T, Kioumourtzoglou D, Williams M, Bryant N, Blatt M (2013). Arabidopsis Sec1/Munc18 protein SEC11 is a competitive and dynamic modulator of SNARE binding and SYP121-dependent vesicle traffic. *Plant Cell*. 25(4):1368-82.

Bandmann V, Müller J, Köhler T, Homann U (2012). Uptake of fluorescent nano beads into BY2-cells involves clathrin-dependent and clathrin-independent endocytosis. *FEBS Lett.* 586(20):3626-32.

14. Poster- und Konferenzbeiträge

Vortrag

TETRA specific long-term exposure of neuronal in vitro networks (2016), Konferenz BIOEM, 2016, Gent, Belgien.

Poster

TETRA specific long-term exposure of neuronal in vitro networks (2016), Konferenz BIOEM, 2016, Gent, Belgien.

A setup for long-term investigations of electromagnetic fields (TETRA) on in vitro cell cultures, International School of Bioelectromagnetics “Alessandro Chiabrera”, 2014, Erice, Italien.

15. Betreute Arbeiten

Betreute Studienarbeiten:

Matthias Klement (2014), Optimierung des CO₂-Miniinkubators für Multielektrodenarray-Zellkulturen, Hochschule für angewandte Wissenschaften Aschaffenburg.

Jonas Krenz (2017), Temperaturveränderung des Zellkulturmediums im CO₂-Inkubator bei TETRA-Befeldung, Hochschule für angewandte Wissenschaften Aschaffenburg.

Betreutes Forschungspraktikum:

Anne Wienand (extern Universität Heidelberg) (2016), Photothermale Inhibition von neuronaler Aktivität durch Near-Infrared-Light, Hochschule für angewandte Wissenschaften Aschaffenburg.

Betreute Bachelorarbeit:

Jonas Krenz (2017), Wirkung elektromagnetischer Strahlung auf die elektrophysiologischen Eigenschaften von hiPS Herzmuskelzellen, Hochschule für angewandte Wissenschaften Aschaffenburg.

Betreute Masterarbeit:

Nico-Wei Kück (2018), Technische Untersuchung und ökonomische Betrachtung von aktuellen Methoden der Neurostimulation am Beispiel von Ultraschallstimulation, Hochschule für angewandte Wissenschaften Aschaffenburg.

16. Curriculum Vitae

Persönliche Information

Name	Tim Köhler
Geburtsdatum	13.03.1984 in Langen (Hessen)
Nationalität	Deutsch

Akademischer Werdegang

Seit 02/2014	Promotion, Fachbereich Biologie, Technische Universität Darmstadt
10/2011 – 10/2013	Masterstudium Technische Biologie, Technische Universität Darmstadt
10/2012 – 12/2012	Forschungspraktikum, University of Glasgow, Schottland, Vereinigtes Königreich Großbritannien
08/2013 – 10/2013	Supervisor für Lehramtsstudenten im Schülerlabor, Technische Universität Darmstadt
10/2010 – 12/2010	Mentor im Grundpraktikum, AG Thiel, Technische Universität Darmstadt
10/2011 – 02/2012	Wissenschaftliche Hilfskraft, AG Homann, Technische Universität Darmstadt
10/2008 – 09/2011	Bachelorstudium Biologie, Technische Universität Darmstadt

Beruflicher Werdegang

07/2018 – 12/2018	Werkstudent, Center of Excellence Medical EMEA, Fresenius Medical Care Deutschland GmbH, Bad Homburg
01/2018 – 06/2018	Projektmanagement Praktikant, Scientific Affairs, Center of Excellence Medical EMEA, Fresenius Medical Care Deutschland GmbH, Bad Homburg
08/2015 – 12/2017	Projektleiter der gentechnischen Anlage, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Aschaffenburg
11/2013 – 12/2017	Wissenschaftlicher Mitarbeiter, Hochschule für Angewandte Wissenschaften Aschaffenburg

17. Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denjenigen bedanken die mich in den letzten Jahren begleitet und unterstützt haben und somit auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Als erstes möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Gerhard Thiel bedanken, für seine fortwährende Unterstützung seit meinem Bachelorstudium bis zur Einreichung dieser Doktorarbeit, für seine Inspiration und den Blick auf die Dinge.

Zu gleichermaßen möchte ich mich bei Prof. Dr. Christiane Thielemann bedanken, für die Möglichkeit an spannenden und innovativen Projekten in einem interdisziplinären Team forschen zu können, für die offenen und inspirierenden Gespräche und die tolle Arbeitsatmosphäre.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Ralf Galuske, der den Grundstein für meine Begeisterung für die Neurobiologie in seinen Bachelor- und Mastermodulen gelegt hat und natürlich auch für die Übernahme des Zweitgutachten.

Auch den akademischen und industriellen Kooperationspartnern Prof. Dr. Ulrich Bochtler, Dr. Maximilian Wölfel und der KaiTec GmbH möchte ich meinen Dank aussprechen.

An dieser Stelle möchte ich auch die Gelegenheit nutzen mich bei PD. Dr. Ulrike Homann, Dr. Vera Bandmann und Prof. Dr. Adam Bertl zu bedanken, die meine Begeisterung für die Forschung früh geweckt haben und mich während des Studiums gefördert haben.

Danke auch an die gesamte AG Thielemann, für die schöne Zeit, die wissenschaftlichen Diskussionen und vor allem für die vielen gemeinsamen Aktivitäten. Ich möchte mich bei Manuel Ciba, Florian Emmerich, Dennis Flachs, Sebastian Allig, Stefan Belle, Berit Körbitzer, Dr. Robert Bestel und Dr. Nenad Krstic bedanken, aber im Besonderen bei Dr. Margot Mayer und Jonas Krenz.

Ich möchte auch der AG Thiel danken, für die Unterstützung und die gemeinsamen Unternehmungen. Besonderen Dank gilt Mirja Manthey, Dr. Brigitte Hertel, Silvia Haase, Dr. Marina Kithil und im speziellen der ehemaligen Doktorandin Dr. Charlotte von Chappuis.

Mein Dank gilt natürlich auch meinen besten und langjährigen Freunden Manuel Nölte, Dr. Sebastian Pfaff, Johannes Born, Andreas Larem, Mathias Peter und im Besonderen Christian Wüst. Ihr wart und seid immer Freude, Rückhalt und Verlässlichkeit.

Ein besonderer Dank gilt meinen lieben Eltern Marion und Jürgen Köhler und meiner Patentante Elke Lahr für eure stetige und bedingungslose Unterstützung.

Der größte Dank gilt aber meiner Freundin Dr. Fenja Siotto, für ihre Liebe, Unterstützung und Inspiration.