

Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

**Gentoxische Effekte von Terahertz-Strahlung in vitro
- Vorhaben 3607S04533**

**Auftragnehmer:
Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB), Braunschweig/Berlin**

**C. Jastrow
H. Hintzsche
B. Heinen
M. Schwerdtfeger
H. Stopper
M. Koch
J. Wehland (†)
U. Kärst
T. Kleine-Ostmann
A. Enders
T. Schrader**

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) und im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz (BfS) durchgeführt.

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMU (UFOPLAN) in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BfS übereinstimmen.

BfS-RESFOR-83/13

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:
urn:nbn:de:2013081411010

Salzgitter, August 2013

Physikalisch-Technische Bundesanstalt

Braunschweig und Berlin

Forschungsvorhaben FKZ 3607S04533

„Gentoxische Effekte von Terahertz-Strahlung *in vitro*“

Abschlussbericht

Dipl.-Ing. Christian Jastrow

Dr. Henning Hintzsche

Dipl.-Ing. (FH) Bernd Heinen

Dipl.-Ing. Michael Schwerdtfeger

Prof. Dr. Helga Stopper

Prof. Dr. Martin Koch

Prof. Dr. Jürgen Wehland (†)

Dr. Uwe Kärst

Dr. Thomas Kleine-Ostmann

Prof. Dr. Achim Enders

Dr. Thorsten Schrader

Braunschweig, 05. Januar 2012

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Forschungsnehmers wieder und muss nicht mit der Meinung des Auftraggebers (Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit) übereinstimmen.

Kurzfassung / Abstract

Im Rahmen des vom Bundesamt für Strahlenschutz in der Zeit vom 01.10.2007 bis zum 31.03.2011 geförderten Forschungsvorhabens FKZ 3607S04533 „Gentoxische Effekte von Terahertz-Strahlung in vitro“ wurden zwei verschiedene Hautzelltypen (HaCaT Keratinozyten und humane primäre Hautfibroblasten) mit Dauerstrich-Terahertz-Strahlung verschiedener Frequenzen zwischen 106 GHz und 2,52 THz exponiert. Als Endpunkte für den Nachweis gentoxischer Effekte wurden der Mikrokerntest und der Comet-Assay benutzt. Die Expositionen erfolgten für 2 h und 8 h bei Leistungsdichten unterhalb, in der Größenordnung und bei 106 GHz auch oberhalb des Grenzwertes von 1 mW/cm^2 . Im Rahmen ergänzender Untersuchungen wurden A_L -Zellen (Hamster-Human-Hybrid) 24 h bei 106 GHz mit einer Leistungsdichte von 2 mW/cm^2 exponiert. Erstmals wurden die Leistungsdichten rückgeführt auf die SI-Einheiten eingestellt. Die spezifische Absorptionsrate (SAR) am Ort der ortsfest verankerten Zellen wurde mit Hilfe numerischer Simulationen ermittelt. Die aus der Exposition resultierende (vernachlässigbare) Erwärmung wurde bestimmt und messtechnisch verifiziert. Durch kontinuierliche Überwachung der Versuchsparameter, Sham-Expositionen, Negativ- und Positivkontrollen sowie eine verblindete Auswertung wurde eine hohe Aussagekraft der Studie gewährleistet. Die Auswertung dreier unabhängiger Versuchsreihen zeigt keine gentoxischen Effekte.

In the research project FKZ 3607S04533 “Genotoxic effects of THz radiation in vitro“ funded by the German Federal Office for Radiation Protection from Oct. 1, 2007 until March 31, 2011 two different skin cell types (HaCaT keratinocyte cell line and primary dermal fibroblasts) have been exposed to continuous-wave terahertz radiation of different frequencies between 106 GHz and 2.52 THz. As end points for the detection of genotoxic effects the micronucleus test and the comet assay have been chosen. The cells have been exposed for 2 h and 8 h at power densities below, in the order of, and at 106 GHz above the safety limit of 1 mW/cm^2 . As part of additional investigations, A_L cells have been exposed to 2 mW/cm^2 of 106 GHz radiation for 24 h. For the first time, power densities have been established traceable to the SI units. The specific absorption rate (SAR) at the location of the cells fixed at the bottom of the cell container has been determined with numerical simulations. The (negligible) heating resulting from the exposure was determined and verified with measurements. Continuous monitoring of the experimental parameters, sham exposures, negative and positive controls and a blinded evaluation of the experimental results served to guarantee a high validity of the study. The evaluation of three independent experimental campaigns showed no genotoxic effects.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
1 Aufgabenstellung, Ablauf des Vorhabens und Gliederung des Abschlussberichtes	5
2 Literaturübersicht	6
2.1 Vorbemerkungen	6
2.2 Methodik	7
2.3 Studien	7
3 Auswahl geeigneter Materialien für Expositionseinrichtung und Probenbehälter	24
4 Konstruktion der Expositionseinrichtung	27
5 Bereitstellung der THz-Feldquellen	28
5.1 Konfiguration der Feldquellen bei 106 GHz und 380 GHz	30
5.1.1 Grundsätzlicher Aufbau der Quellen	30
5.1.2 Charakterisierung und Einstellung des Strahlprofils	31
5.1.3 Einstellung der Leistungsdichten	34
5.1.4 Messunsicherheitsbudget	38
5.2 Konfiguration der Feldquellen bei 2,52 THz	41
5.2.1 Lasersystem und -aufbau	41
5.2.1.1 Systemoptimierung	42
5.2.1.2 Leistungsüberwachung	43
5.2.2 Charakterisierung und Einstellung des Strahlprofils	46
5.2.3 Einstellung der Leistungsdichten	48
5.2.4 Messunsicherheitsbudget	49
6 Dosimetrie	52
6.1 Numerische Simulationen	52
6.2 Temperaturmessungen zur Verifikation	59
7 Methodik und Auswertung der Gentoxizitätstests	60
7.1 Einleitung	60

7.2	Material	61
7.3	Zellkultur.....	61
7.4	Methoden.....	62
7.5	Ergebnisse.....	65
7.5.1	Comet Assay	65
7.5.2	Mikrokerntest.....	69
7.5.3	Mikrokerntest 24-h-Expositionen.....	76
7.6	Diskussion.....	77
7.6.1	Comet Assay	77
7.6.2	Mikrokerntest.....	78
7.6.3	Mikrokerntest 24-h-Expositionen.....	79
8	Fazit	80
9	Literatur.....	81

1 Aufgabenstellung, Ablauf des Vorhabens und Gliederung des Abschlussberichtes

Ziel des dreijährigen Forschungsvorhabens ist die Klärung der Frage, inwieweit mit der Exposition lebender Zellen mit kontinuierlicher Terahertz-Strahlung Risiken bezüglich DNA- und/oder genom-schädigender Wirkungen verbunden sind. Gerade vor dem Hintergrund der zum Teil scharf geführten Diskussionen über Ganzkörperscanner und dem zunehmenden Einsatz heutiger Millimeterwellen-Scanner an Flughäfen ist auf die bedeutende Relevanz dieses Vorhabens hinzuweisen, zumal bis heute nur wenige wirklich umfassende Studien existieren, die sich mit der biologischen Wirkung in diesem Frequenzbereich beschäftigen.

Für die hier beschriebenen Feldexpositionsversuche wurden nur Zellsorten verwendet, die hinsichtlich der Beurteilung des Gefährdungspotenzials von THz-Strahlung für den Menschen relevant sind. Da elektromagnetische Wellen mit Frequenzen oberhalb von 100 GHz nur in die Haut, nicht aber in tiefere Gewebeschichten eindringen können, wurden für das Projekt zwei gut charakterisierte humane Hautzelltypen ausgesucht. Diese sollten mit kontinuierlicher THz-Strahlung exponiert und auf mögliche gentoxische Schäden hin untersucht werden. Dafür wurden mehrere biologische Endpunkte ausgewählt, um DNA-Strangbrüche, Mikrokerninduktion sowie mögliche Einflüsse auf Replikation und Zellzyklus feststellen zu können. Dadurch, dass die Zellen als Monolayer am Boden der Petrischale anhaften, ist sichergestellt, dass diese auch tatsächlich THz-Feldern ausgesetzt sind. Bei den Versuchen konnten Sekundäreffekte durch geeignete Wahl und Überwachung der Umgebungsbedingungen minimiert werden. Erstmals wurde in dem Projekt eine zuverlässige Dosimetrie ermöglicht, indem die Quellen genau charakterisiert wurden und die Leistungsdichte am Ort der Feldexposition rückgeführt auf die SI-Einheiten gemessen wurde. Durch die Exposition mit verschiedenen Leistungsdichten kann im Fall eines positiven Ergebnisses eine Dosis-Wirkungsbeziehung gefunden werden. Um die Zuverlässigkeit der Ergebnisse zu erhöhen, wurden nach einer ersten Probereihe drei weitere, zeitlich unabhängige Versuchsreihen durchgeführt. Die Erfahrungen und Ergebnisse der Probereihe konnten genutzt werden, um Probleme und mögliche Fehler bei der Durchführung der drei Reihen auf ein Minimum zu reduzieren und nötige Anpassungen wie beispielsweise die Reduktion der maximalen Leistungsdichte rechtzeitig vornehmen zu können. So konnten die Abläufe in einem unkritischen Rahmen erprobt und diverse Expositionsparameter vor den eigentlichen Expositionen optimiert und festgelegt werden. Die Auswertung sämtlicher Versuchsreihen erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test, da aufgrund der begrenzten Zahl an Wiederholungsexperimenten nicht von einer Normalverteilung der Daten ausgegangen werden kann. Die Zuverlässigkeit der Ergebnisse wird durch eine verblindete Auswertung sichergestellt.

Die Zellaufzucht erfolgte am Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig. Anschließend wurden die Proben inklusive der Kontrollen in einem Spezialbehälter (5% CO₂-Atmosphäre, 37° C) unverzüglich zum Expositionsort transportiert. Die Feldexpositionen bei 106 GHz und 380 GHz erfolgten an der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt in Braunschweig, die Feldexposition bei 2,52 THz am Institut für Hochfrequenztechnik der TU Braunschweig. Die Bestrahlungen erfolgten unter wohldefinierten Bedingungen in einem umgebauten Inkubator, der zusammen mit der gesamten Laborausstattung vor dem Beginn der Reihe an den Ort der jeweiligen Feldquelle transportiert wurde. Die Expositionen wurden mit

zwei unterschiedlichen Expositionszeiten bei Leistungsdichten zwischen 0 mW/cm² und dem doppelten Basisgrenzwert (2 mW/cm²) durchgeführt. Im Rahmen ergänzender Untersuchungen wurden A_L-Zellen (Hamster-Human-Hybrid) 24 h bei 106 GHz mit einer Leistungsdichte von 2 mW/cm² exponiert. Probenhandhabung und Fixierung geschahen unter Anleitung der Mitarbeiter des Instituts für Toxikologie der Universität Würzburg. Im Anschluss an die Expositionen wurden die fixierten Proben zur Universität Würzburg transportiert und dort mit zwei verschiedenen biologischen Endpunkten, mit Hilfe derer DNA-Strangbrüche bzw. Chromosomenbrüche und –fehlverteilungen detektiert werden können, ausgewertet.

In diesem Abschlussbericht wird zunächst die verfügbare Literatur zu diesem Themenkreis vorgestellt und einzelne Ergebnisse werden diskutiert, um eine Einordnung der Projektergebnisse zu ermöglichen. Anschließend wird in einem ausführlichen Methodenteil die Auswahl geeigneter Materialien für Expositionseinrichtung und Probenbehälter begründet, die Konstruktion der Expositionseinrichtung beschrieben und die Bereitstellung der THz-Feldquellen dargestellt. In dem darauffolgenden Kapitel wird detailliert auf die Dosimetrie eingegangen. Aus numerischen Simulationen werden die zu erwartenden Erwärmungen abgeleitet und messtechnisch verifiziert. Zum Ende des Abschlussberichtes werden die Ergebnisse der Feldexpositionsversuche nach einer Übersicht zu Methodik und Auswertung der Gentoxizitätstests dargestellt und diskutiert.

2 Literaturübersicht

2.1 Vorbemerkungen

Im Gegensatz zum Mobilfunkbereich ist der Terahertzbereich bisher mit Blick auf Auswirkungen auf biologische Systeme kaum untersucht. Die Ursache ist, dass es bis vor wenigen Jahren nicht gelungen war, geeignete Strahlungsquellen und Detektoren zu konstruieren, die Bestrahlungen unter genau kontrollierten Bedingungen ermöglichten. Mittlerweile sind diese Schwierigkeiten überwunden und Anwendungen dieser Technologie sind in Entwicklung bzw. wurden bereits etabliert (Kimmitt 2003, Koch 2005, Koch 2007). Diese Entwicklung ermöglicht Expositionsexperimente nun einerseits, macht diese andererseits aber auch unentbehrlich, da die entwickelten Anwendungen in Zukunft eine Exposition der Bevölkerung mit sich bringen.

Im Zeitraum von 1960 bis 2000 wurden nur vereinzelt derartige Studien durchgeführt. In den letzten zehn Jahren wurden deutlich mehr Arbeiten zu diesem Thema publiziert, einen besonders großen Beitrag leistete hier das von der Europäischen Union geförderte Projekt THz-Bridge (Gallerano 2004). Dennoch sind viele Fragen nach wie vor nicht geklärt. So ist der höhere Frequenzbereich von 4 bis 10 THz nicht untersucht. Außerdem sind fast alle bisherigen Studien in-vitro-Untersuchungen. Qualitativ hochwertige Tierstudien sind bisher nicht durchgeführt wurden, Humanstudien fehlen völlig.

Die Literaturübersicht wurde im Rahmen eines Reviews bereits zur Publikation akzeptiert (Hintzsche and Stopper: Effects by terahertz radiation on biological systems. 2011, Crit Rev Env Sci Tech). Ein Teil der Ergebnisse des experimentellen Teils, die im Rahmen einer Dissertation (Hintzsche: Gentoxizität

nichtionisierender Strahlung, 2011, Universität Würzburg) entstanden, sollen demnächst veröffentlicht werden.

2.2 Methodik

Für die Literaturrecherche wurden die Datenbanken Medline und Web of Science mit verschiedenen Suchbegriffen wie „terahertz“ oder „submillimeter“ durchsucht. Alle Studien, die Wirkungen auf biologische Systeme, verursacht durch elektromagnetische Strahlung der Frequenz 0,1 THz bis 10 THz, untersuchten, wurden in den Datensatz aufgenommen. Der Bereich bis 100 GHz wird bereits ausgiebig genutzt, z. B. durch Kfz-Radar (77 GHz), MIMO-Kommunikationssysteme (60 GHz) und Personenscanner (24-82 GHz). Expositionen der allgemeinen Bevölkerung oberhalb 100 GHz sind in Zukunft zu erwarten, z. B. im Bereich von Personenscannern und der Kommunikation. Arbeiten, die Frequenzen außerhalb dieses Bereiches untersuchten, wurden mit aufgenommen, wenn sie außerdem mindestens eine Frequenz im Terahertzbereich verwendeten. Es wurden nur Publikationen aufgenommen, die sich mit Wirkungen, d. h. funktionalen Effekten, beschäftigten; rein spektroskopische Untersuchungen sind nicht Gegenstand dieser Übersicht. Jede identifizierte Arbeit wurde anschließend daraufhin analysiert, welche Untersuchungen zitiert wurden und welche Publikationen die identifizierte Arbeit als Referenz zitierte. Gegebenenfalls wurden die so gefundenen Arbeiten auch in den Datensatz aufgenommen.

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

Alle experimentellen Arbeiten wurden mindestens mit den Parametern biologisches System, untersuchter Endpunkt, Frequenz, Expositionszeit und Leistungsdichte beschrieben. Die Angaben zur Leistungsdichten in mW/cm^2 wurden, sofern möglich, direkt aus der Publikation entnommen, andernfalls wurden sie aus den angegebenen Daten (Leistung, Energie oder Strahlcharakteristika) umgerechnet oder abgeschätzt. War dies nicht möglich, wurde die Dosimetrie in Abhängigkeit von angegebenen Details in der Form der Leistung oder Energie beschrieben. Modulationsart und -frequenz sowie Strahlungsquellen wurden nicht tiefergehend analysiert, da die Unterschiede bei diesen Parametern für einen sinnvollen Vergleich zu groß sind.

2.3 Studien

Insgesamt konnten 37 veröffentlichte Untersuchungen, die Wirkungen von Terahertzstrahlung auf biologische Systeme untersuchten, identifiziert werden. Einzelheiten zu diesen Arbeiten sind in den Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgelistet. 22 % ($n = 8$) dieser Studien beschäftigten sich theoretisch mit diesem Thema, wohingegen 78 % ($n = 29$) experimentelle Arbeiten waren (Abbildung 1 A). Die erste Arbeit erschien bereits

vor über 40 Jahren (1968), allerdings folgten keine weiteren Untersuchungen in den 1960er Jahren. Auch die folgenden drei Jahrzehnte brachten nur jeweils zwei bis drei Arbeiten hervor. Die Mehrheit der Studien wurde innerhalb der letzten zehn Jahre veröffentlicht. 62 % (n = 23) waren es im Zeitraum von 2000 bis 2009 und immerhin 14 % (n = 5) allein im Jahr 2010. Die Anzahl der publizierten Arbeiten reflektiert die Geschichte dieser Forschung, da es vor den 1960er Jahren praktisch unmöglich war, Sender und Empfänger für diesen Frequenzbereich zu konstruieren. Auch in den folgenden Jahrzehnten blieb dies schwierig und erst ab etwa 2000 konnten alle damit zusammenhängenden Probleme gelöst werden. Besonders die hohe Zahl der Studien, die 2010 innerhalb eines einzigen Jahres veröffentlicht wurden, zeigt das deutlich gestiegene Interesse an diesen Fragestellungen.

Tabelle 1: Übersicht über alle identifizierten Publikationen. Wurden mehr als zwei Frequenzen, Leistungsdichten oder Expositionszeiten untersucht, sind nur die untersten und obersten Werte angegeben. Einordnung der Ergebnisse: (+) Erhöhung des Parameters, (-) Verminderung des Parameters, (+/-) komplexe bzw. unklare Änderung, (0) keine Änderung, (0/+) und (0/-) teilweise Veränderung der Parameter. (P): Gepulst.

Publikation	Biologisches System	Frequenz [THz]	Leistung, Pulsenergie o. Leistungsdichte [mW/cm ²]	Expositionszeit [min]	Endpunkt	Ergebnis
Webb, 1968	E. coli	0,136	7 µW	30 - 240	Wachstum	-
Blackman, 1975	E. coli	0,136	-	30 - 240	Wachstum	0
Webb, 1975	E. coli	0,126 - 0,143	10 - 50	-	Wachstum	-
					DNA-Synthese	-
					RNA-Synthese	0
					Protein-Synthese	-
Tuengler, 1979	Alkohol-dehydrogenase	0,075 - 0,115	10 - 50	180	Aktivität	0
	Hämoglobin		3 - 13		Sauerstoff-bindung	0
Berns, 1987	PTK2-Zellen	1,500	0,1 (P)	0,5 - 10	Morphologie	0
					DNA-Synthese	-
Berns, 1990	CHO-Zellen	1,500	0,1 (P)	3 - 5	DNA-Synthese	-
Govorun, 1991	Alkohol-dehydrogenase	3,300	0,2 - 3 J (P)	-	Aktivität	+/-
	Albumin					+/-
	Peroxidase					-

Publikation	Biologisches System	Frequenz [THz]	Leistung, Pulsenergie o. Leistungsdichte [mW/cm ²]	Expositionszeit [min]	Endpunkt	Ergebnis
Berns, 1994	wie Berns 1987 & 1990					
Hadjiloucas, 2002	S. cerevisiae	0,192 - 0,341	0,0578	30 - 150	Wachstum	+
Clothier, 2003	Keratinocyten	0,100 - 300	2,5 (P)	10 - 30	Differenzierung Vitalität	0 0
Scarfi, 2003	Lymphocyten	0,120 - 0,130	0,03 - 0,05 (P)	20	DNA-Schaden	0
Doria, 2004	Liposomen	0,130	0,16 - 11,1 (P) 0,15 - 5 (P)	2 - 60	Permeabilität	0/+
	Lymphocyten			20	DNA-Schaden	0/+
Fedorov, 2007	Lymphocyten Erythrocyten	3,678	25 mW	30 - 90	Vitalität DNA-Synthese Membran-stabilität	+ + 0
Ramundo-Orlando, 2007	Liposomen	0,130 - 0,150	5,2 - 17,1 (P)	2	Permeabilität	0/+
Zeni, 2007	Lymphocyten	0,120 - 0,130	0,03 - 0,23	20	DNA-Schaden	0
Bondar, 2008	Mäuse	3,600	5	5 - 30	Verhalten	+/-
Kirichuk, 2008a	Ratten	0,150	-	15 - 30	Plättchen-aggregation	-
Korenstein-Ilan, 2008	Lymphocyten	0,100	0,031	60 - 1.440	Aneuploidie	+
Bourne, 2008	Keratinocyten Kornea-Zellen ND7/23-Zellen	0,140	0,1 - 0,25 (P)	1.440	Aktivität Differenzierung Protein-Synthese Morphologie Barrierefunktion	0 0 0 0 0

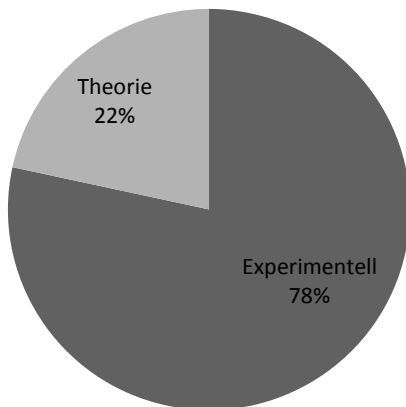
Publikation	Biologisches System	Frequenz [THz]	Leistung, Pulsenergie o. Leistungsdichte [mW/cm ²]	Expositionszeit [min]	Endpunkt	Ergebnis
Kirichuk, 2008b	Erythrozyten	0,240	1	15	Viskosität	-
					Deformation	0
					Aggregation	0
Olshevskaya 2008	Neuronen	0,717 - 3,678	0,3 - 30	60 - 180	Neuron-Netzwerk-Entstehung	+/-
Cherkasova, 2009	Albumin	3,600	10 mW	60	Bindungs-kapazität	+
Homenko, 2009	Alkalische Phosphatase	0,100	0,008	15 - 120	Aktivität	-/0
	Anti-DNP-Antikörper				Bindungs-kapazität	0
Kirichuk, 2009a	Ratten	0,150	0,2	15 - 30	Oxidativer Stress	-
Kirichuk, 2009b	Ratten	0,150	3	15 - 60	Verhalten	-/+
					Plättchen-aggregation	+
Wilmlink, 2010a	Fibroblasten	2,520	84,8	5 - 80	Vitalität	-
					Protein-Synthese	0
Wilmlink, 2010b	wie Wilmlink 2010a					
Wilmlink, 2010c	Fibroblasten Jurkat-Zellen	2,520	227	0,25 - 40	Vitalität	-/+
					Apoptose	-/+
					Nekrose	-/+
					mRNA-Synthese	-/+
Dalzell, 2010	Gamsgewebe	0,100 - 1,000	2,000 - 14,000	0,03	Gewebeschaden	+
	Schweinehaut, Eiweiß					

Von acht theoretischen Studien beschäftigten sich vier (50 %) mit Betrachtungen zu möglichen Wirkmechanismen, drei (37 %) fassten Teile der vorhandenen Literatur zusammen und eine (13 %) war der Bericht des EU-Forschungsprojektes THz-Bridge (Abbildung 1 B). 29 Experimentelle Studien konnten identifiziert werden, von denen zwei ausschließlich Daten publizierten, die bereits vorher veröffentlicht worden waren. Im ersten Fall (Berns and Bewley 1987, Berns et al. 1990, Berns et al. 1994) ist der Grund hierfür unklar, im zweiten Fall (Gerald J. Wilmink et al. 2010b, G. J. Wilmink et al. 2010) handelt es sich um Ergebnisse, die zunächst auf einer Konferenz vorgestellt und veröffentlicht wurden und anschließend als Artikel in einer Zeitschrift erschienen. Der Vollständigkeit halber sind beide Arbeiten mit aufgeführt, wurden aber nicht für die weiteren Analysen verwendet. Einzelzellsysteme wurden in den meisten experimentellen Arbeiten verwendet (29 %, n = 8), direkt gefolgt von Experimenten mit isolierten Systemen (z. B. Biomoleküle) und Blut bzw. Blutzellen (jeweils 22 %, n = 6). Den niedrigsten Anteil mit jeweils 14 % (n = 4) hatten Studien zu Wirkungen auf Tiere und Mikroorganismen (Abbildung 1 C). Fast die Hälfte der Arbeiten (42 %, n = 13) untersuchte Frequenzen im Bereich bis zu 0,150 THz, jeweils deutlich weniger arbeiteten mit Frequenzen im Bereich von 0,150 bis 1 THz (26 %, n = 8) bzw. über 1 THz (32 %, n = 10). Es konnte keine Studie, die Frequenzen über 4 THz verwendete, identifiziert werden (Abbildung 1 D). Acht Studien (19 %) exponierten für weniger als 10 min, 18 Studien (44 %) für 10 - 60 min und 13 Studien (32 %) für mehr als ein Stunde. Zwei Studien (5 %) enthielten keine Angaben zur Expositionszeit (Abbildung 1 E). Die Mehrheit der Untersuchungen (n = 15, 43 %) konnte keinen Effekt feststellen. Eine Zunahme des untersuchten Parameters wurde von 5 Arbeiten (14 %) beschrieben, eine Abnahme von 10 Arbeiten (29 %). 5 Untersuchungen (14 %) berichteten von Wirkungen, die nicht quantifiziert werden konnten (z. B. Verhaltensänderungen) oder unklar beschrieben waren (Abbildung 1 F).

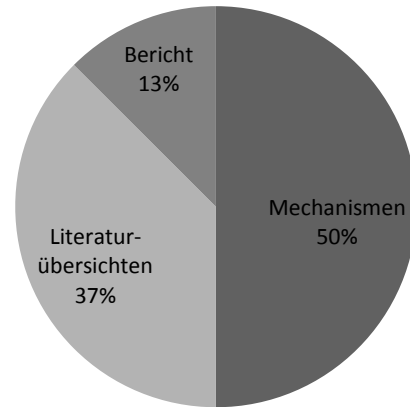
Publikation	Art	Inhalt
Mi, 1989	Literaturübersicht	Chinesische Studien Auswirkungen auf Pflanzen
Smye, 2001	Theorie	Mechanismen Spektroskopie
Fedorov, 2003	Literaturübersicht	Russische Studien
Gallerano, 2004	Programmbereich	THz-Bridge-Ergebnisse
Chitanvis, 2006	Theorie	Modellierung
Zhifu, 2007	Theorie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

Tabelle 2: Übersicht über theoretische Untersuchungen

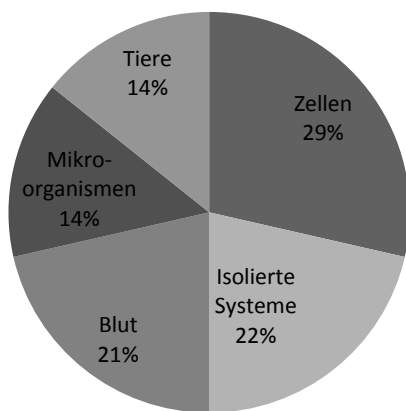
(A) Art der Publikation



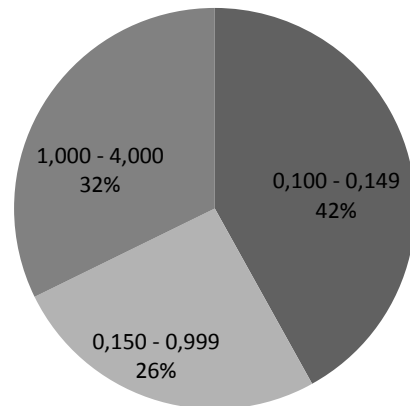
(B) Art der Theorie-Untersuchungen



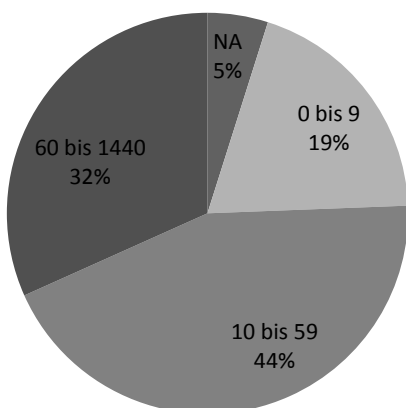
(C) Testsystem



(D) Frequenz [THz]



(E) Expositionszeit [min]



(F) Ergebnis

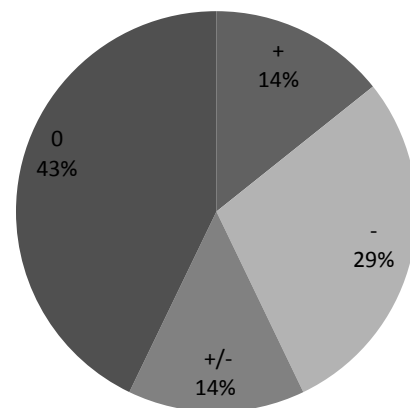


Abbildung 1: Analyse der identifizierten Publikationen. Prozentuale Verteilung hinsichtlich (A) der Art der Publikation, (B) der Art der Theorie-Untersuchung, (C) des verwendeten Testsystems, (D) der untersuchten Frequenz, (E) der Expositionszeit und (F) des Untersuchungsergebnisses.

Literaturübersichten

Die erste Literaturübersicht beschrieb mehrere chinesische Untersuchungen, die sich mit Auswirkungen von Terahertzstrahlung auf Pflanzen beschäftigten (Mi 1989). Sie beinhaltet acht Arbeiten, die in der Zeit von 1986 bis 1988 erschienen. Alle verwendeten als Frequenzen 0,670 oder 2,523 THz und untersuchten hauptsächlich Effekte auf Reis, Weizen oder Bohnen. Leistungsdichten wurden kaum beschrieben, lagen aber anscheinend im Bereich einiger mW/cm^2 . Expositionszeiten variierten von 10 bis 90 Minuten. Zu den untersuchten Auswirkungen gehörten verschiedene Wachstumsparameter, Esterase-Aktivität und Mutationen. Alle aufgeführten Publikationen beobachteten einen durch Bestrahlung verursachten Effekt. Esterase-Aktivität und Mutationsraten waren erhöht (genauere Angaben fehlen) und Wachstumsparameter verbessert. Zwei Studien untersuchten Protein-Expression und Qualität und Quantität der nachfolgenden Generation in *Drosophila melanogaster*. Genaue Angaben fehlen zwar, aber es ist davon auszugehen, dass ähnliche Parameter wie in den Pflanzen-Studien in Bezug auf Frequenz, Leistungsdichte und Expositionszeit verwendet wurden. In Folge der Bestrahlung war die Proteinexpression, sowie die Qualität (vermindert) und Quantität (erhöht) des Nachwuchses verändert. Diese Übersicht ist sehr wertvoll, da Auswirkungen auf Pflanzen bisher nicht anderweitig beschrieben wurden. Die Methodenbeschreibung ist jedoch äußerst dürftig, so dass abzuwarten bleibt, ob die Ergebnisse von anderen Gruppen bestätigt werden können.

Ein weiterer, sehr umfangreicher Übersichtsartikel beschreibt hauptsächlich russische Original-Studien (Fedorov et al. 2003). Er ist entsprechend der Ebenen der untersuchten biologischen Systeme gegliedert. Auf der Ebene der Makromoleküle werden zwei Arbeiten vorgestellt, die auch in der vorliegenden Übersicht beschrieben werden (Govorun et al. 1991, Mi 1989), wobei eine fälschlicherweise als Originalarbeit und nicht (wie es richtig wäre) als Übersichtsartikel dargestellt wird. Zu den weiteren präsentierten Arbeiten gehören eine Studie, die sich mit Bindungskapazität von Hämoglobin nach Bestrahlung mit 330 THz beschäftigt, eine Untersuchung, die exakt den gleichen Inhalt hat wie (Govorun et al. 1991), mehrere spektroskopische Untersuchungen sowie einige Kurzzusammenfassungen von Tagungen. Auf der Ebene der Einzelzellsysteme sind zwei Studien enthalten, die auch in der vorliegenden Übersicht beschrieben werden (Berns and Bewley 1987, Berns et al. 1990). Die darüber hinaus aufgeführten Arbeiten untersuchten die Auswirkungen von Bestrahlung mit 3,3 THz auf Zellteilung (vermindert) und Zelltod (erhöht), Bestrahlung mit 330 THz auf den Membranwiderstand in Erythrozyten (vermindert), Bestrahlung mit 0,890 THz auf die Immunantwort (verändert) und Leukozytenmigration (vermindert) in Zellen der Milz, Bestrahlung mit 0,3 bis 3 THz auf die Viruskonzentration (vermindert) in mit Masern infizierten Zellkulturen und schließlich Bestrahlung mit 0,890 THz auf Membranstabilität (vermindert) und Zelltod (erhöht) in humanen Tumorzellen und *Shigella*-Zellen. Auf der Ebene des Organismus wird wiederum der bereits erwähnte Übersichtsartikel (Mi 1989) mit zwei darin aufgelisteten Originalarbeiten genannt. Darüber hinaus sind zwei Studien zu Wirkungen auf *Drosophila melanogaster* genannt, eine berichtet von erhöhter Fertilität und Vitalität nach Bestrahlung mit 1 bis 100 THz, die andere von verminderten Mutationsraten nach Bestrahlung mit 3,5 THz. Abschließend wird eine Arbeit genannt, die in Ratten Auswirkungen von Bestrahlung mit 0,890 THz auf die Nebennierenmasse (erhöht), auf die Thymusmasse (vermindert) und auf die Konzentrationen von 11-Oxycorticosteroid und alkalischer Phosphatase (verändert) untersuchte.

Die neueste Literaturübersicht (Ramundo-Orlando and Gallerano 2009) beschäftigt sich schwerpunktmäßig mit Arbeiten (Ramundo-Orlando et al. 2007, Scarfi et al. 2003, Zeni et al. 2007, Korenstein-Ilan et al. 2008), die im Zusammenhang mit dem EU-Projekt THz-Bridge (Gallerano 2004) entstanden sind. Die experimentellen Arbeiten sowie der Programmreport werden in der vorliegenden Übersicht ausführlich dargestellt. Weiterhin werden drei Übersichtsartikel vorgestellt, von denen einer hier bereits beschrieben wurde (Fedorov et al. 2003). Die anderen beiden beschreiben ausschließlich Arbeiten, die Frequenzen unterhalb von 80 GHz einsetzen, die somit nicht als Untersuchungen im Terahertzbereich bezeichnet werden können (Mileva et al. 2003, Pakhomov et al. 1998). Weitere acht Studien werden genannt, jedoch nicht näher beschrieben. Diese Studien liegen entweder nur in russischer Sprache vor oder beschäftigen sich mit Frequenzen unterhalb von 100 GHz. Zusätzlich beschreiben die Autoren biologische Anwendungen von Terahertzstrahlung wie z. B. Biokatalyse, pharmazeutisches Screening, Sensorik oder medizinische Bildgebung.

Mechanismusübersichten

Die erste Arbeit, die sich mit möglichen Wirkmechanismen auseinandersetzte, legte einen deutlichen Schwerpunkt auf spektroskopische Untersuchungen, bezog aber auch mögliche funktionale Konsequenzen in die Überlegungen mit ein (Smye et al. 2001). Es werden Veränderungen der Vibrations- und Rotationsenergien beschrieben, die in Aminosäuren, Peptiden und Proteinen auftreten können. Weiterhin werden Vibrationen erläutert, bei denen sich Tertiärstrukturen in DNA-Molekülen gegen-einander bewegen. Die biologische Bedeutung dieser Änderungen wird jedoch offen gelassen.

Eine weitere Mechanismus-Betrachtung verwendete einen eher mathematisch ausgerichteten Ansatz (Zhifu et al. 2007). In einer Reihe von Berechnungen wurden Resonanzeffekte bei der Interaktion zwischen Terahertzstrahlung und lebenden Systemen analysiert. Im Anschluss wurden diese Interaktionen quantenmechanisch betrachtet und abschließend erfolgte eine Analyse möglicher nichtlinearer Effekte. Als Ergebnis wurde postuliert, dass Terahertzstrahlung Resonanzeffekte hervorrufen kann, und dass dies zu starken Oszillationen von Bindungen führt, so dass diese letztlich brechen können.

Eine theoretische Studie untersuchte mit Hilfe von Computermodellierungen Auswirkungen auf die DNA (Chitanvis 2006). Es wurde das Pegrard-Bishop-Dauxois-Modell der Doppelstrang-DNA verwendet. Die Modellierung enthielt nicht nur das DNA-Molekül sondern auch das Lösungsmittel. Es zeigte sich ein Einfluss von Terahertzstrahlung auf die Wasserstoffbrückenbindungen.

Das gleiche Modell wurde in einer weiteren Studie verwendet (Alexandrov et al. 2010). Hier wurde die Dynamik der Bindung zwischen den komplementären Basen bzw. zwischen den Einzelsträngen untersucht. Es wurde gezeigt, dass Terahertzstrahlung eine dynamische Auftrennung der DNA-Einzelstränge verursachen kann. Keine dieser theoretisch beschriebenen Effekte auf die DNA wurde bisher experimentell nachgewiesen.

Programmübersicht

Das bisher umfangreichste interdisziplinäre Forschungsprojekt in diesem Forschungsgebiet war das von der Europäischen Union geförderte Projekt THz-Bridge (Gallerano 2004). Der Bericht enthält Ergebnisse, die auch separat publiziert wurden und in der vorliegenden Übersicht behandelt werden (Doria et al. 2004, Scarfi et al. 2003, Zeni et al. 2007, Korenstein-Ilan et al. 2008, Bourne et al. 2008, Clothier and Bourne 2003). Neben spektroskopischen Untersuchungen und Betrachtungen zu Sicherheitsfragen enthält der Bericht auch unveröffentlichte Ergebnisse zu direkten Effekten auf DNA-Basen. Die Bestrahlung erfolgte mit etwa 5 mW/cm^2 für 20 Minuten bei einer Frequenz von $0,130 \text{ THz}$. Mögliche Effekte auf Adenin, Guanin und Cytosin wurden mittels Rasterkraftmikroskopie untersucht. Es konnten keine Auswirkungen beobachtet werden.

Isolierte Systeme

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

Die erste dieser Untersuchungen wurde in den 1970er Jahren durchgeführt (Tuengler et al. 1979). Es wurden Hämoglobin und Alkoholdehydrogenase bestrahlt und funktionale Auswirkungen analysiert. Die Bestrahlung erfolgte mit steigender Frequenz ($3,5 \text{ MHz/s}$) im Bereich von $0,075$ bis $0,115 \text{ THz}$. Die Autoren gaben die Expositionszeit nicht explizit an, allerdings kann sie aus den Angaben zur Frequenzänderung abgeschätzt werden und betrug etwa drei Stunden. Die Alkohol-Dehydrogenase wurde mit einer Leistungsdichte von etwa $10 - 50 \text{ mW/cm}^2$ bestrahlt. Es konnten keine Effekte größer als $0,1 \%$ beobachtet werden. Hämoglobin wurde mit etwa $3 - 13 \text{ mW/cm}^2$ bestrahlt, wobei keine Effekte größer als $0,4 \%$ gezeigt werden konnten. Die Autoren selbst stellten fest, dass die Leistungsfluss-dichte nicht tatsächlich gemessen, sondern nur abgeschätzt werden konnte.

Auswirkungen auf die Alkoholdehydrogenase wurden auch in einer weiteren Studie untersucht, die zusätzlich noch Albumin und Peroxidase betrachtete (Govorun et al. 1991). Es wurde gepulste Strahlung einer Frequenz von $3,3 \text{ THz}$ verwendet. Hierbei kamen Pulsenergien von 5 mJ zum Einsatz, dies ergab eine durchschnittliche Gesamtenergie von $0,2$ bis 3 J . Die Aktivität der Peroxidase nahm leicht ab, wohingegen die Funktion der anderen beiden Proteine komplexere Veränderungen zeigte. Zuerst trat eine Abnahme auf, die bei höheren Energien aufgehoben wurde und sogar in eine Erhöhung überging. Die Autoren gaben keine Erklärung für dieses nichtlineare Ergebnis. Weder Expositionszeit noch Leistungsdichten bzw. Strahlcharakteristika wurden angegeben.

Eine weitere Studie untersuchte Auswirkungen auf Albumin, konkret auf die Bindungskapazität von Progesteron zu Albumin (Cherkasova et al. 2009). Die Bestrahlung erfolgte bei $3,6 \text{ THz}$ mit etwa 10 mW (keine Leistungsdichte angegeben) für 60 Minuten und resultierte in einer erhöhten Bindungskapazität. Zusätzlich wurden spektroskopische Unterschiede beobachtet, aus denen die Autoren schlussfolgerten, dass Konformationsunterschiede für die beobachteten Effekte verantwortlich gewesen sein könnten.

Eine letzte Untersuchung zu Effekten auf Proteine untersuchte, welchen Einfluss eine Bestrahlung mit 0,1 THz auf gelöste oder fixierte alkalische Phosphatase hatte (Homenko et al. 2009). Die Bestrahlung erfolgte mit 0,008 mW/cm² für unterschiedliche Zeiträume von 15 bis 90 Minuten (Enzym allein) und von 30 bis 120 Minuten (Enzym und Substrat). Die Aktivität des fixierten Enzyms war nach Bestrahlung nicht verändert, während das gelöste Enzym eine verminderte Aktivität aufwies. Die Autoren schlossen daraus, dass die Fixierung einen protektiven Einfluss hat. Allerdings muss betont werden, dass die Effekte zwar statistisch signifikant, aber dennoch extrem niedrig sind. Weiterhin ist die Dosimetrie der Untersuchung fraglich, da es sich um ein wässriges System handelt, bei dem starke Absorption auftritt. Zusätzlich wurde die Interaktion zwischen einem Antikörper (anti-DNP gegen Dinitrophenyl) und seinem Substrat untersucht. Es wurde wieder Strahlung einer Frequenz von 0,1 THz mit 0,008 mW/cm² verwendet, hier wurde allerdings nur ein Zeitintervall, 90 Minuten, angewendet. Die Autoren beschrieben einen signifikanten Effekt im Falle der Bestrahlung des Substrat-Antikörper-Komplexes im Gegensatz zur Bestrahlung des Substrates vor der Antikörper-Zugabe. Die Abbildungen der Publikation unterstützten diese Behauptung jedoch nicht.

Ein anderes System, das untersucht wurde, besteht aus künstlichen Liposomen, die als Modell für Zellmembranen eingesetzt werden. Der Einfluss auf die Permeabilität wird getestet, indem ein Enzym (Anhydrase) in das Innere der Liposomen aufgenommen und das entsprechende Substrat (p-Nitrophenylacetat) zur externen Lösung zugegeben wird. Der Gehalt des Reaktionsproduktes wird bestimmt, wobei ein Anstieg bedeutet, dass die Barriere der Liposomengrenzschicht nicht mehr wirksam ist, d. h. die Membranstabilität ist vermindert. In der ersten Studie mit diesem Modell wurden zwei Versuchsvarianten (beide bei 0,130 THz) eingesetzt. In der ersten Variante wurden die Liposomen für 60 Minuten mit 0,16 mW/cm² (Pulsfrequenz 5 Hz) oder 0,23 mW/cm² (Pulsfrequenz 7 Hz) bestrahlt. In der zweiten Variante wurde die Expositionszeit auf zwei Minuten reduziert, allerdings wurden die Leistungsdichten auf 5,6 mW/cm² (Pulsfrequenz 5 Hz), 7,8 mW/cm² (Pulsfrequenz 7 Hz) bzw. 11,1 mW/cm² (Pulsfrequenz 10 Hz) erhöht. Nur in der zweiten Versuchsvariante, und hier nur bei 7,8 mW/cm², konnte ein klarer Effekt auf die Liposomenstabilität beobachtet werden. Die Autoren deklarierten nicht einen sogenannten Fenster-Effekt, sondern assoziierten die Wirkung mit der Pulsfrequenz. Hier ist wiederum die Dosimetrie zu hinterfragen, da es sich um ein wässriges System handelt.

Die zweite Untersuchung mit diesem Modell verwendete ebenfalls eine Frequenz von 0,130 THz (Ramundo-Orlando et al. 2007). Die Messungen wurden über zwei Minuten während der Bestrahlung durchgeführt, wobei die Bestrahlung bereits etwa eine Minute vor Beginn der Messungen begonnen wurde. Es wurden drei verschiedene Pulsfrequenzen (5, 7 und 10 Hz) untersucht und zu jeder dieser Frequenzen wurden je vier verschiedene Leistungsdichten im Bereich von 5,2 bis 17,1 mW/cm² angewendet. Ein hoch-signifikanter Effekt konnte für alle Leistungsdichten bei der mittleren Pulsfrequenz von 7 Hz beobachtet werden. Alle anderen Bestrahlungen (mit Ausnahme von 7,5 mW/cm² bei 5 Hz) zeigten keine deutlichen Änderungen. Zusätzlich wurde noch mit un gepulster Strahlung bei 0,150 THz mit 6,2 mW/cm² bestrahlt, wobei keine Änderungen gezeigt wurden. Das Resümee der Studie lautete, dass der Effekt von der Pulsfrequenz abhängt und dass thermische Wirkungen ausgeschlossen werden können. Unabhängig von der Frage der Temperatur ist die erste Schlussfolgerung bezüglich der Abhängigkeit von der Pulsfrequenz offensichtlich zutreffend und sollte tiefergehend untersucht werden. Besonders von Interesse ist hier, die Experimente vom Modell auf reale Membranen zu übertragen.

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

Mikroorganismen

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

Bereits in den 1960er Jahren beschäftigten sich Forscher mit Effekten auf *E. coli* (Webb and Dodds 1968). Hier wurde das Wachstumsverhalten der Bakterien nach Bestrahlung bei 0,136 THz mit geschätzten 7 μW für vier Stunden beobachtet. Messungen wurden alle 30 Minuten durchgeführt. Eine starke Hemmung des Wachstums konnte nach 2 Stunden beobachtet werden, wenn die Zellen in der lag-Phase bestrahlt wurden. Diese Hemmung trat bereits nach 1,5 Stunden auf, wenn die Bestrahlung in der log-Phase erfolgte. Die Autoren diskutieren eine Hemmung der Zellteilung oder auch der metabolischen Prozesse als möglichen Wirkmechanismus, liefern jedoch keine weiteren Nachweise dafür.

Später versuchte eine andere Gruppe, diese Experimente zu wiederholen (Blackman et al. 1975). Auch hier wurde Strahlung mit 0,136 THz für vier Stunden auf *E. coli* angewendet. Im Gegensatz zu der früheren Studie (Webb and Dodds 1968) konnte keine Wachstumshemmung beobachtet werden. Eine genaue Messung der Leistungsdichte war nach Auskunft der Autoren nicht möglich, so dass aus ihrer Sicht das gesamte Experiment ergebnislos blieb.

Im selben Jahr präsentierte die erste Gruppe wieder eine Untersuchung, bei der nicht nur Auswirkungen auf das Wachstum, sondern auch auf die Synthese von DNA, RNA und Proteinen bestimmt wurden. *E. coli*-Kulturen wurden neben mehreren Frequenzen unterhalb von 0,100 THz auch mit 0,126, 0,129, 0,136, 0,141 und 0,143 THz bestrahlt. Die Leistungsdichten betragen etwa 10 bis 50 mW/cm^2 . Die Expositionszeit wurde nicht angegeben, aufgrund der ersten Publikation kann aber von vier Stunden ausgegangen werden. Je nach verwendeter Frequenz verminderte sich das Wachstum auf 6 - 53 %, die DNA-Synthese auf 8 - 53 % und die Protein-Synthese auf 9 - 52 %. Einzig die RNA-Synthese blieb unverändert (79 - 106 %). Da die Hemmung für alle Frequenzen unterschiedlich stark ausfiel und keine lineare Korrelation gefunden wurde, diskutierten die Autoren Resonanzeffekte als mögliche Mechanismen.

Wachstum wurde auch in einer weiteren Studie, allerdings bei *S. cerevisiae*, untersucht (Hadjiloucas et al. 2002). Hier wurden die Mikroorganismen mit verschiedenen Frequenzen von 0,192 bis 0,341 THz jeweils für 2,5 Stunden bestrahlt. Die Leistung reichte von 0,4 bis 30 mW , nähere Angaben zu Leistungsdichte oder Strahlcharakteristika fehlen. Keine Änderung des Wachstums konnte bei den elf niedrigsten Frequenzen beobachtet werden, es zeigte sich aber eine klare Zunahme bei 0,341 THz. Die Autoren proklamierten einen Fenster-Effekt, wobei die Frequenz die höchste der untersuchten war, so dass in diesem Fall nicht von einem Fenster gesprochen werden kann. Anschließend wurde diese Frequenz näher untersucht. Es wurden Expositionszeiten von 30, 60, 90, 120 und 150 Minuten und eine Leistungsdichte von 57,8 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$

eingesetzt. Eine signifikante Zunahme wurde für alle Expositionszeiten außer 150 Minuten beschrieben. Allerdings zeigten die beigefügten Abbildungen eine Wachstumszunahme nur nach Exposition für 30 Minuten, für die anderen Zeiten war keine Veränderung erkennbar. Es bleibt weiterhin unklar, warum gerade eine Exposition für 150 Minuten im zweiten Teil keinen Effekt zeigte, wohingegen im ersten Teil bei genau dieser Expositionszeit ein klarer Effekt beobachtet wurde. Die Autoren gingen auf diesen Widerspruch nicht ein. Obwohl die Ergebnisse dieser Arbeit von den Autoren selbst im Titel als „vorläufig“ bezeichnet wurden, ist bislang keine weitere Publikation erschienen, die diese Effekte näher untersuchen würde.

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

Säugerzellsysteme

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

Eine der ersten Studien bestimmte den Effekt von Strahlung einer Frequenz von 1,5 THz auf PTK2-Zellen, eine Zelllinie, die von Zellen des Rattenkängurus stammt (Berns and Bewley 1987). Es wurden 10, 20 bzw. 100 Pulse zu jeweils 100 W/cm² angewendet, die resultierenden Expositionszeiten waren 0,5 - 1, 1 - 2 bzw. 5 - 10 Minuten. Die durchschnittliche Leistungsdichte betrug etwa 0,1 mW/cm². Unterschiede in der Zellmorphologie wurden weder direkt nach der Exposition noch nach drei Stunden Postinkubation festgestellt. Nach einer Postinkubationszeit von 20 Stunden wurde eine sehr geringe Änderung in der Morphologie beobachtet. Es wurde eine verminderte DNA-Synthese nach der langen Expositionszeit, jedoch nicht nach den beiden kürzeren Zeiten festgestellt. Da die Auswirkungen nur bei einem Teil der Zellpopulation beobachtet wurden, diskutierten die Autoren eine genetische Prädisposition oder eine Abhängigkeit vom Zellzyklus im Zusammenhang mit möglichen Wirkmechanismen.

Die gleiche Gruppe untersuchte auch Auswirkungen auf Zellen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen), sowohl in der S-Phase synchronisierte als auch nicht synchronisierte (Berns et al. 1990). Es wurde wieder die DNA-Synthese nach langer Expositionszeit (wiederum 1,5 THz mit durchschnittlich 0,1 mW/cm²), d. h. 100 Pulse entsprechend etwa 5 bis 10 Minuten, untersucht. Es konnte erneut eine Hemmung der DNA-Synthese beobachtet werden, die in synchronisierten Zellen stärker auftrat. Aus diesem Grund schlossen die Autoren auf eine direkte Wirkung auf die DNA.

Einige Jahre später wurde eine weitere Publikation veröffentlicht, die genau diese Ergebnisse der letzten beiden Studien beschrieb (Berns et al. 1994).

Die erste von zwei sehr ausführlichen Studien verwendete zwei verschiedene, gepulste Strahlungsquellen (0,2 - 3,0 THz und 0,1 - 2,7 THz) und untersuchte Effekte auf primäre humane Keratinozyten (Clothier and Bourne 2003). Diese sind als Hautzellen ein besonders interessantes Untersuchungsobjekt, da bei THz-Expositionen des menschlichen Körpers aufgrund starker Absorption die Haut am stärksten betroffen wäre.

Die Zellen wurden mit $2,5 \text{ mW/cm}^2$ für 10, 20 und 30 Minuten exponiert. Auswirkungen auf die Differenzierung und die Vitalität wurden nach verschiedenen Postinkubationszeiten untersucht. Es wurden keine Effekte beobachtet. Die Autoren beschrieben eine hohe Variabilität zwischen den verschiedenen Zellspendern, allerdings wird die Variabilität zwischen den einzelnen Expositionen nicht erwähnt.

In einer zweiten Studie untersuchte die gleiche Gruppe gepulste Strahlung einer Frequenz von $0,140 \text{ THz}$ mit Leistungsdichten von $0,1$ bis $0,25 \text{ mW/cm}^2$ bei einer Expositionszeit von 24 Stunden (Bourne et al. 2008). Keratinozyten wurden wieder auf Veränderungen bei Differenzierung und Vitalität untersucht. Außerdem wurden Morphologie und die Expression von Hitzeschockproteinen betrachtet. Zusätzlich wurden humane Kornea-Zellen exponiert und hinsichtlich Vitalität, Expression von Hitzeschockproteinen und Barrierefunktion überprüft. Schließlich wurden noch ND7/23-Zellen, eine neuronale Zelllinie, verwendet. Hier wurden die Vitalität und der Glutathiongehalt untersucht. Alle beschriebenen Parameter wurden durch die Exposition nicht beeinflusst.

Nur eine Studie beschäftigte sich mit Zellen, die nicht von einem Säugetier stammen (Olshevskaya et al. 2008). Isolierte Neuronen von *Lymnaea stagnalis*, der Spitzschlamm Schnecke, wurden exponiert und beobachtet. Nach einer Exposition mit $3,678 \text{ THz}$ (keine Angaben zu Expositionszeit oder Leistungsdichte) waren bei 12 - 15 % der Neuronen oberflächliche Heterogenitäten, sowie nicht näher charakterisierte Wachstumsstörungen zu beobachten. Nach Exposition mit $0,717 \text{ THz}$ zeigte sich bei 70 - 80 % der Neuronen eine gestörte Anhaftung an die Oberfläche. Abschließend wurde eine detailliert beschriebene Exposition durchgeführt ($2,498 \text{ THz}$; $0,3$, $1 - 10$ und 30 mW/cm^2 ; 60 , 120 und 180 Minuten). Hier zeigte sich ein verändertes Membranpotential der Zellen. Insgesamt ist die Beschreibung der Methoden sehr lückenhaft und entsprechend schwer interpretierbar.

Die erste Arbeit einer Dreier-Serie von Studien untersuchte Auswirkungen von Strahlung einer Frequenz von $2,52 \text{ THz}$ auf humane primäre Hautfibroblasten (Gerald J. Wilmink et al. 2010b, G. J. Wilmink et al. 2010). Die Zellen wurden für 5, 10, 20, 40 und 80 Minuten mit $84,8 \text{ mW/cm}^2$ exponiert. Anschließend wurden die Vitalität und die Transkription von Hitzeschock- und mit DNA-Schaden assoziierte Proteine untersucht. Die Transkription blieb unbeeinflusst, aber die Vitalität sank auf etwa 90 %. Da die verwendete Leistungsdichte sehr hoch war, wurden Temperaturmessungen durchgeführt, die zeigten, dass die Temperatur während der Exposition um $3 \text{ }^\circ\text{C}$ stieg. Daher wurde nun als zusätzliche Kontrollen nicht nur unbehandelte Zellen, sondern auch um $3 \text{ }^\circ\text{C}$ erwärmte Zellen eingesetzt. Hier zeigte sich die gleiche Verminderung der Vitalität auf 90 %.

In einer zweiten Studie wurden ebenfalls primäre Hautfibroblasten nach Exposition mit $2,52 \text{ THz}$ untersucht (Gerald J. Wilmink et al. 2010a). Nach Bestrahlung mit 227 mW/cm^2 für 1 bzw. 2 Minuten wurde eine mRNA-Untersuchung durchgeführt, wobei mehr als 400 Gene (mit Verbindung zu Apoptose, Proteolyse, Metabolismus, DNA-Schaden etc.) analysiert wurden. Es konnte kein Muster erkannt werden, d. h. einige Gene waren hoch-, andere herunterreguliert. Große Änderungen konnten nicht beobachtet werden. Darüber hinaus wurde eine Apoptose-spezifische Färbung nach einer Expositionszeit von 15 Sekunden (wahrscheinlich wiederum 227 mW/cm^2) eingesetzt und zeigte programmierten Zelltod hauptsächlich direkt an der Expositionsstelle, nicht jedoch in umliegenden Arealen. Schließlich wurden Jurkat-Zellen, eine Lymphozyten-Zelllinie, für 5, 10, 20, 30 und 40 Minuten exponiert. Ab einer Expositionszeit von 20 Minuten

konnte auftretender Zelltod beobachtet werden. Genauere durchflusszytometrische Messungen ergaben, dass hierbei sowohl apoptotische als auch nekrotische Prozesse beteiligt waren.

Die dritte Studie untersuchte Gewebeschäden (Dalzell et al. 2010). Im ersten Teil wurden Gewebestücke der Gämse im Frequenzbereich von 0,1 bis 1,0 THz für 2 Sekunden mit Leistungsdichten von 2.000 bis 14.000 mW/cm² exponiert. Der entstandene Gewebeschaden wurde analysiert und eine ED₅₀ von 7.160 mW/cm² wurde bestimmt. Diese lag in der Nähe eines vorher modellierten Wertes von 5.000 mW/cm². Im zweiten Teil wurden Schweinehaut und Eiweiß bei 1,89 THz für 10 Minuten exponiert. Angaben zur Leistungsdichte sind nicht schlüssig, liegen aber im Bereich um 190 mW/cm². In der Schweinehaut konnte kein Gewebeschaden beobachtet werden. Auch in den Eiweiß-Proben traten nur in einigen Proben kleine Veränderungen auf.

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

Blut(-zellen)

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

Die erste Studie untersuchte Zellproliferation und Mikrokernfrequenz, ein Biomarker für chromosomale DNA-Schäden (Scarfi et al. 2003). Lymphozyten von sechs Spendern wurden mit gepulster Strahlung bei 0,120 THz mit 0,05 mW/cm² exponiert. Ein zweiter Satz von Lymphozytenproben von drei Spendern wurde bei 0,130 THz mit 0,03 mW/cm² exponiert. Expositionszeit war in beiden Fällen 20 Minuten. Signifikante Veränderungen konnten weder für die Proliferation noch für die Mikrokernfrequenzen beobachtet werden.

Ähnliche Experimente wurden von der gleichen Gruppe in Hinblick auf unterschiedliche Pulsfrequenzen durchgeführt (Doria et al. 2004). Zunächst wurden Proliferation und Mikrokernfrequenz in Lymphozyten von fünf Spendern nach gepulster Exposition bei 0,130 THz für 20 Minuten untersucht. Die verwendeten Pulsfrequenzen von 5 und 7 Hz ergaben durchschnittliche Leistungsdichten von 0,15 bzw. 0,25 mW/cm². Es konnte kein DNA-Schaden beobachtet werden. Zusätzlich wurde noch eine weitere Methode verwendet, der Comet Assay. Dieser untersucht Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA. Die Expositionen (wiederum für 20 Minuten bei 0,130 THz) wurden hier in zwei Expositionsaufbauten durchgeführt, in der ersten mit 2 mW/cm² und in der zweiten mit 5 mW/cm². Im ersten Aufbau verursachte die Exposition keinen DNA-Schaden, aber im zweiten Aufbau konnte eine kleine, aber signifikante Erhöhung des DNA-Schadens beobachtet werden. Die Autoren spekulierten, dass der verwendete Metallkonus zu Resonanzeffekten führte und so der aufgetretene Schaden erklärt werden könnte. Im Allgemeinen ist die Dosimetrie

wiederum schwer zu beurteilen, da es sich um wässrige Systeme handelt. Allerdings trifft dies nicht für den letzten Teil zu, bei dem erhöhter DNA-Schaden beobachtet wurde, da hier nur Lymphozyten ohne Kulturmedium exponiert wurden.

In einer ähnlichen Studie wurde wiederum der Mikrokerntest in Lymphozyten nach gepulster Exposition bei 0,120 THz mit 0,05 mW/cm² für 20 Minuten durchgeführt (Zeni et al. 2007). Zusätzlich wurden noch 20-minütige gepulste Expositionen bei 0,130 THz mit 0,03, 0,16 und 0,23 mW/cm² durchgeführt. Die letzten beiden Expositionen wurden zusätzlich mit Hilfe des Comet-Assays ausgewertet. Alle Auswertungen zeigten, dass kein DNA-Schaden auftrat. Interessanterweise beschrieben die Autoren die Arbeit als „Pilotstudie“ bzw. als „die erste Studie ... von ... gentoxischen Effekten“, obwohl bereits zwei Publikationen (Doria et al. 2004, Scarfi et al. 2003) analoge Experimente beschrieben.

Die letzte Arbeit des THz-Bridge-Projektes verwendete auch Lymphozyten, untersuchte allerdings das Auftreten von Aneuploidie und assoziierten Effekten (Verlust oder Gewinn eines Chromosoms, asynchrone Replikationszeit der Chromosomen) in den Chromosomen 1, 10, 11 und 17 mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungs-Technologie (FISH) (Korenstein-Ilan et al. 2008). Die Zellen wurden bei 0,1 THz mit 0,031 mW/cm² für 1, 2 und 24 Stunden exponiert. Aneuploidie wurde nach Expositionen für 2 und 24 Stunden für die Chromosomen 11 und 17, aber nicht für 1 und 10 beobachtet. Asynchrone Replikation trat nach 2 (Chromosomen 1, 11 und 17) bzw. nach 24 Stunden (alle Chromosomen) Expositionszeit auf. Dieser Befund ist wichtig, da Aneuploidie im Menschen potentiell zu Krebserkrankungen führen kann. Die Untersuchungen sollten daher unabhängig wiederholt werden, wobei einige Nachteile der Auswertung verbessert werden sollten. Beispielsweise wurden Beobachtungen von Nullisomie (d. h. ein Chromosomenpaar fehlt vollständig) nicht in die Auswertung mit einbezogen, obwohl dies von großem Interesse gewesen wäre. Weiterhin wurden in die Auswertung nur Zellen mit einer Fläche von mehr als 50 µm² eingeschlossen, anscheinend um nur PHA-stimulierte Zellen auszuwerten. Allerdings wurden dadurch alle Zellen, die bereits durch die Mitose und noch nicht durch die nächste S-Phase gegangen sind, ausgeschlossen, wodurch viele potentiell interessante Zellen für die Auswertung verloren wurden.

Eine weitere Untersuchung verwendete Strahlung einer Frequenz von 3,678 THz mit 25 mW (Fedorov et al. 2007). Nach Exposition für 30 Minuten wurden Vitalität und DNA-Synthese in Lymphozyten untersucht. Erythrozyten wurden für 30 und 90 Minuten exponiert und auf Membranstabilität untersucht, indem der Hämoglobin-Export aus den Zellen überwacht wurde. Vitalität und DNA-Synthese wurden durch die Exposition vermindert. Die Membranstabilität war nur unter hypoosmotische Bedingungen eingeschränkt, nicht bei osmotisch normaler Umgebung. Die Autoren deklarierten einen Einfluss von Monozyten auf den beobachteten Effekt in Lymphozyten, allerdings untermauern die präsentierten Daten dies nicht. Weiterhin behaupteten die Autoren, dass die untersuchten Parameter unter dem Einfluss von Terahertzstrahlung einen hohen diagnostischen Wert haben. Worin dieser Wert genau besteht und auf welche Art von Diagnose Bezug genommen wird, bleibt jedoch unklar.

Eine weitere Studie untersuchte Blutproben von Angina-pectoris-Patienten (Kirichuk et al. 2008a). Einige Blutproben wurden mit ISDN, d. h. Isosorbiddinitrat (Isoket), einem NO-Donor-Medikament zur Behandlung der Angina pectoris, behandelt. Die Exposition der Blutproben und/oder des Medikaments erfolgte bei 0,240 THz mit 1 mW/cm² für 15 Minuten. Es ist nicht klar ersichtlich, ob zusätzlich auch einzelne Patienten

direkt exponiert wurden. Mit ISDN behandelte Blutproben zeigten eine deutliche verringerte Viskosität, die durch die Exposition noch weiter verringert wurde. Bei der Untersuchung von Erythrozyten konnten keine Auswirkung auf die Aggregation und fast keine Auswirkung auf die Deformierbarkeit festgestellt werden. Identische Ergebnisse wurden gefunden, wenn die Blutproben vor der ISDN-Behandlung exponiert wurden.

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

Tierstudien

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

In der Untersuchung mit Mäusen wurden die Tiere bei 3,6 THz mit etwa 5 mW/cm² für verschiedene Zeiträume von 5 bis 30 Minuten exponiert (Bondar et al. 2008). Die Tiere wurden in Käfigen gehalten, die ein kleines Loch enthielten, durch das die Strahlung eintrat. Die Käfige wurden durch eine transparente Barriere von einem zweiten Käfig, in dem ein weiteres Tier gehalten wurde, abgetrennt. Während der Exposition wurde das Verhalten beobachtet. Es zeigten sich keine Veränderungen mit Bezug zu der transparenten Barriere bzw. zu dem anderen Tier. Es traten aber Veränderungen mit Bezug zum Loch auf, z. B. war die Frequenz des Schnüpperns am Loch und die Verweildauer in der Nähe des Loches vermindert. Einen Tag später wurde das Verhalten in einem Labyrinth untersucht. Im Vergleich zu Kontrolltieren wurden hier kleine, jedoch signifikante Veränderungen festgestellt, beispielsweise war die Gesamtzeit im Labyrinth leicht erhöht. Die Autoren zogen den Schluss, dass die Tiere die Exposition spüren und in der Folge ein ängstliches Verhalten zeigen. Die Dosimetrie in den frei beweglichen Tieren ist in diesem Experiment jedoch zweifelhaft.

Eine Studie mit Ratten untersuchte die Auswirkung einer Exposition bei 0,150 THz für 15 und 30 Minuten auf die Thrombozytenaggregation nach Immobilisierung (Kirichuk et al. 2008b). Angaben zur Leistung bzw. Leistungsdichte fehlen. Die Aggregation der Thrombozyten war nach Immobilisierung deutlich erhöht, konnte jedoch nach einer Exposition von 15 Minuten, und noch deutlicher von 30 Minuten auf Normalhöhe (teilweise sogar darunter) verringert werden. Die Autoren beschrieben, dass die verwendete Frequenz mit einer Absorptionsbande von Stickstoffmonoxid übereinstimmt und deklarierten, dass dieses durch die Exposition endogen freigesetzt wird und so die Wirkung vermittelt.

Die nächste Studie der gleichen Gruppe verwendete die gleichen Parameter (Ratten, 0,150 THz, 15 und 30 Minuten), enthielt aber hier Angaben zur Leistungsdichte, die etwa 0,2 mW/cm² betrug (Kirichuk and Tsymbal 2009). Es wurden verschiedene Stress-Biomarker, die im Zusammenhang mit Lipidoxidation und antioxidativen Vorgängen stehen, im Blut untersucht. Wiederum verursachte Immobilisierung der Tiere eine deutliche Erhöhung aller Parameter und die Exposition konnte diese Erhöhung rückgängig machen. Zusätzlich wurde noch eine Gruppe nicht mit Terahertzstrahlung, sondern mit Strahlung einer Frequenz von

53,5 GHz exponiert. Hier konnte keine Reduktion der Parameter festgestellt werden. Wieder wurde die vermittelnde Rolle von Stickstoffmonoxid diskutiert.

Die dritte Studie dieser Gruppe verwendete erneut eine Frequenz von 0,150 THz, allerdings mit 3 mW/cm² für 15, 30 und 60 Minuten (Kirichuk et al. 2009). Als ein Endpunkt wurde hier das Verhalten in einem Labyrinth getestet. Die Immobilisierung führte zu einer Verringerung des Orientierungsvermögens der Tiere, allerdings trat diese Verringerung nach Exposition noch stärker auf. Weiterhin wurde wieder die Thrombozytenaggregation untersucht. Interessanterweise konnten die ersten Ergebnisse (Kirichuk et al. 2008b) nicht bestätigt werden. Es wurde gefunden, dass die Aggregation nach Immobilisierung deutlich erhöht war, jedoch konnte diese Erhöhung durch die Exposition hier nicht rückgängig gemacht werden, sondern verursachte sogar noch eine weitere Erhöhung. Überraschenderweise kommentierten die Autoren diese gegensätzlichen Befunde in keiner Weise.

Fazit

Der vorliegende Abschlussbericht erweitert die Wissensbasis zur gentoxischen Wirkung von THz-Strahlung durch eine umfassende In-vitro-Studie, die sowohl den betrachteten Frequenzbereich erweitert (106 GHz bis 2,52 THz), als auch die Rückführung der Versuchsparameter auf SI-Einheiten gewährleistet.

3 Auswahl geeigneter Materialien für Expositionseinrichtung und Probenbehälter

Um eine hohe Qualität der Expositionen und der Resultate sicherzustellen und Fremdeffekte durch für Zellkulturen physiologisch ungünstige Umgebungsbedingungen ausschließen zu können, sollten die Befeldungen in einem Inkubator durchgeführt werden. Dieser musste dafür jedoch so modifiziert werden, dass die THz-Strahlung seitlich eingekoppelt und umgelenkt werden kann, um dann von unten auf die Probenschalen zu treffen, in denen die Zellen direkt am Boden haften. Für die Modifikationen mussten daher Materialien gefunden werden, die die Strahlung möglichst wenig (durch Aufkonzentration oder Dämpfung der Felder) beeinflussen. Da die Absorption vieler Stoffe im THz-Frequenzbereich sehr hoch ist, mussten die verwendeten Materialien auf Ihre Eigenschaften hin untersucht werden. Das betrifft sowohl die Einkoppelfenster zur Abdichtung der Einstrahlöffnungen innerhalb der Inkubatorwand als auch die Probenbehälter, in denen die Zellen kultiviert werden. Um Aussagen über die Verwendbarkeit für die Exposition mit THz-Wellen treffen zu können, wurden Probemuster sämtlicher auf dem deutschen Markt erhältlichen, verschiedenen Typen an Probengefäßen angefordert und am Institut für Hochfrequenztechnik der TU Braunschweig mittels THz-Zeitbereichsspektroskopie und FIR-Laser auf ihre Transparenz hin untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Transparenz bei 2,52 THz am geringsten ist, so dass aus Zeitgründen auf eine quantitative Auswertung im THz-Zeitbereichsspektrometer verzichtet wurde. Eine Auswahl möglicher Probenbehälter und die Zusammenfassung der Messergebnisse bei 2,52 THz zeigt Abbildung 2.

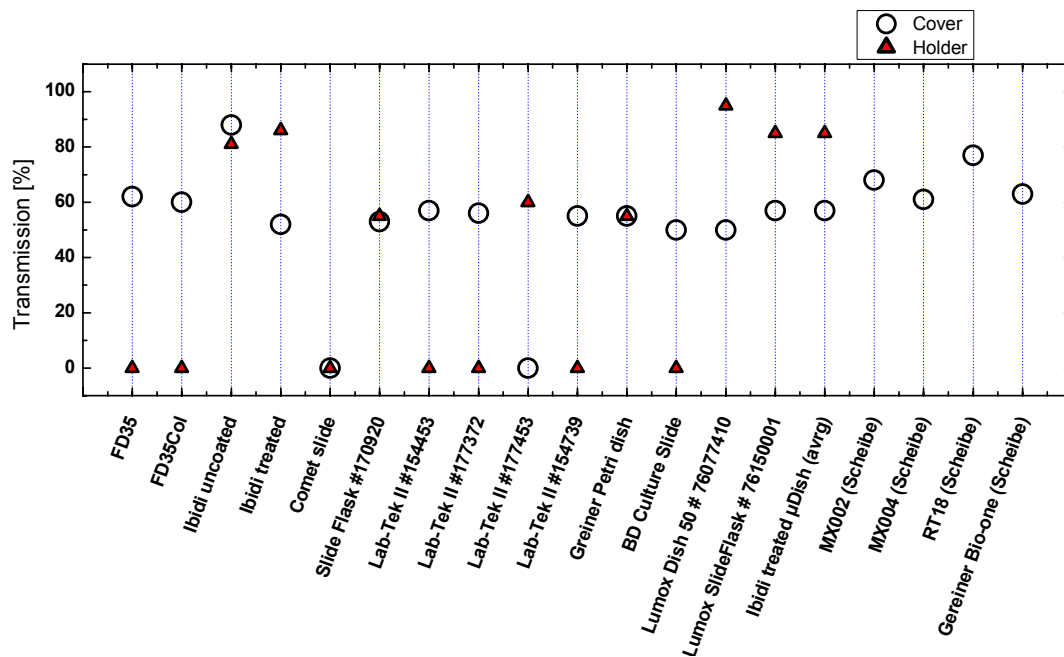


Abbildung 2: Transmissionsgrad verschiedener Probenbehälter (Behälterboden „Holder“ und Behälterdeckel „Cover“) und möglicher Fenstermaterialien bei 2,52 THz.

Da die Proben von unten exponiert werden, ist die Transparenz der Böden („Holder“) entscheidend. Wie zu erkennen ist, weisen nur die Ibidi-Schalen und die Lumox-Behälter einen hohen Transmissionsgrad auf, da diese aus hochtransparenten Spezialkunststoffen gefertigt sind und deren Böden lediglich aus einer dünnen Folie besteht. Daher kommen von allen untersuchten Schalen auch nur diese für die Expositionen in Frage. Aufgrund der größeren mechanischen Stabilität durch die Verwendung einer stärkeren Folie fiel die Entscheidung zu Gunsten der Ibidi-Dishes, zumal diese in Vorversuchen bereits ein gutes Anwachsverhalten, gute Mikroskopierbarkeit und keine Eigenfluoreszenz gezeigt haben. Für die Realisierung einer möglichst homogenen Exposition in der Mitte eines Gaußstrahls mit 2 cm oder 3 cm Strahlbreite musste ein Protokoll entwickelt werden, um die Zellen nur in der Mitte der Schalen in einem 1,2 cm großen Kreis aussäen zu können. Dies funktionierte mit den handelsüblichen Schalen jedoch nur teilweise, da die Behälter für die Verwendung der Flexipermasätze zur Begrenzung der Saatzone zu klein sind. Aus diesem Grund und auch um störende Feldverzerrungen am Rande der Expositionszone zu minimieren, wurde mit dem Hersteller eine 5 cm große Sonderanfertigung entwickelt (Abbildung 3).



Abbildung 3: Für die Expositionen verwendete 5-cm-Schale von ibidi

Bei diesen Behältern sind im Gegensatz zu der 3,5 cm großen Standardschale die für eine gleichmäßige Feldverteilung störenden Schalenränder weit genug von der exponierten Fläche entfernt. Um sicherzustellen, dass eventuelle Änderungen in der Produktion nicht die Qualität der Dosimetrie während der Projektlaufzeit beeinflussen, wurden von jeder Charge jeweils fünf Behälter bei 2,52 THz auf ihre Transparenz hin untersucht. In der nachfolgenden Abbildung 4 ist zu erkennen, dass sämtliche Schalen durchgängig eine sehr hohe Transmission aufweisen.

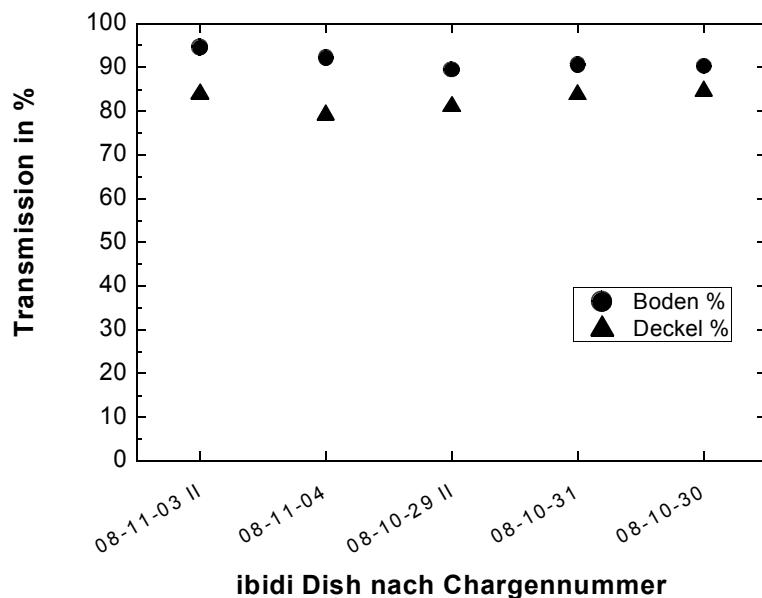


Abbildung 4: Exemplarisches Beispiel für die bei 2,52 THz gemessene Transmission der verwendeten Behälter nach Chargennummer.

Da die Wasseraufnahme von Kunststoffen meist nicht zu vernachlässigen ist und speziell bei THz-Frequenzen ein großes Problem darstellen würde, wurde dieses Verhalten an einigen Schalen untersucht. Eine Befüllung mit DMEM-Nährlösung und eine anschließende viertägige Lagerung im Brutschrank änderte jedoch nichts an der Transmission der Schalen, wodurch die vom Hersteller postulierte äußerst geringe Wasseraufnahme bestätigt wurde.

Zur Einkopplung der THz-Strahlung bei gleichzeitigem Einschluss der Inkubatoratmosphäre mussten die in der Expositionskammer vorgesehenen seitlichen Öffnungen mit im THz-Frequenzbereich transparenten Fenstern abgedichtet werden. Typische Materialien für solche Aufgaben sind TPX und TOPAS. Scheibenförmige Proben dieser Kunststoffe wurden daher angefordert und bei 2,52 THz ebenfalls auf ihren Transmissionsgrad hin untersucht. Wie der Abbildung 2 („MX002“, „MX004“, „RT18“ und „Greiner Bio-one“) zu entnehmen ist, werden jedoch niemals mehr als 80% der eingestrahlten Leistung transmittiert. Dies liegt neben der Absorption der Kunststoffe vor allem an der Fresnelreflexion, die auf Grund des Brechzahlssprungs Luft-Kunststoff auftritt. Daher wurde die von den Lumox-Slide-Flasks bekannte und separat erhältliche Lumox-Folie zum Abdichten verwendet (s. Abbildung 2 „Lumox dish 50“). Durch deren im Vergleich zur verwendeten Wellenlänge sehr geringen Dicke von 25 µm erscheint diese elektrisch fast unsichtbar und es treten kaum mehr Reflexionen auf.

4 Konstruktion der Expositionseinrichtung

Da die Umgebungsbedingungen für biologische Systeme wie Zellkulturen extrem wichtige Parameter darstellen, müssen für aussagekräftige Ergebnisse die Expositionen in einem Inkubator mit wohldefinierter Atmosphäre stattfinden. Bei einer fünfprozentigen CO₂-Atmosphäre regelt der Brutschrank die Temperatur stets auf 36,0 °C. So ist sichergestellt, dass die Proben temperatur auch bei einer leichten Erwärmung durch die Bestrahlung stets in einem physiologisch günstigen Bereich liegt. Um die Einkopplung des Parallelstrahls in die Expositionskammer zu ermöglichen, mussten Löcher in der Seitenwand des Inkubators vorgesehen und mit dem Hersteller abgesprochen werden. Obwohl die Befeldung lediglich von unten durchgeführt wird, wurde eine zweite seitliche Öffnung oberhalb der biologischen Probe vorgesehen, um prinzipiell Durchgangsmessungen zu ermöglichen. Der Abstand der Durchführungen wurde dabei so gewählt, dass statt der Verwendung eines Parallelstrahls optional auch eine Fokussierung mittels zweier Parabolspiegel durchgeführt werden kann. Dieser beträgt daher genau das Doppelte der Fokusslänge ausgesuchter Parabolspiegel, um die Probe genau im Fokuspunkt beider Spiegel halten zu können. Da die Einkopplung von der Seite durchgeführt werden soll, mussten im Brutschrank metallische Umlenkspiegel (45°) und entsprechende Halterungen vorgesehen und konstruiert werden. Die in der PTB aus verchromtem Stahl gefertigten Spiegel wurden mittig exakt auf der Höhe der Öffnungen angebracht. Der obere Spiegel ist jedoch nur optional für eine Durchgangsmessung wie bereits beschrieben (evtl. zur besseren Ausrichtung oder zum Monitoring) vorgesehen. Für die Expositionen wird dieser entfernt, zumal die mit Nährmedium gefüllten Petrischalen die gesamte Leistung absorbieren. In der Mitte der Kammer wurde eine Trägerplatte eingepasst, die die Proben reproduzierbar genau in der Strahlmitte halten und somit eine Fehlpositionierung während der Expositionen verhindern soll. Um die Felder möglichst wenig zu beeinflussen, wurde dafür elektrisch neutrales Rohacell verwendet, das bis zu hohen Frequenzen eine Dielektrizitätskonstante von $\epsilon \approx 1$ aufweist und somit sehr nah an die dielektrischen Eigenschaften von Luft herankommt. Zur Verbesserung der Luftzirkulation innerhalb der Kammer und der Stabilisierung der Atmosphäre wurde die Trägerplatte seitlich mit großen Löchern versehen. Da der Wärmeschrank aus Edelstahl gefertigt ist, besteht im Inneren prinzipiell die Gefahr von Mehrfachreflexionen bzw. stehenden Wellen, weshalb der Inkubator mit Absorberfolie ausgekleidet wurde. Nur so ist sichergestellt, dass die Proben wie geplant lediglich von unten und nicht durch seitliches Streulicht angeleuchtet werden. Die folgende Abbildung 5 zeigt die leere Expositionskammer vor (links) und nach (rechts) der Fertigstellung.

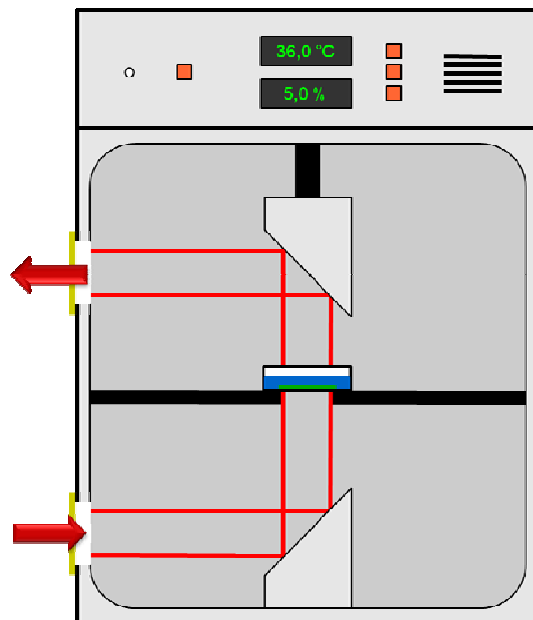


Abbildung 5: Umgebauter Inkubator als Expositions-kammer mit Umlenkspiegeln (links) und mit Absorberfolie und Trägerplatte (rechts). Der Ort der Zellkulturen ist rechts in orange angedeutet.

5 Bereitstellung der THz-Feldquellen

Die im Rahmen des Vorhabens durchgeführten Expositionen gut charakterisierter humaner Zelllinien sollten insgesamt bei mindestens drei verschiedenen diskreten Frequenzen in dem bisher wenig untersuchten Frequenzbereich oberhalb von 100 GHz erfolgen. Neben der Maßgabe, die Ergebnisse des EU-Vorhabens „THz-BRIDGE“ (aneugene und gentoxische Effekte im Grenzwertbereich von 1 mW/cm^2 für die Allgemeinbevölkerung) zu verifizieren, sollten die Expositionsversuche über einen großen Frequenzbereich hinaus ausgedehnt werden, um die Datenbasis zu verbreitern. Dazu wurde zunächst die Exposition bei sechs Frequenzen angestrebt. Um bei diesen Frequenzen genügend hohe Leistungen für die angestrebten Leistungsdichten von bis zu 10 mW/cm^2 erzeugen zu können, sollten die Feldexposition bei

106 GHz mit einem verstärktem und anschließend frequenzvervielfachten Mikrowellenoszillator, bei 130 GHz mit einem Gunn-Oszillator, bei 380 GHz mit einem Carcinotron (Rückwärtswellenoszillator) und bei 604 GHz, 1,63 THz und 2,52 THz mit Hilfe eines Fern-Infrarot-Gaslasers durchgeführt werden. Um eine hinreichend homogene Befeldung zu gewährleisten wurde der Durchmesser der Expositionszone (1,2 cm) klein im Vergleich zur Strahlbreite gewählt. Um dennoch nicht zu viel der ohnehin schon geringen Leistung durch die Aufweitung des Strahls zu verlieren, wurden die strahlformenden Optiken so konstruiert, dass sich möglichst ein 2 cm breiter Strahl mit gaußschem Profil ergibt. So sollten im Maximum des Strahls Strahlungsdichten von 0,1...10 mW/cm² erreicht werden.

Die oben genannten sechs Frequenzen entsprechen dem im Projektantrag genannten Maximalprogramm. Während der praktischen Arbeitsplanung mit den Projektpartnern ist jedoch klar geworden, dass die Abläufe wesentlich zeitintensiver sind als ursprünglich gedacht. Daher musste das Arbeitspensum für die Laufzeit des Projektes auf das Pflichtprogramm, welches Expositionen lediglich bei 106 GHz, 380 GHz und 2,52 THz vorsah, reduziert werden. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass eine Exposition mit den höchsten angestrebten Leistungsdichten extremen Erwärmungen der Proben einhergehen (siehe Kapitel 6.2), weswegen eine maximale Expositionsleistungsdichte von 2 mW/cm² festgesetzt wurde. Leistungsdichten von 2 mW/cm² konnten nur bei 106 GHz eingestellt werden. Bei 380 GHz fiel die Feldquelle irreparabel aus, bevor die Versuchsreihe mit der mittleren und höchsten Leistungsdichte durchgeführt werden konnte. Bei 2,52 THz trat eine zunehmende Degradation der Laserquelle auf, die trotz zahlreicher Versuche und weiterer über das Projekt hinaus getätigter Investitionen nicht aufgehalten werden konnte, so dass nur eine Exposition bis 0,9 mW/cm² möglich war.

Das Vorgehen ist wie folgt: Die mittlere Leistungsdichte des leeren Feldes am Ort der Feldexposition wird vor jeder Exposition durch Vorgabe der Quellenleistung eingestellt. Aufgrund der hohen gemessenen Transparenz der Probenkontainer (s. Kap. 3) sowie der geringen Membrandicke des Bodens des Probencontainers im Bezug auf die Wellenlänge entspricht dies der einfallenden Leistungsdichte auf den Monolayer im Zellmedium. Für die Einstellung der Leistungsdichte wurde eine Unsicherheitsanalyse durchgeführt, so dass die Leistungsdichte mitsamt Unsicherheit für jede Exposition bekannt ist. Dabei wird auch die gemessene relative Leistungsdichteverteilung im Gaußstrahl berücksichtigt. Bei 106 GHz wurden numerische Simulationen durchgeführt, aus denen hervorgeht, welche SAR-Werte aus den vorgegebenen Leistungsdichten resultieren. Die SAR-Werte im Zellmedium sind proportional zur eingestrahnten Leistungsdichte. Die Simulationen berücksichtigen die dielektrischen Eigenschaften des Probencontainers und des Zellmediums. Diese Simulationen können aufgrund ihrer Komplexität nicht bei höheren Frequenzen über 106 GHz durchgeführt werden. Weiterhin erfordern sie die vereinfachende Annahme einer ebenen Welle anstelle eines gaußförmigen Strahlprofils, da dies in der Simulationsumgebung technisch noch nicht möglich ist. Aus den numerisch bestimmten SAR-Verteilungen wurde die Temperaturerhöhung abgeleitet und mittels Messung verifiziert.

5.1 Konfiguration der Feldquellen bei 106 GHz und 380 GHz

5.1.1 Grundsätzlicher Aufbau der Quellen

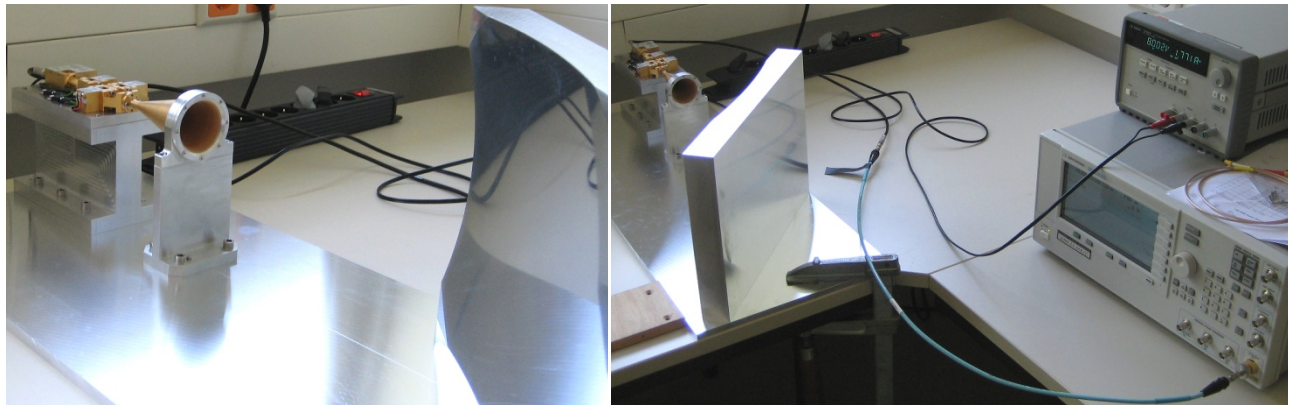


Abbildung 6: Oben: Frequenzvervielfacherkaskade mit Parabolspiegel (links) für die Expositionen bei 106 GHz und mit Netzteil und Signalgenerator als Speisequelle (rechts) - unten: Rückwärtswellenoszillator (Carcinotron) mit strahlformender Linsenoptik und planarem Umlenkspiegel für die Expositionen bei 380 GHz

Zur Veranschaulichung der grundsätzlichen Aufbauten der THz-Feldquellen für die Expositionen bei 106 GHz und 380 GHz, sind in der Abbildung 6 Fotos der beiden in der PTB verfügbaren Quellen zusammengefasst. Die Frequenzvervielfacherkaskade (oben) selbst besteht aus mehreren Verstärkern und einem Versechsfacher, der Eingangssignale mit Hilfe einer nichtlinearen Kennlinie in der Frequenz vervielfachen kann. Als Eingangssignal dient ein unmoduliertes Sinussignal eines herkömmlichen Mikrowellensignalgenerators, dessen Frequenz auf 17,667 GHz eingestellt wurde, um das Leistungsmaximum der Kaskade zu erreichen. Dadurch ergibt sich eine Expositionsfrequenz von $6 \cdot 17,667 \text{ GHz} = 106 \text{ GHz}$. Die so erzeugte Ausgangsleistung von maximal 155 mW wird als horizontal polarisierte Welle über ein Rillenhorn abgestrahlt und mittels eines fest verbauten Parabolspiegels fokussiert und um 90° umgelenkt.

Unten in der Abbildung ist der Rückwärtswellenoszillator mit seinen Hochspannungsanschlüssen zu sehen. Das benötigte Hochspannungsnetzteil, welches sämtliche für den Betrieb benötigten Spannungstufen mit entsprechender Ausgangsleistung zur Verfügung stellt, befindet sich auf dem Foto hinter der Röhre (blauer Schrank) und ist hier nicht näher gezeigt. Auf dem Bild ebenfalls zu erkennen ist das runde Rillenhorn mit

einer eingebetteten Linse zur Strahlkollimierung und der planare Umlenkspiegel, der die zumeist elliptisch polarisierte Strahlung parallel zur optischen Bank umleitet. Die maximale Ausgangsleistung beträgt mindestens 25 mW und hängt stark von den Einstellungen der Röhre ab. So kann über die Hochspannung der Anode 1 die Frequenz der Röhre über mehrere 10 GHz eingestellt werden. Zudem ist eine Leistungseinstellung über die Steuerung des Anodenstroms möglich. Auch hierbei wurde als Arbeitspunkt das Leistungsmaximum der Röhre gewählt, woraus sich eine Anodenspannung von 6449 V und eine Frequenz von ca. 380 GHz ergab.

5.1.2 Charakterisierung und Einstellung des Strahlprofils

Zur Bestimmung des Strahlprofils sollte anfangs die aus der Optik bekannte Knife-Edge-Methode verwendet werden. Dabei wird der Strahl in Querrichtung schrittweise mit einem scharfkantigen Blech abgeschattet und die relative Leistung bestimmt. Aus der mathematischen Ableitung der Messkurve kann dann die Halbwertsbreite des Strahls bestimmt werden. Abbildung 7 zeigt zur Veranschaulichung einen solchen Aufbau an der Frequenzvervielfacherkaskade bei 106 GHz.

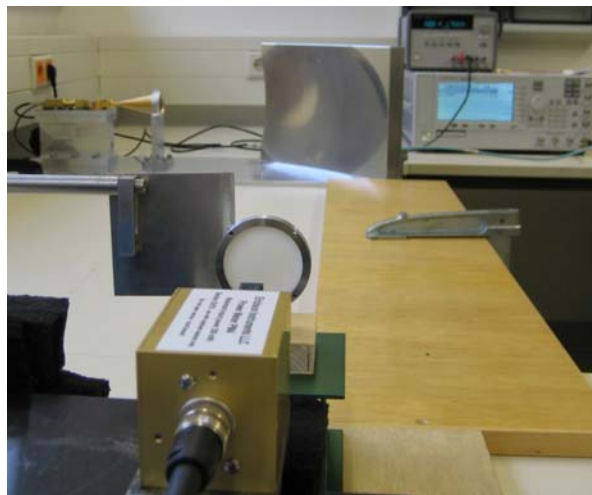


Abbildung 7: Knife-Edge-Methode zur Bestimmung der Strahlbreite bei 106 GHz mit scharfkantigem Blech, Linse zur Fokussierung und Detektorkopf (Erickson Powermeter)

Diese Methode funktioniert gut, sofern der Detektor hinter der Klinge größer ist als der Strahl selbst, versagt jedoch, sobald hinter der Klinge fokussierende Optiken zur Bündelung des „Rest“strahls in den Detektor eingesetzt werden müssen. In dem Fall entspricht das Resultat nämlich der Faltung der eigentlichen Strahlgeometrie mit der effektiven Apertur des Detektors bzw. der Linse. Die Konsequenz daraus ist, dass das Messergebnis von der verwendeten Linse abhängt, wie beispielhaft in der folgenden Abbildung 8 gezeigt ist. Während sich unter Verwendung einer Linse mit 6 cm Fokusslänge eine Halbwertsbreite von 15 mm ergibt, liefert die 12-cm-Linse dagegen nur 12 mm als Halbbreite.

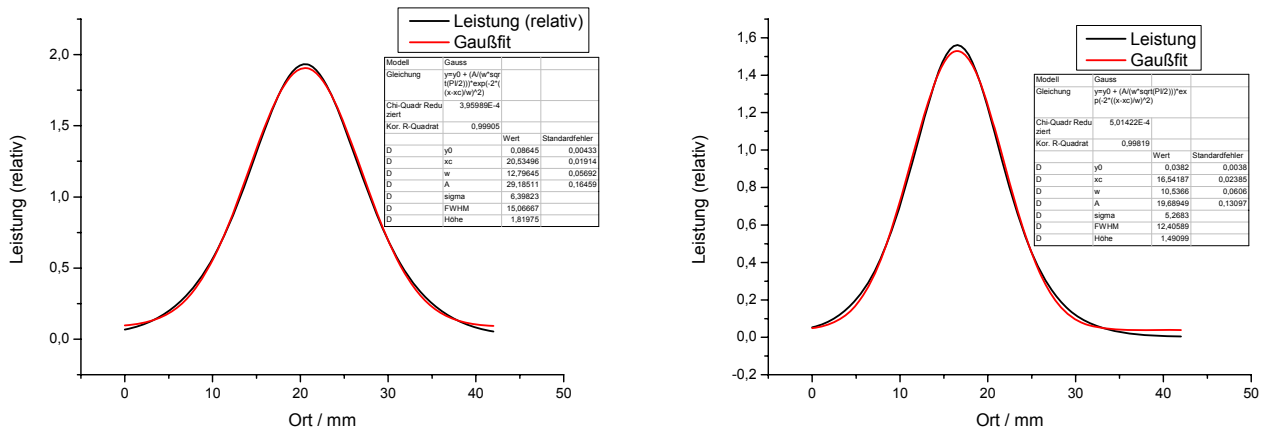


Abbildung 8: Mittels Knife-Edge-Methode ermittelte Strahldurchmesser bei 106 GHz unter Verwendung unterschiedlicher Linsen (links: $f = 6$ cm; rechts: $f = 12$ cm) zur Fokussierung auf den Detektor

Dieses Problem kann umgangen werden, indem eine sehr kleine Messapertur verwendet wird, da die Faltung mit einer extrem schmalen Apertur wiederum das Strahlprofil als Ergebnis hat. Daher wurden zur Strahlcharakterisierung schmale dielektrische Polyethylenfasern (2 mm Durchmesser) verwendet, mit denen das Profil unter Anwendung eines ansteuerbaren motorisierten XZ-Verschiebetisches auf Höhe der Strahlmitte lateral abgescannt wurde. Die ermittelte relative Leistung wurde mit einem Erickson Powermeter gemessen, in das die Faser über eine Hornantenne eingeleitet wurde. Abbildung 9 verdeutlicht den Aufbau.

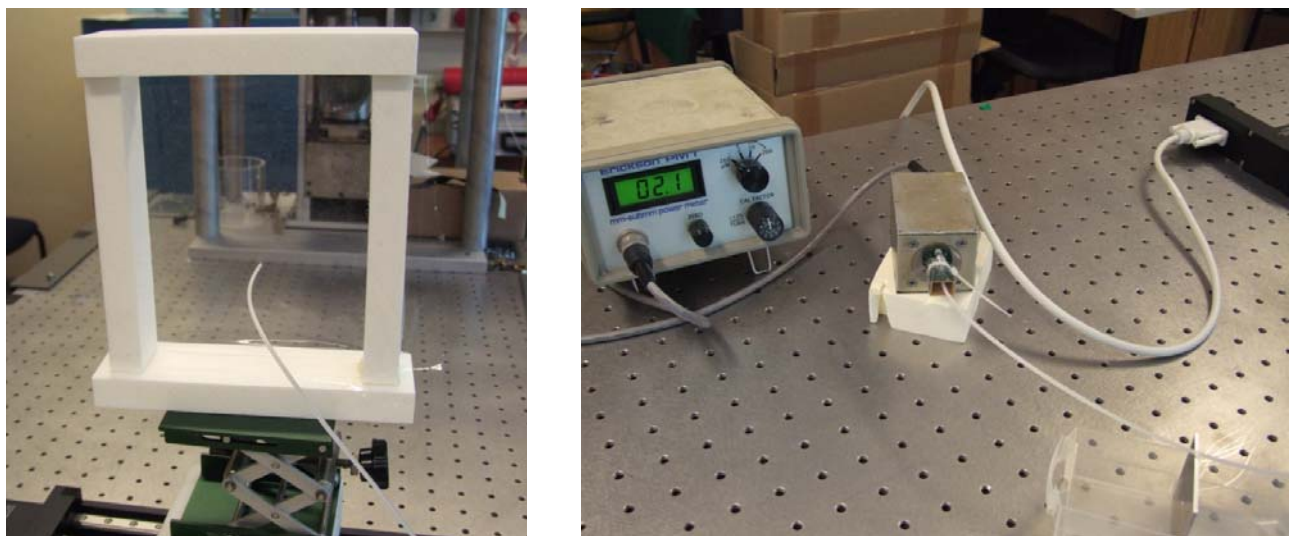


Abbildung 9: Profils캔 mit dielektrischer Faser und Erickson Powermeter am Carcinotron bei 380 GHz

Durch mehrere Messungen entlang der Strahlausbreitungsrichtung, konnte die Position ermittelt werden, an der die Strahltaile 2 cm breit ist und die Zellproben exponiert werden sollen. Da die eindimensionale Abtastung zwar verlässliche Werte für die Breite des Strahls liefert, jedoch keinerlei Aussage über seine Qualität bzw. zweidimensionale Verteilung in der Zellebene, wurden darüber hinaus zweidimensionale Scans bei 106 GHz und 380 GHz direkt am Ort der Probe durchgeführt. Um außerdem noch den Einfluss der Probenhalterung zu untersuchen, wurden die Profile nicht nur im Freiraum sondern auch innerhalb des Inkubators 1 cm über dem Rohacellhalter abgetastet. Sämtliche Ergebnisse dazu sind in der Abbildung 11

zusammengefasst, in der linken Spalte die für 106 GHz und in der rechten Spalten die Resultate bei 380 GHz. In der ersten Zeile sind die Messergebnisse des lateralen eindimensionalen Scans gezeigt, anhand derer der Aufstellungsort des Inkubators so bestimmt wurde, dass die Halbwertsbreite des Strahls bei 106 GHz 2 cm beträgt (95 cm Abstand von der Frequenzvervielfacherkaskade; das Nebenmaximum wurde für den Gaußfit ignoriert). Die endgültige Aufstellung des Inkubators während der Expositionen bei 106 GHz ist noch einmal in der folgenden Abbildung 10 zu sehen.

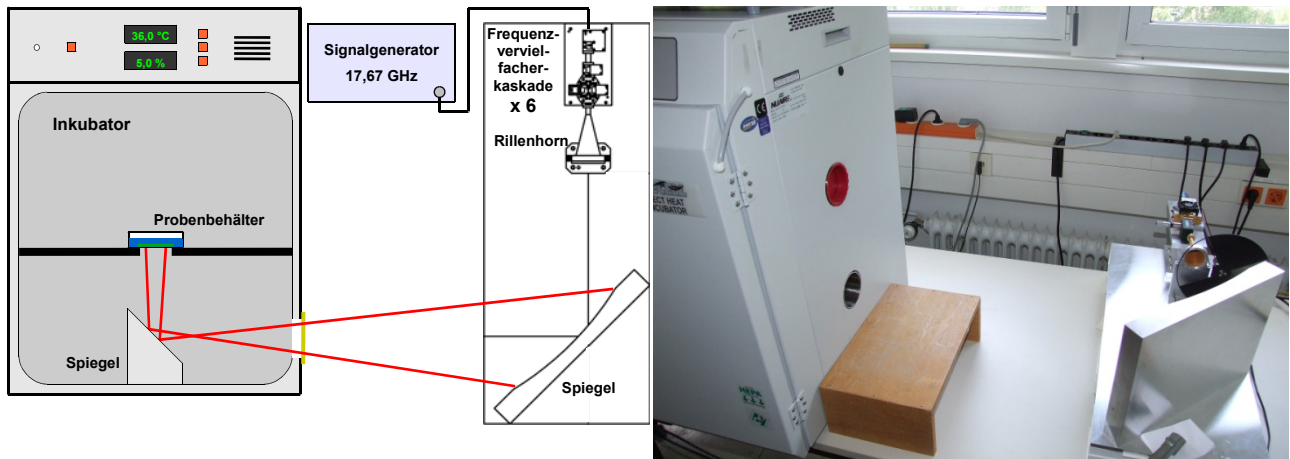


Abbildung 10: Schema zur Einkoppelung der THz-Leistung bei 106 GHz in den Inkubator (links) und Aufbau während der Exposition (rechts)

Für die Expositionen am Carcinotron bei 380 GHz wäre ein Abstand von rund 40 cm zwischen Quelle und Zellkultur notwendig gewesen. Da jedoch der Strahlweg innerhalb des Inkubators bereits 42 cm beträgt und darüber hinaus die Hochspannungsanschlüsse der Röhre ein Heranrücken des Brutschranks an die Austrittsöffnung der Quelle unmöglich machten, wurde der kleinstmögliche Abstand (77 cm) gewählt, wodurch sich eine Strahlbreite von rund 3 cm ergibt. Für die Expositionen war dies jedoch unkritisch, da die Feldverteilung innerhalb der 1,2 cm breiten Expositionszone durch einen breiteren Strahl noch gleichmäßiger wird. Da sich die integrale Leistung im Strahl räumlich weiter verteilt, muss diese etwas erhöht werden, um die gleiche Leistungsdichte zu erreichen. Dies ist am Carcinotron jedoch problemlos möglich. In der zweiten Zeile der Abbildung sind die Ergebnisse des zweidimensionalen Faser-Scans zu sehen, der in dem zuvor bestimmten Abstand zur Quelle im Freiraum durchgeführt wurde. Der Vergleich mit den in Zeile 3 gezeigten Resultaten nach Abtasten innerhalb des Inkubators 1 cm oberhalb der Probenposition lässt dabei ganz eindeutig den Einfluss der Probenhalterung erkennen. Obwohl die Permittivität des Rohacellhalters mit $\epsilon = 1,09$ nahezu identisch mit der von Luft ist, scheint die Ausparung für die Strahlzuführung in der Platte als Wellenleiter zu wirken, wodurch das Strahlprofil zu hohen Frequenzen hin zunehmend verzerrt wird. Numerische Berechnungen des Probenhalters bestätigen die Messungen. Da geeignete Simulations- und Messumgebungen jedoch erst während der Projektlaufzeit verfügbar wurden, konnten diese Erkenntnisse nicht mehr in die Konstruktion der Feldexpositionseinrichtung einfließen. Dafür findet dieser Effekt jedoch Berücksichtigung im Messunsicherheitsbudget (siehe unten) und liefert mit einer angenommenen Schwankung von 30% einen großen Beitrag.

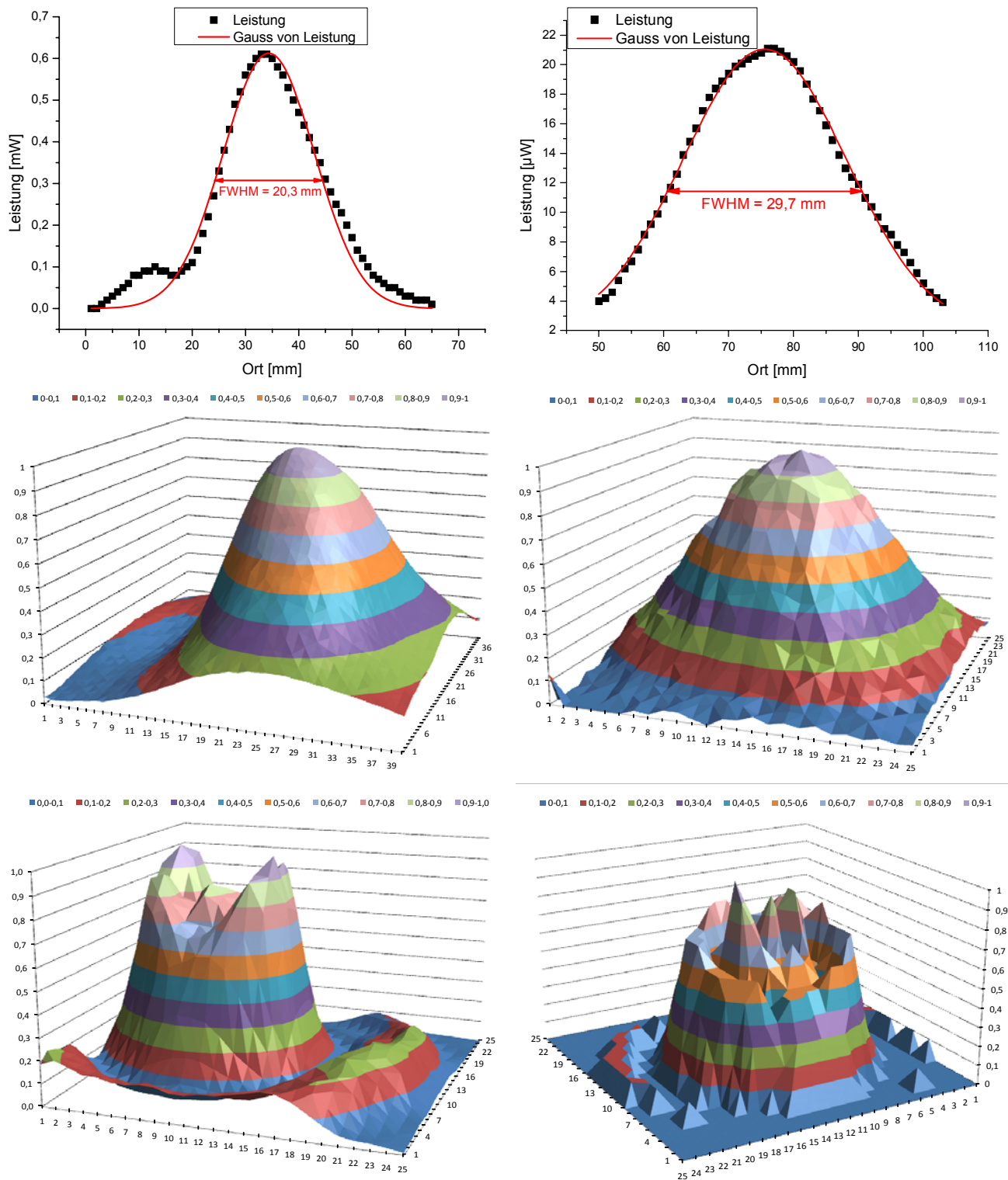


Abbildung 11: Strahlprofile bei 106 GHz (links) und 380 GHz (rechts); von oben nach unten: Bestimmung der Strahlbreite mit angefitteter Gaußkurve, zweidimensionale Abtastung im Freiraum in der für die Expositionen richtigen Entfernung und zweidimensionale Abtastung im Inkubator

5.1.3 Einstellung der Leistungsdichten

Das im Projektantrag ursprüngliche genannte Vorhaben, die notwendigen Leistungsdichten mit einem in der PTB Berlin rückgeführt kalibrierten Bolometer einzustellen und ein simpler zu bedienendes Erickson Powermeter über Vergleichsmessungen daran anzukoppeln, ist aus mehreren Gründen fehlgeschlagen und

wurde nach mehreren Versuchen aufgegeben. Es stellte sich bei der Charakterisierung notwendiger Abschwächer zur Leistungseinstellung, die aus mehreren Schichten Holz oder Kunststoff bestanden, heraus, dass sich zwischen den einzelnen Schichten Interferenzen bildeten, die bereits bei minimalen Verschiebungen der Abschwächer Leistungseinbrüche von fast 50% zur Folge hatten. Dadurch wurden reproduzierbare Leistungsmessungen mit geringen Unsicherheiten unmöglich. Darüber hinaus hätten sich die Messunsicherheiten bei der Addition einzeln charakterisierter Abschwächer zu einem Gesamtstapel multipliziert und extrem hohe Werte ergeben. Eine Charakterisierung des ganzen Stapels war aufgrund zu geringer Messdynamik bzw. der zu großen Empfindlichkeit des Bolometers ebenfalls nicht möglich.

Des Weiteren traten selbst zwischen den verwendeten Detektoren (Bolometer und Erickson Powermeter) und der Quelle stehende Wellen mit der Folge von Interferenzen mit ähnlich hohen Leistungsschwankungen auf, wie mit der Abbildung 12 veranschaulicht wird.

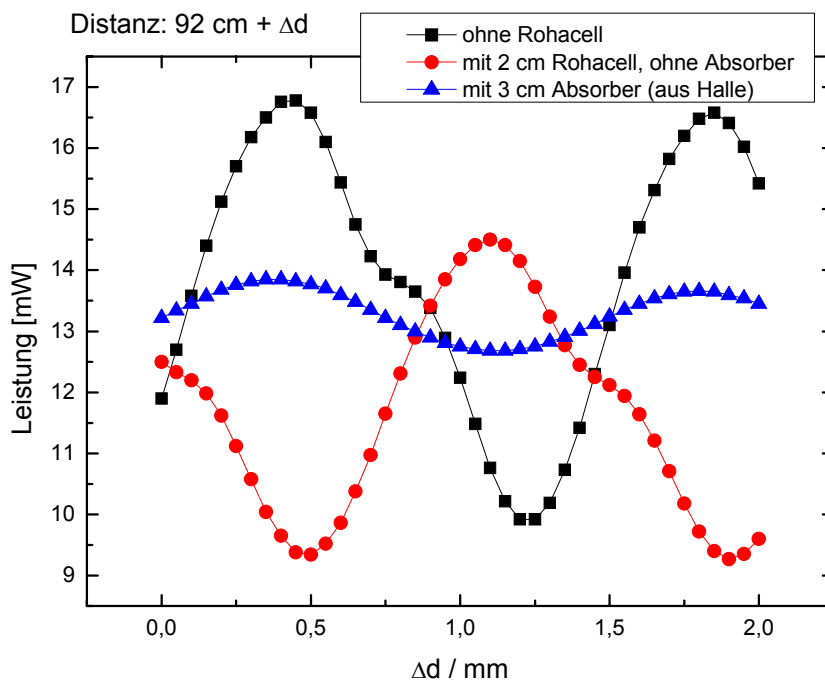


Abbildung 12: Starke Leistungsschwankungen bei 106 GHz bei leichter Verschiebung des Detektors (Erickson Powermeter) in Strahlrichtung als Folge stehender Wellen zwischen Quelle und Detektor

Selbst eine minimale Ortsänderung des hier verwendeten Erickson Powermeters hat extreme Auswirkungen auf die angezeigte Leistung. Dass es sich dabei tatsächlich um stehende Wellen handelt, wird deutlich, wenn der recht große Detektorkopf mit Absorbermaterial verkleidet wird. Die Schwankungen (blaue Kurve) werden deutlich kleiner, verschwinden jedoch nicht vollständig und verhinderten eine genaue Einstellung der Leistungsdichte daher.

Aus diesen Gründen wurde eine neue Methode zur Einstellung und Rückführung der Leistung bei 106 GHz und 380 GHz mit einem Thomas Keating Powermeter entwickelt. Dieser Leistungsmesser weist zwar eine deutlich geringere Empfindlichkeit auf, hat jedoch den Vorteil, dass er in Transmission arbeitet und wegen des planaren Einkoppelfensters keine richtungsabhängige Empfindlichkeit besitzt. Außerdem ist aufgrund der Fenstergröße die Messung der gesamten Strahlleistung möglich, anhand derer die Leistungsdichte in der Strahlmitte ausgerechnet werden kann. Der Messkopf kann durch seine Bauform bei linear

polarisierten Feldern im Brewster-Winkel aufgestellt werden, wodurch Reflexionen, die zu stehenden Wellen führen, eliminiert werden. Die gemessenen Leistungen sind somit nahezu unabhängig von der Positionierung des Leistungsmessers. Die durch leichte Verschiebung des Messkopfes entlang der Strahlausbreitungsrichtung nachgewiesenen Restinterferenzen wurden als Beitrag zum Messunsicherheitsbudget berücksichtigt. Da die Polarisation bei der Frequenzvervielfacherkaskade (106 GHz) nahezu linear ist, ist eine Messung unter dem Brewster-Winkel, unter dem keinerlei Reflexionen auftreten, problemlos möglich. Der Rückwärtswellenoszillator für die Expositionen bei 380 GHz verwendet zur Speisung der Antenne jedoch einen Hohlleiter, in dem sich bei dieser Frequenz Moden höherer Ordnung ausbreiten können, was zur Folge hat, dass die Polarisation der abgestrahlten Felder je nach Arbeitspunkt auf der Röhrenkennlinie eher elliptisch und eben nicht rein linear ist. Daher sind die Restinterferenzen hier etwas größer und liefern einen etwas größeren Beitrag im Messunsicherheitsbudget. Die Einstellung der Strahlleistung mit dem Thomas Keating Powermeter und der Halterung für den Brewster-Winkel ist aber prinzipiell auch am Carcinotron möglich.

Der Leistungsmesser führt bei der vom Hersteller vorgesehenen Betriebsart nur einen internen Abgleich bzw. eine interne „Kalibrierung“ mit dem mitgelieferten Controller und der dazugehörigen Software durch. Dazu wird vom mitgelieferten Programm zunächst der Nullpegel ohne Bestrahlung gemessen, um das Grundrauschen zu quantifizieren. Danach wird der im Messkopf verbaute resistive Metallfilm mit einer Rechteckspannung der Choppfrequenz geheizt und über die Ausgangsspannung der Kalibrierfaktor intern bestimmt. Sowohl das Heizen als auch das Auslesen werden von der mitgelieferten Steuereinheit durchgeführt und sind daher von außen weder zugänglich noch verifizierbar. Aus diesem Grund musste ein manuelles Kalibrierverfahren entwickelt werden, um eine Rückführung auf die SI-Einheiten zu ermöglichen. Dazu wurde eine elektronische Schaltung entwickelt, die aus dem Ausgangssignal des Choppers eine Heizspannung für den Messkopf generiert, welche somit automatisch genau der Choppfrequenz entspricht und darüber hinaus mit einem rückgeführt kalibrierten Oszilloskop gemessen werden kann. Die durch das Heizen generierte Ausgangsspannung am Messkopf kann über einen Lock-In-Verstärker ausgelesen werden. Mit der gemessenen Heizspannung und dem rückgeführt bestimmbaren Filmwiderstand des Powermeters kann die umgesetzte Leistung analytisch berechnet und über die Relation zum Ausgangssignal der Kalibrierfaktor bestimmt werden. Dabei müssen jedoch die Absorption des Films und die Transmission des verwendeten Folien-Fensters bekannt sein. Da der Kopf nicht demontierbar ist, konnten lediglich die Herstellerangaben dafür verwendet werden. Da die manuellen Messungen und deren Aufbau sehr zeitaufwendig sind, konnte dieses Verfahren während der regulären Expositionen nicht durchgeführt werden. Für die Leistungseinstellung während der Bestrahlung wurde weiterhin das Verfahren mit der Herstellersoftware angewandt. Um die Lücke in der Rückführung zu schließen, wurden deshalb Vergleichsmessungen mit beiden Verfahren durchgeführt und statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse dieser Auswertungen flossen als Mittelwert und Standardabweichung in das Messunsicherheitsbudget ein.

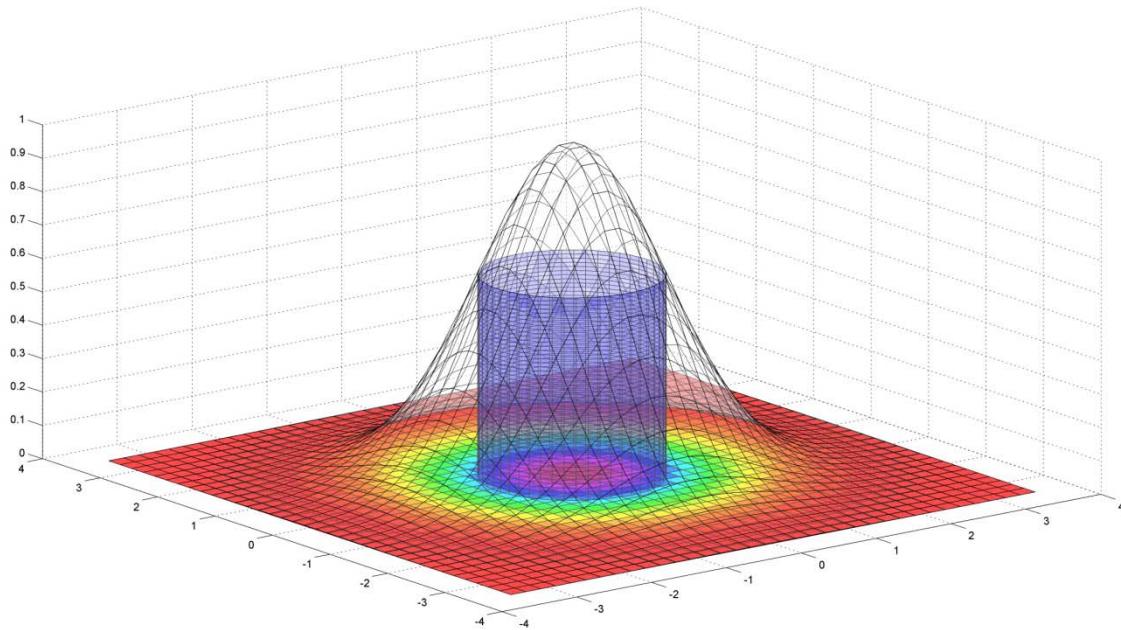


Abbildung 13: Beispielhafte Gaußverteilung mit Markierung (blauer Zylinder) einer möglichen kreisrunden Expositionszone als Teil des Strahls

Um die für die Expositionen einzustellenden Leistungsdichten zu bestimmen, musste der Leistungsanteil innerhalb der Expositionszone (in der Abbildung 13 exemplarisch als blauer Zylinder gekennzeichnet) von der Gesamtleistung des eintreffenden Strahls ermittelt werden. Sobald dieser bekannt ist, kann die gewünschte Leistungsdichte in der Expositionszone sehr einfach über die mit dem Thomas Keating Powermeter gemessene integrale Leistung eingestellt werden. Tritt ein Strahl der Halbwertsbreite b mit einem gaußschen Profil mittig durch eine Scheibe mit dem Radius r , so ergibt sich der relative Anteil der Leistung $P_{Scheibe}$ innerhalb der Scheibe im Vergleich zur Gesamtleistung des Strahls (ohne Herleitung) zu:

$$P_{Scheibe} = 1 - \frac{1}{16^{(r/b)^2}}$$

Ausgehend von einer 1,2 cm breiten Expositionszone (die Zellen wurden mit Flexipermaufsätzen in einem Kreis mit dem Durchmesser 1,2 cm ausgesät) ergibt sich demzufolge ein Anteil von 22 % bei einer Strahlhalbwertsbreite (s. Kapitel 5.2.2.) von 2 cm (106 GHz und 2,52 THz) und 10,5 % bei einer Strahlhalbwertsbreite von 3 cm (380 GHz) der Gesamtleistung innerhalb der Zone. Daraus ergeben sich für eine Strahlbreite von 2 cm eine einzustellende Gesamtleistung von 5,11 mW pro 1 mW/cm² Leistungsdichte innerhalb der Expositionszone und für eine Breite von 3 cm eine einzustellende Gesamtleistung von 10,77 mW pro 1 mW/cm² Leistungsdichte. Damit ergeben sich nach Auswertung der genauen Dosimetrie folgende für die verschiedenen Expositionserien eingestellten Leistungsdichten (Abbildung 14):

	mW/cm ²	HaCaT-Zellen		Fibroblasten	
		2 h	8 h	2 h	8 h
106 GHz	0	x	x	x	x
	0,04	x		x	
	0,39	x		x	
	0,88	x	x	x	x
	1,96	x		x	
106 GHz (Ergänzung)	1,96	HaCaT / HDF / AL: 24 h			
380 GHz	0	x	x	x	x
	0,03	x		x	
	0,30	x		x	
	0,58	x	x	x	x
2,52 THz	0	x	x	x	x
	0,05	x		x	
	0,15	x		x	
	0,31	x	x	x	x
	0,44	x		x	
	0,88	x		x	

Abbildung 14: Expositionsmatrix als Übersicht über alle durchgeführten Expositionen inkl. der Bestrahlungen im Rahmen der Projekterweiterung; Farbcodierung: Auswertung mittels Comet Assay (orange), Mikrokerntest (grün) und beiden Verfahren (gelb)

5.1.4 Messunsicherheitsbudget

Zur Bestimmung der Unsicherheit während der Exposition wurde ein doppeltes Messunsicherheitsbudget erstellt. Mit dem ersten Budget wird die Messunsicherheit während der Leistungsmessung bestimmt. Dessen Ergebnis fließt dann als Startwert in das zweite Budget ein, mit dem die Unsicherheit der Leistungseinstellung innerhalb der Expositionszone ermittelt wird. Dadurch wird eine sehr genaue Abschätzung der Gesamtunsicherheit möglich. Von der Struktur und Modellgleichung sind die Budgets für 106 GHz und 380 GHz identisch. Die Unsicherheitsbeiträge müssen jedoch quantitativ an die jeweils betrachtete Quelle angepasst werden, da u.a. die Regulierungsgenauigkeit an der jeweiligen Quelle und deren Stabilität einfließen. Auch die Restinterferenzen variieren aufgrund der Polarisationsabhängigkeit. Die Modellgleichung für die Leistungsmessung ergibt sich aus der Funktionsweise des Messkopfes und konnte zum größten Teil der Bedienungsanleitung entnommen werden,

$$P = \frac{\text{Formfaktor} \cdot \text{Freqdev} \cdot V_{\text{Lockin}} \cdot \text{Interferenz}}{\text{Absorption} \cdot \text{Transmission} \cdot r_{pi}},$$

wobei sich die interne Responsivität als Zwischenergebnis ergibt zu:

$$r_{pi} = \frac{V_{cal} \cdot R_{Film}}{V_0^2} .$$

Die in den Formeln genannten Variablen stehen für die einzelnen Beiträge im Messunsicherheitsbudget und bekommen für die Aufstellung des Budget ihre jeweilige Messunsicherheit zugewiesen. Die Erläuterung der Beiträge können zusammen mit ihren Werten der nachfolgenden Tabelle (Abbildung 15) entnommen werden. Exemplarisch werden dabei die Werte für eine einzustellende Leistungsdichte von 2 mW/cm² bei 106 GHz verwendet:

Symbol	Beschreibung	Wert	Erw. Messunsicherheit	Typ
P	Ergebnis der THz-Leistungsmessung			Ergebnis
Formfaktor	Abweichung der zeitlichen Verläufe durch das Choppen	1	0,05	Normal
Freqdev	Fehler durch Schwankungen in der Choppfrequenz	1	0,1	Normal
V _{Lockin}	Lock-In-Anzeige während der Leistungsmessung	5,02 mV		Konstante
Absorption	Absorption des Metallfilms	0,49	0,02	Normal
Transmission	Transmission des Fensters	0,9735	0,05	Normal
r _{pi}	Interne Responsivität			Zwischenergebnis
Interferenz	Restinterferenzen durch Stehwellen trotz Brewster-Winkel	1	0,05	Rechteck
V _{cal}	Lock-In-Anzeige beim Heizen	5 mV		Konstante
R _{Film}	Widerstand des Metallfilms	159,4 Ω	1,6 mΩ	Normal
V ₀	Spitzenwert der Heizspannung	0,88 V	0,01 V	Normal

Abbildung 15: Unsicherheitsbeiträge des Messunsicherheitsbudgets für die Leistungsmessung bei 106 GHz und 2 mW/cm²

Die mit Hilfe der GUM Workbench ermittelte erweiterte Messunsicherheit für das Ergebnis der THz-Leistungsmessung fließt dann, wie oben bereits erwähnt, als Startwert in das Budget für die *Einstellung* der Expositionsleistung ein. Die Stabilität der Expositionsleistung wurde untersucht. Für einen konstanten Strom an Frequenzvervielfacherkaskade bzw. Carcinotron, der während der Exposition überwacht wurde, ergibt sich der in Abbildung 16 genannte Beitrag. Für die Expositionen bei 106 GHz lautet die Modellgleichung dafür:

$$P_{Exposition} = P \cdot \text{Stabilität} \cdot \text{Dämpfung} \cdot \text{Homogenität} \cdot \text{Programmabweichung} ,$$

wobei sich die einzelnen Unsicherheitsbeiträge für eine Leistungsdichte von 2 mW/cm² wie folgt ergeben:

Symbol	Beschreibung	Wert	Erw. Mess-unsicherheit	Typ
$P_{\text{Exposition}}$	Eingestellte Gesamtleistung in der Expositionszone			Ergebnis
P	Mittels TK-Powermeter gemessene Leistung	10,2 mW	1,5 mW	Normal
Stabilität	Leistungsstabilität der Quelle	1	0,003	Normal
Dämpfung	Fehler durch Einstellungsauigigkeit der Abschwächung	1	0,005	Rechteck
Homogenität	Ermittelte Schwankungen durch Abweichung v. Gauß	1	0,15	Rechteck
Programm-abweichung	Abweichung der Messungen mittels TK-Programm für die Expositionen von der manuellen Rückführung	0,9865	0,0372	Normal

Abbildung 16: Unsicherheitsbeiträge des Messunsicherheitsbudgets für die Einstellung der Expositionsleistung am Ort der Probe bei 106 GHz und 2 mW/cm²

Da die Aufschlüsselung sämtlicher Beiträge aller Budgets den Rahmen sprengen würde, soll hier nur eine Zusammenfassung der Endergebnisse gezeigt werden. Die folgende Tabelle enthält daher die zu erwartenden Werte für die eingestellte Leistungsdichte des Strahls am Expositionsort:

Frequenz	Durchschnittliche Leistungsdichte am Expositionsort	Erweiterte Mess-unsicherheit	Relative erweiterte Messunsicherheit
106 GHz	0,04 mW/cm ²	0,01 mW/cm ²	36 %
	0,39 mW/cm ²	0,09 mW/cm ²	23 %
	0,88 mW/cm ²	0,19 mW/cm ²	23 %
	1,96 mW/cm ²	0,45 mW/cm ²	23 %
380 GHz	0,03 mW/cm ²	0,02 mW/cm ²	77%
	0,30 mW/cm ²	0,09 mW/cm ²	30 %
	0,58 mW/cm ²	0,18 mW/cm ²	30 %

Abbildung 17: Zusammenfassung der erweiterten Messunsicherheiten (k=2) der Expositionsleistungen für alle Expositionen bei 106 GHz und 380 GHz in Abhängigkeit der Leistungsdichten

5.2 Konfiguration der Feldquellen bei 2,52 THz

5.2.1 Lasersystem und -aufbau

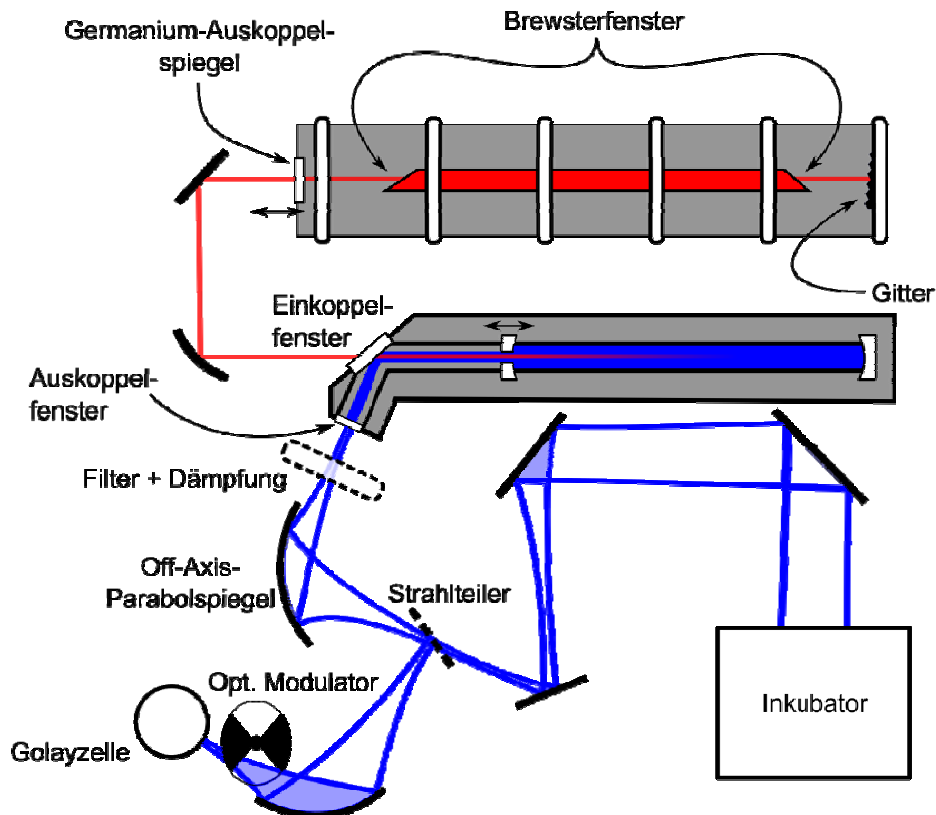


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Laboraufbaus für die Expositionen bei 2,52 THz

Die in diesem Abschnitt beschriebene Expositionsquelle besteht aus zwei Lasersystemen: einem optisch gepumpten Ferninfrarot-Gaslaser (FIR-Laser) und einem CO₂-Laser, der die Pumpenergie bereitstellt. Der weitverbreitete Einsatz des CO₂-Lasers innerhalb der Material bearbeitenden Industrie führte zu einer Vielzahl unterschiedlicher Typen dieses Lasers, die mit dem Ziel der Erzeugung hoher Leistungen entwickelt wurden. Für das Pumpen eines FIR-Lasers werden zusätzliche Anforderungen an die Emissionswellenlänge des CO₂-Lasers gestellt, da diese auch die Wellenlänge der THz-Emission bestimmt. Die Grundkomponente des Lasers bildet eine 1,75 m lange doppelwandige Glasröhre, durch deren äußere Kammer Kühlwasser fließt. Durch die innere Kammer strömt ein Gasgemisch aus 9% Kohlendioxid (CO₂), 11% Stickstoff (N₂) und 80% Helium (He) bei einem Druck von ca. 20 - 30 mbar. An den Seiten der Röhre befinden sich im Abstand von 135 cm zwei Elektroden an die ein Hochspannungsnetzteil (15 kV, 30 mA) angeschlossen ist. Durch dieses wird die Pumpenergie für den CO₂-Laser zugeführt. Die eigentliche Kavität wird durch einen Germanium-Spiegel und ein Reflexionsgitter zur Wellenlängenselektion gebildet. Der Germanium-Spiegel lässt sich durch ein Piezostellglied bewegen und ermöglicht so das Nachregeln der Kavitätslänge. Unter den für die Expositionen eingestellten Bedingungen emittiert der CO₂-Laser bei 9,62 ca. 15 W, die in den FIR-Laser eingekoppelt werden.

Der Ferninfrarot-Laser besteht aus einer Quarzglasröhre der Länge 150 mm und einem Durchmesser von 50 mm. Innerhalb der Glasröhre befindet sich Methanol (CH₃OH), welches bei einem Druck von 0,66 mbar

ebenfalls gasförmig ist. Das Pumplicht wird von dem Gas absorbiert und es kommt zu einer stimulierten Strahlungsemission bei 2,52 THz. Die Röhre fungiert als Wellenleiter für die erzeugte Strahlung, von welcher ein Teil durch ein 3 mm großes Loch im Kavitätsspiegel ausgekoppelt wird. Die THz-Wellen werden an dem Einkoppelfenster aus KRS-6, durch welches das Pumplicht eintritt, nahezu vollständig reflektiert und über ein transparentes Kunststofffenster ausgekoppelt.

5.2.1.1 Systemoptimierung

Zu Beginn der Charakterisierungs- und Aufbauarbeiten betrug die Gesamtleistung direkt am Ausgang des FIR-Lasers weniger als 1 mW (gemessen mit einem an der PTB Berlin kalibrierten pyroelektrischem Sensor, Polytec Rk-5700). Alte Messdaten und Literaturwerte ließen unter den gegebenen Bedingungen aber mehr Leistung erwarten. Bei der näheren Untersuchung fielen mehrere degenerierte Komponenten im Lasersystem auf, die anschließend ausgetauscht wurden. Hauptsächlich handelte es sich hierbei um Fenster, die sich im Strahlengang des CO₂-Lasers befanden.

Die Salzkristall (NaCl)-Brewsterfenster innerhalb der Kavität des CO₂-Lasers: Diese schließen die Glasröhre des Lasers ab und sollen gleichzeitig eine verlustfreie Transmission der Strahlung ermöglichen. Die Reaktion zwischen NaCl und der Feuchtigkeit in der Laborluft führt jedoch auf Dauer zu einer rauen Oberfläche auf den Fenstern, welche die Verluste erheblich vergrößert und hierdurch die Ausgangsleistung des Lasers verringert.

Einkoppelfenster des FIR-Lasers aus KRS-6: Die Gesamtleistung des CO₂-Lasers wird durch dieses Fenster in den FIR-Laser eingekoppelt. Die hohen Leistungen und die durch die Fokussierung bedingten Intensitäten führen bei längerer Beanspruchung zu Verfärbungen und Rissen im Material. Diese verringern die in den Laser eingekoppelte und nutzbare Pumpleistung.

Mit Hilfe der aus Projektmitteln beschafften Pyrokamera (Spiricon Pyrocam III) lässt sich direkt am Ausgang des FIR-Lasers das Strahlprofil in Echtzeit untersuchen und dreidimensional visualisieren. Das gemessene Strahlprofil in Abbildung 19 lässt erkennen, dass drei Strahlen aus dem FIR-Laser ausgekoppelt werden. Grund hierfür ist, dass nicht nur THz-Strahlung sondern auch ein Teil des Pumplichtes des CO₂-Lasers das Kunststofffenster passiert. Für die Expositionen ist daher eine zusätzliche spektrale Filterung des Strahls notwendig. Die Filterung bestand bei den unteren drei Leistungsflussichten (0,05 - 0,15 - 0,3 mW/cm²) aus einer HDPE-Platte (engl. high-density polyethylene) und bei den oberen beiden Leistungsdichten (0,4 – 0,9 mW/cm²) aus einem Quarzkristall. Die hierbei maximal erreichten Leistungen betragen 1,7 mW mit HDPE als Filtermaterial und 5,3 mW mit einer Quarzkristallfilterung. Die Leistungsunterschiede ergeben sich aus der größeren Absorption im Kunststoff und einer zusätzlichen Überarbeitung des Lasersystems und der Strahlführung nach Aufbau der Quarzkristallfilterung.

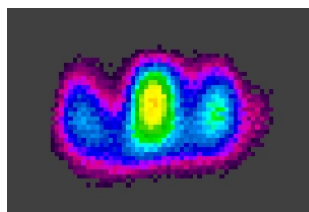


Abbildung 19: Mit Spiricon Pyrocam III aufgenommenes Strahlprofil direkt nach dem Auskoppelfenster des FIR-Lasers ohne spektrale Filterung

Nach den Umbaumaßnahmen ist sichergestellt, dass nur Strahlung der Frequenz 2,52 THz die Zellen erreicht. Die maximale Leistung beträgt nach allen Instandsetzungen, Verbesserungen und der Filterung 5,3 mW.

5.2.1.2 Leistungsüberwachung

Da die verwendete Expositionsquelle keine Möglichkeit zur automatischen Regulierung der Leistung bietet, haben wir uns für eine externe Überwachung entschlossen. Hierfür wurde ein geringer Prozentsatz des Hauptexpositionsstrahls separiert und zur Detektion auf einen thermischen Detektor (Golayzelle) fokussiert. Die drei folgenden Unterabschnitte beschreiben den realisierten Laboraufbau, den Angleich an das Gebrauchsnorm (Polytec Rk-5700) und die zur Überwachung entwickelte Hard- und Software.

Die zentrale Komponente der Leistungsüberwachung bildet der Strahlteiler, der bei möglichst hoher Transmission einen sehr geringen Anteil der Leistung auskoppeln soll. Aus diesen Vorgaben lassen sich die Anforderungen an Brechungsindex und Absorption des Materials ableiten. Eine geringe Materialabsorption ist für möglichst geringe Verluste im Strahlteiler unabdingbar. Diese kann zum einen durch die Materialwahl, andererseits aber auch durch dessen Dicke beeinflusst werden. Da der Auskoppelfaktor mit steigendem Brechzahlssprung zwischen Material und Luft zunimmt, sollte der Brechungsindex daher möglichst nahe an dem von Luft liegen.

Durch die langjährige Erfahrung der AG Koch im Bereich der THz-Forschung steht eine umfassende Materialdatenbank zur Verfügung. Die Auswertung der Ergebnisse machte sehr schnell deutlich, dass viele Kunststoffe die Anforderungen nahezu vollkommen erfüllen. Allerdings erforderte die relativ hohe Absorption bei 2,52 THz eine starke Reduktion der Dicke, weshalb eine dünne, auf einen Metallring gespannte PE-Folie gewählt wurde.

Aufgrund des geringen Durchmessers von nur ca. 5 cm war es notwendig, die THz-Strahlung durch den Teiler zu fokussieren. Dies stellt sicher, dass keine Verluste durch Beugung an den Rändern entstehen. Zusätzlich ließ sich ohne großen Aufwand die ausgekoppelte Strahlung mit einem Off-Axis-Parabolspiegel auf den thermischen Detektor – eine Golayzelle – fokussieren (Abbildung 20).

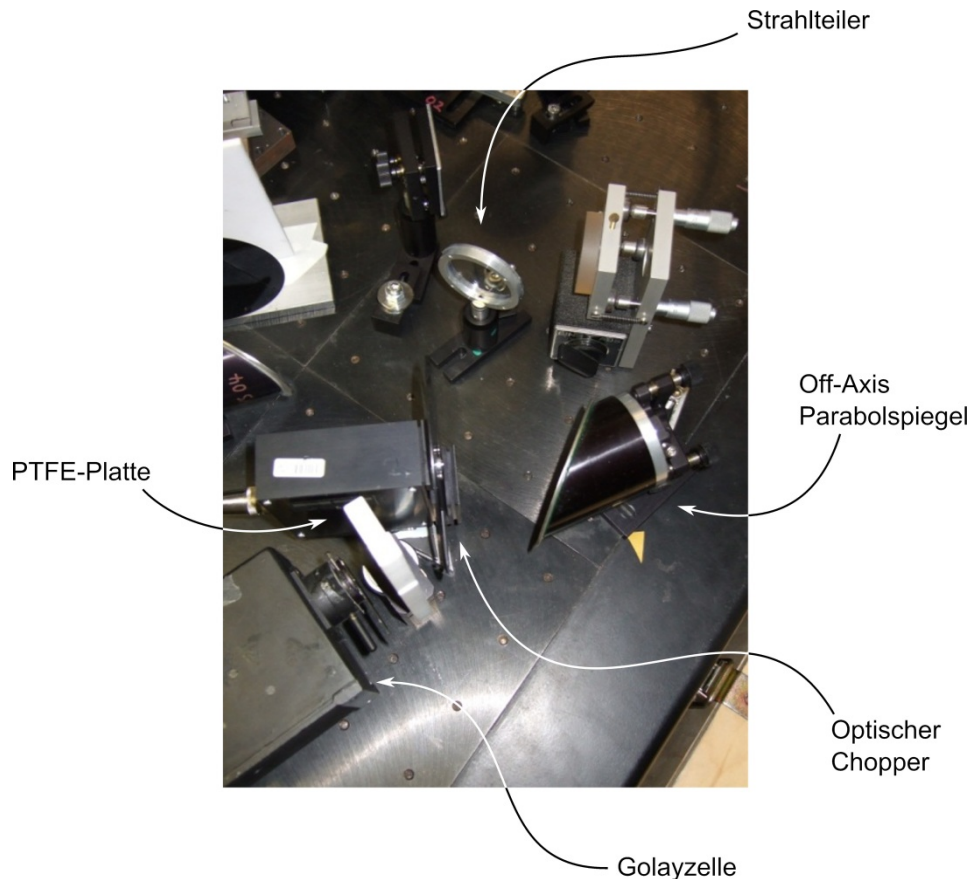


Abbildung 20: Teilausschnitt des Laboraufbaus zur Überwachung der Leistungsdichten

Die Golayzelle ist ausreichend sensitiv und ermöglicht es, auch kleine Leistungen von wenigen μW sicher zu detektieren. Sie bildet eine gute Alternative zum Bolometer, welches einer aufwendigen Kühlung mit flüssigem Stickstoff und Helium bedarf. Der zuverlässige Betrieb der Golayzelle erfordert eine Modulation der zu detektierenden Strahlung und eine Weiterverarbeitung des Ausgangssignals mittels eines Lock-In-Verstärkers. Die Lock-In-Technik ermöglicht später die Trennung von modulierten und nichtmodulierten Anteilen im Messsignal. Der optische Modulator (Chopper) wird direkt zwischen Off-Axis-Parabolspiegel und Golayzelle positioniert. Silberbeschichtete Spiegel, wie der hier verwendete Off-Axis-Parabolspiegel, reflektieren jedoch auch Umgebungslicht, welches sich auf das zu messende Signal addiert. Silizium eignet sich hervorragend für eine zusätzliche spektrale Filterung der Strahlung. Optische Wellenlängen werden sehr stark absorbiert, während THz-Strahlung das Material mit geringen Verlusten passieren kann. Mit einem solchen, direkt vor das Einkoppelfenster geklebten Filter, ist die Golayzelle somit unempfindlich gegenüber Umgebungslicht. Für die Detektion der Strahlung wurde die Leistung des zu messenden Signals zusätzlich durch einen PTFE-Block verringert.

Durch die Überwachung der Leistung wird sichergestellt, dass der FIR-Laser während der gesamten Expositionsdauer die eingestellten Leistungsdaten erreicht. Zusätzlich lässt sich aus den Messdaten die Messunsicherheit der Gesamtleistung abschätzen.

Der bisher beschriebene Laboraufbau bietet zwar die Möglichkeit, die Gesamtleistung zu überwachen, liefert aber noch keine Aussage über die Leistung in der Expositionszone. Für die Leistungsbestimmung des FIR-Lasers wird auf einen von der PTB Berlin kalibrierten Pyrodetektor (Polytec Rk-5700) zurückgegriffen, der beim Abgleich der Golayzelle für die Leistungsüberwachung als Referenz verwendet wurde.

Der in Abbildung 21 dargestellte Laboraufbau unterscheidet sich von den Expositionsbedingungen nur durch einen zusätzlichen Off-Axis-Parabolspiegel, welcher die Gesamtleistung, die ansonsten in den Inkubator eingekoppelt wird, auf das Polytec-Powermeter fokussiert. Der gleichzeitige Betrieb von Monitoraufbau und Powermeter minimiert den Fehler während des Abgleichs. Durch abwechselnde Messungen zwischen Golayzelle und Powermeter hätte die Leistungsschwankung des FIR-Lasers einen zusätzlichen Unsicherheitsbeitrag geliefert.

Nach dem Abgleich zwischen Polytec Rk-5700 und Golayzelle lässt sich aus den Monitordaten über den Umrechnungsfaktor die Gesamtleistung berechnen.

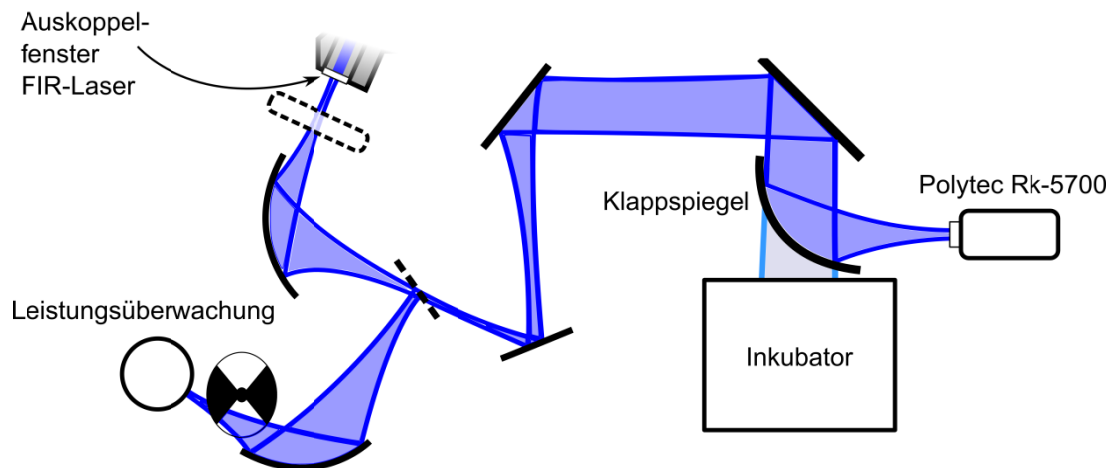


Abbildung 21: Schematische Darstellung der THz-Strahlführung beim Abgleich zwischen Leistungsüberwachung und Polytec Rk-5700

Der direkte Vergleich zwischen Monitor-Golayzelle und Polytec Rk-5700 ermöglicht eine fehlerarme Ankopplung an das Gebrauchsnormal. Die Monitorzelle und der zugehörige Laboraufbau bleiben nach dem Abgleich in ihrer ursprünglichen Position.

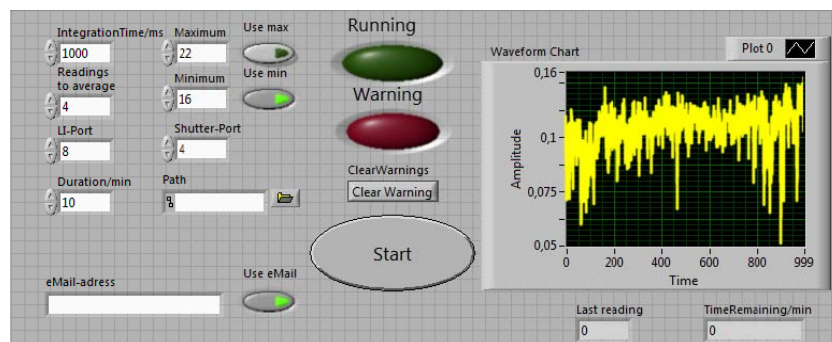


Abbildung 22: Oberfläche der Software zur Expositionskontrolle und Leistungsüberwachung

Die Charakterisierungs- und Umbauarbeiten machten deutlich, dass das Lasersystem im gesamten Expositionszeitraum manuell nachgeregelt und überwacht werden muss. Zusätzlich ist für die spätere Unsicherheitsbestimmung eine lückenlose Dokumentation der Laserleistung notwendig. Die für diese Zwecke entworfene Softwareoberfläche (Abbildung 22) bündelt diese Vorgänge und stellt sie übersichtlich dar. Einhergehend hiermit entstand auch ein vom PC aus steuerbarer Strahlblocker (Abbildung 23). Durch die Integration der Steuerung in die Software wird eine exakte Kontrolle der Expositionsdauer realisiert und Fehlexpositionen werden vermieden.

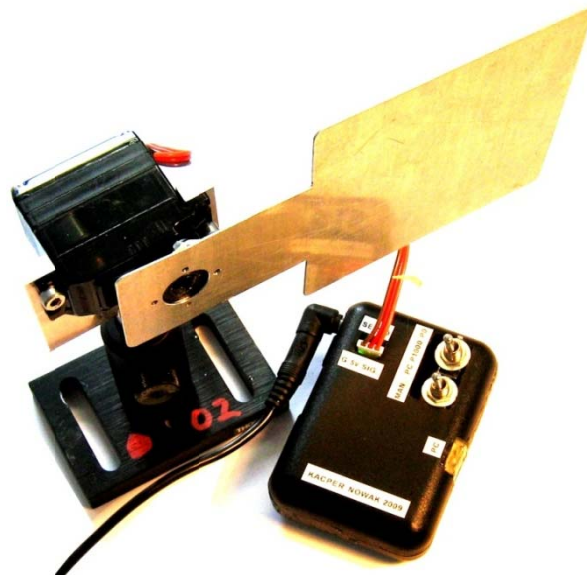


Abbildung 23: Computer gesteuerter mechanischer Strahlstopper zur Expositionskontrolle

Die Teilautomatisierung des Expositionsablaufes stellt sicher, dass die Expositionszeiten genau eingehalten und die Leistungsdaten einheitlich dokumentiert werden.

5.2.2 Charakterisierung und Einstellung des Strahlprofils

Die Einstellung von Leistungsdichten in der Expositionszone (siehe Abbildung 13) erfordert eine Charakterisierung der örtlichen Leistungsverteilung des Gaußstrahls. Für die Bestimmung dieses Strahlprofils wird der Weg der Strahlung so verändert, dass sich diese entlang des Labortisches ausbreitet. Durch Entfernen des letzten Spiegels, der normalerweise die Strahlung in den Inkubator leitet, lässt sich genau dieser Ausbreitungsweg einstellen. Da es sich bei dem Umlenkspiegel um eine planare Metallfläche handelt, ruft das Entfernen keine Veränderungen an der Strahlprofilform hervor. Der Strahl wird am Ende des optischen Tisches mit einem Off-Axis-Parabolspiegel aufgefangen und für die Charakterisierung auf eine Golayzelle fokussiert (Abbildung 24).

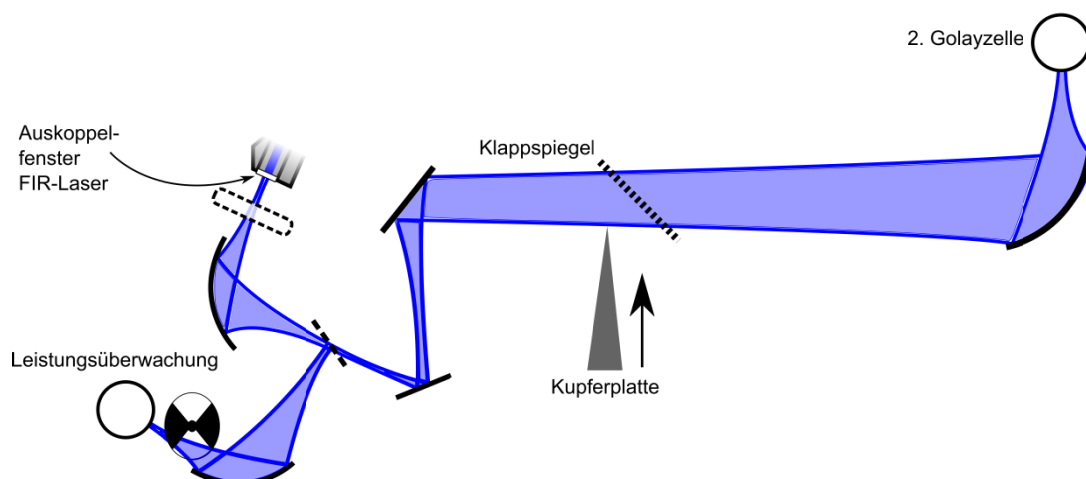


Abbildung 24: Schematische Darstellung der THz-Strahlführung bei der Messung der Strahlprofile

Die Ermittlung der Gaußprofile erfolgte mithilfe einer unter dem Begriff Rasierklingenmethode (engl. Knife-Edge Technique) bekannten Messtechnik. Das aus dem Bereich der Optik stammende Prinzip wurde zunächst hauptsächlich für Laser mit viel kleineren Wellenlängen und kleineren Strahldurchmessern entwickelt. Dabei wird der Laserstrahl mit einer scharfen Klinge senkrecht zu seiner Ausbreitungsrichtung

abgetastet und die Signalleistung in Abhängigkeit der Position ermittelt. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 25 dargestellt. An der Position 0 mm verdeckt die Platte den kompletten Gaußstrahl und die Signalamplitude wird zu Null. Bei 40 mm ist die Platte nicht mehr im Strahlengang und das Ergebnis ist die Gesamtamplitude. Der Kurvenverlauf zwischen diesen beiden Punkten entspricht dem Integral der Gaußfunktion und ermöglicht die Rekonstruktion der Strahlparameter mit Hilfe von

$$I_{Gau\beta} = I_0 + \frac{I_A}{w\sqrt{\pi/2}} e^{-2\frac{(x-x_c)^2}{w^2}}$$

mit der Strahlbreite w bei der die Amplitude auf $1/e^2$ des ursprünglichen Wertes abgefallen ist, der Position des Maximums x_c , der Amplitude I_A und dem Offset I_0 .

Auf Grund der hohen Schwankungen in der Signalamplitude war eine numerische Ableitung der Messdaten nicht möglich und es musste auf den direkten Vergleich mit dem Integral der Gaußfunktion zurückgegriffen werden

$$\int_{-\infty}^{\infty} I_{Gau\beta} dx = I_0 x + \frac{I_A}{2} - \sqrt{\pi} \cdot \text{erf}\left(\frac{I_A}{2w}(x_c - x)\right).$$

Eine exemplarische Darstellung und die dazugehörigen Strahlparameter finden sich in Abbildung 25. Anhand von

$$\text{FWHM} = w \frac{2}{\sqrt{\ln(4)}}$$

lässt sich aus der $1/e^2$ Breite w die Halbwertsbreite (engl. Full width half maximum - FWHM) bestimmen.

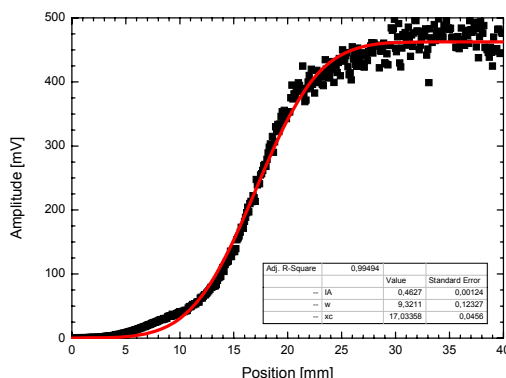


Abbildung 25: Mit einer Golayzelle gemessene Intensität in Abhängigkeit von der Position der Metallplatte (schwarz) und dem Integral der Gaußfunktion (rot)

Die Messung an einer Position senkrecht zur Strahlrichtung ermöglicht jedoch keine Aussage über die Ausbreitungseigenschaften des Strahls. Die Auftragung mehrerer Messungen entlang der Ausbreitungsrichtung ermöglicht durch eine lineare Extrapolation der Messdaten die Ermittlung des idealen Abstandes ($l = 73$ cm) vom letzten planen Spiegel (Abbildung 24), in welchem die Halbwertsbreite des Strahls den geforderten 2 cm entspricht.

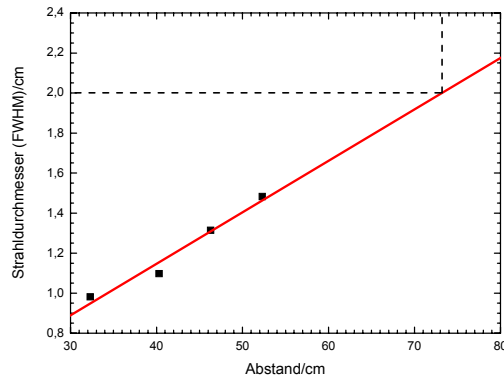


Abbildung 26: Gemessener Strahldurchmesser entlang der Ausbreitungsrichtung (schwarz) mit einer linearen Extrapolation der Messdaten (rot). Die spätere Position des Inkubators entspricht den gestrichelten Linien

Aufgrund der hohen Leistungsschwankungen des FIR-Lasers war es nicht möglich, die Gaußprofile direkt aus den abgeleiteten Messdaten zu ermitteln. Daher wurde direkt das Integral der Gaußfunktion mit den Messdaten verglichen (Abbildung 25). Die Charakterisierung des Strahlprofils entlang der Ausbreitungsachse ermöglicht die Extrapolation der Halbwertsbreite in größeren Entfernungen und somit die Bestimmung der korrekten Inkubatorposition für die Expositionen (Abbildung 26).

5.2.3 Einstellung der Leistungsdichten

Die Charakterisierung der Strahlprofile in Kapitel 5.2.2 ergibt eine Entfernung von 73 cm für eine Halbwertsbreite von 2 cm. Dieses Ergebnis legt die genaue Position des Inkubators fest. Abbildung 27 zeigt den aufgestellten Inkubator mit dem Pyrodetektor Polytec Rk-5700 zur Leistungskontrolle an der für die Zellen vorgesehenen Position. Für die räumliche Justierung des Expositionsstrahls wurde hingegen auf eine zweite Golayzelle zurückgegriffen. Durch die kleinere Apertur der Golayzelle lässt sich das Maximum des Gaußstrahls besser auf die Mitte der Zellen ausrichten. Zusätzlich führten die Temperatur im Inkubator und die senkrechte Ausrichtung zu hohen Fehlerwerten bei der Verwendung des thermisch sensitiven Pyrodetektors. Hierdurch ist eine direkte Leistungskontrolle im Inkubator während der Expositionen nicht möglich. Dementsprechend wird die Strahlposition mit Hilfe der Golayzelle und die Gesamtleistung mit der separaten Leistungsüberwachung kontrolliert.



Abbildung 27: Kontrolle der Inkubatorposition mit dem Polytec Rk-5700

Zur Einstellung der unterschiedlichen Leistungsdichten musste während der Expositionen auf dämpfende Materialien im Strahlengang zurückgegriffen werden. Eine Variation der Drücke im CO₂- und FIR-Laser zur Leistungseinstellung hätte zu erheblichen Stabilitätsproblemen geführt und die Durchführung des konzentrierten Expositionsplans unmöglich gemacht. Die Abbildung 28 zeigt exemplarisch die Einstellung von 0,05 mW/cm² durch zusätzliche Dämpfung mittels einer PTFE-Platte und eines HR-Siliziumwafers. Zusätzlich ist die spektrale Filterung durch den HDPE-Block direkt vor dem FIR-Laser zu erkennen.

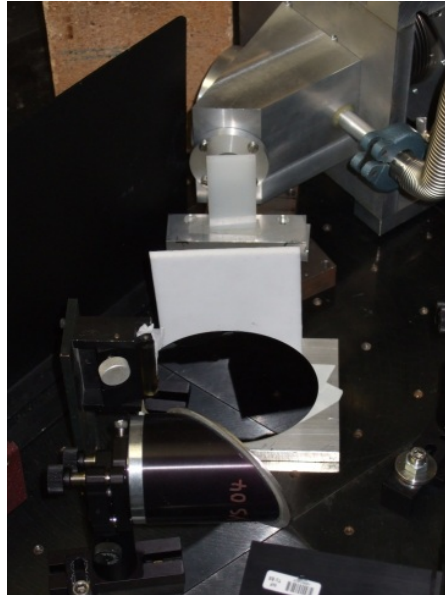


Abbildung 28: Dämpfung der THz-Leistung durch PTFE-Platte und Siliziumwafer (schwarz-blau) mit spektraler Filterung durch HDPE-Platte direkt am Ausgang des FIR-Lasers

Die Kenntnis des Strahlprofils und der Gesamtleistung ermöglicht in der Kombination die Berechnung der mittleren Leistungsdichte innerhalb der Expositionszone und die Bestimmung der optimalen Position des Inkubators. Zur Einstellung der unterschiedlichen Leistungsdichten dienen in den Strahlengang gestellte dämpfende Materialien.

5.2.4 Messunsicherheitsbudget

Dieser Abschnitt beschreibt anhand der höchsten Leistungsdichte exemplarisch die Fehlerberechnung. Die Fehlerbeiträge des Messunsicherheitsbudgets setzen sich aus drei Teilabschnitten zusammen, die sich anhand der Formeln unterscheiden lassen.

- 1.) Umrechnungsfaktor mW/V der Monitorzelle – Fehlerbeitrag durch den Abgleich zwischen Polytec Rk-5700 und Leistungsüberwachung:

$$u_{\text{Monitor}} = \frac{P_{\text{Pyro}} k_{\text{Pyro}} k_{\text{Pospyro}}}{A_{\text{Golay1}} k_{\text{Golay}}}$$

- 2.) Expositionsleistung mit den Unsicherheitsbeiträgen der Expositionsquelle und Golayzelle:

$$P_{\text{expo}} = A_{\text{Golay2}} k_{\text{Golay}} k_{\text{Laser}} u_{\text{Monitor}}$$

- 3.) Leistungsdichte mit Unsicherheit des Strahlenganges:

$$I_{expo} = P_{expo} u_{Leistungsdichte} k_{PosStrahl}$$

Tabelle 3 fasst alle Unsicherheitsbeiträge zusammen und erläutert sie. Tabelle 4 beinhaltet alle Umrechnungsfaktoren und Absolutwerte. Das Endergebnis für Expositionsleistung und Expositionsleistungsdichte wird in Tabelle 5 dargestellt. Es ergibt sich für die Leistungsdichte eine relative Unsicherheit von $\pm 28\%$.

Name	Wert	Standardmessunsicherheit	Verteilung	Beschreibung
$k_{PosStrahl}$	0,85	0,0866	Rechteck	Schwankung der Expositionsleistungsdichte durch Ungenauigkeiten bei der Ausrichtung des Inkubators, inkl. Unsicherheiten in der Realisierung des Strahlprofils
k_{Golay}	1,00	0,010614	normal	Unsicherheit der Golayzelle
k_{Laser}	1,00	0,0361	normal	Abweichung des Lasers bestimmt aus Typ A Beobachtung (Messdaten) und Unsicherheit der Golayzelle $k_{Laser} = \sqrt{k_{Mess}^2 - k_{Golay}^2}$
k_{Pyro}	1,15	0,0974	normal	Kalibrierfaktor des Polytec Rk-5700 aus Kalibrierschein mit erweiterter Unsicherheit von 17%
$k_{Pospyro}$	1,05	0,0289	Rechteck	Positionsfehler beim Aufstellen des Polytec Rk-5700

Tabelle 3: Auflistung der einzelnen Unsicherheitsbeiträge mit ihren Namen, Werten, der angenommenen Verteilung und Beschreibung

Name	Wert	Beschreibung
$u_{Monitor}$	$62,84 \frac{mW}{V}$	Umrechnungsfaktor: Monitorsignal in Gesamtleistung
$u_{Leistungsdichte}$	$0,1953 \frac{1}{cm^2}$	Umrechnungsfaktor: Gesamtleistung in Leistungsdichte (nach Berechnung aus Kapitel 5.1.3)
P_{Pyro}	4,6 mW	Gemessene Leistung während der Kalibrierung der Monitorzelle
A_{Golay1}	0,088 V	Anzeigewert der Golayzelle während der Kalibrierung
A_{Golay2}	0,08459 V	Gemittelter Anzeigewert der Golayzelle während der Exposition

Tabelle 4: Im exemplarischen Messunsicherheitsbudget verwendete Absolutwerte und Umrechnungsfaktoren

Name	Wert		Absolute erweiterte Messunsicherheit	Einheit	Relative erweiterte Messunsicherheit
P_{Expo}	5,3	\pm	0,99	mW	20 %
I_{Expo}	0,88	\pm	0,25	$\frac{mW}{cm^2}$	28 %

Tabelle 5: Berechnete Leistung und Leistungsdichte mit der absoluten und relativen erweiterten Messunsicherheit

Aus der Zusammenfassung aller Messunsicherheiten und der Berechnung ihrer Beiträge zur Gesamtunsicherheit ergibt sich für den gewählten Fall ein relativer Fehler von $\pm 28\%$. Die Leistungsdichte ergibt sich somit zu: $0,88 \pm 0,25 \frac{mW}{cm^2}$. Für die spätere übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse werden an dieser Stelle die Einzelexpositionen der Leistungsdichten zusammengefasst. Als Resultat ergibt dies fünf Leistungsdichten mit der jeweils zugehörigen erweiterten Messunsicherheit. Hierbei werden zwei erweiterte Messunsicherheiten angegeben, die aus der Schwankung der Expositionsquelle (k_{Laser}) im Durchschnitt (mittlere relative Standardabweichung) und im Extremfall (maximale relative

Standardabweichung) resultieren. Die Standardabweichung für k_{Laser} werden aus den für jede einzelne Exposition bestimmten Standardabweichungen wie folgt ermittelt:

Mittlere relative Standardabweichung: Mittelwert gebildet aus den Standardabweichungen aller Expositionen einer Leistungsdichte

Maximale relative Standardabweichung: Größte aufgetretene Standardabweichung bei der Leistungsdichte während einer einzelnen Exposition

In Tabelle 6 sind die endgültigen Mittelwerte und erweiterten Messunsicherheiten und die für die Berechnung verwendeten Standardabweichungen zusammengefasst. Die Standardabweichungen sind wie bei der Verwendung im Messunsicherheitsbudget auf den Mittelwert der Expositionsleistungsdichte normiert.

Nummer	Mittelwert [mW/cm ²]	Mittlere relative Standardabw. (norm.)	Aus mittlerer relativer Standardabw. berechnete erweiterte Messunsicherheit [%]	Max. relative Standardabw. (norm.)	Aus max. relativer Standardabw. berechnete erweiterte Messunsicherheit [%]
1	0,053	0,0441	30	0,0790	32
2	0,150	0,0386	29	0,0908	33
3	0,306	0,0481	31	0,1950	48
4	0,442	0,0244	28	0,0531	29
5	0,882	0,0234	28	0,0361	28

Tabelle 6: Leistungsdichten und erweiterte Messunsicherheit für Schwankung der Expositionsquelle (k_{Laser}) im Durchschnitt (Mittelwert gebildet aus den Standardabweichungen aller Expositionen einer Leistungsdichte) und für den Extremfall (Maximum – größte aufgetretene Standardabweichung innerhalb der Leistungsdichte während einer Exposition). Die angegebenen Standardabweichungen entsprechen den für k_{Laser} verwendeten Werten

Abbildung 29 zeigt die Bereiche der Leistungsdichten, in denen sie sich mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% nach den Berechnungen mit mittlerer und maximaler relativer Standardabweichung befinden. Wird der FIR-Laser als perfekt stabile Quelle angenommen, also mit keiner Standardabweichung (Standardabweichung $k_{Laser} = 0$), ergibt sich aus den verbleibenden Beiträgen im Messunsicherheitsbudget eine erweiterte Messunsicherheit von $\pm 28\%$. Aus dem Vergleich mit den Ergebnissen in Tabelle 6 lässt sich schließen, dass im Fall der Leistungsdichten 4 und 5 die Stabilität des FIR-Lasers somit keinen signifikanten Beitrag zur Gesamtunsicherheit geliefert hat. Diese vergrößerte Stabilität resultiert aus der für die Leistungsdichten 4 und 5 erneut vorgenommenen Überarbeitung des Lasersystems. Hingegen kam es bei den Expositionen für die Leistungsdichte 3 zu stark erhöhten Schwankungen des FIR-Lasersystems, welche sich in einer extrem hohen maximalen relativen Standardabweichung und im Ergebnis in einer erweiterten Messunsicherheit von $\pm 48\%$ widerspiegeln. Vergleicht man die mit der mittleren relativen Standardabweichung berechneten erweiterten Messunsicherheiten, so zeigen sich bei allen Leistungsdichten keine größeren Beiträge durch die Schwankungen des FIR-Lasersystems.

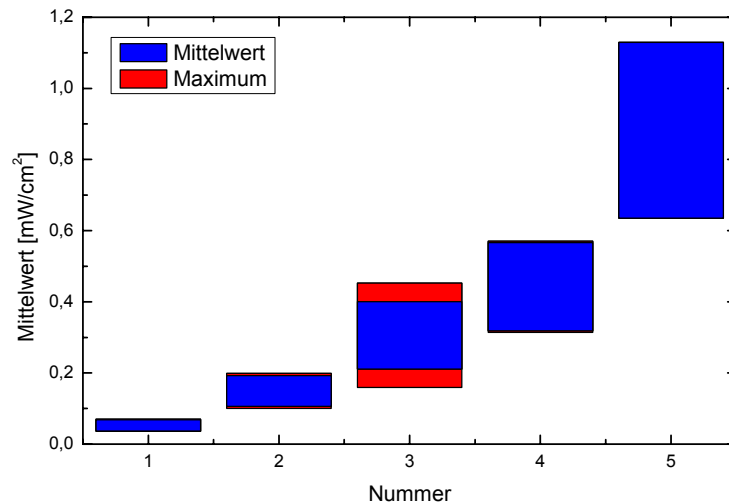


Abbildung 29: Auftragung der Bereiche in denen sich die Leistungsdichten mit einer Wahrscheinlichkeit von 95% befinden. Berechnet mit der mittleren (blau) und maximalen relativen Standardabweichung (rot) für k_{Laser}

6 Dosimetrie

6.1 Numerische Simulationen

Um Aussagen über die in den biologischen Proben umgesetzte Leistung treffen zu können, sind zwangsläufig numerische Simulationsrechnungen notwendig. Die Problematik besteht besonders darin, dass sich die Verteilung der spezifischen Absorptionsrate (SAR) aufgrund der hohen Verluste im Nährmedium entlang der Probendicke (hier in Ausbreitungsrichtung des Strahls) bereits auf wenigen 100 μm extrem stark ändert. Das SAR-Konzept ist daher auch nur für Frequenzen bis etwa 10 GHz sinnvoll einsetzbar. Die Messung der SAR-Verteilung bei den in Projekt verwendeten Frequenzen mit handelsüblichen SAR-Sonden ist deswegen auch unmöglich. Zwar könnte über eine (integrale) Temperaturmessung der Nährlösung die in der Probe umgesetzte Gesamtleistung grob bestimmt werden, eine Aussage über den SAR-Wert direkt am Schalenboden und somit innerhalb der Zellschicht kann jedoch nicht getroffen werden. Um Informationen über die SAR-Verteilung und die Gleichmäßigkeit der Befeldung im Voraus erhalten zu können, wurden bereits sehr früh im Projekt Simulationen mit CST Microwave Studio (Finite-Integral-Methode) durchgeführt. Das simulierte Modell zeigt die Abbildung 30 im Schnitt.

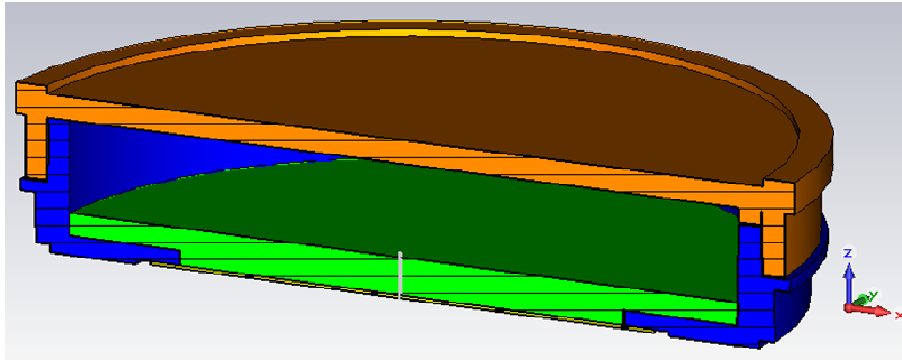


Abbildung 30: Modell einer Ibidi-Schale (5 cm) mit Körper (blau), Deckel (orange) und DMEM-Nährlösung (grün); der dünne (200 μm) Folienboden ist in der Abbildung nicht zu erkennen und befindet sich in der Schalenmitte unter dem Nährmedium

Dabei zeigte sich relativ schnell, dass die dielektrischen Eigenschaften einen sehr starken Einfluss auf das Ergebnis haben. Werden die Verluste der für die Simulationen verwendeten Materialien zu gering angesetzt, entstehen bereits bei Frequenzen ab 10 GHz Resonanzen, da die Behälter dann als dielektrischer Resonator fungieren. Auf Grund der Tatsache, dass querlaufende Wellen in dem Fall nicht ausreichend gedämpft werden, entstehen so Feldüberhöhungen von bis zu 1000%, und es bilden sich durch konstruktive Interferenz regelrechte „Brennflecken“ in der Mitte der runden Petrischale aus, wie in der Abbildung 31 beispielhaft an einer relativ verlustarmen Plexiglasschale zu erkennen ist.

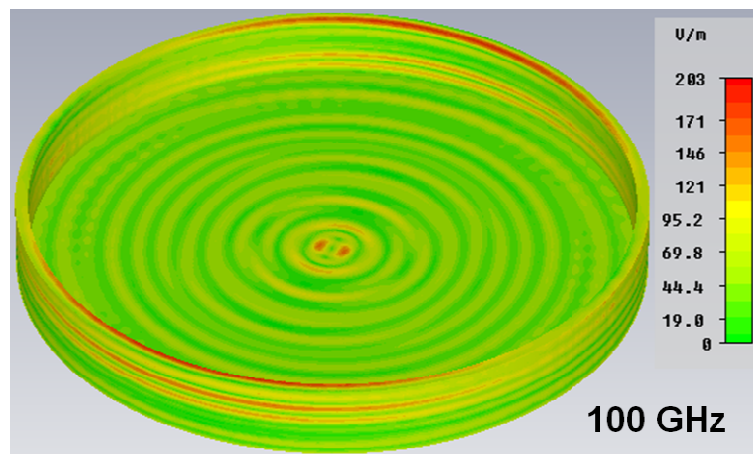


Abbildung 31: Feldverteilung in einem einfachen Plexiglasmodell (leerer Probenbehälter) mit geringer Dämpfung bei Anregung von unten mit einer ebenen Welle der Feldstärke 100 V/m

Eine möglichst realistische Angabe der elektrischen Eigenschaften ist deshalb unumgänglich. Proben der für die Experimente verwendeten Nährlösung DMEM/FCS wurden daher zur Bestimmung des Brechungsindex bzw. der relativen Permittivität ϵ_r und des Absorptionskoeffizienten α an das Institut für Hochfrequenztechnik der TU Braunschweig weitergegeben. Die mittels THz-Zeitbereichsspektroskopie für den Frequenzbereich von 200 GHz bis 2,6 THz erhaltenen Messergebnisse sind in der Abbildung 32 als schwarze Linie zu erkennen. Die starken Schwankungen an den Rändern des Messbereichs erklären sich bei den unteren Frequenzen durch Beugungseffekte, die auf Grund der größeren Wellenlänge an den Rändern der Küvette auftreten. Im oberen Bereich leidet hingegen die Messdynamik unter der rasch zunehmenden Absorption der THz-Strahlung, was zu instabilen Messungen führt.

DMEM-Kulturmedium

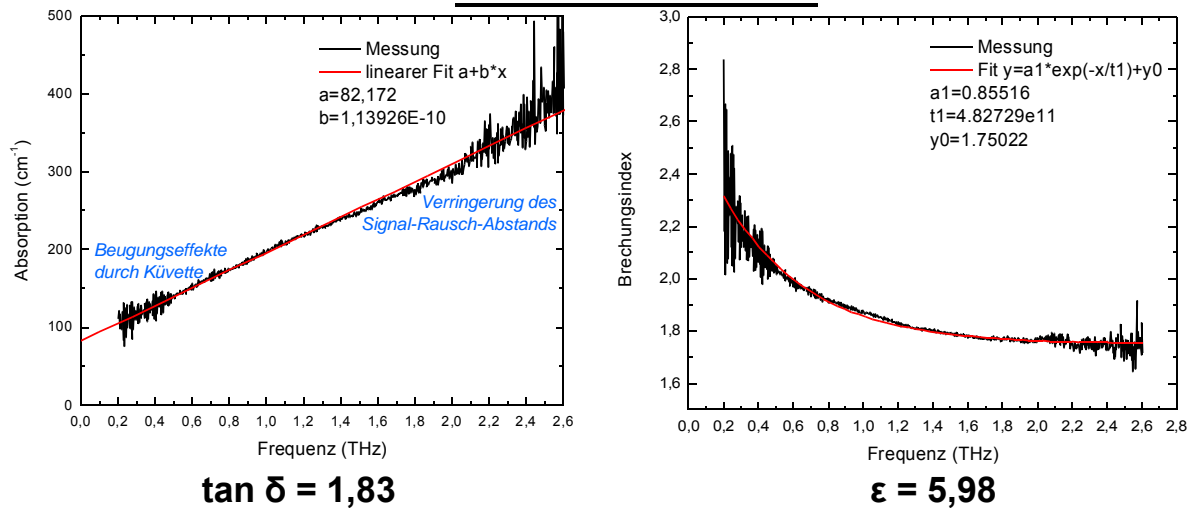


Abbildung 32: Messergebnisse der THz-Zeitbereichsspektroskopie von DMEM-Nährlösung (schwarz) mit gefitteten Kurven (rot) und den daraus resultierenden dielektrischen Parametern bei 106 GHz (ganz unten)

Die roten Kurven zeigen die mathematischen Fits, mit Hilfe derer die dielektrischen Parameter durch Extrapolation bei 106 GHz zu $\tan \delta = 1,83$ und $\epsilon = 5,98$ ermittelt wurden.

Die so extrahierten Parameter für die dielektrischen Eigenschaften der verwendeten Materialien sind in das Simulationsmodell eingeflossen, woraus sich folgende Gesamtheit an Materialdaten ergibt:

Material	ϵ_r	$\tan \delta$	μ_r	$\rho / \text{kg/m}^3$	$\lambda / \text{W/K m}$	$c / \text{kJ/kg K}$
Boden	2,34	0,005	1,0	1020	0,147	1,5
Körper	2,28	0,0001	1,0	1020	0,147	1,5
Deckel	3,0	0,01	1,0	1040	0,16	1,5
DMEM-Nährlösung	5,97998	1,8256	1,0	993,326	0,632	4,179

Abbildung 33: Dielektrische und thermische Parameter der in den Simulationen verwendeten Materialien

Da Rechnungen nach der finiten Integrationstechnik wegen der verwendeten Volumendiskretisierung extrem rechenintensiv sind, wurde das in Abbildung 30 gezeigte Modell lediglich bei der untersten Expositionsfrequenz (106 GHz) simuliert. Die Anregung geschah dabei von unten mit einer ebenen Welle der Feldstärke 61,4 V/m, was im Freiraum einer Leistungsdichte von 1 mW/cm² entspricht. Im Vergleich zur realen Gaußverteilung während der Expositionen wird dabei in den Simulationen mehr Energie in die Schalen eingebracht. Insbesondere werden die Randbereiche der simulierten Probe im Vergleich zur realen Bestrahlung übermäßig stark exponiert, während die Feldstärke innerhalb der Expositionszone den realen Werten sehr nahe kommt. Das führt im Ergebnis zu leicht höheren SAR- und Temperaturwerten in der Simulation. Da eine Definition eigener Fernfeldquellen in CST nicht kompatibel mit dem verwendeten Löser ist und die Generierung von Gaußstrahlen noch in der Erprobungsphase steckt, war dieses Vorgehen das einzig mögliche. Die lokalen SAR-Werte innerhalb der Expositionszone werden davon kaum beeinflusst, da die hohen dielektrischen Verluste laterale Feldwirkungen verhindern. Der Gesamtfehler, der dadurch entsteht, ist tatsächlich nicht sehr groß, wie weiter unten durch die Temperaturmessungen gezeigt wird.



Abbildung 34: SAR-Verteilung 20 µm über dem Schalenboden bei Anregung mittels ebener Welle der Feldstärke 61,4 V/m und Mittelung über 0,001 g

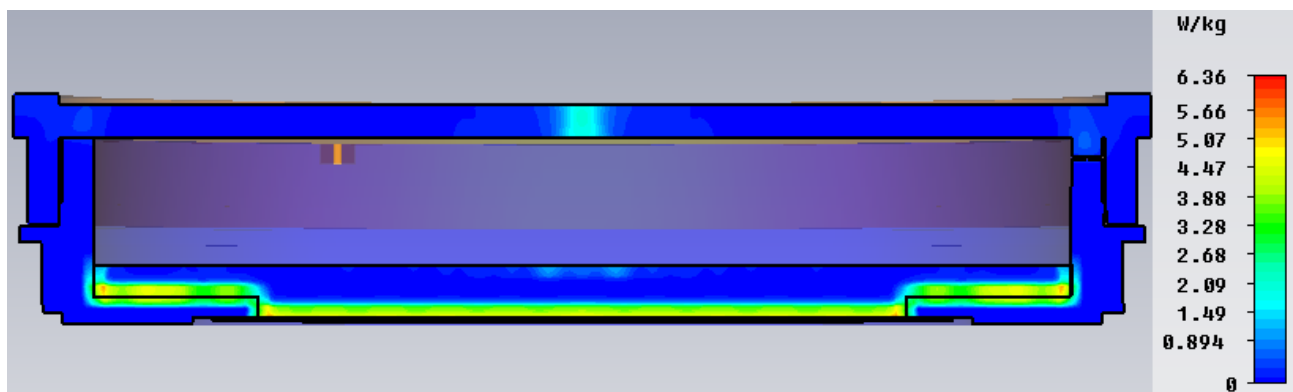


Abbildung 35: SAR-Verteilung im Schnittbild bei Anregung mittels ebener Welle der Feldstärke 61,4 V/m und Mittelung über 0,001 g

In den Abbildung 34 und Abbildung 35 sind die berechneten und über 0,001 g große würfelförmige Massenelemente gemittelten SAR-Verteilungen für eine Leistungsdichte von 1 mW/cm² gezeigt. Wie in der Abbildung 35 zu erkennen ist, entstehen aufgrund hoher Verluste entlang der Ausbreitungsrichtung des Strahls sehr starke Gradienten in der SAR-Verteilung. Nahezu die gesamte einfallende Energie wird auf dem Weg durch die Probe bereits auf den ersten paar 100 µm absorbiert und führt dort zu sehr hohen SAR-Werten von bis zu 6,4 W/kg. Um eine ungefähre Vorstellung von der Leistung zu bekommen, die die Zellen während der Expositionen sehen (Zelldicke ca. 30-50 µm), ist die SAR-Verteilung in einer Schnittebene 20 µm oberhalb des Schalenbodens in Abbildung 34 gezeigt. In dieser Ebene liegt die spezifische Absorptionsrate bei ca. 5 W/kg und somit recht nah am absoluten Maximum im Schnittbild Abbildung 35. Eine geeignete Wahl für die Schnittebene über dem Boden zu finden, um aussagekräftige Ergebnisse für die Zellschicht zu erhalten, ist jedoch extrem schwierig, da die Dicke der Zellschicht nicht eindeutig bestimmbar ist. Zwar sind die Abmessungen einzelner, gut charakterisierter Zellen bekannt, jedoch variiert die Dicke einer angewachsenen Zellschicht u.a. mit dem Wassergehalt und dem Stadium der Adhäsion, d.h. der Zeit, die die Zellen bereits festgewachsen sind, da sich diese am Boden regelrecht „flachziehen“. Aufgrund des großen Gradienten entlang der Strahlausbreitung kann daher bereits eine geringe Änderung der Schnitthöhe deutliche Änderungen beim SAR-Wert hervorrufen. Die Zellschicht selbst wurde während der Projektarbeiten nicht in das Simulationsmodell integriert. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Zellschicht zu 60-80% aus Wasser und zu 20-40% aus Feststoffen (Proteine etc.) besteht. Die dielektrischen

Eigenschaften werden daher vor allem durch das Wasser bestimmt. Dessen Energieabsorption ist jedoch, wie oben bereits beschrieben, so groß, dass sich an der Feldverteilung nicht viel ändert. Einfacher gesagt: Der Absolutwert der Dämpfung ist so hoch, dass sich kleine (relative) Schwankungen in der Dämpfung nur minimal auswirken. Dies wurde überprüft, indem über Mischungsgleichungen durch andere Arbeitsgruppen ermittelte Werte für die Permittivität und den Verlustwinkel von Hautzelllinien als zusätzliche Zellschicht modelliert und in die Simulationen eingepflegt wurden. Änderungen bei der Erwärmung waren nicht feststellbar, die der SAR-Werte lediglich minimal und somit zu vernachlässigen. Entsprechende Messwerte für die dielektrischen Eigenschaften waren nicht vorhanden.

Da die Menge der Nährlösung in den Probenbehältern prozess- und transportbedingt im Rahmen des für die Zellen zulässigen Bereiches schwankt, wurden auch die Auswirkungen der Füllmenge auf die Simulationsergebnisse untersucht. Bei einer Reduktion der DMEM-Menge von 3 ml auf 2,5 ml betrug sowohl die Änderung des SAR-Wertes als auch die der Temperaturerhöhung in der Probe lediglich wenige Promille und ist somit vernachlässigbar. Die folgenden Abbildung 36, Abbildung 37 und Abbildung 38 zeigen zum Vergleich die entsprechenden SAR-Werte ohne Massenmittelung. Der Verzicht auf die Mittelung führt zu einer noch stärkeren Konzentration hoher SAR-Werte am Rand, wo die Welle auf die DMEM-Schicht trifft bzw. zu einem noch steileren Gradienten entlang der Strahlrichtung. Um diesen zu verdeutlichen, wurde für die Abbildung 38 die Punkt-SAR entlang einer gedachten Linie in der Schalenmitte entlang der Ausbreitungsrichtung des Strahls ausgewertet. Es zeigt sich, dass die Wahl der Betrachtungsebene gerade in der Grenzschicht zwischen Schalenboden und Flüssigkeit einen immensen Einfluss hat. Für die Zellebene 20 μm über dem Schalenboden bedeutet der Verzicht auf die Mittelung eine Erhöhung des SAR-Wertes um das 2,5-fache. Die Auswahl geeigneter Massenelemente ist daher ein kritischer Punkt bei der Bestimmung der SAR-Verteilung und führt letztendlich zu der Erkenntnis, dass lediglich die ungemittelte Punkt-SAR aussagekräftige Vergleiche bei In-Vitro-Experimenten ermöglicht.

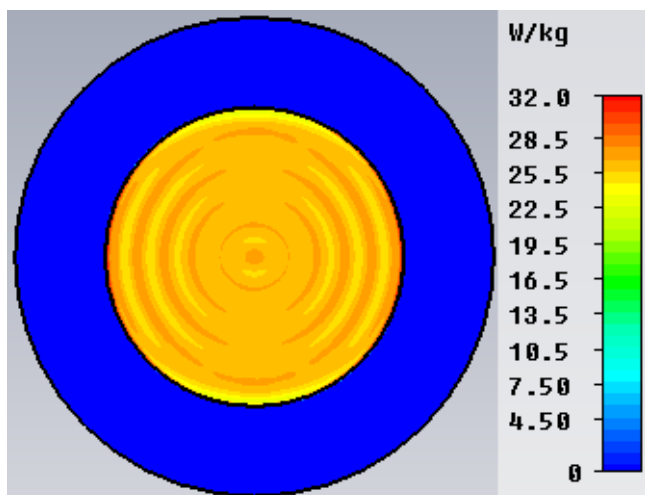


Abbildung 36: SAR-Verteilung 20 μm über dem Schalenboden bei Anregung mittels ebener Welle der Feldstärke 61,4 V/m ohne Mittelung

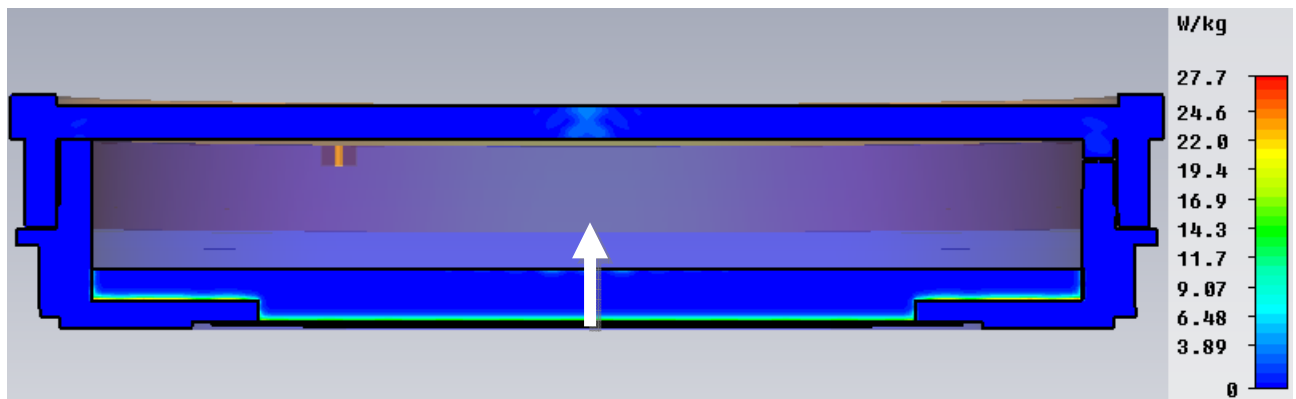


Abbildung 37: SAR-Verteilung im Schnittbild bei Anregung mittels ebener Welle der Feldstärke 61,4 V/m ohne Mittelung

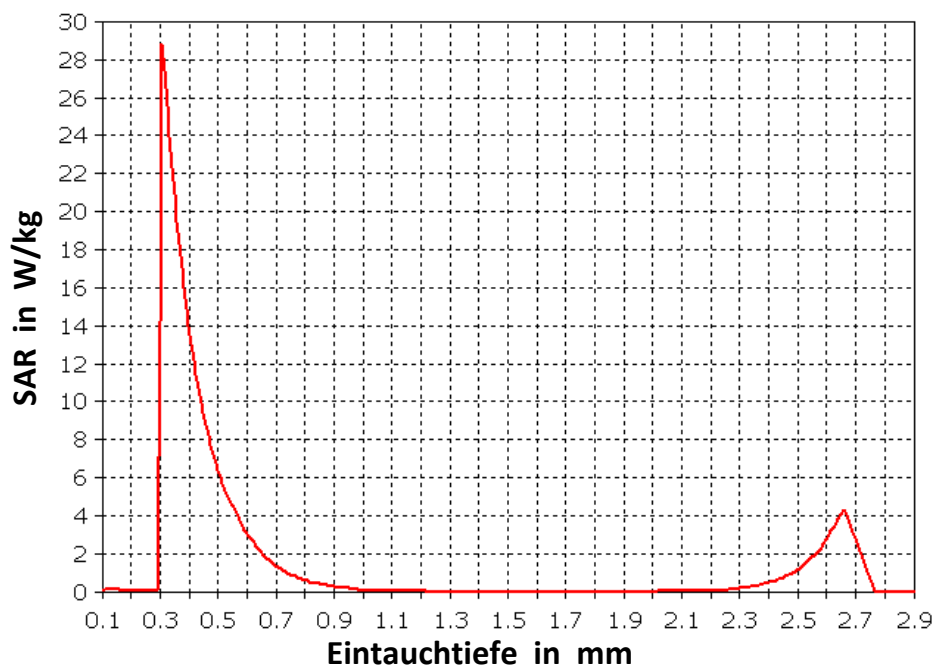


Abbildung 38: Verteilung der Punkt-SAR entlang einer gedachten Linie (siehe weißer Pfeil in Abbildung 37) bei 106 GHz; Achtung: Der Schalenboden beginnt bei 0,1 mm, die Nährflüssigkeit bei 0,3 mm!

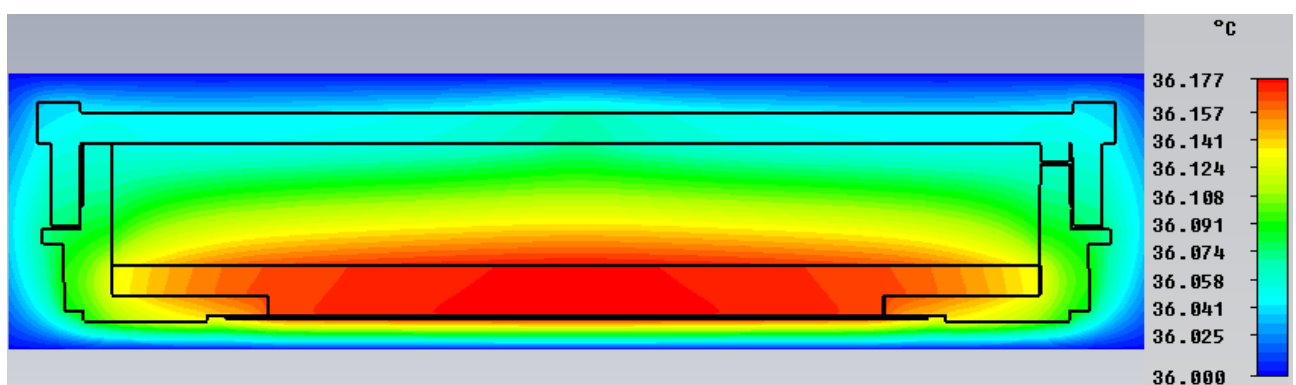


Abbildung 39: Temperaturverteilung im Schnittbild bei Anregung mittels ebener Welle der Feldstärke 61,4 V/m

Abbildung 39 zeigt die berechnete Erwärmung bei Exposition mit 1 mW/cm^2 bei 106 GHz. Da die Probenhalterung aus thermisch gut isolierendem Rohacell besteht, oben und unten jeweils geöffnet ist und für eine gute Konvektion innerhalb des Inkubators gesorgt ist, wurden die lateralen thermischen Randbedingungen als offen bzw. adiabatisch und die für die Z-Achse als isotherm angenommen bei einer

Hintergrundtemperatur (Inkubortemperatur) von 36°C. Daraus resultiert eine Erwärmung um ca. 0,2 °C auf insgesamt 36,2 °C.

Um eine Vorstellung zu bekommen, welche (Punkt-)SAR-Werte bei höheren Frequenzen zu erwarten sind, wurde ein vereinfachtes Simulationsmodell erstellt, welches in Abbildung 40 links zu sehen ist. Da das gesamte Modell aufgrund begrenzter Hardwareressourcen bei so hohen Frequenzen nicht mehr berechnet werden kann, wurde dafür ein 2 x 2 mm großer würfelförmiger Ausschnitt aus einer ibidi-Schale gewählt. Für die räumliche Begrenzung des Würfels wurden periodische Randbedingungen gewählt, wodurch eine unendliche Ausdehnung des Modells angenommen wird. Die Gültigkeit dieses Modells ist durch die hohe Absorption der Nährflüssigkeit gegeben, die dazu führt, dass querlaufende Wellen vollständig gedämpft und laterale Wechselwirkungen somit verhindert werden. Feldwechselwirkungen geschehen daher nur an der unmittelbaren Grenzfläche zwischen Schalenboden und DMEM. Aus diesem Grund besteht das vereinfachte Modell lediglich aus der 200 µm dicken Bodenfolie und einer rund 2,4 mm hohen DMEM-Schicht, die einer Befüllung mit 3 ml Nährflüssigkeit entspricht. Die Diskretisierung erfolgt in Form von 0,17 Mio. Gitterzellen bei 106 GHz, 4,63 Mio. Gitterzellen bei 380 GHz und 68,5 Mio. Gitterzellen bei 1,0 THz. Die Anregung erfolgte wie beim vollständigen Modell mit einer ebenen Welle der Feldstärke 61,4 V/m, die einer Leistungsdichte von 1 mW/cm² entspricht. Ausgewertet wurde dabei der Verlauf der ungemittelten SAR entlang einer gedachten Linie in der Mitte des Würfels (siehe weißer Pfeil in der Abbildung), um den starken Gradienten deutlich zu machen. Der Vergleich der Verläufe bei 106 GHz in Abbildung 40 rechts und Abbildung 38 zeigt eine relativ gute Übereinstimmung beider Kurven, wodurch die Gültigkeit des Modells auch anhand der berechneten Ergebnisse nochmals untermauert wird. Für die höheren Frequenzen ergeben sich ähnliche Verläufe, der auftretende Maximalwert variiert jedoch stark. So beträgt die ungemittelte maximale spezifische Absorptionsrate nicht nur 27 W/kg wie bei der Bestrahlung mit 106 GHz, sondern bis zu 43 W/kg bei 380 GHz und 58 W/kg bei 1,0 THz. Der Kurvenverlauf lässt erkennen, dass ein Großteil der eingebrachten Strahlungsleistung bei Eintritt in das verlustbehaftete Nährmedium unmittelbar auf den ersten 50 µm absorbiert und in Wärme umgesetzt wird. Je stärker die Absorption bzw. steiler der Gradient ist, desto größer ist folglich der maximale Energieumsatz an der Grenzschicht zwischen Boden und Flüssigkeit und somit auch in der Zellebene.

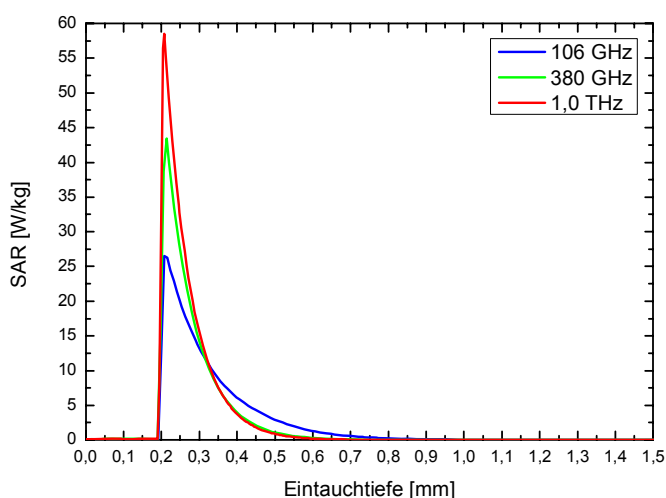
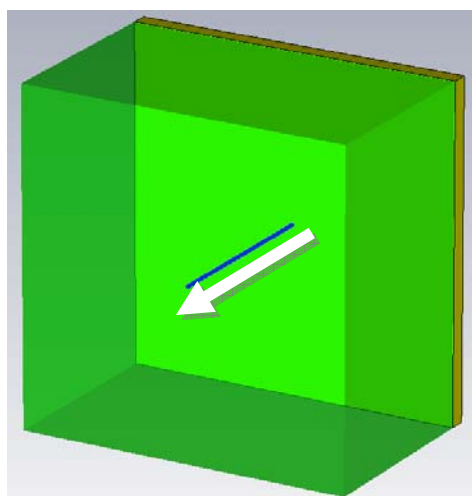


Abbildung 40: 2 x 2 mm großes würfelförmiges CST-Modell als kleiner Ausschnitt aus einer mit Nährflüssigkeit gefüllten ibidi-Schale (links) und die simulierte Verteilung der Punkt-SAR entlang einer gedachten Linie (siehe weißer Pfeil links) bei 106 GHz, 380 GHz und 1,0 THz

6.2 Temperaturmessungen zur Verifikation

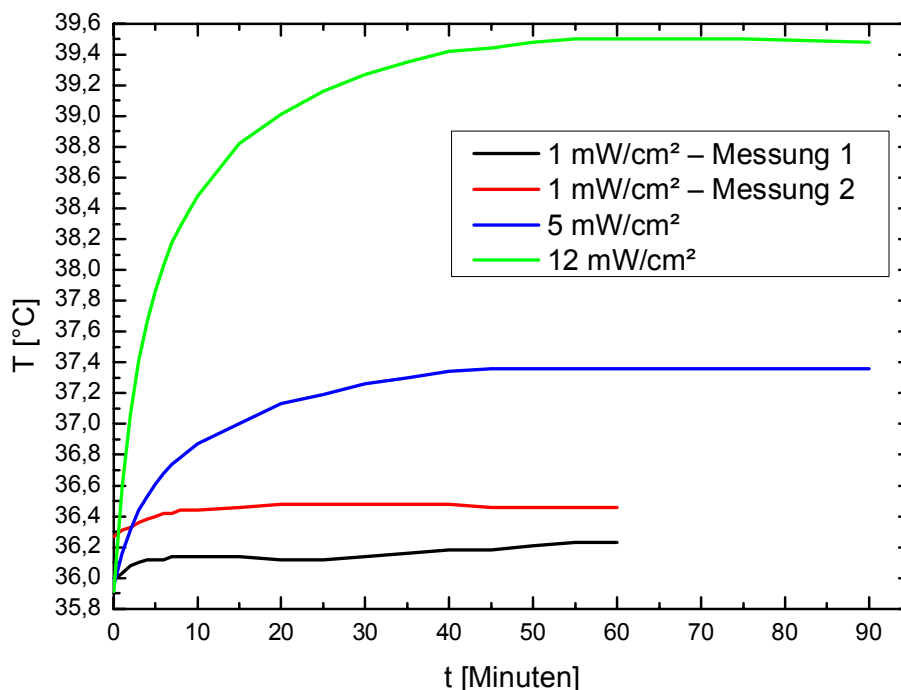


Abbildung 41: Gemessener Temperaturanstieg in mit 106 GHz exponierten DMEM-Proben bei verschiedenen Leistungsdichten

Die in den Simulationen berechnete Erwärmung der Proben wurde anhand von unabhängigen Temperaturmessungen verifiziert. Dazu wurden ibidi-Schalen mit 3 ml DMEM-Nährlösung gefüllt und bei 106 GHz mit verschiedenen Leistungsdichten bestrahlt. Die Ergebnisse der Messungen sind in Abbildung 41 gezeigt. Beide Messungen für eine Leistungsdichte von 1 mW/cm² zeigen einen Temperaturanstieg von ca. 0,2 °C und sind damit in sehr guter Übereinstimmung mit den numerischen Resultaten. Die Schwankungen im vermeintlich stationären Zustand der Erwärmung, wie beispielsweise im schwarz gezeichneten Graphen gut zu erkennen ist, ergeben sich aus den Regelschwankungen der Inkubatortemperatur. Die grüne Kurve der Grafik macht deutlich, warum die maximale für die Expositionen verwendete Leistungsdichte im Projekt von 10 mW/cm² auf 2 mW/cm² reduziert wurde. Eine Exposition mit 12 mW/cm² führt aufgrund der vollständigen Absorption der Strahlungsenergie zu einer Probenerwärmung von 4 °C auf dann 40 °C bei einer Inkubatortemperatur von 36 °C. Bei diesen Temperaturen muss von einem thermisch induzierten Zellschaden ausgegangen werden, da der für die Zellen physiologisch günstige Bereich eindeutig verlassen wird. Durch die Reduktion der maximalen Leistungsdichte befanden sich die Zellproben stets in einem physiologisch günstigen Temperaturbereich, wodurch thermisch induzierte Schäden, wie sie bei der Verwendung der ursprünglich angedachten maximalen Leistungsdichte von 10 mW/cm² bestimmt aufgetreten wären, sicher vermieden werden konnten.

7 Methodik und Auswertung der Gentoxizitätstests

7.1 Einleitung

Der Comet Assay (auch Einzelzellgelelektrophorese genannt) ist eine Methode zur Bestimmung des DNA-Schadens auf Einzelzellniveau (Olive and Banath 2006). Er wurde 1984 in seiner neutralen Variante entwickelt (Ostling and Johanson 1984), ist aber heute in seiner später etablierten basischen Variante gebräuchlich (Singh et al. 1988). Er detektiert Einzel- und Doppelstrangbrüche und sogenannte alkalilabile Stellen. Untersucht wird immer eine Einzelzellsuspension, die aus dem zu untersuchenden System gewonnen werden muss. Die Zellen werden in einer Agarose-Suspension auf einen Objektträger gebracht und lysiert, so dass nur der kompakte Zellkern übrig bleibt. Anschließend werden die Kerne einer Elektrophorese unterzogen. DNA-Fragmente, die durch Strangbrüche entstanden sind, wandern aufgrund ihrer geringeren Größe im elektrischen Feld schneller als der Hauptkern. Dadurch ergibt sich mikroskopisch das charakteristische Bild eines Kometen, bei dem die DNA-Moleküle im Hauptkern den Kometenkopf und die Fragmente den Kometenschweif darstellen. Der Comet Assay ist eine weltweit anerkannte Methode der Gentoxizitätsprüfung (Tice et al. 2000).

Der Mikrokerntest ist ein seit langem etabliertes Verfahren zur Messung von DNA-Schäden (OECD 2010, Stopper and Müller 1997). Er wurde ursprünglich von Boller und Schmid entwickelt (Boller and Schmid 1970) und später durch die Verwendung von Cytochalasin B von Fenech und Morley deutlich verbessert (Fenech and Morley 1985). Er quantifiziert das Auftreten kleiner nuklearer Strukturen, die Mikrokerne genannt werden. Sie enthalten entweder gebrochene Chromosomenfragmente im Falle eines klastogenen Agens oder komplette Chromosomen im Falle eines aneugenen Agens. Normalerweise entstehen die Mikrokerne während der Mitose wenn Chromosomen oder deren Bruchstücke nicht vom Spindelapparat erfasst und somit nicht korrekt auf die Tochterzellkerne aufgeteilt werden (Abbildung 42). Das experimentelle Vorgehen wurde in umfangreiche Ringversuchen für Lymphozyten und Zelllinien validiert und standardisiert (Bonassi et al. 2001, Fenech et al. 2003a, Fenech et al. 2003b, OECD 2010, Reifferscheid et al. 2008, von der Hude et al. 2000). Der Mikrokerntest stellt einen guten Indikator test dar, weil die Mikrokernefrequenz in peripheren Lymphozyten direkt mit dem Risiko für Krebs und Herz-Kreislauf-Erkrankungen korreliert (Bonassi et al. 2007, Murgia et al. 2008, Murgia et al. 2007). Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, dass das Auftreten weiterer nuklearer Anomalien, wie z. B. Brücken zwischen zwei Kernen oder Kernblasen, sinnvoll ausgewertet werden kann, wodurch sich der Mikrokerntest als ein „Zytom“-Test betrachten lässt (Fenech 2006).

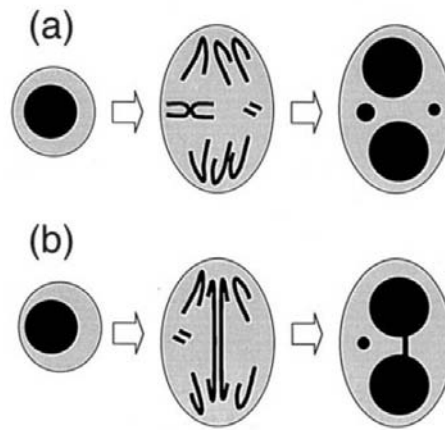


Abbildung 42: Schematische Darstellung der Mikrokernentstehung (a) und der Formierung einer Brücke zwischen zwei Kernen (b). Modifiziert nach (Fenech 2000)

7.2 Material

Chemikalien

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

Zelllinien

Die A_L-Zellen wurden von Prof. Dr. E. Schmid (Universität München) zur Verfügung gestellt. Diese enthalten neben einem Chromosomensatz von 20 Chromosomen des chinesischen Hamsters (CHO-Zellen) zusätzlich das humane Chromosom 11, das u. a. für das Oberflächenprotein CD59 codiert (Waldren et al. 1979). Aufgrund dieser Eigenschaft können diese Zellen z. B. für Mutationsstudien verwendet werden. HaCaT-Zellen, eine immortalisierte Keratinozyten-Zelllinie wurde von Cell Line Service (CLS), Eppelheim, bezogen. Die Zellen wurden ursprünglich von der Peripherie eines humanen (HaCaT) Melanoms isoliert und zu Beginn bei niedrigem Calcium-Spiegel (HaCaT) und leicht erhöhter Temperatur (HaCaT) kultiviert (Boukamp et al. 1988). Ohne tumorigen zu sein sind die Zellen unter diesen Bedingungen spontan immortalisiert. Weiterhin wurden humane dermale Fibroblasten (HDF) verwendet, die von Greiner BioOne (Kremsmünster, Österreich) bezogen wurden.

7.3 Zellkultur

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

AL-Zellen

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

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

Primäre Fibroblasten

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

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

HaCaT-Zellen

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

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

7.4 Methoden

Comet Assay

Alle folgenden Arbeiten wurden zügig und möglichst unter Lichtausschluss bei 4 °C durchgeführt. Direkt im Anschluss an die Expositionen bzw. die Substanzbehandlungen wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst, in Medium aufgenommen und zentrifugiert (5 min, 1.000 U/min). Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet wurde mit 180 µl Low-Melting-Point-Agarose (LMP-Agarose) aufgenommen. Von dieser Zellsuspension wurden 45 µl auf einen Objektträger gegeben, der vorher mit High-Melting-Point-Agarose (HMP-Agarose) beschichtet wurde. Die Schicht mit der Zellsuspension wurde

mit einem Deckglas abgedeckt bis sich die Suspension leicht verfestigte. Von jeder Exposition wurden zwei Objektträger angefertigt. Anschließend wurden die Objektträger für mindestens 1 Stunde bei 4 °C in einer Lyse-Lösung (2,225 M NaCl, 89 mM EDTA, 8,9 mM Tris, 10 % DMSO, 1 % Triton X-100 und 0,89 % Na-Sarcosinat) gelagert. Die Zellen wurden im Elektrophorese-Puffer (0,3 M NaOH, 1mM EDTA) bei 4 °C für 20 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde im gleichen Puffer eine Elektrophorese (25 V, 300 mA) durchgeführt. Nach Waschen in Tris-Puffer (5 Minuten) und Fixierung in Methanol (-20 °C, 5 Minuten) wurden die Präparate getrocknet (37 °C, 10 Minuten) und bis zur Auswertung gelagert.

Nach Codierung der Präparate erfolgte die Färbung mit einer Färbelösung aus GelRed- und Dabco-Lösung (1:3). Zur Herstellung der Dabco-Lösung wurden 250 mg Dabco in 10 ml PBS gelöst und anschließend mit 90 ml Glycerin gemischt. Die Auswertung der Präparate wurde computergestützt (Komet 5) mit dem Mikroskop Labophot-2 (Nikon) bei 200-facher Vergrößerung durchgeführt (Abbildung 43). Es wurden 50 Zellen pro Objektträger ausgewertet und der prozentuale Anteil der DNA im Kometenschweif (Tail DNA %) wurde erfasst (Tice et al. 2000).

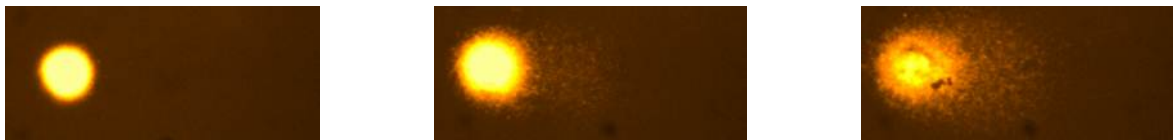


Abbildung 43: Mikroskopische Aufnahme von Zellkernen mit keinem (links), leichtem (Mitte) und hohem (rechts) DNA-Schaden

Mikrokerntest

Nach den Expositionen bzw. Substanzbehandlungen wurden die Zellen, soweit im Einzelfall nicht anders angegeben, für weitere 24 Stunden unter Zugabe von Cytochalasin B (3 µg/ml) postinkubiert. Danach wurden sie in Methanol (-20 °C) fixiert und für mindestens 1 Stunde gelagert. Vor der Auswertung der Zellen, die im Terahertzbereich exponiert wurden, wurde das Methanol abgenommen und die Proben wurden codiert und die Zellen gefärbt. Dies erfolgte durch 90-minütige Inkubation (37 °C) mit einem anti- α -Tubulin-Antikörper (1:50 in PBS) und anschließender Inkubation mit Chromomycin A₃ für 3 Minuten. Vor der Auswertung der Zellen, die für 24 Stunden exponiert wurden, wurde das Methanol abgenommen und die Präparate wurden codiert und mit 5 µl Safe-Green-Lösung (Biotrend Chemikalien GmbH) für 3 Minuten gefärbt. Anschließend wurden die Präparate mit Dabco eingedeckt (Abbildung 44).

Die Auswertung erfolgte mikroskopisch bei 400-facher Vergrößerung (Nikon TE-2000-E). Erfasst wurde in 1.000 Zellen zunächst der Anteil einkerniger, doppelkerniger und mehrkerniger Zellen. Die Anzahl der Mikrokerne wurde ausschließlich in doppelkernigen Zellen (mindestens 1.000 für die Positivkontrollen, 2.000 für Expositionen und Sham-Expositionen) bestimmt. Bei den Fibroblasten erfolgte die Bestimmung der Mikrokernfrequenzen in einkernigen Zellen. Bei den Zellen, die 24 Stunden exponiert wurden, war die Zahl der ausgewerteten Zellen höher, sie lag hier für die Expositionen und Sham-Expositionen bei 12.000 und für die Positivkontrollen in der Regel bei 9.000, mindestens jedoch bei 4.000. Alle Expositionen wurden in voneinander unabhängigen Replikaten mindestens dreimal durchgeführt. Die folgenden Kriterien mussten erfüllt sein, damit eine nukleare Anomalie als Mikrokern gewertet werden konnte:

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

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

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

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

Ursprünglich sollten die Fibroblasten ebenfalls mit Cytochalasin B behandelt werden. Es zeigte sich jedoch, dass eine Behandlung dieser Zellen nicht möglich war, da sich sehr starke morphologische Veränderungen zeigten, wodurch eine Auswertung unmöglich wurde. Es wurde versucht, sowohl die Behandlungszeit als auch die Konzentration von Cytochalasin B so zu modifizieren, dass eine sinnvolle Auswertung möglich wäre. Wurde jedoch die Behandlungszeit oder die Konzentration so weit gesenkt, dass die morphologischen Veränderungen nicht mehr auftraten, so war der Anteil doppelkerniger Zellen so gering, dass eine Auswertung nun aus diesem Grund nicht möglich war. Es wurden somit Alternativverfahren recherchiert. Am besten geeignet schien die Methode der EdU-Inkorporation. Zur Bestimmung der Proliferation wurde hier der Anteil der Zellen bestimmt, die sich während einer vierstündigen Inkubationszeit in der S-Phase befanden. Hierzu wurden die Zellen für 4 Stunden vor der Fixierung mit 10 µM 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) inkubiert. Das an Stelle von Thymidin in die DNA inkorporierte EdU wurde nach der Fixierung mit Hilfe einer Farbreaktion mit einem FITC-gekoppelten Azid sichtbar gemacht (Click-iT EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit, Invitrogen). Die Färbung erfolgte anschließend mit Bisbenzimid.

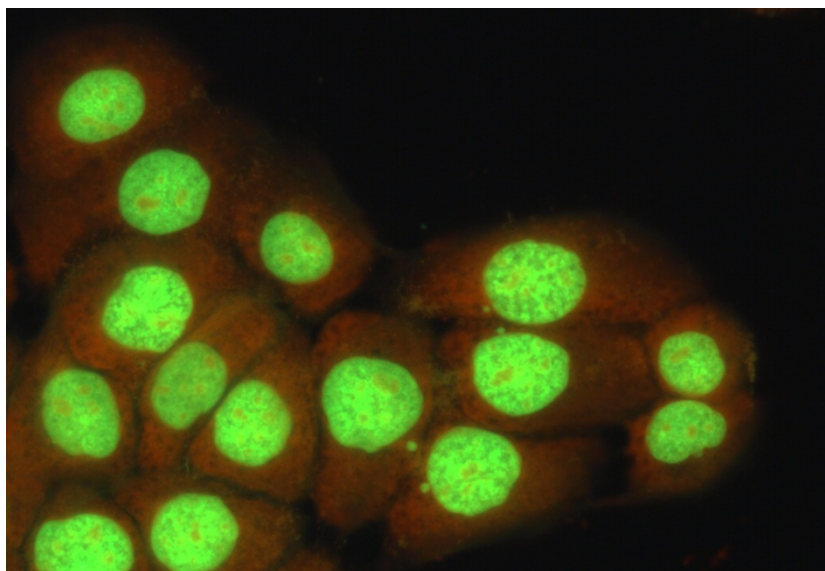


Abbildung 44: Zellen mit deutlich erkennbaren Mikrokernen neben den Hauptkernen

7.5 Ergebnisse

Die Expositionen fanden bei verschiedenen Leistungsdichten für 2 bzw. 8 Stunden und außerdem für einige Expositionsparameter für 24 Stunden statt. Zusätzlich wurden unbehandelte Zellen als Negativkontrolle und mit Chemikalien behandelte Zellen als Positivkontrolle eingesetzt. Da die Kontrollen nicht immer parallel zu spezifischen Expositionen durchgeführt wurden, sind diese Kontrollen als gemittelte historische Kontrollen dargestellt. Die Sham-Expositionen wurden jedoch immer in zeitlichem Zusammenhang zu den Expositionen durchgeführt. Zur Erläuterung: unbehandelte Zellen als Negativkontrolle wurden im Gegensatz zu sham-exponierten Zellen nicht in den Expositionsinkubator eingebracht, aber ansonsten genauso behandelt und transportiert wie alle Zellproben. Bei den Sham-Expositionen wurde der Strahl vor dem Inkubator geblockt.

7.5.1 Comet Assay

Die HaCaT-Zellen zeigten insgesamt keine signifikante Erhöhung des DNA-Schadens als Folge der Exposition. Dagegen zeigten die mit Methylmethansulfonat (MMS) behandelten Zellen einen deutlich erhöhten DNA-Schaden. Bei 0,106 THz war eine leichte Erhöhung bei der langen Expositionszeit zu beobachten, dieser Trend war jedoch nicht signifikant (Abbildung 45 - Abbildung 48). Die hohe Standardabweichung deutete auf einen einzelnen Ausreißer hin. Bei 0,380 THz zeigte sich bei den langen Expositionszeiten ein gegenläufiger Trend, hier war die Sham-Exposition leicht gegenüber den restlichen Expositionen erniedrigt, die eigentliche Exposition wies eine sehr niedrige Schadensrate auf. Bei allen Expositionen bei 2,520 THz zeigte sich wie bei den zweistündigen Expositionen der anderen Frequenzen, dass die Schadenshöhe der Expositionen denen der Kontrollen entsprach. Bei 0,106 THz wurden zusätzlich separate Expositionen durchgeführt, die auch eine Leistungsdichte von 2 mW/cm² beinhalteten (Abbildung 46). Trotz einer relativ hohen Variabilität innerhalb der Proben (insbesondere bei der Sham-Exposition) ist erkennbar, dass die exponierten Zellen keinen höheren DNA-Schaden als die Kontrollen aufwiesen.

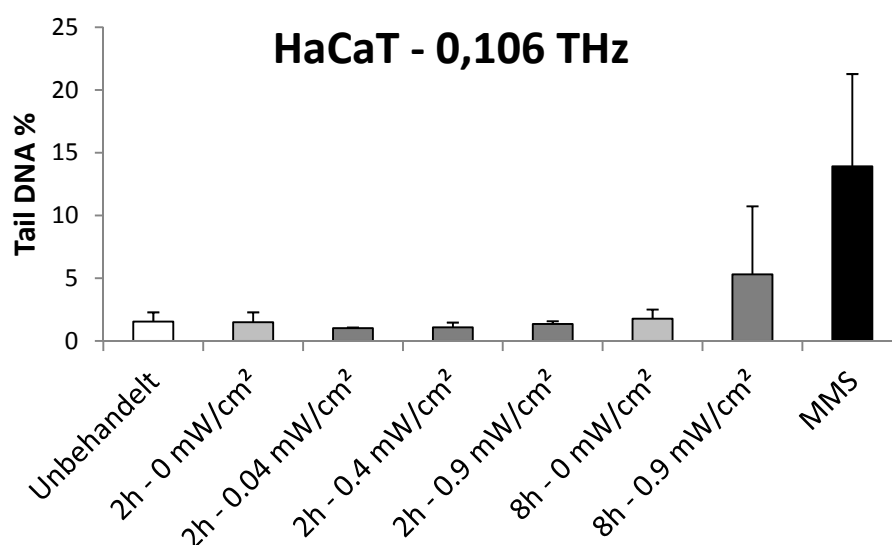


Abbildung 45: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten.

Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

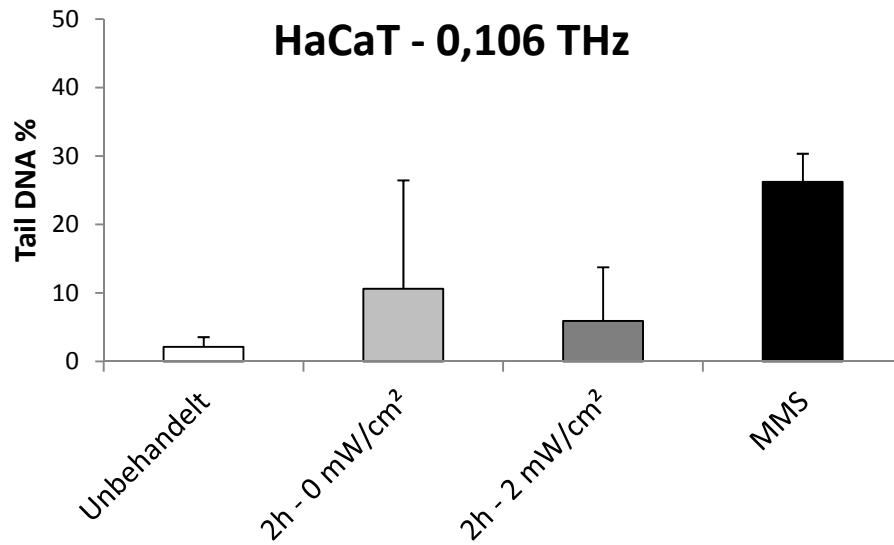


Abbildung 46: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat.

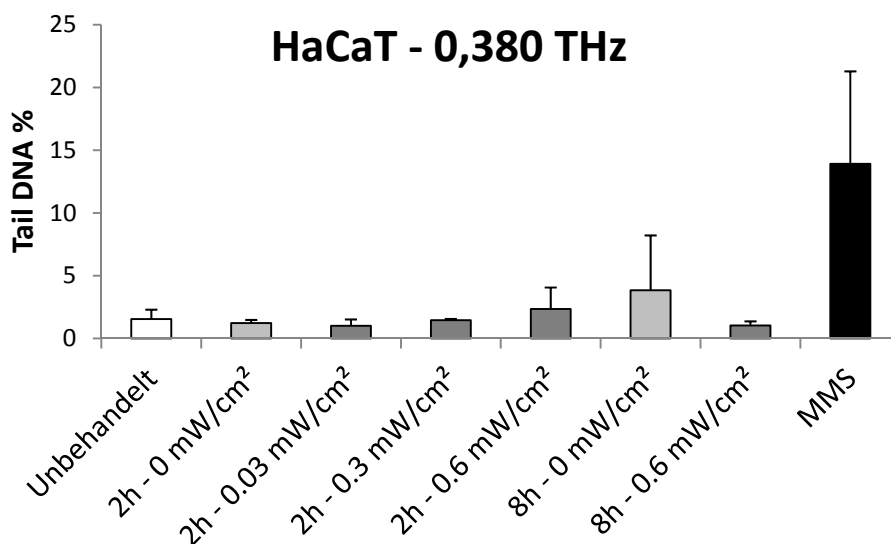


Abbildung 47: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,380 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

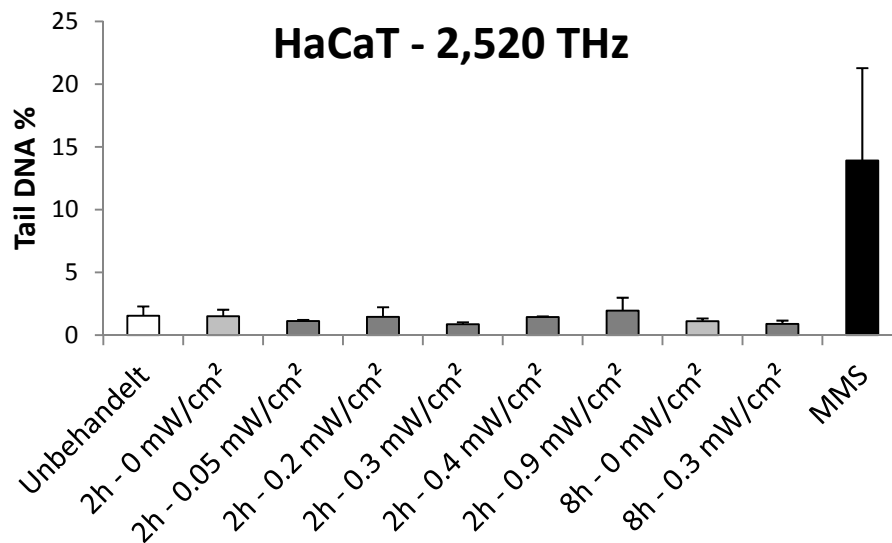


Abbildung 48: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 2,520 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

Auch die Fibroblasten zeigten insgesamt keinen signifikanten DNA-Schaden als Folge der Expositionen (Abbildung 49 - Abbildung 52). Die Behandlung mit MMS verursachte einen klaren Anstieg des DNA-Schadens. Dieser war deutlich höher als in den HaCaT-Zellen. Bei 0,106 THz waren leicht schwankende Ergebnisse zu beobachten. So waren die Werte der Sham-Expositionen und der kurzen Exposition mit 0,4 mW/cm² leicht höher als die übrigen Expositionen. Allerdings waren diese Veränderungen nicht signifikant. Bei 0,380 THz traten diese Schwankungen nicht auf, hier war eine leichte Erhöhung bei 0,4 mW/cm² zu verzeichnen, allerdings wiederum nicht signifikant. Auch bei 2,520 THz war auf den ersten Blick keine Veränderung des DNA-Schadens zu beobachten. Es zeigte sich jedoch, dass der DNA-Schaden der kurzen Exposition mit 0,4 mW/cm² statistisch signifikant höher war als die zugehörige Sham-Exposition. Der Wert der Exposition (2,9 %) war jedoch nur marginal höher als der der Sham-Exposition (1,4 %). Die Signifikanz ist hauptsächlich durch die sehr niedrigen Standardabweichungen dieser Exposition und der Sham-Exposition zu erklären. Der Wert der Exposition mit 0,9 mW/cm² beispielsweise lag deutlich höher (5,9 %), war aber nicht statistisch signifikant erhöht. Um diesen Befund zusätzlich zu überprüfen, wurden alle Comet-Assay-Proben, die bei 2,520 THz exponiert wurden, ein zweites Mal ausgewertet. In dieser Wiederholungsanalyse konnte die leichte, aber statistisch signifikante Erhöhung bei 0,4 mW/cm² bestätigt werden. Es handelt sich somit nicht um einen Auswertefehler. Eine biologische Relevanz ist nicht erkennbar. Bei den Fibroblasten wurden ebenfalls separate Zusatzexpositionen bei 0,106 THz durchgeführt, die auch eine Leistungsdichte von 2 mW/cm² beinhalteten (Abbildung 50). Die exponierten Zellen zeigten keinen höheren DNA-Schaden als die Kontrollen.

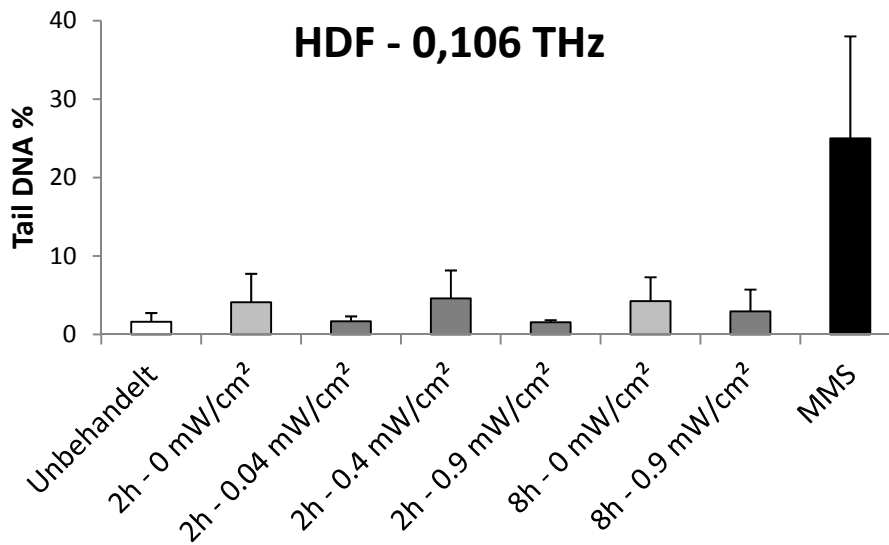


Abbildung 49: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

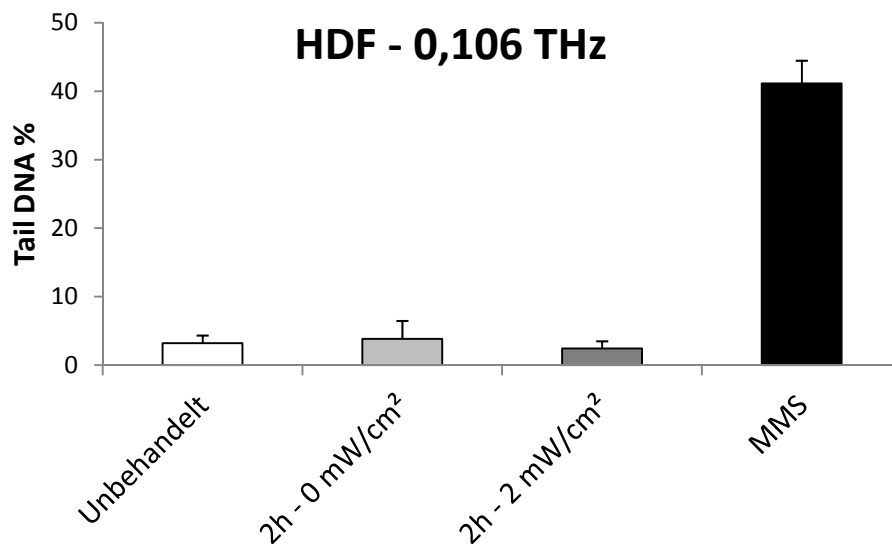


Abbildung 50: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat.

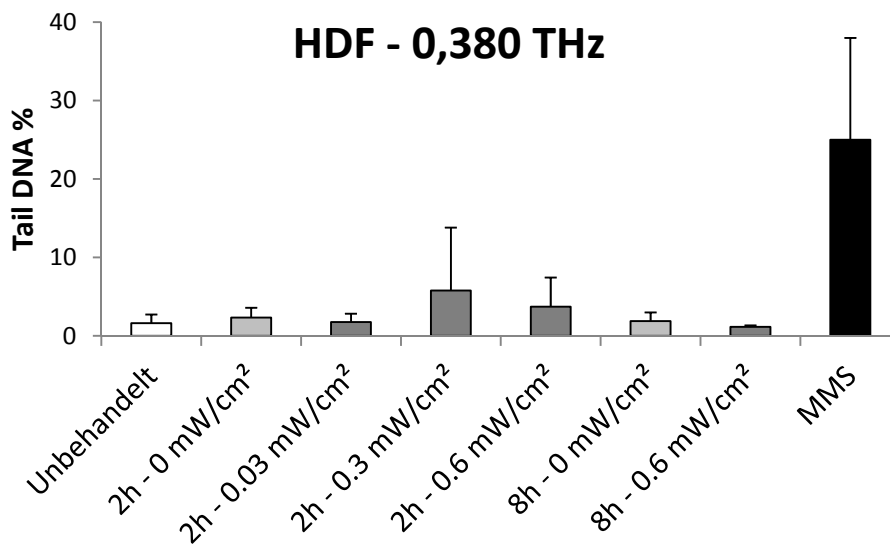


Abbildung 51: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,380 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

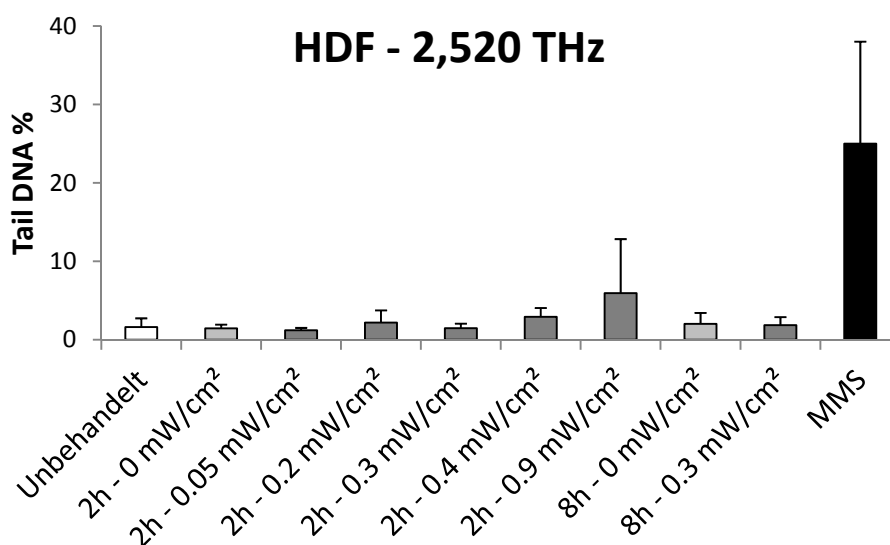


Abbildung 52: DNA-Schaden (Tail DNA %) in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 2,520 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2 x 50 Zellen je Replikat. Der Wert der kurzen Exposition bei 0,4 mW/cm² ist signifikant höher als die zugehörige Sham-Exposition ($p \leq 0,05$). Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

7.5.2 Mikrokerntest

Beim Mikrokerntest in HaCaT-Zellen zeigte sich insgesamt, dass keine Erhöhung der Mikrokernfrequenz auftrat (Abbildung 53 - Abbildung 55). Dies gilt für alle drei untersuchten Frequenzen. Mitomycin C (MMC) als Positivkontrolle zeigte eine sehr deutliche Zunahme der Mikrokerne. Dagegen zeigte Vinblastin (VIN)

keine vergleichbar starke aber doch eine klare Zunahme. Die beim Comet Assay beobachteten Schwankungen der Werte waren beim Mikrokerntest nicht zu beobachten, die Ergebnisse waren insgesamt stabiler.

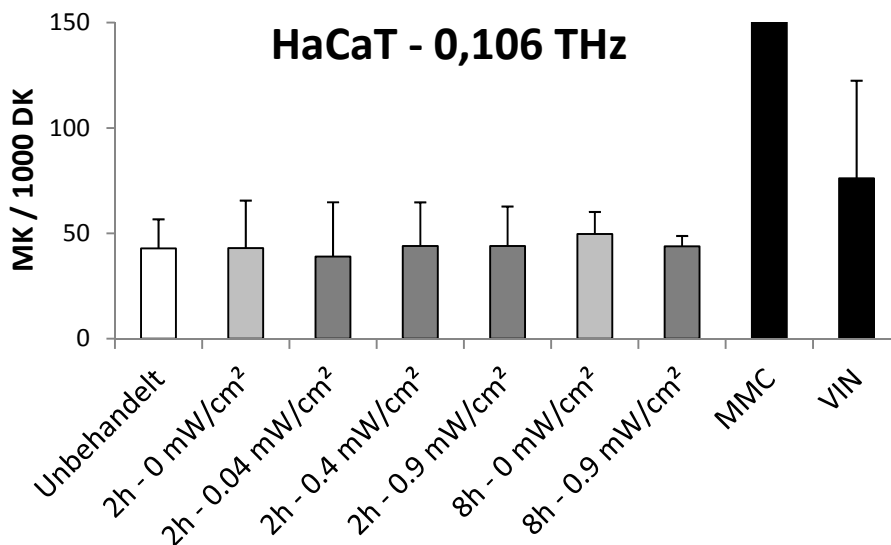


Abbildung 53: Mikrokernelnfrequenz in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 doppelkernige Zellen je Exposition bzw. mindestens 1.000 doppelkernige Zellen je Positivkontrolle. MMC-Behandlung: 495 ± 369 MK / 1.000 DK. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

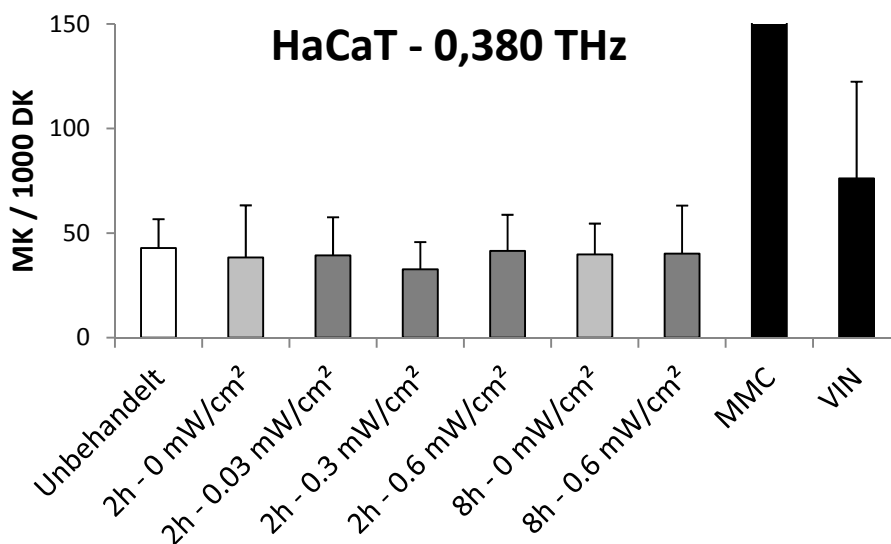


Abbildung 54: Mikrokernelnfrequenz in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,380 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 doppelkernige Zellen je Exposition bzw. mindestens 1.000 doppelkernige Zellen je Positivkontrolle. MMC-Behandlung: 495 ± 369 MK / 1.000 DK. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

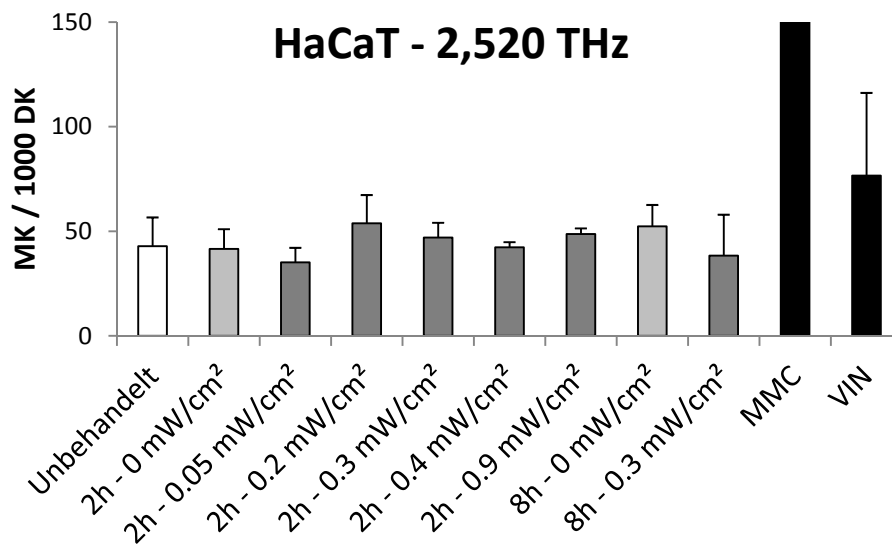


Abbildung 55: Mikrokernfrequenz in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 2,520 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 doppelkernige Zellen je Exposition bzw. mindestens 1.000 doppelkernige Zellen je Positivkontrolle. MMC-Behandlung: 495 ± 369 MK / 1.000 DK. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

Auch die Proliferation der Zellen war bei den Expositionen unverändert im Vergleich zu den jeweiligen Sham-Expositionen bzw. den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 56 - Abbildung 58). Mit MMC behandelte Zellen proliferierten dagegen deutlich schlechter, bei Vinblastin war die Proliferation sogar noch weiter vermindert.

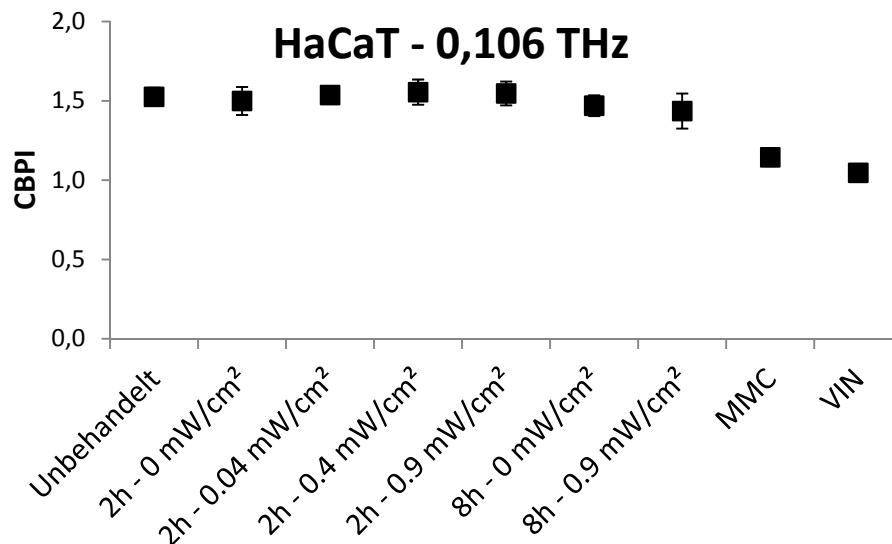


Abbildung 56: Cytochalasin-B-Proliferationsindex CBPI in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Replikat hinsichtlich der Zahl der Kerne pro Zelle. Daraus wurde der Proliferationsindex CBPI ermittelt. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

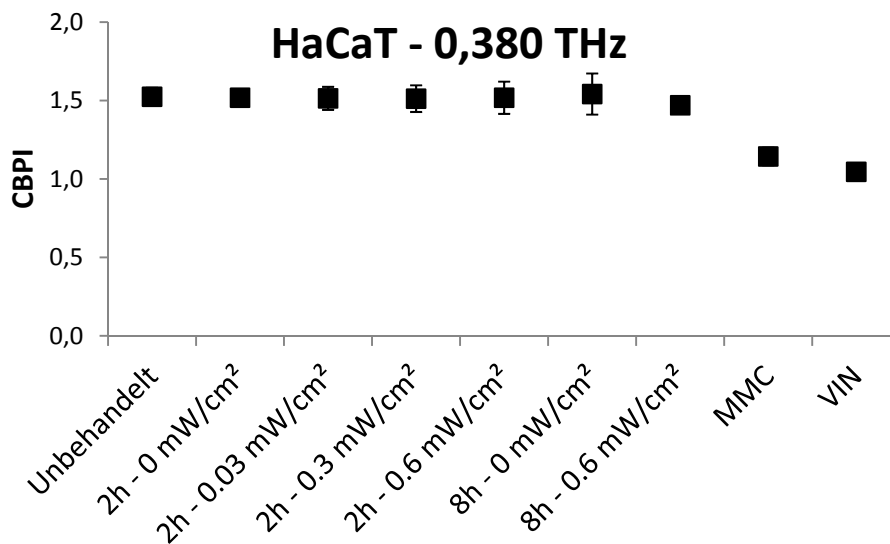


Abbildung 57: Cytochalasin-B-Proliferationsindex CBPI in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,380 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Replikat hinsichtlich der Zahl der Kerne pro Zelle. Daraus wurde der Proliferationsindex CBPI ermittelt. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

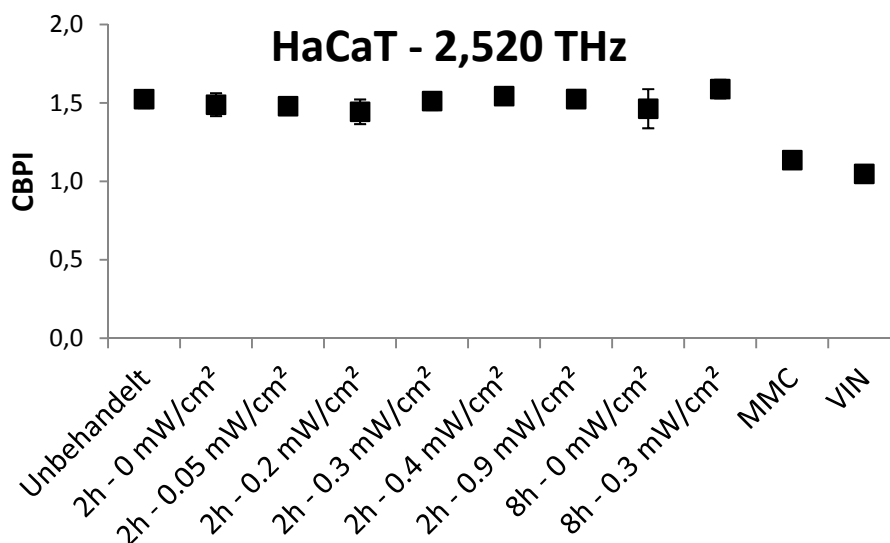


Abbildung 58: Cytochalasin-B-Proliferationsindex CBPI in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 2,520 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Replikat hinsichtlich der Zahl der Kerne pro Zelle. Daraus wurde der Proliferationsindex CBPI ermittelt. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

Bei den Fibroblasten war ebenfalls zu beobachten, dass die Mikrokernfrequenz bei den Expositionen nicht erhöht war im Vergleich zu den Sham-Expositionen und den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 59 -

Abbildung 61). Sowohl MMC als auch VIN führten zu einer erhöhten Mikrokernfrequenz, allerdings zeigte sich hier im Gegensatz zu den HaCaT-Zellen nur eine moderate Erhöhung nach Behandlung mit MMC.

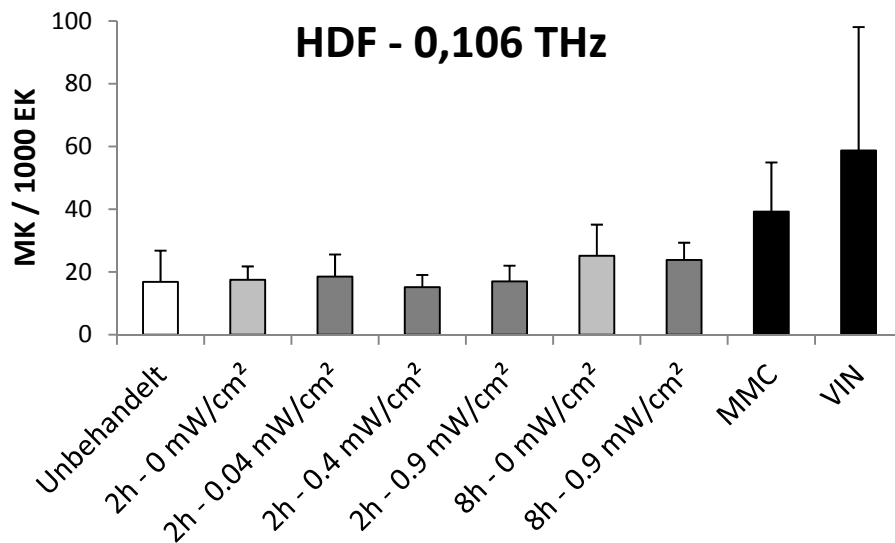


Abbildung 59: Mikrokernelhäufigkeit in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 einkernige Zellen je Exposition bzw. mindestens 1.000 Zellen je Positivkontrolle. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

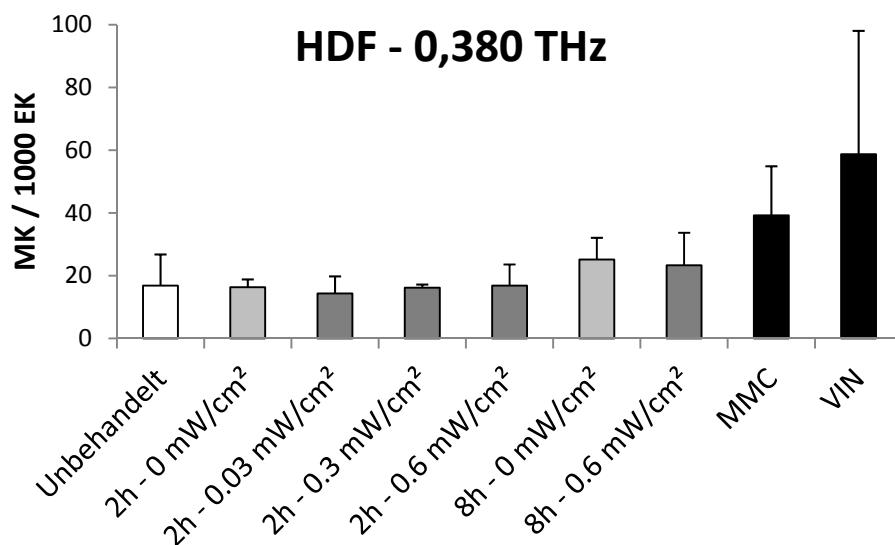


Abbildung 60: Mikrokernelhäufigkeit in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,380 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 einkernige Zellen je Exposition bzw. mindestens 1.000 Zellen je Positivkontrolle. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

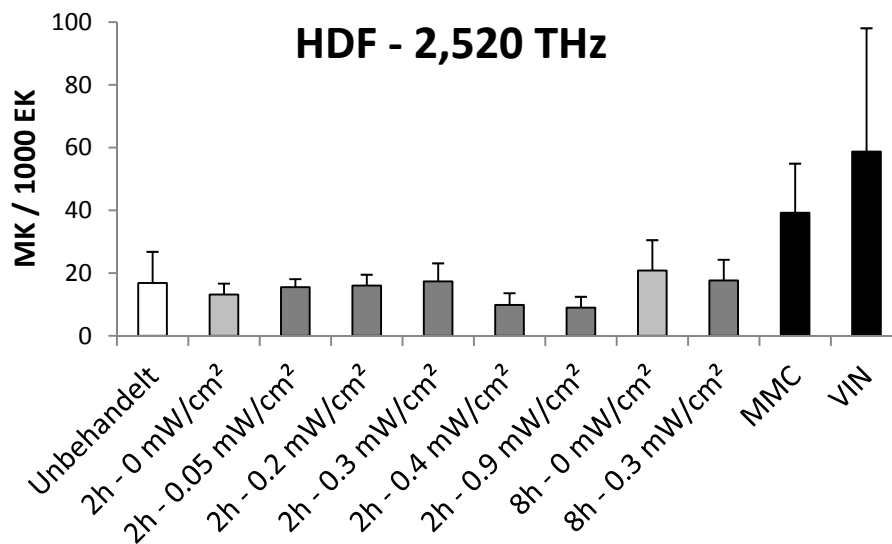


Abbildung 61: Mikrokernelhäufigkeit in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 2,520 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 einkernige Zellen je Exposition bzw. mindestens 1.000 Zellen je Positivkontrolle. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

Der Anteil der EdU-positiven Zellen als Maß für die Proliferation zeigte eine deutlich höhere Variabilität als der Cytochalasin-B-Proliferationsindex bei den HaCaT-Zellen (Abbildung 62 - Abbildung 64). Es war jedoch keine Abhängigkeit vom Expositionsprotokoll zu erkennen. Die Positivkontrollen zeigten keinen deutlichen Effekt, jedoch war bemerkenswerterweise zu erkennen, dass die mit MMC behandelten Proben tendenziell einen höheren Anteil an EdU-positiven Zellen enthielten.

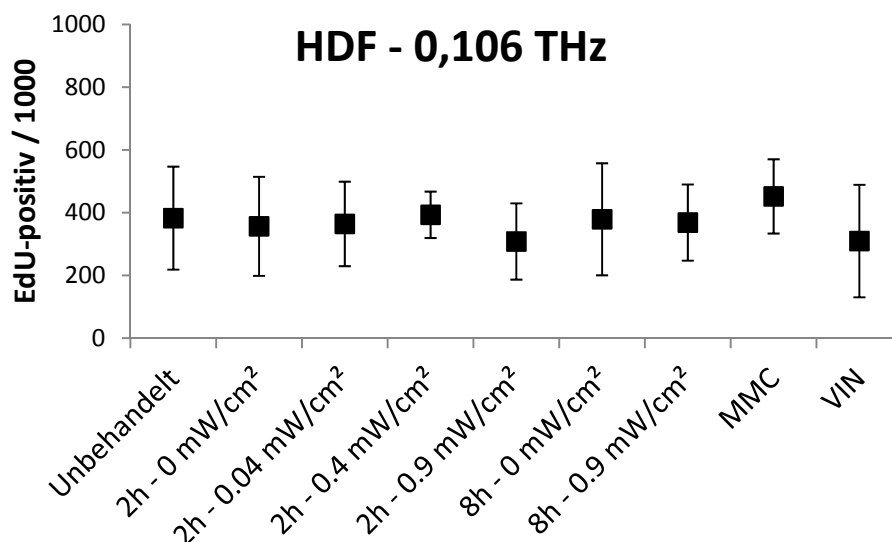


Abbildung 62: Anteil EdU-positiver Zellen pro 1.000 Zellen in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

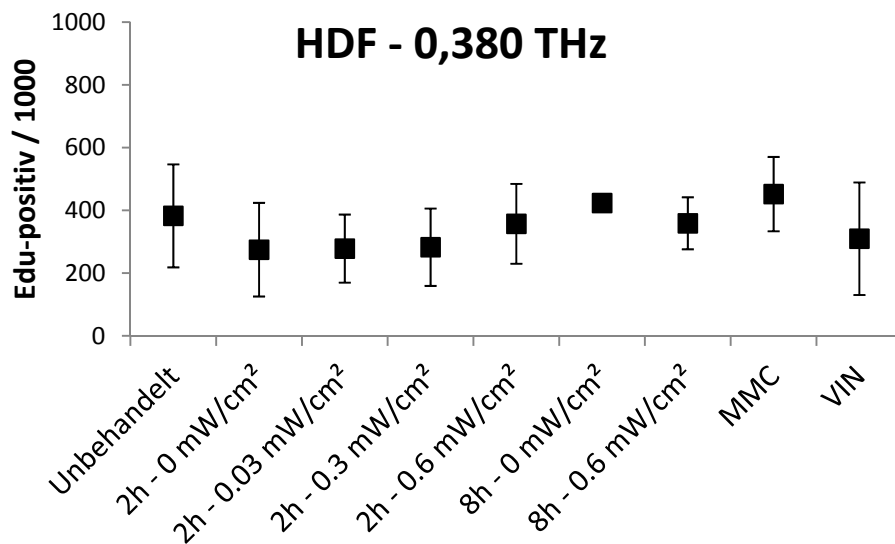


Abbildung 63: Anteil EdU-positiver Zellen pro 1.000 Zellen in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,380 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

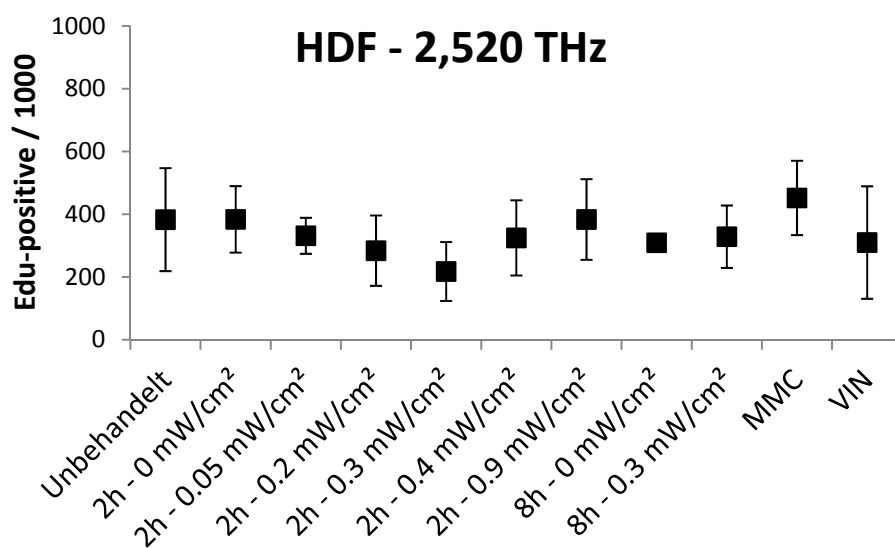


Abbildung 64: Anteil EdU-positiver Zellen pro 1.000 Zellen in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 2,520 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Ausgewertet wurden 2.000 Zellen je Replikat. Die Werte der unbehandelten Negativkontrollen und der Positivkontrollen wurden über den gesamten Zeitraum der Expositionen als historische Kontrollen aus zwölf unabhängigen Proben gemittelt.

7.5.3 Mikrokernstest 24-h-Expositionen

Bei begleitenden Untersuchungen wurde herausgefunden, dass durch Befeldung bei 0,106 THz in A_L-Zellen Mitosestörungen hervorgerufen werden können (Hintzsche et al. 2011). In diesem Zusammenhang erschien schwer zu erklären, warum durch die Befeldung keine Mikrokerninduktion erfolgte. Gängige Vorstellungen von der Bildung von Mikrokernen gehen davon aus, dass diese aus Mitosestörungen mindestens zu einem gewissen Anteil gebildet werden. Eine mögliche Erklärung für diese sich scheinbar widersprechenden Erkenntnisse könnte sein, dass der Mikrokernstest in seiner üblichen Variante nicht sensitiv genug ist, um die relativ geringe Erhöhung an Mitosestörungen zu detektieren. Denkbar wäre hier insbesondere, dass die Befeldung nur auf Zellen in der Mitose wirkt, nicht jedoch auf Zellen in der Interphase. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die bisher verwendeten Zellen (HaCaT und HDF) und die A_L-Zellen erneut befeldet. Um sicherzustellen, dass die Zellen während der Expositionen alle Zellzyklusphasen durchliefen, wurde die Expositionszeit auf 24 h erhöht. Um gegebenenfalls auch geringe Erhöhungen detektieren zu können wurde die Anzahl der ausgewerteten Zellen deutlich erhöht. Es wurde angestrebt, für alle Expositionen und Sham-Expositionen drei unabhängige Replikate mit insgesamt 30.000 Zellen und für alle Kontrollen drei unabhängige Replikate mit insgesamt 12.000 Zellen auszuwerten. Dies wurde in fast allen Fällen erreicht, allerdings konnten sowohl für die HaCaT-Zellen als auch für die HDF-Zellen bei den unbehandelten Proben nur zwei unabhängige Proben durchgeführt werden. Hier wurden jedoch zweimal 9.000 Zellen (HaCaT) bzw. einmal mehr als 4.000 und einmal mehr als 9.000 Zellen (HDF) ausgewertet werden, so dass die Gesamtzahl eingehalten wurde. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen Abbildung 65 bis Abbildung 67 dargestellt. Neben den Mikrokernfrequenzen sind auch die Proliferationsraten abgebildet, im Falle der HaCaT- und A_L-Zellen in Form des Cytochalasin-B-Proliferationsindex, im Falle der HDF-Zellen in Form des Anteils der EdU-positiven Zellen. Die Mikrokernraten der exponierten Zellen waren nicht erhöht im Vergleich zu den Sham-exponierten bzw. unbehandelten Zellen, dagegen zeigten die Positivkontrollen deutlich höhere Mikrokernraten.

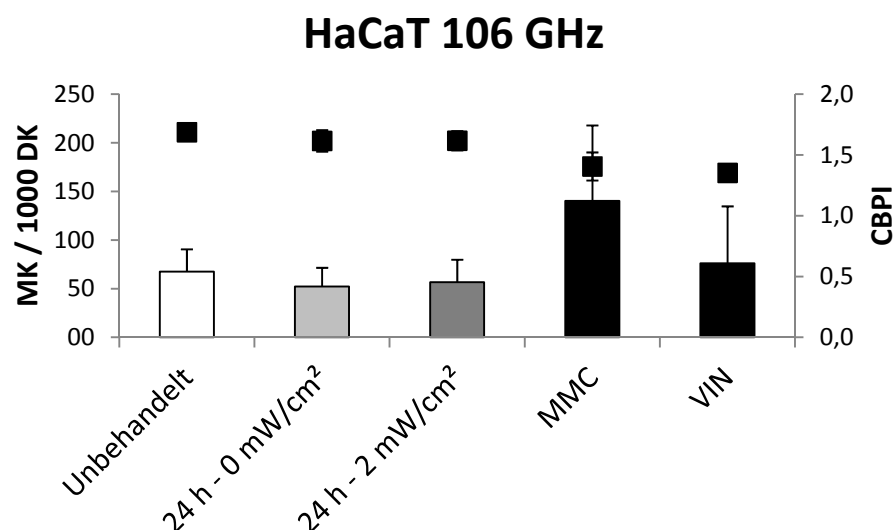


Abbildung 65: Mikrokernfrequenz und Proliferation in HaCaT-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Details im Text.

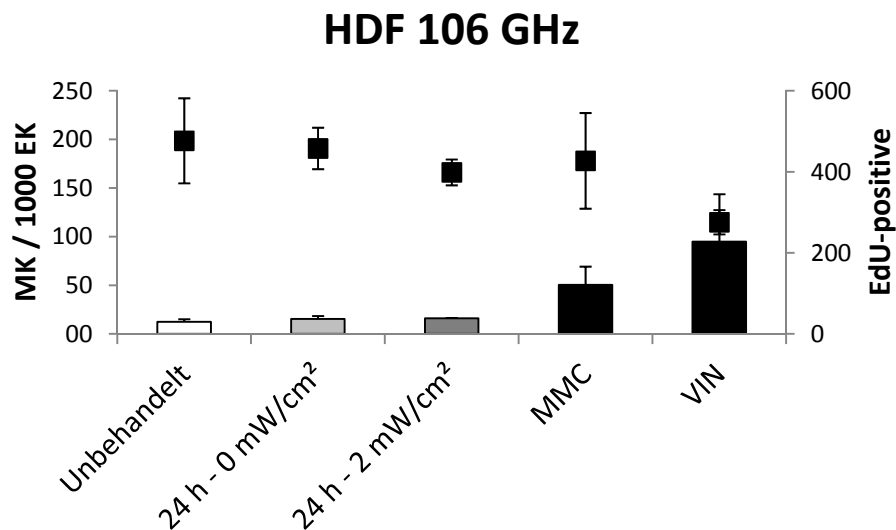


Abbildung 66: Mikrokernfrequenz und Proliferation in HDF-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Details im Text.

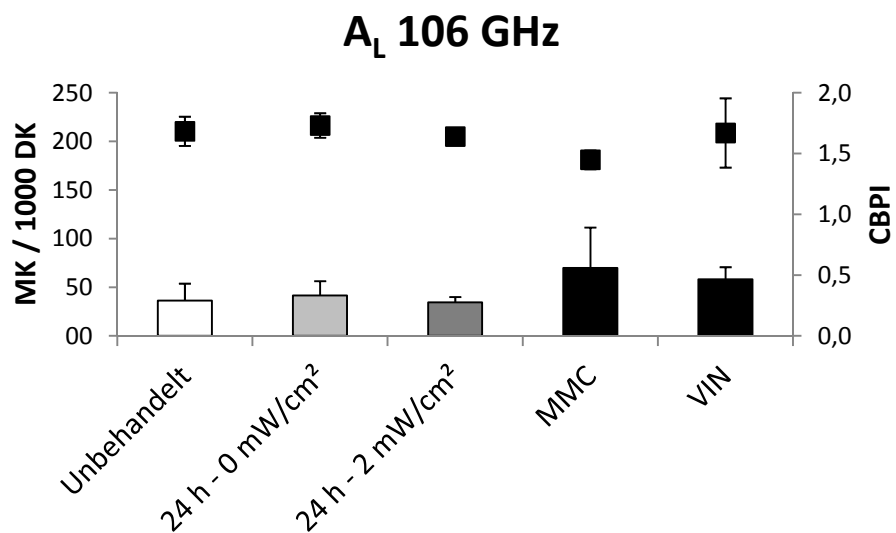


Abbildung 67: Mikrokernfrequenz und Proliferation in A_L-Zellen in Abhängigkeit von verschiedenen Expositionen bei 0,106 THz. Dargestellt sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Replikaten. Details im Text.

7.6 Diskussion

7.6.1 Comet Assay

Im Terahertzbereich wurden drei Frequenzen untersucht, 0,106 THz, 0,380 THz und 2,520 THz. Es wurden mehrere Leistungsdichten verwendet und jeweils für eine kurze (2 Stunden) und eine lange (8 Stunden) Expositionszeit exponiert. Zusätzlich wurden unbehandelte Kontrollen, Sham-Expositionen und Positivkontrollen durchgeführt. Weder die Fibroblasten noch die HaCaT-Zellen zeigten bei den Expositionen erhöhten DNA-Schaden im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen (Abbildung 45 bis Abbildung 52). Dagegen verursachte die Behandlung mit MMS eine deutliche Erhöhung des DNA-Schadens. Letzteres zeigt,

dass der Comet Assay unter diesen Versuchsbedingungen gut geeignet ist, Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA zu detektieren.

Bei hohen Frequenzen über 0,150 THz sind bisher keine Untersuchungen auf Gentoxizität durchgeführt wurden. Als Pilotstudie lassen sich die Ergebnisse bei 0,380 THz und 2,520 THz somit nicht mit Literaturberichten vergleichen. Die Ergebnisse bei 0,106 THz sind jedoch vergleichbar mit einigen Untersuchungen im Rahmen des THz-Bridge-Projektes (Doria et al. 2004, Zeni et al. 2007). Hier wurden Lymphozyten bei 0,130 THz für 20 Minuten bestrahlt. Dabei wurden zum überwiegenden Teil beobachtet, dass kein DNA-Schaden verursacht wurde. Nur unter bestimmten Versuchsbedingungen traten Erhöhungen des Schadens auf (Doria et al. 2004). Dies war jedoch nur in einem von mehreren Versuchsaufbauten der Fall, hier wurde die Probe in einem metallischen Konus exponiert. Die Autoren spekulieren über möglicherweise auftretende Resonanzeffekte in diesem Konus. Allerdings waren die Leistungsdichten mit 2 und 5 mW/cm² auch deutlich höher als in der vorliegenden Arbeit. Insgesamt stimmen die hier präsentierten Ergebnisse mit den bereits gefundenen, negativen Ergebnissen überein, die vereinzelt Befunde mit erhöhtem DNA-Schaden konnten nicht bestätigt werden.

Die verwendeten Zellen wurden auch in anderen Untersuchungen verwendet. So wurden in neueren Studien ebenfalls primäre humane Hautfibroblasten exponiert, bei denen festgestellt wurde, dass die Genexpression bestimmter Proteine unverändert blieb (Gerald J. Wilmink et al. 2010a, G. J. Wilmink et al. 2010). Es wurde eine Verringerung der Vitalität beobachtet, die auf die Erwärmung der Proben zurückgeführt werden konnte. Primäre Keratinozyten, denen die hier verwendeten HaCaT-Zellen ähneln, wurden ebenfalls im Terahertzbereich exponiert. Hier wurde u. a. die Vitalität untersucht, die jedoch unverändert blieb (Bourne et al. 2008, Clothier and Bourne 2003). In allen diesen Studien wurden zwar andere Untersuchungsmethoden verwendet, sie stützen jedoch die hier beschriebenen Erkenntnisse, dass Terahertzstrahlung bei den untersuchten Leistungsdichten im Rahmen der untersuchten Endpunkte und Expositionsbedingungen keine Auswirkungen auf biologische Systeme hat.

7.6.2 Mikrokerntest

Die Expositionen für den Mikrokerntest fanden unter den gleichen Bedingungen wie für den Comet Assay statt, d. h. die Frequenzen waren 0,106 THz, 0,380 THz und 2,520 THz und es wurden verschiedene Leistungsdichten und Expositionszeiten verwendet. Bei den Expositionen traten keine erhöhten Mikrokernfrequenzen im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollen auf, auch die Proliferation war unverändert (Abbildung 53 bis Abbildung 64). Die Behandlungen mit Mitomycin C zeigten einen sehr deutlichen Anstieg. Die mit Vinblastin behandelten Zellen reagierten zwar nicht in diesem starken Maße, zeigten aber auch eine Erhöhung der Mikrokernfrequenz. Diese beiden Substanzen wurden gewählt, weil Mitomycin C eine typisch klastogene, d. h. Chromosomen brechende, und Vinblastin eine typisch aneugene, d. h. Chromosomenfehlverteilungen verursachende, Substanz ist. Somit ist sichergestellt, dass der Mikrokerntest in diesem Versuchsprotokoll in der Lage ist, beide möglichen Arten der Mikrokernentstehung zu detektieren.

Untersuchungen mit dem Mikrokerntest bei Frequenzen über 0,150 THz liegen bisher nicht vor. Somit sind bisher keine Ergebnisse publiziert, mit denen die erhaltenen Daten verglichen werden könnten. Dagegen haben drei Studien den Mikrokerntest bei Lymphozyten, die mit 0,120 bzw. 0,130 THz bestrahlt wurden, eingesetzt (Doria et al. 2004, Scarfi et al. 2003, Zeni et al. 2007). Bei allen diesen Studien war die Anzahl der Mikrokerne bei den Expositionen unverändert gegenüber den Kontrollen. Somit bestätigen diese Untersuchungen die hier vorgelegten Ergebnisse.

7.6.3 Mikrokerntest 24-h-Expositionen

Auch bei Befeldung für 24 h zeigte sich keine Erhöhung der Mikrokernraten. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Kombination des Auftretens von Mitosestörungen und die Abwesenheit einer Mikrokerninduktion durch Zellzyklus-spezifische Effekte zu erklären ist. Für die Analyse wurden hier jeweils mindestens 30.000 Zellen für exponierte und Sham-exponierte Proben ausgewertet, dies ist deutlich mehr als üblicherweise beim Mikrokerntest verwendet werden. Somit war die Sensitivität des Tests für die Detektion kleiner Effekte optimiert.

8 Fazit

Im Rahmen des Projektes wurden HaCaT Keratinozyten und humane primäre Hautfibroblasten mit Dauerstrich-Terahertz-Strahlung bei 106 GHz, 380 GHz und 2,52 THz exponiert. Die Exposition erfolgte für 2 h und 8 h bei Leistungsdichten zwischen 0,03 und 0,9 mW/cm². Oberhalb des Grenzwertes wurden die Zellen bei 106 GHz für 24 h mit 2 mW/cm² exponiert. Bei 380 GHz und 2.52 THz konnten aufgrund der Degradation der THz-Quellen keine Expositionsexperimente oberhalb des Grenzwertes durchgeführt werden. Die Leistungsdichten wurden rückgeführt auf die SI-Einheiten mit bekannter Unsicherheit eingestellt und die Versuchsbedingungen aufgezeichnet. Durch dosimetrische Berechnungen, die messtechnisch verifiziert wurden, konnte gezeigt werden, dass die Erwärmung der Zellen bei allen verwendeten Leistungsdichten vernachlässigbar ist und die Zellen während der Exposition im physiologisch sinnvollen Bereich zwischen 36° C und 37° C waren. Die Auswertung dreier unabhängiger Versuchsreihen zeigt keine relevanten Effekte, weder beim Mikrokerntest noch beim Comet Assay. Um sicherzustellen, dass auch andere Arten von THz-Strahlung, wie sie zunehmend in kommerziellen Anwendungen erzeugt werden, keine gentoxische Wirkung aufweisen, erscheint eine Ausweitung des Parameterraumes für weitere Feldexpositionsexperimente geboten (insbesondere weitere Frequenzen zwischen 24 GHz und 300 GHz, gepulste und modulierte Strahlung und Expositionen oberhalb des Grenzwertes).

Im Comet Assay zu detektierende strukturelle Beschädigungen wie Einzel- und Doppelstrangbrüche, oder alkalilabile Stellen, wären aufgrund der Energie dieser Strahlen auch als direkter Effekt nicht zu erwarten gewesen. Jedoch sind indirekte Effekte über Beeinträchtigung von DNA-interagierenden Enzymen (z.B. Reparatur) oder Resonanzeffekte in der Literatur vorgeschlagen worden, die möglicherweise zu einem solchen Schaden hätten führen können.

Der Mikrokerntest detektiert strukturelle Chromatiden- und Chromosomenschäden (Bruchereignisse) sowie Fehlverteilung ganzer Chromosomen (Aneuploidie). Wiederum war von direkt induzierten Bruchereignissen aufgrund der Energie dieser Strahlen nicht auszugehen, jedoch indirekte Effekte auf DNA-interagierende Proteine denkbar. Diese hätten neben Chromosomenbruch (z.B. im Falle von Reparaturenzymen) auch zu Fehlverteilungen führen können, wenn Proteine des Mitoseapparates betroffen wären; letzteres schien aufgrund von Literaturberichten denkbar.

Es wurde in parallelen Arbeiten zum vorliegenden Projekt allerdings das Auftreten einer geringen Zahl an Mitosestörungen nach Befeldung mit 106 GHz beobachtet. Da mitosestörende Agentien auch zur Mikrokernbildung führen sollten, bleibt unklar, welches Schicksal diese Zellen erlitten. Denkbar ist eine Korrektur im Sinne einer Reparatur, oder ein späteres Absterben solcher Zellen. Somit würden diese Zellen dann auch kein mutagenes Risiko darstellen. Unwahrscheinlich, und aus der Gentoxizität von Substanzen bislang nicht bekannt wäre ein Mechanismus, der diesen Zellen die Vollendung der Mitose trotz dieser beobachteten Störungen ermöglicht, und zu Tochterzellen ohne Mikrokern und dennoch fehlerhaftem Chromatin führen würde. Eine weitere Erforschung dieser Zusammenhänge wäre wünschenswert.

9 Literatur

- Alexandrov, B. S., Gelev, V., Bishop, A. R., Usheva, A. and Rasmussen, K. O. (2010) 'DNA Breathing Dynamics in the Presence of a Terahertz Field', *Phys Lett A*, 374(10), 1214.
- Berns, M. W. and Bewley, W. (1987) 'Inhibition of Nucleic-Acid Synthesis in Cells Exposed to 200 Micrometer Radiation from the Free-Electron Laser', *Photochemistry and Photobiology*, 46(2), 165-167.
- Berns, M. W., Bewley, W., Sun, C. H. and Templin, P. (1990) 'Free-Electron Laser Irradiation at 200 Mu-M Affects DNA-Synthesis in Living Cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(7), 2810-2812.
- Berns, M. W., Bewley, W., Sun, C. H., Templin, P. and Karn, A. (1994) 'Free-Electron Laser Irradiation at 200-Mu-M Inhibits DNA-Synthesis in Living Cells', *Journal of Laser Applications*, 6(3), 165-169.
- Blackman, C. F., Benane, S. G., Weil, C. M. and Ali, J. S. (1975) 'Effects of nonionizing electromagnetic radiation on single-cell biologic systems', *Ann N Y Acad Sci*, 247, 352-66.
- Boller, K. and Schmid, W. (1970) '[Chemical mutagenesis in mammals. The Chinese hamster bone marrow as an in vivo test system. Hematological findings after treatment with trenimon]', *Humangenetik*, 11(1), 35-54.
- Bonassi, S., Fenech, M., Lando, C., Lin, Y. P., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Jia, C., Di Giorgio, M., Ferguson, L. R., Fucic, A., Lima, O. G., Hrelia, P., Krishnaja, A. P., Lee, T. K., Migliore, L., Mikhalevich, L., Mirkova, E., Mosesso, P., Muller, W. U., Odagiri, Y., Scarffi, M. R., Szabova, E., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2001) 'Human MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei', *Environ Mol Mutagen*, 37(1), 31-45.
- Bonassi, S., Znaor, A., Ceppi, M., Lando, C., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Ban, S., Barale, R., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Cebulska-Wasilewska, A., Fabianova, E., Fucic, A., Hagmar, L., Joksic, G., Martelli, A., Migliore, L., Mirkova, E., Scarfi, M. R., Zijno, A., Norppa, H. and Fenech, M. (2007) 'An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans', *Carcinogenesis*, 28(3), 625-31.
- Bondar, N. P., Kovalenko, I. L., Avgustinovich, D. F., Khamoyan, A. G. and Kudryavtseva, N. N. (2008) 'Behavioral effect of terahertz waves in male mice', *Bull Exp Biol Med*, 145(4), 401-5.
- Boukamp, P., Petrussevska, R. T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A. and Fusenig, N. E. (1988) 'Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line', *J Cell Biol*, 106(3), 761-71.

- Bourne, N., Clothier, R. H., D'Arienzo, M. and Harrison, P. (2008) 'The effects of terahertz radiation on human keratinocyte primary cultures and neural cell cultures', *Altern Lab Anim*, 36(6), 667-84.
- Cherkasova, O. P., Fedorov, V. I., Nemova, E. F. and Pogodin, A. S. (2009) 'Influence of terahertz laser radiation on the spectral characteristics and functional properties of albumin', *Optics and Spectroscopy*, 107(4), 534-537.
- Chitanvis, S. M. (2006) 'Can low-power electromagnetic radiation disrupt hydrogen bonds in dsDNA?', *Journal of Polymer Science Part B-Polymer Physics*, 44(18), 2740-2747.
- Clothier, R. H. and Bourne, N. (2003) 'Effects of THz exposure on human primary keratinocyte differentiation and viability', *Journal of Biological Physics*, 29(2-3), 179-185.
- Dalzell, D. R., McQuade, J., Vincelette, R., Ibey, B., Payne, J., Thomas, R., Roach, W. P., Roth, C. L. and Wilmlink, G. J. (2010) *Damage thresholds for terahertz radiation*, translated by Jansen, E. D. and Robert, J. T., SPIE, 75620M.
- Doria, A., Gallerano, G. P., Giovenale, E., Messina, G., Lai, A., Ramundo-Orlando, A., Sposato, V., D'Arienzo, M., Perrotta, A., Romano, M., Sarti, M., Scarfi, M. R., Spassovsky, I. and Zeni, O. (2004) 'THz radiation studies on biological systems at the ENEA FEL facility', *Infrared Physics & Technology*, 45(5-6), 339-347.
- Fedorov, V. I., A.G., K., Shevela, E. Y. and Chernykh, E. R. (2007) *Investigation of possibility of submillimeter laser using as instrument for diagnostics in medicine*, translated by Vladislav, P., Andrey, L. and George, Z., SPIE, 673404.
- Fedorov, V. I., Popova, S. S. and Pisarchik, A. N. (2003) 'Dynamic effects of submillimeter wave radiation on biological objects of various levels of organization', *International Journal of Infrared and Millimeter Waves*, 24(8), 1235-1254.
- Fenech, M. (2000) 'The in vitro micronucleus technique', *Mutat Res*, 455(1-2), 81-95.
- Fenech, M. (2006) 'Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death', *Mutat Res*, 600(1-2), 58-66.
- Fenech, M., Bonassi, S., Turner, J., Lando, C., Ceppi, M., Chang, W. P., Holland, N., Kirsch-Volders, M., Zeiger, E., Bigatti, M. P., Bolognesi, C., Cao, J., De Luca, G., Di Giorgio, M., Ferguson, L. R., Fucic, A., Lima, O. G., Hadjidekova, V. V., Hrelia, P., Jaworska, A., Joksic, G., Krishnaja, A. P., Lee, T. K., Martelli, A., McKay, M. J., Migliore, L., Mirkova, E., Muller, W. U., Odagiri, Y., Orsiere, T., Scarfi, M. R., Silva, M. J., Sofuni, T., Surralles, J., Trenta, G., Vorobtsova, I., Vral, A. and Zijno, A. (2003a) 'Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes. Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project', *Mutat Res*, 534(1-2), 45-64.

- Fenech, M., Chang, W. P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S. and Zeiger, E. (2003b) 'HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures', *Mutat Res*, 534(1-2), 65-75.
- Fenech, M. and Morley, A. A. (1985) 'Measurement of micronuclei in lymphocytes', *Mutat Res*, 147(1-2), 29-36.
- Gallerano, G. P. (2004) *Tera-Hertz radiation in Biological Research, Investigations on Diagnostics and study on potential Genotoxic Effects*, EU.
- Govorun, V. M., Tretiakov, V. E., Tulyakov, N. N., Fleurov, V. B., Demin, A. I., Volkov, A. Y., Batanov, V. A. and Kapitanov, A. B. (1991) 'Far-Infrared Radiation Effect on the Structure and Properties of Proteins', *International Journal of Infrared and Millimeter Waves*, 12(12), 1469-1474.
- Hadjiloucas, S., Chahal, M. S. and Bowen, J. W. (2002) 'Preliminary results on the non-thermal effects of 200-350 GHz radiation on the growth rate of *S-cerevisiae* cells in microcolonies', *Physics in Medicine and Biology*, 47(21), 3831-3839.
- Hintzsche, H., Jastrow, C., Kleine-Ostmann, T., Stopper, H., Schmid, E. and Schrader, T. (2011) 'Terahertz radiation induces spindle disturbances in human-hamster hybrid cells', *Radiat Res*, 175(5), 569-74.
- Homenko, A., Kapilevich, B., Kornstein, R. and Firer, M. A. (2009) 'Effects of 100 GHz radiation on alkaline phosphatase activity and antigen-antibody interaction', *Bioelectromagnetics*, 30(3), 167-75.
- Kimmitt, M. F. (2003) 'Reststrahlen to T-rays - 100 years of terahertz radiation', *Journal of Biological Physics*, 29(2-3), 77-85.
- Kirichuk, V. F., Andronov, E. V., Mamontova, N. V., Tupicin, V. D. and Mayborodin, A. V. (2008a) 'Use of terahertz electromagnetic radiation for correction of blood rheology parameters in patients with unstable angina under conditions of treatment with isoket, an NO donor', *Bull Exp Biol Med*, 146(3), 293-6.
- Kirichuk, V. F., Efimova, N. V. and Andronov, E. V. (2009) 'Effect of high power terahertz irradiation on platelet aggregation and behavioral reactions of albino rats', *Bull Exp Biol Med*, 148(5), 746-9.
- Kirichuk, V. F., Ivanov, A. N., Antipova, O. N., Krenickiy, A. P., Mayborodin, A. V. and Tupikin, V. D. (2008b) 'Sex-specific differences in changes of disturbed functional activity of platelets in albino rats under the effect of terahertz electromagnetic radiation at nitric oxide frequencies', *Bull Exp Biol Med*, 145(1), 75-7.
- Kirichuk, V. F. and Tsymbal, A. A. (2009) 'Effects of terahertz irradiation at nitric oxide frequencies on intensity of lipoperoxidation and antioxidant properties of the blood under stress conditions', *Bull Exp Biol Med*, 148(2), 200-3.

- Koch, M. (2005) 'Terahertz-Technologie: Quo Vadis?', *Photonik*, 4, 2-5.
- Koch, M. (2007) 'Terahertz Technology: A Land to Be Discovered', *OPN*, 3, 21-25.
- Korenstein-Ilan, A., Barbul, A., Hasin, P., Eliran, A., Gover, A. and Korenstein, R. (2008) 'Terahertz radiation increases genomic instability in human lymphocytes', *Radiat Res*, 170(2), 224-34.
- Mi, Z. Y. (1989) 'Biological-Research by Optically Pumped Far Infrared-Lasers', *Infrared Physics*, 29(2-4), 631-636.
- Mileva, K., Georgieva, B. and Radicheva, N. (2003) 'About the biological effects of high and extremely high frequency electromagnetic fields', *Acta Physiol Pharmacol Bulg*, 27(2-3), 89-100.
- Murgia, E., Ballardini, M., Bonassi, S., Rossi, A. M. and Barale, R. (2008) 'Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study', *Mutat Res*, 639(1-2), 27-34.
- Murgia, E., Maggini, V., Barale, R. and Rossi, A. M. (2007) 'Micronuclei, genetic polymorphisms and cardiovascular disease mortality in a nested case-control study in Italy', *Mutat Res*, 621(1-2), 113-8.
- OECD (2010) 'Guideline For The Testing Of Chemicals: 487 In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test', 487,
- Olive, P. L. and Banath, J. P. (2006) 'The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells', *Nat Protoc*, 1(1), 23-9.
- Olshevskaya, J. S., Ratushnyak, A. S., Petrov, A. K., Kozlov, A. S. and Zapara, T. A. (2008) 'Effect of terahertz electromagnetic waves on neurons systems', *Computational Technologies in Electrical and Electronics Engineering, 2008. SIBIRCON 2008. IEEE Region 8 International Conference on*, 210-211.
- Ostling, O. and Johanson, K. J. (1984) 'Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells', *Biochem Biophys Res Commun*, 123(1), 291-8.
- Pakhomov, A. G., Akyel, Y., Pakhomova, O. N., Stuck, B. E. and Murphy, M. R. (1998) 'Current state and implications of research on biological effects of millimeter waves: a review of the literature', *Bioelectromagnetics*, 19(7), 393-413.
- Ramundo-Orlando, A. and Gallerano, G. P. (2009) 'Terahertz Radiation Effects and Biological Applications', *Journal of Infrared Millimeter and Terahertz Waves*, 30(12), 1308-1318.
- Ramundo-Orlando, A., Gallerano, G. P., Stano, P., Doria, A., Giovenale, E., Messina, G., Cappelli, M., D'Arienzo, M. and Spassovsky, I. (2007) 'Permeability changes induced by 130 GHz pulsed radiation on cationic liposomes loaded with carbonic anhydrase', *Bioelectromagnetics*, 28(8), 587-98.

- Reifferscheid, G., Ziemann, C., Fieblinger, D., Dill, F., Gminski, R., Grummt, H. J., Hafner, C., Hollert, H., Kunz, S., Rodrigo, G., Stopper, H. and Selke, D. (2008) 'Measurement of genotoxicity in wastewater samples with the in vitro micronucleus test: results of a round-robin study in the context of standardisation according to ISO', *Mutat Res*, 649(1-2), 15-27.
- Scarfi, M. R., Romano, M., Di Pietro, R., Zeni, O., Doria, A., Gallerano, G. P., Giovenale, E., Messina, G., Lai, A., Campurra, G., Coniglio, D. and D'Arienzo, M. (2003) 'THz exposure of whole blood for the study of biological effects on human lymphocytes', *Journal of Biological Physics*, 29(2-3), 171-177.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. and Schneider, E. L. (1988) 'A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells', *Exp Cell Res*, 175(1), 184-91.
- Smye, S. W., Chamberlain, J. M., Fitzgerald, A. J. and Berry, E. (2001) 'The interaction between Terahertz radiation and biological tissue', *Phys Med Biol*, 46(9), R101-12.
- Stopper, H. and Müller, S. O. (1997) 'Micronuclei as a Biological Endpoint for Genotoxicity: A Minireview', *Toxicology in Vitro*, 11, 8.
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C. and Sasaki, Y. F. (2000) 'Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing', *Environ Mol Mutagen*, 35(3), 206-21.
- Tuengler, P., Keilmann, F. and Genzel, L. (1979) 'Search for Millimeter Microwave Effects on Enzyme or Protein Functions', *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences*, 34(1-2), 60-63.
- von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H. G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. and Madle, S. (2000) 'In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances', *Mutat Res*, 468(2), 137-63.
- Waldren, C., Jones, C. and Puck, T. T. (1979) 'Measurement of mutagenesis in mammalian cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76(3), 1358-62.
- Webb, S. J. and Dodds, D. D. (1968) 'Inhibition of bacterial cell growth by 136 gc microwaves', *Nature*, 218(5139), 374-5.
- Wilmink, G. J., Ibey, B. L., Roth, C. L., Vincelette, R. L., Rivest, B. D., Horn, C. B., Bernhard, J., Roberson, D. and Roach, W. P. (2010a) *Determination of death thresholds and identification of terahertz (THz)-specific gene expression signatures*, translated by Jansen, E. D. and Robert, J. T., SPIE, 75620K.
- Wilmink, G. J., Rivest, B. D., Ibey, B. L., Roth, C. L., Bernhard, J. and Roach, W. P. (2010b) *Quantitative investigation of the bioeffects associated with terahertz radiation*, translated by Jansen, E. D. and Robert, J. T., SPIE, 75620L.

- Wilmink, G. J., Rivest, B. D., Roth, C. C., Ibey, B. L., Payne, J. A., Cundin, L. X., Grundt, J. E., Peralta, X., Mixon, D. G. and Roach, W. P. (2010) 'In vitro investigation of the biological effects associated with human dermal fibroblasts exposed to 2.52 THz radiation', *Lasers Surg Med*.
- Zeni, O., Gallerano, G. P., Perrotta, A., Romano, M., Sannino, A., Sarti, M., D'Arienzo, M., Doria, A., Giovenale, E., Lai, A., Messina, G. and Scarfi, M. R. (2007) 'Cytogenetic observations in human peripheral blood leukocytes following in vitro exposure to THz radiation: a pilot study', *Health Phys*, 92(4), 349-57.
- Zhifu, D., Canbang, Z., Shengyu, W. and Lingyun, Z. (2007) *Analysis on interaction effect of terahertz radiation with living biology system*, translated by Qingming, L., Lihong, V. W., Valery, V. T. and Min, G., SPIE, 65340X.

| Verantwortung für Mensch und Umwelt |

Kontakt:

Bundesamt für Strahlenschutz

Postfach 10 01 49

38201 Salzgitter

Telefon: + 49 30 18333 - 0

Telefax: + 49 30 18333 - 1885

Internet: www.bfs.de

E-Mail: ePost@bfs.de

Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.



Bundesamt für Strahlenschutz