

Aus der Klinik für Chirurgie
(Direktor: Prof. Dr. Hans-Peter Bruch)
der Universität zu Lübeck

***In-vitro* Untersuchungen zur Wirkung
schwebender Magnetwellen auf das
Wachstumsverhalten von HeLa-Zellen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von
Timo Borberg
aus Hannover

Lübeck, 2008

1. Berichtstatter/Berichtstatterin:

2. Berichtstatter/Berichtstatterin:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1. Schwebende Magnetwellen
- 1.2. Historie der Tumorbehandlung
- 1.3. Tumorbestrahlung und deren Risiken
- 1.4. HeLa - Zellen
- 1.5. Zellwachstum
- 1.6. Apoptose
- 1.7. Zielsetzung

2. Material und Methoden

2.1. Zellen

- 2.1.1. HeLa-Zellen
- 2.1.2. Kultivierung der Zellen
- 2.1.3. Zellzahlbestimmung

2.2. Magnetwellen

- 2.2.1. Schwebende Magnetwellen
- 2.2.2. Geräte zur Erzeugung von schwebenden Magnetwellen

2.3. Versuchsaufbau

- 2.3.1. Vorbereitung der Materialien
- 2.3.2. Zellwachstumsbestimmung (Alamar + Photometer)
- 2.3.3. Zellproliferationsbestimmung (Ki-67-Marker)
- 2.3.4. Apoptosebestimmung (Annexin V)

3. Ergebnisse

3.1. Zellwachstumsbestimmungen

3.2. Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose- und Proliferationsrate

3.2.1. Bestimmung der Proliferationsrate

3.2.2. Bestimmung der Apoptoserate

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Methode

- 4.1.1. In-vitro Modell
- 4.1.2. Durchflusszytometrie, Apoptose und Proliferation
- 4.1.3. Wachstumsbestimmung mit Alamar Blue
- 4.1.4. Bestrahlung

4.2. Diskussion der Ergebnisse

5. Zusammenfassung

6. Literaturnachweis

7. Abkürzungen

8. Anhang

- 8.1. Abbildungsverzeichnis
- 8.2. Tabellenverzeichnis
- 8.3. Materialien
- 8.4. Geräte
 - 8.4.1. Software
- 8.5. Statistik
 - 8.5.1. Frequenz 42,7Hz mit der Stromstärke 85mA
 - 8.5.2. Frequenz 42,7Hz mit der Stromstärke 250mA
 - 8.5.3. Frequenz 51Hz mit der Stromstärke 85mA
 - 8.5.4. Frequenz 51Hz mit der Stromstärke 250mA
 - 8.5.5. Frequenz 60,3 Hz mit der Stromstärke 85 mA
 - 8.5.6. Frequenz 60,3 Hz mit der Stromstärke 250mA
 - 8.5.7. Frequenz 60,3 Hz mit der Stromstärke 250mA, ohne Hochspannung (50V)

9. Danksagung

10. Lebenslauf

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

(Prof. W. Heisenberg, Physiker und Philosoph, Nobelpreisträger der Physik)

1. Einleitung

Die Magnetfeldtherapie wird seit der Antike als Heilverfahren angewandt. Heutzutage werden elektrisch erzeugte Magnetfelder vor allem in der Rheumatologie, Chirurgie und Schmerztherapie therapeutisch eingesetzt. Ebenso führte Prof. Dr. Riethmüller an der Universität zu Tübingen eine Studie mit Magnetfeldern an Patienten mit psychosomatischen Erkrankungen durch, bei der 87% der Probanden danach einen deutlichen Rückgang der Beschwerden angaben. Zudem haben 70% der Probanden, die zusätzlich unter Schmerzen litten, auf diese Therapie angesprochen. In den neunziger Jahren erbrachte der Neurologe und Psychiater Prof. George (Medical University of South Carolina, USA) erste klinische Erkenntnisse mit der Methode der transkraniellen Magnetstimulation (TMS) zur Therapie von Depressionen. An Patienten, die aufgrund ihres Diabetes mellitus an peripherer Polyneuropathie litten, führte Dr. Weintraub (New York Medical College, USA) eine Studie mit magnetischen- und Placeboeinlegesohlen durch. Nach einem Monat verspürten die Patienten an dem Fuß mit der magnetischen Einlegesohle eine deutliche Besserung. Der Effekt von Magnetsohlen ist auch in einer Studie mit Patienten, die unter unspezifischen Fußschmerzen am Arbeitsplatz leiden, von Winemiller et al. (Mayo Clinic College of Medicine, USA) erforscht worden. Bei Patienten, die aufgrund einer Poliomyelitis an chronischen Gelenkschmerzen leiden, wurden wechsellipolare Magnetfolien eingesetzt. Diese ergaben bei Dreiviertel der Probanden eine deutliche Verbesserung ihrer Schmerzen. Ebenso wirkt der Einfluss von Magnetfeldern auf Schmerzpatienten mit rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis des Knies (Wolsko et al., Harvard, Boston, USA und Segal et al., Vanderbilt, Nashville, USA). In einer Studie mit Patienten, die unter chronischen Knieschmerzen leiden, wurde ein signifikanter Einfluss auf die Schmerzreduktion und die Funktionsfähigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe erreicht (Hinman et al., Galveston, Texas, USA). Eine signifikante Schmerzreduktion wurde mittels Magnetfeldtherapie bei Patienten mit chronischen pelvinen Schmerzen erreicht (Brown et al., Tennessee, USA). Seit einigen Jahren wird die Magnettherapie in ihrer Wirkung auf die Heilung von diabetischen Ulzera unter anderem an den Füßen untersucht (Szor et al., Toledo, Ohio, USA). In einer Pilotstudie zur Wirkung eines statischen Magnetfeldes auf chronische Beinulzerationen wurde ein signifikanter Heilungseffekt beschrieben (Eccles et al., London, England). Es gibt allerdings noch keine experimentellen Studien, die die Auswirkungen von

Magnetwellen auf Zellen beschreiben. Der Ansatz experimentelle Daten mit Zellkulturen in Petrischalen zu erarbeiten, ist bisher nicht vorhanden. Diese Studie beschäftigt sich mit dem Problem, die Auswirkungen von Magnetfeldeinwirkungen auf humane Zellen zu erforschen und ein Modell zu installieren, um wachstumshemmende Frequenzen zu detektieren. In Studien mit Bakterienkulturen wurde deutlich, dass es sich problematischer gestaltet, wachstumshemmende, als wachstumsstimulierende Frequenzen zu finden. Ebenso ist es schwierig, ideale Frequenzen in einem idealen Magnetfeld zu installieren.

1.1. Schwebende Magnetwellen

Schwebende Wellen entstehen durch Überlagerung von Sinusschwingungen unterschiedlicher Frequenz. Als Magnetwellen werden sie über eine Spule an die Atmosphäre abgegeben. Durch Anlegen einer statischen Hochspannung an einer isolierten Platte nahe der Spule erhält das schwebende Magnetfeld zusätzlich einen „elektrischen Vektor“. Die Intention, die Auswirkungen von solchen niederfrequenten schwebenden Magnetwellen auf eine Tumorzelllinie zu untersuchen, kam aus der Landwirtschaft. Dort können schwebende Magnetwellen eingesetzt werden, um Mikroorganismen in organischem Dünger zum Wachstum anzuregen. Die Firma Graviton (Berlin, Deutschland) forscht aber auch an Pilzhemmversuchen mit schwebenden Magnetwellen (J. Axmann, Fa. Graviton, Berlin, 2003). Man fand Frequenzbereiche, die die Pilzkulturen im Wachstum deutlich hemmten. Dieses Erkenntnis wird u.a. zur Reinigung von Rohrsystemen, z.B. in Wasserleitungen in Schwimmbädern, eingesetzt. Man fährt mit Magnetspulen die Kunststoff – Rohrleitungen von außen ab und kann sie auf diese Weise von Bakterien und Pilzen freihalten.

1.2. Historie der Tumorbehandlung

In Deutschland erkranken ca. 300 000 Menschen jährlich an Krebs (Rolf Sauer, 2003), jeder dritte bis vierte Einwohner der BRD muss mit der Erkrankung an einem malignen Tumor rechnen. In unserer Gesellschaft ist der Krebs die zweithäufigste Todesursache in

allen Altersklassen. Seit Anfang des 20. Jahrhunderts nimmt die Häufigkeit überproportional zum Bevölkerungswachstum und der gestiegenen Lebenserwartung zu. Der Terminus „Krebs“ (Karzinom) geht auf Hippokrates (5. Jahrhundert v. Chr.) zurück. Durch ihn wurden destruktive, oberflächlich wachsende und die benachbarten Organe infiltrierende Tumore beschrieben. Auch ein sich lokal entwickelndes Brustdrüsenkarzinom hat bei Hippokrates Erwähnung gefunden. Die Krebserkrankung ist eine der ältesten Erkrankungen der Menschheitsgeschichte. Im „Papyrus Ebers“, einem Schriftstück der ägyptischen Medizin (1500 v. Chr.), wurde schon darüber berichtet. Die damalige Therapie mit Arsen wurde bis ins 19. Jahrhundert angewandt.

In der Medizin gibt es grundsätzlich mehrere Möglichkeiten, Tumoren zu bestrahlen. Der erste therapeutische Einsatz von Röntgenstrahlen fand im Jahr 1896 statt, nachdem sie 1895 von W.-C. Röntgen entdeckt wurden. Die ersten, die diese Therapiemöglichkeit anwendeten, waren unter anderem E.H. Grubbé in der Brustkrebstherapie, E. Voigt in der Therapie des Nasopharynxkarzinoms und L. Freund auf dem Gebiet des Tierzellnävus. In diesem Jahr wurde auch bereits von O. Leppin über die erste Radiodermatitis (seine eigene Hand) berichtet. 1903 nehmen S.W. Goldberg und E.S. London die erste erfolgreiche Brachytherapie in St. Petersburg vor. Die strahlenbiologische Grundregel („Die Strahlensensibilität einer Zelle ist während der Teilungsphase am größten.“) wurde 1906 von J. Bergonié und L. Tribondeau aufgestellt. 1907 berichtet Krönig über die Strahlentherapie des Gebärmutterkrebses. Der erste Hochfrequenz – Linearbeschleuniger wurde 1930 von R. Wideroe gebaut (Rolf Sauer,2003).

1.3. Tumorbestrahlung und deren Risiken

Heutzutage gibt es verschiedene Verfahren, um Tumore elektromagnetisch zu bestrahlen. Zu diesen gehören die Röntgentherapie, die Hochenergie – Strahlentherapie (Hochvolttherapie), Brachytherapie und Hyperthermie.

Es bestehen einige Behandlungsrisiken, Nebenwirkungen und etwaige Komplikationen in der Strahlentherapie. Beispielsweise strahleninduzierte Neoplasien. Bestrahlungsfolgen sind heute seltener geworden, lassen sich aber nicht vollständig ausschließen. Es können chronische Nebenwirkungen an langsam reagierenden Geweben (definitionsgemäß ab dem 90. Tag) auftreten, die manchmal asymptomatisch bleiben, aber auch massive Beeinträchtigungen des Patienten nach sich ziehen können. Komplikationen der Behandlung oder der aus ihr resultierenden Nebenwirkungen sind Blutungen (aus dem zerfallenen Tumor), „Stressulkus“ während der Behandlung, Herzinfarkt und Thrombose (Rolf Sauer,2003).

1.4. HeLa - Zellen

Bei HeLa-Zellen handelt es sich um humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Es sind die ersten menschlichen Zellen, von denen eine permanente Zellkultur etabliert werden konnte. Kultiviert wurden sie 1951 von einer Patientin, die an einem humanen Papillomavirus 18 positiven (HPV 18)Zervixkarzinom erkrankt war. Seither nutzt die Forschung die hohe Teilungsrate und die gute Kultivierbarkeit der HeLa-Zellen. Aus diesen Gründen wurden HeLa-Zellen auch für die *in vitro* Untersuchung des Einflusses von schwebenden Magnetwellen auf humane Tumorzellen ausgewählt.

1.5. Zellwachstum

Die Proliferation aller Zellen muss im Sinne des Gesamtorganismus kontrolliert werden. Diese Vermehrungskontrolle wird u.a. über eine chemische Stimulation oder Kontakt-(Wachstums-) Inhibition von anderen (meistens benachbarten) Zellen sichergestellt. Durch die chemischen Stimulantien werden beispielsweise intrazelluläre „Kontrollmechanismen“ inhibiert und so eine Fortsetzung des Zellzyklus bewirkt. Ein Beispiel für eine fehlende „Zellwachstumskontrolle“ findet sich beim Retinoblastom, einem Augentumor, bei dem das Rb-Protein defekt ist oder fehlt.

Wachstumsfaktoren, die die Zellproliferation vorantreiben, gehören zu den Signalen, die entweder von fremden Zellen (parakriner Weg = Zielzelle und Bildungszelle verschieden) oder der Zielzelle (autokriner Weg = Zielzelle und Bildungszelle identisch) ausgesendet werden (U.–N. Riede und H.–E. Schaefer, Allgemeine und spezielle Pathologie, Thieme). Die Wachstumsfaktoren aktivieren die G₁- Cyclin – Cdk – Komplexe und phosphorylieren das Rb- Protein. Dieser Vorgang bewirkt eine Konformationsänderung des Rb – Proteins, die dazu führt, dass Genregulationsproteine freigesetzt und Zellproliferationsstimulierende Gene aktiviert werden. Es werden meistens mehrere Wachstumsfaktoren in einer bestimmten Kombination benötigt, um sich unter Kulturbedingungen zu vermehren (B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Essential Cell Biology, 1998).

1.6. Apoptose

Apoptose wird als programmierter, selektiver Zelltod bezeichnet und spielt bei der Organisation vielzelliger Organismen eine bedeutende Rolle. Der Zelltod wird intrinsisch oder extrinsisch ausgelöst. Der programmierte Zelltod wird durch physiologische Faktoren hervorgerufen oder von den Umgebungszellen angeregt. Die Apoptose ist die Grundlage einer geregelten Embryogenese (überflüssige Organanlagen sterben ab), der Funktion des Immunsystems (natürliche Killerzellen und zytotoxische T – Lymphozyten als Auslöser) und Gewebemöostase (Schutz vor Neoplasien). Es gibt folgende Merkmale, die den programmierten Zelltod charakterisieren: Hauptmerkmale sind das „Schrumpfen“ des Zytoplasmas, die Anlagerung des Chromatins an die Zellmembran und die Veränderung der Phospholipidverteilung der Doppellipidschicht der Zellmembran. Als effektives Kernstück (U.–N. Riede und H.–E. Schaefer, Allgemeine und spezielle Pathologie, 1999) der Apoptose wird ein kaskadenartig aktivierbares System von „Zelltod – Proteasen“ (= Caspasen, cysteine – aspartate – proteine cleaving enzyme) bezeichnet. Diese Proteasen attackieren das Zytoskelett, die Kernproteine und die nukleären Regulations- und Schutzproteine. Als letzter Schritt nach Ausschaltung des DNS – Reparaturmechanismus

fragmentieren die Proteasen über eine Endonukleaseaktivierung die DNS. Diese Aktivierung einer spezifischen Endonuklease ist ein zentrales Ereignis bei der Apoptose (G. Löffler, Löffler und Petrides, 1998). Der Ablauf der Apoptose wird von anderen Zellen reguliert, die Signale aussenden, welche entweder die Apoptose begünstigen oder inhibieren (B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter, Essential Cell Biology, 1998).

1.7. Zielsetzung

Das Ziel dieser Studie „*In-vitro* Untersuchungen zur Wirkung schwebender Magnetwellen auf das Wachstumsverhalten von HeLa-Zellen“ besteht darin, zu prüfen, ob verschiedene Frequenzfenster, die bei Bakterienkulturen zu einer Wachstumsreduktion geführt haben, auch bei der HeLa-Zelllinie wirken. Mit dem gleichen Versuchsaufbau wurde parallel auch eine Studie mit Fibroblastenkulturen durchgeführt, um zu erforschen, ob schwebende Magnetwellen einen Einfluß auf das Wachstum dieser Zellen haben. Bestärkt wird dieses Vorhaben durch die Tatsache, dass Magnetwellen schon vielfach und erfolgreich in der Medizin als therapeutisches Mittel eingesetzt werden (Jörg Zittlau, Ärztezeitung, 05.02.01). Die Studie mit HeLa-Zellen durchzuführen hat den Grund, diese Methodik zu testen, ob es zur Inhibierung des Wachstums von diesen Tumorzellen geeignet ist.

Ziele:

- Nachweis des Einflusses von schwebenden Magnetwellen auf das Wachstum der HeLa-Zellen in Petrischalen durch die Gewinnung experimenteller Daten
- Erforschung eines spezifischen Frequenzbereiches mit inhibierendem Einfluss auf das Wachstum der HeLa-Zellen

Ausblick: Es soll erstmals ein Modell installiert werden mit dem hemmende Frequenzen auf das Wachstum von humanen Tumorzellen erforscht werden können, da es hierzu bisher keine experimentellen Daten gibt. Das Fernziel dieser Grundlagenstudie ist die Möglichkeit der Anwendung in der Tumorthherapie, mit dem Hintergrund, eine möglichst nebenwirkungsarme Therapieform zu entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1 Zellen

2.1.1. HeLa-Zellen

Die für diese Arbeit verwendete, adhärent wachsende Zelllinie HeLa S3 wurde von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig) bezogen.

2.1.2. Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Zelllinie HeLa S3 wurde in Gewebekulturflaschen der Fa. Nunc (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) durchgeführt. Die Flaschengrösse (genauer die Fläche, auf der adhärente Zellen wachsen können) variiert mit der zu beimpfenden Zellzahl (siehe Tab. 1). Grundsätzlich verwendet man kleine Flaschen für Stammkulturen (permanent wachsende Zellen) und große Flaschen für Vermehrungskulturen (Experimente). Alle Arbeiten erfolgen unter einer Klasse II Werkbank unter sterilen Bedingungen.

Kleine Flaschen (cm ²)	5ml Medium	1* 10 ⁶ Zellen
Mittlere Flaschen (cm ²)	20ml Medium	4-5*10 ⁶ Zellen
Grosse Flaschen (cm ²)	50ml Medium	2-3*10 ⁷ Zellen
Mittlere Petrischale (cm ²)	10ml Medium	2*10 ⁷ Zellen

Tabelle 1, Beimpfen der Flaschen

Die HeLa-Zellen werden in supplementierten Dulbeccos Eagle Medium (Firma Gibco BRL/Life Technologies, siehe Anhang) bei 37 Grad Celsius, 100% relativer Feuchte und 5 % Kohlendioxid in einem Feuchtbrutschrank (Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) kultiviert. Das Umsetzen der Zellen mit konsekutivem Ausdünnen erfolgte bei einer Konfluenz von 70-80%. Hierzu wird das Nährmedium (siehe Anhang) aus der Flasche mit Pasteur Pipetten abgesaugt und 8ml PBS Dulbecco Puffer (Fa. Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) in die Flasche pipettiert. Die Zellen werden gespült und anschliessend der Puffer wieder abgesaugt. Nun werden die Zellen in 0,25% Trypsin-Lösung (Fa. Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe) 10min bei 37°C im Feuchtbrutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen vollständig vom Boden der Zellkulturflasche gelöst haben, werden diese nach Zugabe von 8ml Nährmedium zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Nach dem Resuspendieren in Nährmedium wird die Zellzahl in der Neubauerzählkammer bestimmt (siehe 2.1.3.) und dann verdünnt wieder ausgesät (siehe Tab.1).

2.1.3. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl der HeLa-Zellen wird mit der Neubauerzählkammer (Fa. Brand, Ludwigshafen) durchgeführt. Zur Vorbereitung der Zellen für die Zählkammer werden diese mit Trypanblau (Trypan blue solution 0,4%, Fa. Sigma, St. Louis, USA) angefärbt. Es werden hierzu 10µl der Zellsuspension mit 90µl Trypanblau in einem Eppendorfröhrchen gemischt und davon 10µl in die Zählkammer pipettiert. Durch die Eigenschaft des Trypanblaus, nur durch Membranen abgestorbener Zellen zu diffundieren, bleiben lebende Zellen mit intakter Membran ungefärbt. Dies führt zu einer Blaufärbung der toten Zellen, die dadurch von den lebenden Zellen, die unter dem Lichtmikroskop (Fa. Zeiss Axioplan, Oberkochen) farblos erscheinen, unterschieden werden können. Es werden nun 4 Felder à 16 Planquadrate lichtmikroskopisch ausgezählt. Um die absolute Zellzahl der gesamten Suspension zu errechnen, wird aus der Anzahl der lebenden (farblosen) Zellen in den vier Feldern der arithmetische Mittelwert gebildet.

Folgende Formel liegt der Berechnung zu Grunde :

$$a = m \cdot v \cdot 10^5 \text{ Zellen/ml} \quad (a = \text{absolute Zellzahl, } m = \text{arithmetischer Mittelwert, } v = \text{Volumen der Zellsuspension})$$

2.2. Magnetwellen

2.2.1. Schwebende Magnetwellen

Um die schwebenden Magnetwellen zu generieren, werden zwei Sinuskurven unterschiedlicher Frequenz (f_1 und f_2) erzeugt, die überlagert und verstärkt werden. Die Frequenz der schwebenden Welle (Δf) ergibt sich aus der Differenz von f_1 und f_2 . Die schwebende Welle ist durch die ebenfalls sinusförmige Welle mit der Frequenz Δf charakterisiert (siehe Tab. 2), sowie der innerhalb dieser Welle schwingenden höherfrequentigen Basisfrequenz ($(f_1 + f_2)/2$). Diese so generierte Welle wird auf eine Spule (Fa. Graviton, Berlin) übertragen, an die zusätzlich eine Hochspannung angelegt (5,6 kV) wird (siehe Abb. 1). Im Zentrum der Spule entsteht so ein elektrostatisch gerichtetes Magnetfeld, in dem die mit Zellsuspension (s. 2.3.2.) gefüllten Petrischalen stehen (siehe Abb.3 und Abb. 4). Die verschiedenen Frequenzparameter (siehe Tab. 2) werden jeweils mit einer Stromstärke von 85mA und 250mA gemessen, um eine Aussage über die Wachstumsreduktion in Abhängigkeit zu der angelegten Stromstärke machen zu können (siehe 3.).

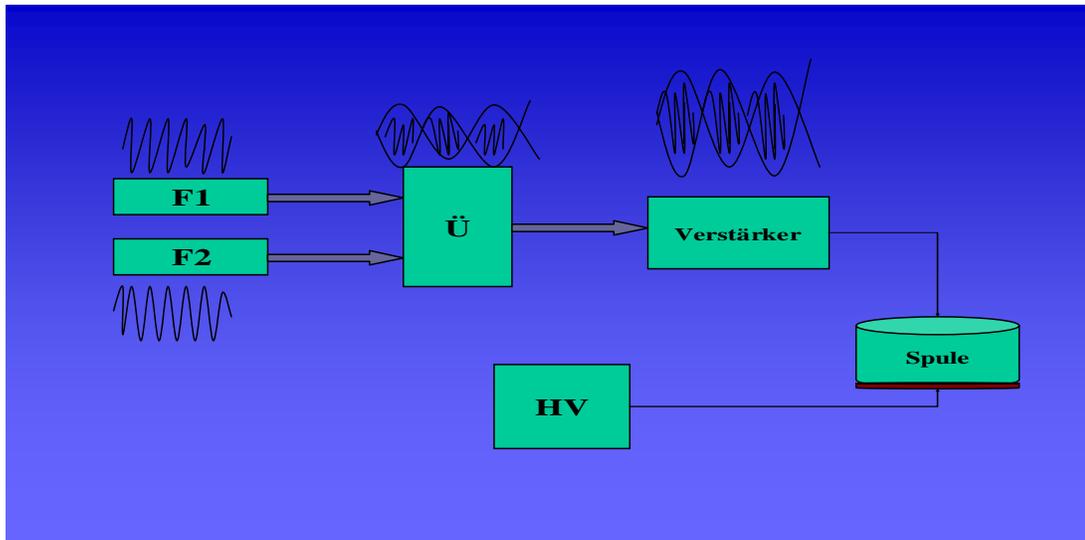


Abb. 1, Geräteaufbau (schematisch), Ü= Überlagerungseinheit, HV= Hochspannungsgenerator, F1/2= Programmable Function Generator

Frequenz f_1 (Hz)	Frequenz f_2 (Hz)	Delta (Hz)
3387,7	3430,4	42,7
3383,5	3434,5	51
3378,9	3439,2	60,3

Tab. 2 , Frequenzparameter

2.2.2. Geräte zur Erzeugung von Magnetwellen

Mittels zweier Geräte (Fa. Hameg, Programmable Function Generator HM 8130) kann man sich in der Frequenz unterscheidende Sinuskurven erzeugen. Wie im nachgeschalteten Oszilloskop (Fa. Voltcraft, Oszilloskop 622 Fg, 20 MHz) dargestellt, werden diese beiden Frequenzen überlagert und man erhält das für den Versuchsteil

nötige Frequenzmuster (siehe Abb. 2). Die Verstärkung wird durch einen HiFi-Verstärker (Fa. Kenwood, KA- 660 D) erreicht. Die Stromstärke wird mit einem analogen Wechselstrommessgerät eingestellt (85 mA oder 250 mA), das mit einem digitalen Referenzmessgerät hoher Genauigkeit geeicht wird (Echt – Effektivwertmessung; True RMS; hoher Frequenzbereich). Die erzeugte Frequenz wird mit einem gegen die Feuchtigkeit im Inkubator isolierten Kabel in den Inkubatorschrank hineingeleitet und an die Spule (Fa. Graviton, Berlin) angelegt. An der Unterseite der Spule ist eine Metallplatte angebracht, an der eine Hochspannung (5,6 kV) angelegt ist. Die Spule steht auf leeren Petrischalen. Diese Maßnahme ist notwendig, um die Feuchtigkeit auf den Bodenblechen von der Spule fernzuhalten. Ebenso platziert man den Stapel mit den Schalen der HeLa-Zellsuspension auf einer leeren Petrischale, damit dieser optimal im Zentrum der Spule steht (siehe Abb.3).



Abb. 2, Geräteaufbau zur Erzeugung von schwebenden Magnetwellen

2.3. Versuchsaufbau

2.3.1. Vorbereitung der Materialien

Es werden neun Petrischalen mit Zellen beimpft. Davon werden drei Petrischalen (mit A, B und C beschriftet) übereinander gestapelt, auf eine leere Schale (als Abstandhalter zum Bodenblech und somit auch zum Schutz vor Feuchtigkeit) gestellt und in der Spule (mit angelegter Hochspannung) positioniert (siehe Abb. 3).

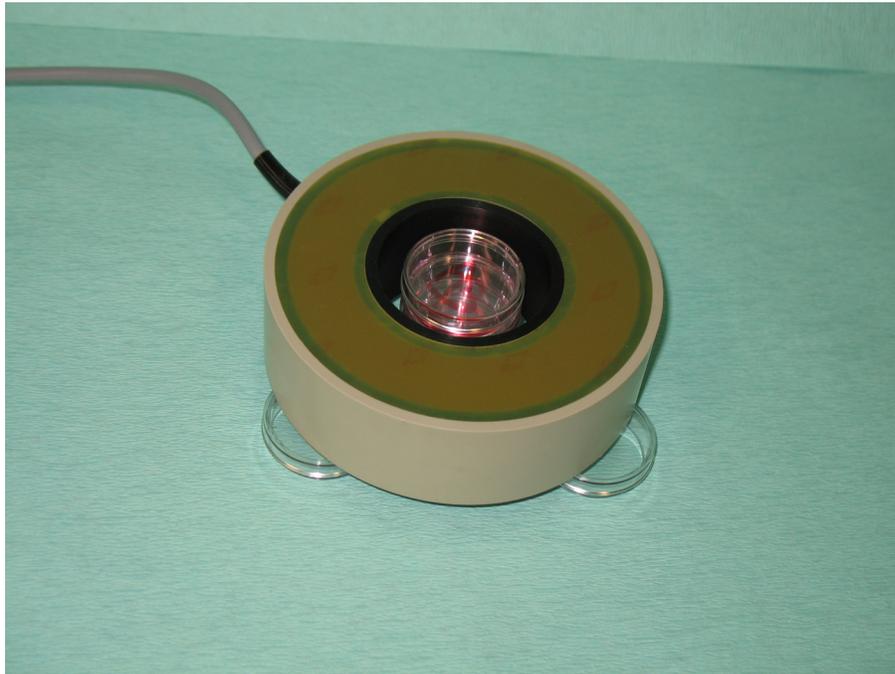


Abb. 3, Aufbau der zu bestrahlenden Petrischalen in der Spule

Als Kontrolle werden drei weitere Petrischalen auf der gegenüberliegenden Seite in ein tiefer gelegenes Fach des Inkubators (Fa. Kendro Laboratory Products, Heraeus) mit identischem Aufbau in einer baugleichen Spule ohne angelegte Spannung gestellt (mit 4, 5 und 6 beschriftet). Durch die räumliche Trennung (> 50 cm) und die Eiseneinsätze (als Bodenbleche) im Inkubator wird ein Einfluss der mit Hochspannung versorgten Spule auf

die Kontrollen verhindert. Zu dem werden die letzten drei Petrischalen ebenfalls übereinander gestapelt und ohne Kontakt zu den Spulen in das tiefer gelegene Fach gestellt (siehe Abb. 4). Diese Schalen dienen als Kontrolle ohne jeglichen Einfluss der Spulen (mit oder ohne Hochspannung). Zu diesen Schalen werden noch die unter 2.3.2. beschriebenen Meßkorrekturschalen gestellt (siehe Abb. 4).

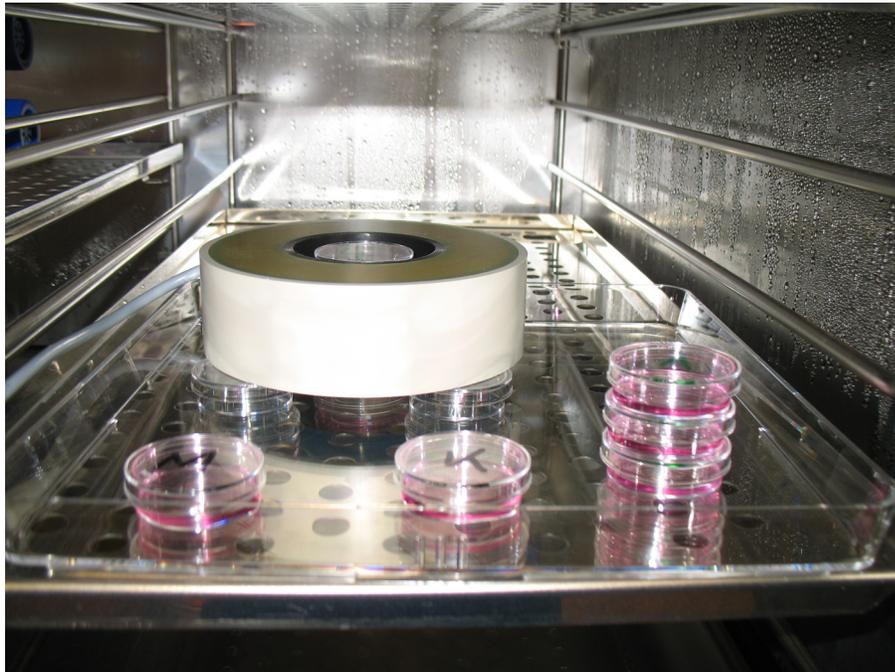


Abb. 4, Aufbau : Kontrollschälchen, zum Teil in der Spule

2.3.2. Zellwachstumsbestimmung

Nachdem der HeLa-Zellansatz (wie unter 2.1.2 beschrieben) erstellt und eine Inkubationszeit von 24 Stunden eingehalten wurde, erfolgt die erste Zellwachstumsbestimmung. Diese wird mit dem Alamar Blue Assay (Fa. Biosource, USA) durchgeführt. Alamar Blue Assay ist ein Farbwachstumsindikator, der auf der Basis der metabolischen Zellaktivität funktioniert. Ebenso ist es ein Redox Indikator

(Oxidation/Reduktion), der in Abhängigkeit der chemischen Reduktion des Nährmediums bei Zellwachstum arbeitet (siehe Abb. 5) (Lancaster, M. V. and Fields, R.D. 1996).

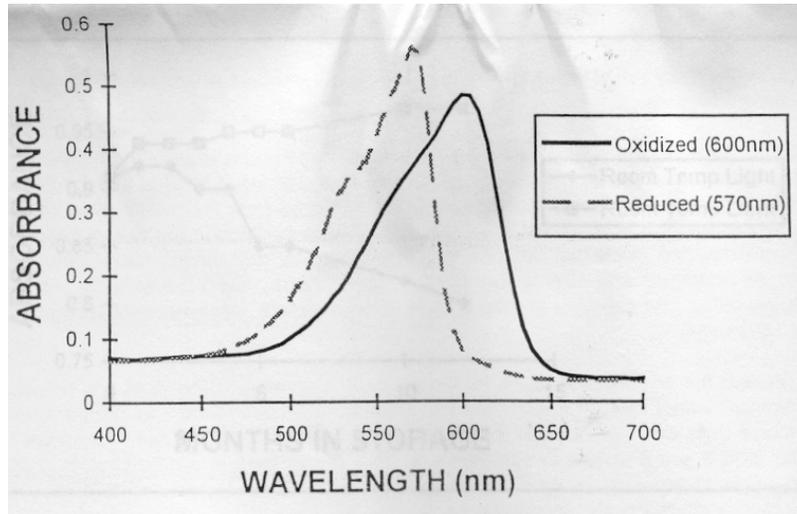


Abb. 5, Alamar Blue Assay Absorbtion

Aus den Zellschalen (3cm Durchmesser = 10cm²) wird das Nährmedium mit Pasteurpipetten abgesaugt und es werden 2ml des Dulbecco Mediums ohne Phenolrot (mit 5ml L-Glutamin) in die Petrischalen pipettiert, zusätzlich verbringt man jeweils exakt 2ml des Mediums in zwei weitere Petrischalen, die keine Zellen enthalten. Die zwei Schalen, die nur das Medium enthalten, dienen der Meßkorrektur. Die Zellschalen mit den neuen Ansätzen und die beiden Meßkorrekturschalen werden nun inkubiert (37°C, 5% CO₂). Nach einer Stunde werden in jede Schale, mit Ausnahme eines der Meßkorrekturschälchen, 200µl Alamar Blue Assay verbracht und durch Schwenken vermischt. Aus allen Schalen werden sofort 100µl entnommen. Danach werden die Schalen wieder in den Inkubator gestellt. Mit den entnommenen Aliquots werden im Photometer die Extinktionen bei 570nm und 600nm gemessen. Diese 1. Messung entspricht dem „Nullstundenwert“. Nach zwei, vier und sechs Stunden nimmt man auf die gleiche Art und Weise weitere Extinktionsmessungen im Photometer vor. Nach der sechs Stunden Messung wird das Medium (phenolrotfrei) aus allen Schalen abgesaugt und die Schalen werden nun mit Nährmedium durch mehrmaliges Pipettieren gewaschen. In die gewaschenen Petrischalen mit den HeLa-Zellen werden 2ml Nährmedium gegeben und

bis zur nächsten Messung in den Inkubator gestellt. An den drei folgenden Tagen werden die Zellansätze auf die gleiche Weise behandelt und die Extinktionsmessungen zu den gleichen Zeiten durchgeführt, um Erkenntnisse über das Zellwachstum zu erhalten.

Die Messzeiten sind konstant, die Frequenzen und angelegten Stromstärken werden variiert. Die Zellen werden mit jeder Frequenz und der jeweiligen Stromstärke 72h bestrahlt. Die Messungen werden zu den Zeitpunkten 0h, 2h, 4h und 6h täglich vorgenommen. Als Kontrollmessung wurde eine Messreihe durchgeführt, die ohne angelegte Hochspannung erfolgte, um zu prüfen, ob die Anwesenheit der Hochspannung einen Einfluß auf die Kontrollschalen ausübt. Auf diese Weise können Rückschlüsse auf die Richtigkeit des Versuchsaufbaus gezogen werden.

Frequenz (Hz)	Stromstärke (mA)	Spannung (Volt)	Gruppe	Messdauer pro Messreihe (h)
60,3	250	50	a-c, k1-k6	72
60,3	250	Hochspannung	a-c, k1-k6	72
60,3	85	Hochspannung	a-c, k1-k6	72
51	250	Hochspannung	a-c, k1-k3	72
51	85	Hochspannung	a-c, k1-k3	72
42,7	250	Hochspannung	a-c, k1-k3	72
42,7	85	Hochspannung	a-c, k1-k3	72

Tab. 3, Übersicht Messreihe

2.3.3. Zellproliferationsbestimmung

Die Zellproliferation wurde mit dem monoklonalen Antikörper Ki-67 bestimmt, der zu den meist verwendeten immunhistologischen Markern für die Proliferation von Zellen zählt. Die HeLa-Zellen werden hierfür 72 Stunden bestrahlt (wie unter 2.3.1. und 2.3.2. beschrieben). Es wird die Standardmethode mit Triton-X 100-Lösung und Paraformaldehyd durchgeführt (Endl et al., 2001). Der monoklonale Antikörper bindet an das humane Ki-67 Antigen (pKi-67). Dieses Antigen befindet sich ausschließlich im Kern von proliferierenden Zellen (in gesunden – und entarteten Geweben). Zellen in der Ruhephase (G_0 -Phase) oder in der Phase der DNA – Reparatur bilden kein Ki-67 Antigen (Gerdes et al., 1984, Schlüter et al., 1993). Das Ki-67 Antigen ist in sich permanent

teilenden Zellen, wie humane MCF-7 und MR65 Tumorzellen, konsekutiv nachweisbar (Verheijen et al., 1989; van Dierendonck et al., 1989). Um die durchflusszytometrische Bestimmung der Proliferation durchzuführen, müssen die Zellen permeabilisiert und fixiert werden. Auf diese Art gelangen die monoklonalen Ki-67 Antikörper in den Zellkern (Schwartz et al., 1985). Zur Anwendung kam ein Fixationsverfahren mit Ethanol, um die Zellen zu permeabilisieren, aber gleichzeitig die Unversehrtheit der Oberflächenmarker zu gewähren (Telford et al., 1998).

Die Durchführung der Zellproliferationsmessung beginnt mit dem Aberntem der HeLa-Zellen, die im Inkubator gewachsen sind. Im Gegensatz zu der Zellwachstumsbestimmung mit Alamar Blue (siehe 2.3.2) werden hier keine Petrischalen, sondern 12-Lochplatten verwendet. Diese 12-Lochplatten mit der HeLa-Zellsuspension werden aus dem Inkubator entnommen und mit Pasteurpipetten abgesaugt. Danach wird mit 1ml PBS-Puffer gespült und 1ml Trypsin zugegeben. Nun werden die 12-Lochplatten 5-7 min inkubiert. Als nächstes gibt man 1ml Zellmedium dazu, um das Trypsin zu inaktivieren. Durch wiederholtes Aspirieren mit der Pasteurpipette wird die Suspension gut durchgemischt. Nun wird die Suspension in Fac Scan Röhrchen (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) gegeben und zentrifugiert. Jetzt folgt die Färbung mit Ki-67-Antikörper (FITC). Nach dem Zentrifugieren wird der Überstand abgeschüttet und mit 1ml PBS Puffer (mit 0,5% FKS) unter Schütteln gewaschen. Es folgt eine weitere Zentrifugation mit identischem Programm und danach wieder das Abschütten des Überstandes. Dann wird in 500µl PBS (mit 0,5m % FKS) resuspendiert und mit 500µl frischer, eiskalter 4%ige PFA-Lösung (siehe 8.1. Materialien) fixiert. Jetzt wird 10 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss abermals zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, 500µl PBS (mit 0,25 % Triton X – 100, eiskalt) dazugegeben und das Pellet resuspendiert (Penetration der Zelle). Nun wird nochmals 5 min auf Eis inkubiert und danach 500µl PBS (mit 0,5 % FKS) dazugegeben. Es wird nochmals zentrifugiert und der Überstand entfernt. Nun gibt man 100µl Primäantikörper FITC Ki – 67 dazu (Gemisch mit PBS, 0,5% FKS in der Verdünnung 1: 99) und inkubiert auf Eis 45 Minuten. Nach Zugabe von 500µl PBS (mit 0,5 % FKS) wird zentrifugiert und abgegossen. Dieser letzte Schritt wird noch einmal durchgeführt, dann werden 500µl FACS – Lösung hinzugegeben und im FAC SCAN Durchflusszytometer (FACscan, Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgt mit dem Programm CellQuest Version 3.2 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland).

2.3.4. Apoptosebestimmung mit dem Protein Annexin V

Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges Protein, das sich an Phospholipide bindet.

Die Apoptose von Zellen ist ein Prozess, der in vielen verschiedenen Phasen abläuft. Chromatin heftet sich an die Zellmembran (Aggregation), das Zytoplasma schrumpft und die DNA wird fragmentiert (siehe 1.6).

Die Phospholipide sind in der aus einer Doppellipidschicht bestehenden Zellmembran asymmetrisch angeordnet. In einer intakten Zelle befinden sich Phosphatidylserine ausschließlich an der Innenseite der Zellmembran (siehe Abb. 6). Phosphatidylserine sind negativ geladene Phospholipide. Es gibt andere Phospholipide, wie z.B. Phosphatidylcholin, die allerdings nicht nur an der Innenseite der Zellmembran vorkommen.

In der frühen Phase der Apoptose kommt es zu einer Translokation des Phosphatidylserins von der inneren zur äußeren Seite der Membran. In dieser Phase ist die Zellmembran noch unversehrt (Darzynkiewicz et al., 1997; van Engeland et al., 1998). Annexin V hat eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin. Daher kann Annexin V als Marker der frühen Phase des Apoptosevorganges verwendet werden (siehe Abb. 6).

Annexin V wird mit Fluorescein Iso Thio Cyanat (FITC) konjugiert und es kann so durchflusszytometrisch die Apoptose in einer Zellsuspension (siehe 2.3.3.) bestimmt werden. Propidiumjodid wird als Zellfärbung verwendet, die es ermöglicht, apoptotische von nekrotischen Zellen zu differenzieren, da durch Propidiumjodid die DNA angefärbt wird und dies nur bei nicht intakter Zellmembran möglich ist.

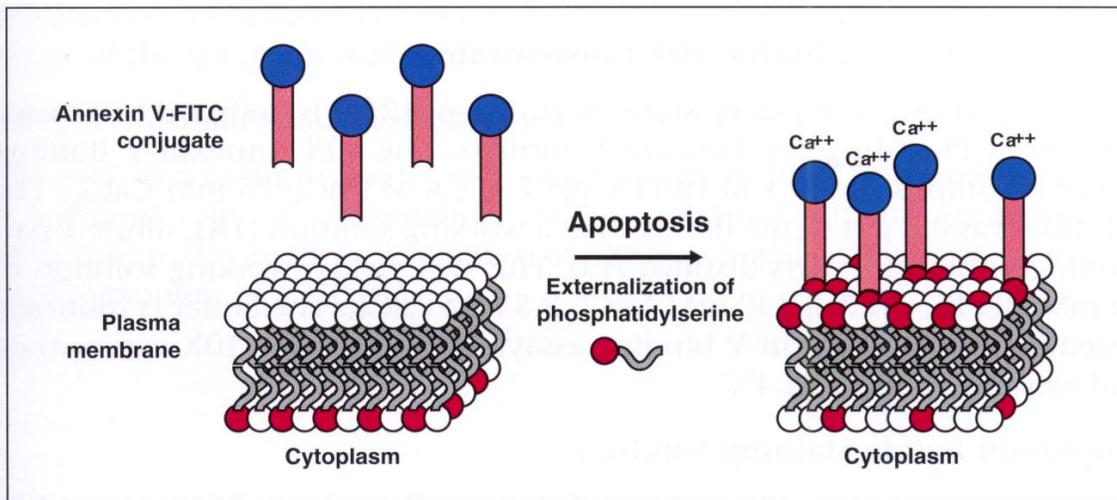


Abb. 6, Annexin V-Färbung (schematisch). Annexin V ist nicht in der Lage an intakten Zellen zu binden (die Phosphatidylserine sind auf der Membraninnenseite lokalisiert). Ist die Zelle in der frühen Phase der Apoptose, kehren sich die Phosphatidylserine nach außen um und Annexin V kann (in Anwesenheit von Calcium) an das Phospholipid binden (Fa. Biosciences Pharmingen, Heidelberg).

Daraus folgt, dass bei dieser Methode Zellen, die sich in der frühen Phase der Apoptose befinden, Annexin V positiv und Propidiumjodid negativ gefärbt sind (Vermes et al., 1995). Als eindeutiges Zeichen für den Ablauf einer Apoptose ist die Veränderung der Farbeigenschaften der Zellen im zeitlichen Verlauf zu bewerten. Die Färbung der Zellen zur Bestimmung der Apoptoserate erfolgt mit dem Annexin V – FITC Apoptosis Detection Kit I (Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland, Product – information, 2001).

2.4. Statistik

Für unabhängige Stichproben wurde der zweiseitige Mann-Whitney-U-Test verwendet, um die Gruppen („Bestraht“, „Kontrolle mit Spule“ und „Kontrolle ohne Spule“) zu vergleichen. Als signifikant gilt ein p-Wert $\leq 0,05$. Das Programm SPSS (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) wurde zur Erhebung der deskriptiven und vergleichenden Statistik angewandt.

3. Ergebnisse

3.1. Zellwachstumsbestimmungen

Es werden im Folgenden die Analysen der Zellwachstumshemmung bestrahlter Zellen im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen vorgestellt. Die Messungen bei 0h und 6h (Extinktionsbestimmung 0 bzw. 6h nach Zugabe von Alamar Blue zu den Zellkulturen) sind in die graphische Darstellung nicht mit aufgenommen worden, da durch den sehr frühen bzw. sehr späten Zeitpunkt der Messung keine validen signifikanten oder tendenziellen Aussagen gemacht werden konnten. Denn zum Zeitpunkt 0h, der den Ausgangspunkt beschreibt, hat noch kein Einfluss des Versuchsaufbaus und der Versuchsdurchführung auf die Zellen stattgefunden. Die Sechsstundenwerte ebenfalls aus der graphischen Darstellung herauszunehmen, wurde durch die generell sehr hohe Proliferationsrate der Zellen zu diesem Zeitpunkt verursacht (Alamar Blue Verbrauch = Substrat über 50 %).

Kontrollmessung ohne Hochspannung mit 50 Volt:

Als Kontrollmessung wurde eine Messreihe durchgeführt, die ohne angelegte Hochspannung, sondern mit 50 Volt erfolgte (siehe 2.3.2). Aus der Auswertung ist ersichtlich, dass in dieser Messreihe keine signifikanten Änderungen oder Tendenzen in der Wachstumsreduktion zwischen der Gruppe „Bestrahlt“ und den Kontrollgruppen bestehen (siehe Abb. 7).

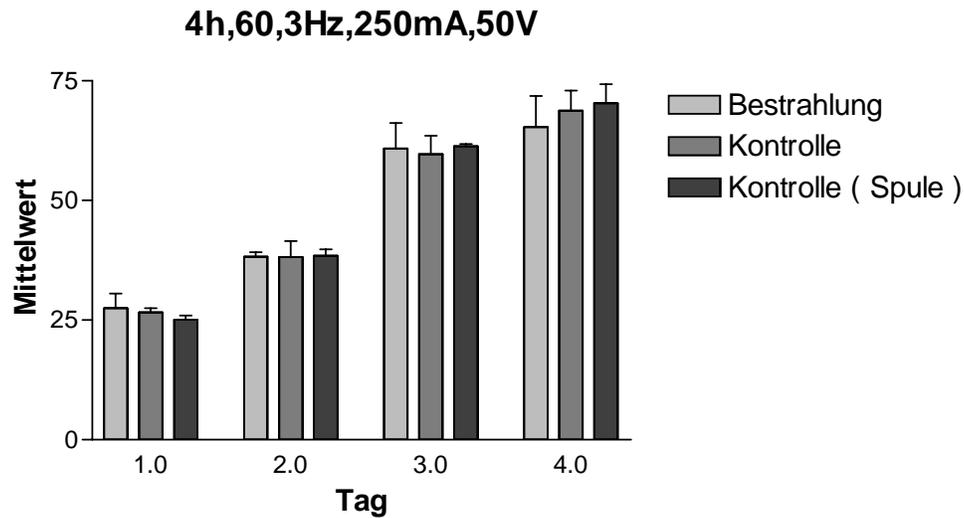


Abb. 7, Vierstundenwerte (Extinktionsbestimmungen 4h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz $\Delta f = 60,3$ Hz, der Stromstärke 250 mA und 50 Volt Spannung (ohne angelegte Hochspannung)

Messreihe 60,3 Hz, 250 mA und 5,6 kV:

Bei der Messreihe, in der mit der Frequenz $\Delta f = 60,3$ Hz, der Stromstärke 250 mA und 5.6 kV bestrahlt wurde, ist eine signifikante Wachstumsreduktion im Vergleich der Gruppe „Bestrahlt“ zur Gruppe „Kontrolle (Spule)“ zu beobachten. Dies wird deutlich an Tag 2 bei den Vierstundenwerten (siehe Abb. 9 und Tab. 4). Signifikante Änderungen der Wachstumsreduktion sind ebenso bei den Zweistundenwerten der Tage 3 und 4 in den Kontrollgruppen zu verzeichnen (siehe Abb. 8 und Tab. 4), ebenso wie bei den Vierstundenmessungen an den Tagen 3 und 4. Bei der Gruppe „Kontrolle (ohne Spule)“ zeigt sich an Tag 2 zur Zweistundenmessung eine tendenzielle Reduktion des Wachstums (p-Wert : 0,06). In den übrigen Messungen ist die Wachstumsreduktion im Vergleich der Gruppe „Bestrahlt“ zu der Gruppe „Kontrolle“ weder signifikant noch tendenziell unterschiedlich.

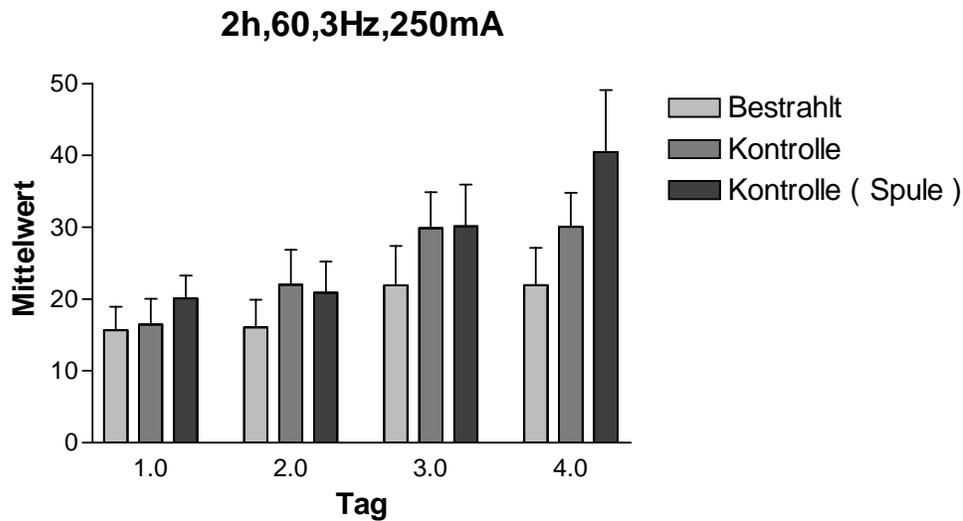


Abb. 8, Zweistundenwerte (Extinktionsbestimmungen 2h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 60,3 Hz, der Stromstärke 250 mA und 5.6 kV

Gruppe	Tag 3, 2h – Tag 1, 2h	Tag 4, 2h – Tag 1, 2h	Tag 2, 4h – Tag 1, 4h	Tag 3, 4h – Tag 1, 4h	Tag 4,4h – Tag 1, 4h
A-C (bestrahlt)	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant	p = 0,05	Nicht Signifikant	Nicht Signifikant
K1-K3 (ohne Spule)	p = 0,003	p = 0,008	p = 0,028	p = 0,011	Nicht Signifikant
K4-K6 (mit Spule)	p = 0,028	p = 0,012	p = 0,021	p = 0,021	p = 0,012

Tab.4, Signifikante Änderungen (p-Werte) der Frequenz (Δf) 60,3 Hz, 250 mA, 5,6 kV

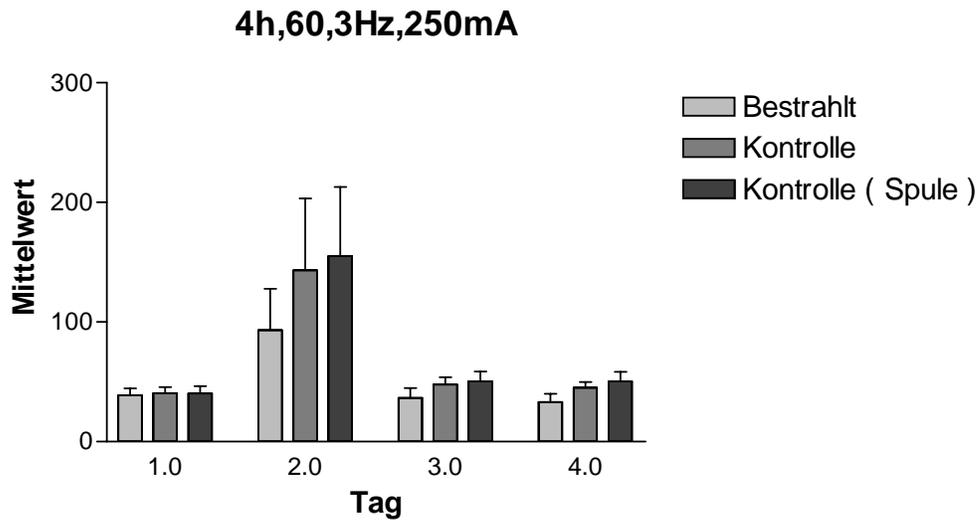


Abb. 9, Vierstundenwerte (Extinktionsbestimmungen 4h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 60,3 Hz, der Stromstärke 250 mA und 5.6 kV

Messreihe 60,3 Hz, 85 mA und 5,6 kV:

Die Frequenz $\Delta f = 60,3$ Hz wurde auch mit einer Stromstärke von 85 mA und 5,6 kV gemessen. Hier sind die Zweistundenwerte der Tage 1 - 4 aufgeführt (siehe Abb. 10 und Tab. 5), die an Tag 4 eine höchst signifikante Erniedrigung des Wachstums der Gruppe „Bestrahlt“ und der Gruppe „Kontrolle (ohne Spule)“ zeigen (p-Wert: 0,001). Zwischen den Gruppen gibt es allerdings keine signifikanten Unterschiede. Das gleiche gilt auch für die Werte der Vierstundenmessung (p-Wert: 0,003 und 0,005) (siehe Abb. 11 und Tab. 5). Eine tendenzielle Wachstumsreduktion ist in der Gruppe „Bestrahlt“ zum Zeitpunkt 2h zu erkennen (siehe Tab. 5).

Gruppe	Tag 4, 2h – Tag 1, 2h	Tag 4, 4h – Tag 1, 4h	Tag 3, 2h – Tag 1, 2h
A-C (bestrahlt)	p = 0,001	p = 0,005	p = 0,085
K1-K3 (ohne Spule)	p = 0,001	p = 0,003	Keine Tendenz oder Signifikanz

Tab. 5, Signifikante Änderungen und Tendenzen (p-Werte) der Frequenz (Δf) 60,3 Hz, 85 mA, 5,6 kV

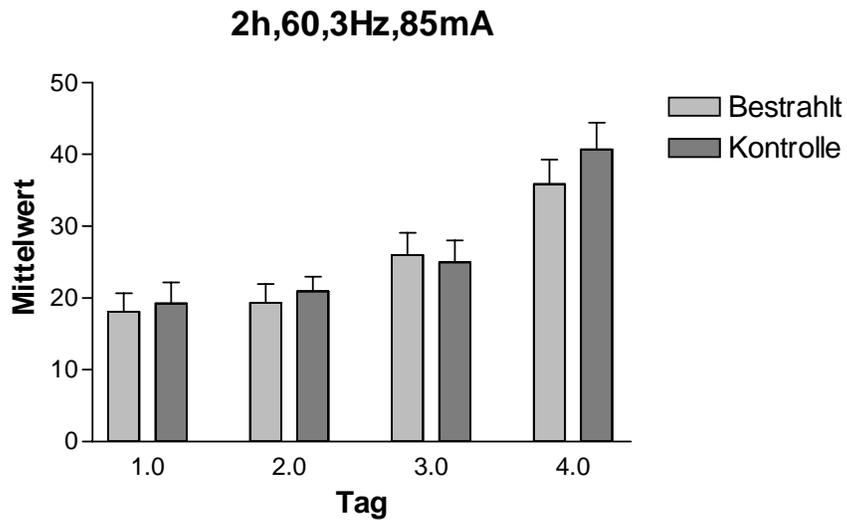


Abb. 10, Zweistundenwerte (Extinktionsbestimmungen 2h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 60,3 Hz, der Stromstärke 85 mA und 5.6 kV

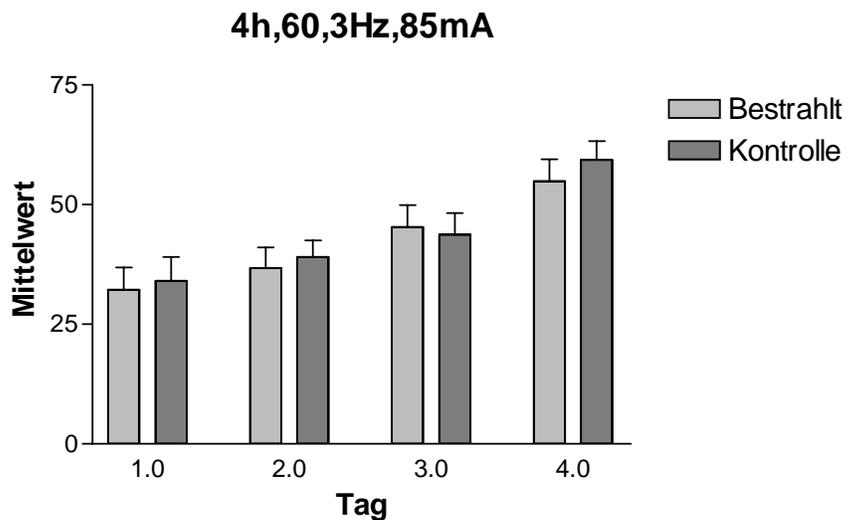


Abb. 11, Vierstundenwerte (Extinktionsbestimmungen 4h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 60,3 Hz, der Stromstärke 85 mA und 5.6 kV

Messreihe 51 Hz, 250 mA und 5,6 kV:

Mit der Frequenz $\Delta f = 51$ Hz, der Stromstärke 250 mA und 5,6 kV wurden keine signifikanten Ergebnisse erzielt (siehe 8.5.4.).

Messreihe 51 Hz, 85 mA und 5,6 kV:

Bei der Messreihe mit der gleichen Frequenz, aber einer Stromstärke von 85 mA (siehe Abb. 12 und 13) ist das Zellwachstum der Gruppe „Kontrolle“ im Vergleich zur Gruppe „Bestrahlt“ an Tag 3 bei den Zwei- und Vierstundenwerten signifikant erniedrigt (p-Wert Tag3/2h: 0,05, p-Wert Tag3/4h: 0,05).

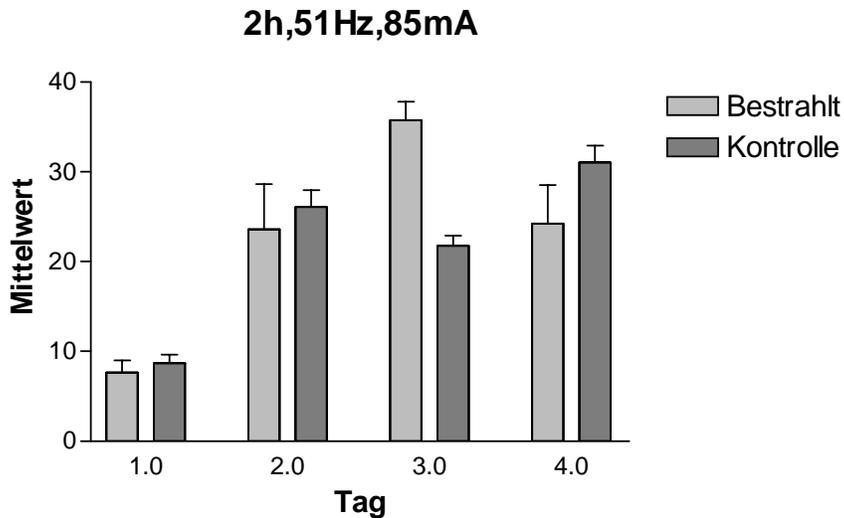


Abb. 12, Zweistundenwerte (Extinktionsbestimmungen 2h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 51 Hz, der Stromstärke 85 mA und 5.6 kV

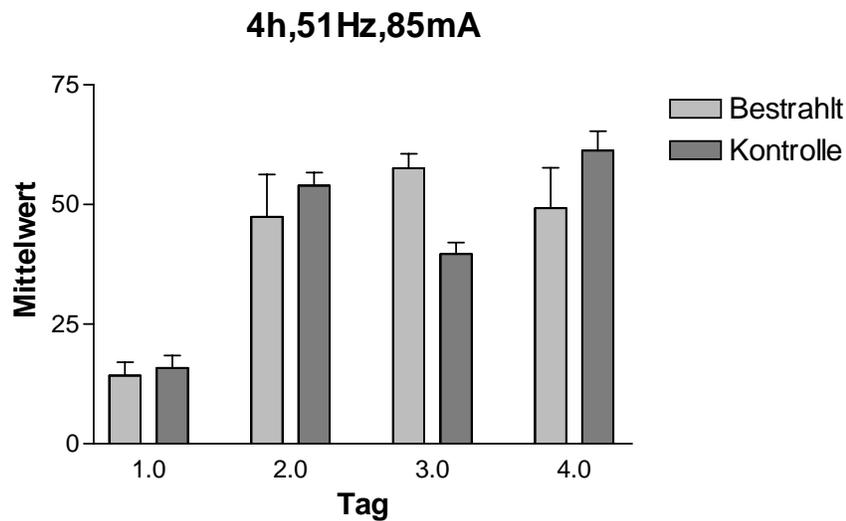


Abb. 13, Vierstundenwerte (Extinktionsbestimmungen 4h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 51 Hz, der Stromstärke 85 mA und 5.6 kV

Messreihe 42,7 Hz, 250 mA und 5,6 kV:

Das Frequenzfenster 42,7 Hz wurde ebenso mit 85 mA und 250 mA gemessen. Bei den Messungen mit 42,7 Hz und 250 mA wurden keine Signifikanzen festgestellt (siehe 8.5.2.).

Messreihe 42,7 Hz, 85 mA und 5,6 kV:

Bei der Durchführung dieser Messung (42,7 Hz) mit 85 mA (siehe Abb. 14) zeigen die Ergebnisse bei den Zweistundenmessungen an Tag 4 eine signifikante Reduktion des Wachstums der Zellen in der Gruppe „Bestraht“ im Vergleich zur Gruppe „Kontrolle“ (p-Wert: 0,05). An den Vierstundenwerten des dritten Tages zeigt sich, dass sich auch hier die Gruppe „Kontrolle“ in der Inhibierung des Zellwachstum, im Vergleich zur Gruppe „Bestraht“ signifikant unterscheidet (p-Wert: 0,05) (siehe Abb. 15) .

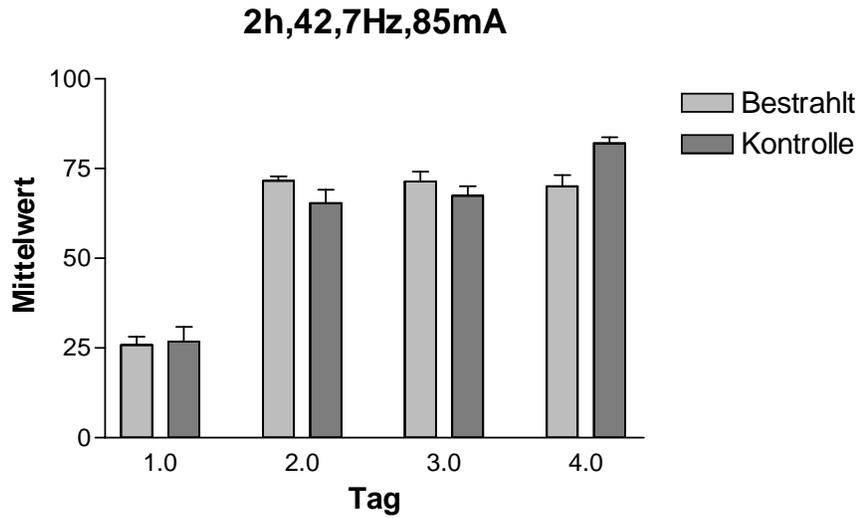


Abb. 14, Zweistundenwerte (Extinktionsbestimmungen 2h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 42,7 Hz, der Stromstärke 85 mA und 5.6 kV

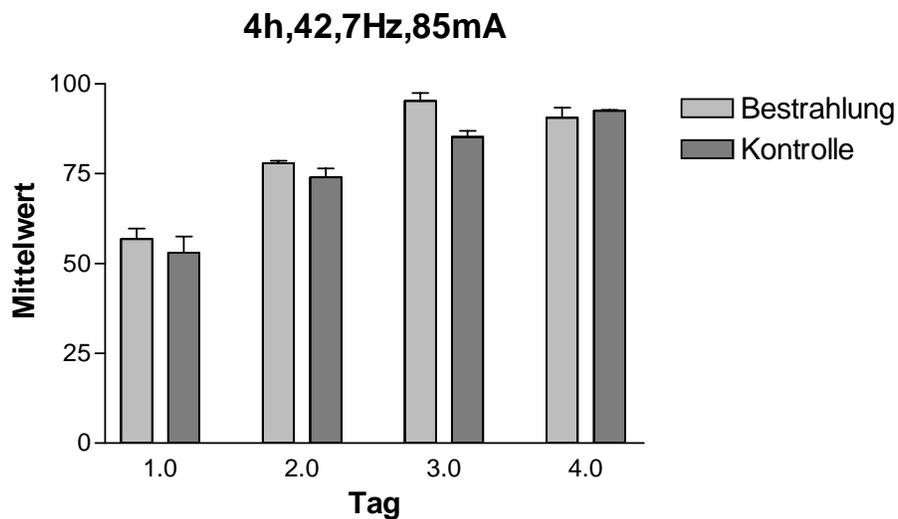


Abb. 15, Vierstundenwerte (Extinktionsbestimmungen 4h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 42,7 Hz, der Stromstärke 85 mA und 5.6 kV

Die Standardabweichungen sind an den vierten Messtagen hoch (siehe Tab. 6 und 7).

Gruppe	42,7Hz,85mA	42,7Hz,250mA	51Hz,85mA	51Hz,250mA
a-c (bestrahlt)	9,00023	3,23373	13,30448	1,06604
k1-k3 (ohne Spule)	0,64416	6,88592	5,22240	1,87127

Tab.6, Standardabweichungen der vierten Messtage

Gruppe	60,3Hz,85mA	60,3Hz,250mA	60,3Hz,50V(ohne Hochspannung)
a-c (bestrahlt)	18,19078	25,41319	2,35924
k1-k3 (ohne Spule)	14,50325	15,35032	8,10009
k4-k6 (mit Spule)	Keine Daten	18,00880	3,13168

Tab.7, Standardabweichungen der vierten Messtage

3.2. Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptose- und Proliferationsrate

Die Apoptoserate der HeLa-Zellen wurde unter Verwendung des Fluoreszenz – markierten Annexin V Antikörpers am FACS (FACscan, Becton Dickinson, Heidelberg) bestimmt. Die Messungen wurden nach 72h Bestrahlung mit der Frequenz $\Delta f = 60,3$ Hz, der Stromstärke 250 mA und 5,6 kV durchgeführt.

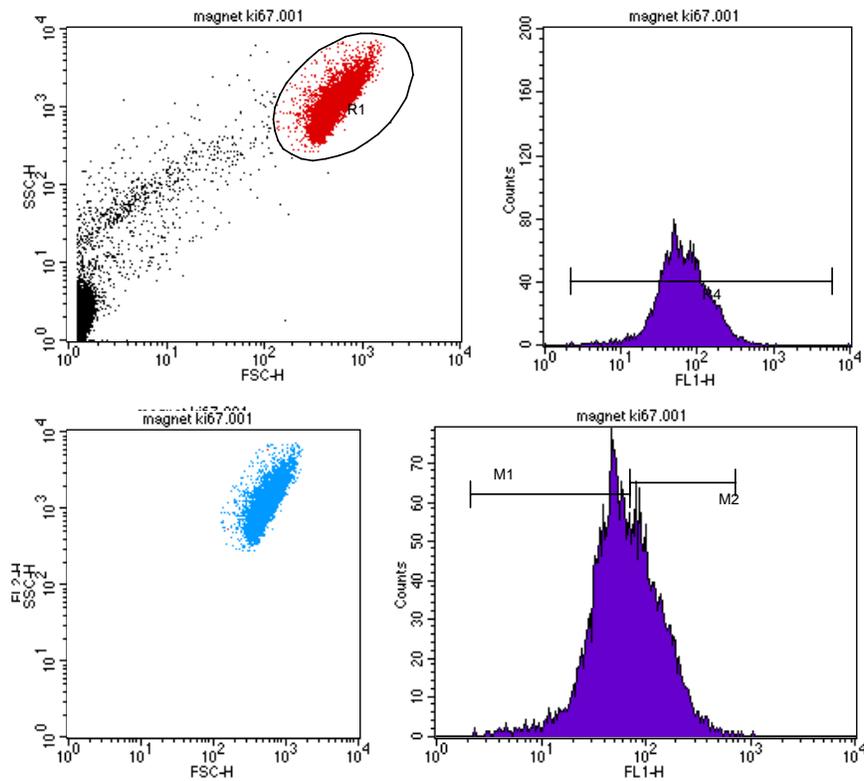
3.2.1 Bestimmung der Proliferationsrate

Die Ki-67 Messung im Durchflusszytometer stellt einen Meßparameter für den Einfluss der elektromagnetischen Strahlung dar. Diese Messung wird durchgeführt, um den

Proliferationsindex der bestrahlten und unbestrahlten HeLa-Zellen zu messen. Es werden einige Beispiele für die Gruppen „Bestrahlt“, „Kontrolle mit Spule“ und „Kontrolle ohne Spule“ aufgeführt. In Abb. 16 zeigt sich, dass 41,26% der 72h bestrahlten Zellen (Sample A als Beispiel) Ki-67 positiv gefärbt wurden, bei ihnen also Proliferation nachgewiesen wurde (siehe 2.3.3.). Im Vergleich zu den bestrahlten Zellen zeigt Abb. 17, dass bei der Messung der nicht bestrahlten HeLa-Zellen unter der Spule (Sample 6) der Anteil der Ki-67 positiv gefärbten (proliferierenden) Zellen 24,24% beträgt. Der Anteil der Zellen in der Proliferationsphase bei den nicht bestrahlten Zellen ohne Spule liegt im Beispiel des Samples 1 bei 11,32% (siehe Abb. 18). Dieser signifikante Unterschied zwischen Sample A (Bestrahlt) und Sample 1 (Kontrolle ohne Spule) ist in der Zusammenschau aller in dieser Messreihe erstellten Ergebnisse am ehesten als „Ausreisser“ zu werten. Vergleicht man alle Messergebnisse der mit dem Ki-67-Fluoreszenzfarbstoff angefärbten Zellen (Tab.8), so wird deutlich, dass sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den bestrahlten und nicht bestrahlten Zellen ergeben haben.

Gruppe	Sample (Apoptose)	Sample (Apoptose)	Sample (Apoptose)
Bestrahlt	A (41,26%)	B (38,48%)	C (29,79%)
Kontrolle ohne Spule	1 (11,32%)	2 (33,33%)	3 (38,97%)
Kontrolle mit Spule	4 (33,89%)	5 (35,05%)	6 (24,24%)

Tab.8, Auflistung der Ki-67 positiv gefärbten (proliferierenden) HeLA-Zellen (Angabe in Prozent)



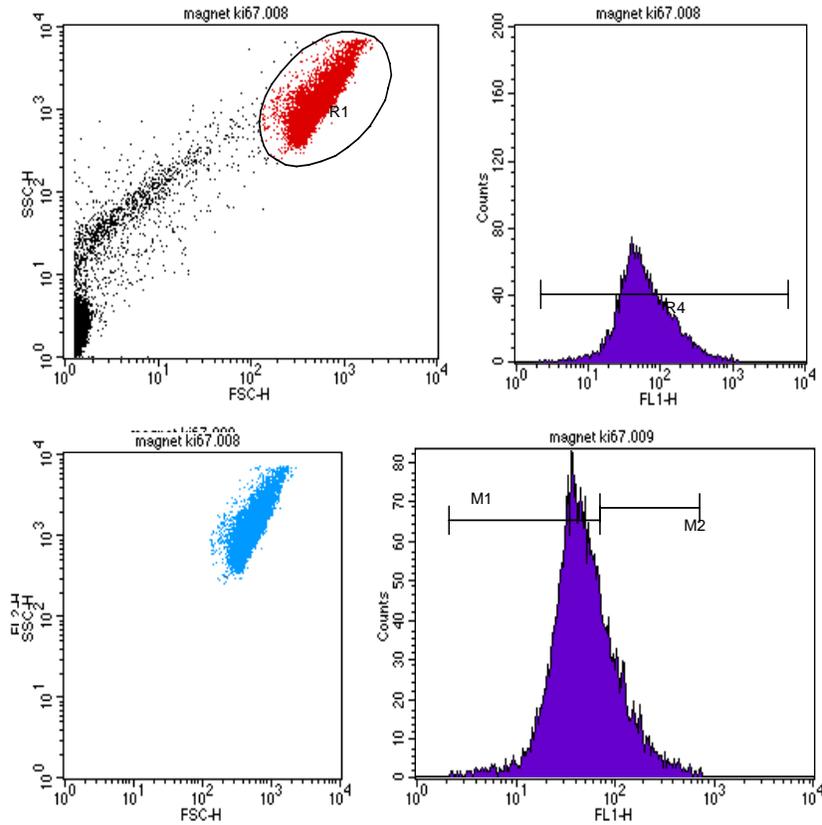
Histogram Statistics

File: magnet ki67.001 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: A Patient ID: bestrahlt
 Tube: Panel:
 Acquisition Date: 21-Sep-04 Gate: G4
 Gated Events: 9999 Total Events: 18359
 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 991C	9999	100.00	54.46	79.96	63.28	77.91	60.43	45
M1	2, 72	5914	59.15	32.21	43.65	40.39	34.39	44.11	45
M2	72, 73C	4126	41.26	22.47	131.54	120.44	49.36	111.40	77

Abb. 16, Beispiel der FACS-Analyse der Proliferationsrate der HeLa-Zellen aus der Gruppe Bestrahlt (hier Sample A) durch Anfärbung mit dem Ki-67-Fluoreszenzfarbstoff nach 72 h

(M1: Ki-67 negative HeLa-Zellen, M2 : Ki-67 positive HeLa-Zellen)



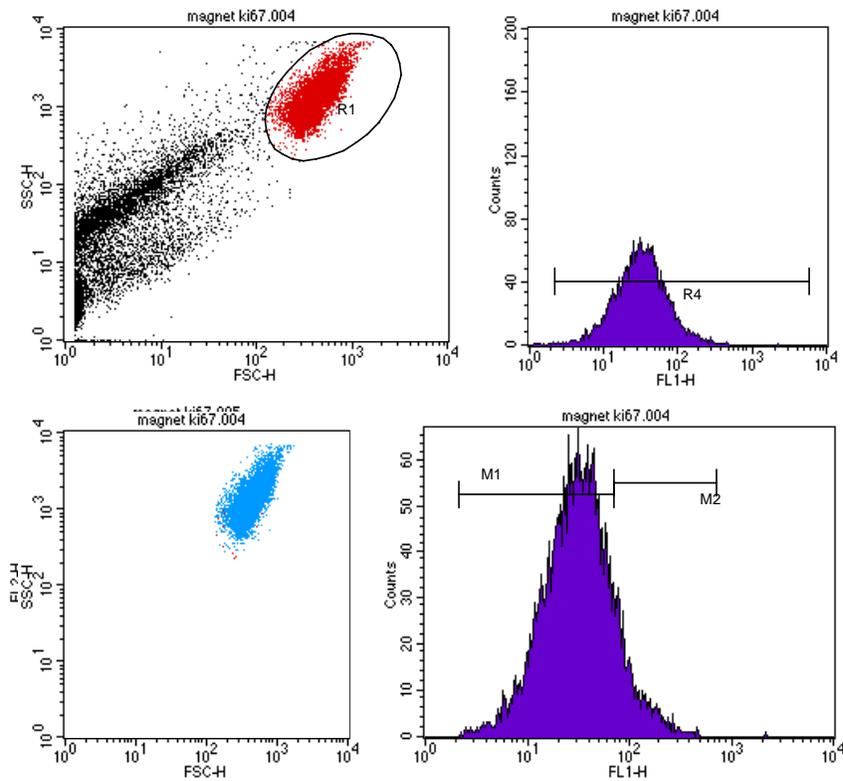
Histogram Statistic

File: magnet ki67.009 Log Data Units: Linear Values
 Sample ID: 6 Patient ID: nicht bestrahlt mit S_i
 Tube: Panel:
 Acquisition Date: 21-Sep-04 Gate: G4
 Gated Events: 9990 Total Events: 15279
 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left	Right	Events	% Gate	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak	CI
All	1	991	9990	100.00	65.38	61.72	47.97	92.50	45.32	35	
M1	2	7	7604	76.12	49.77	39.38	36.07	38.34	37.86	35	
M2	72	73	2422	24.24	15.85	132.00	118.08	59.78	104.60	83	

Abb. 17, Beispiel der FACS-Analyse der Proliferationsrate der HeLa-Zellen aus der Gruppe (6) ohne Bestrahlung unter Spule durch Anfärbung mit dem Ki-67-Fluoreszenzfarbstoff nach 72 h

(M1: Ki-67 negative HeLa-Zellen, M2 : Ki-67 positive HeLa-Zellen)



Histogram Statistics

File: magnet ki67.004
 Sample ID: 1
 Tube:
 Acquisition Date: 21-Sep-04
 Gated Events: 9971
 X Parameter: FL1-H (Log)

Log Data Units: Linear Value:
 Patient ID: nicht bestrahlt
 Panel:
 Gate: G4
 Total Events: 17050

Marker	Left	Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1	9910	9971	100.00	58.48	40.36	30.75	101.61	31.06	30
M1	2	73	8861	88.87	51.97	30.76	26.31	52.01	28.39	30
M2	72	73C	1129	11.32	6.62	114.41	105.86	47.83	94.75	74

Abb. 18, Beispiel der FACS-Analyse der Proliferationsrate der HeLa-Zellen aus der Gruppe (1) ohne Bestrahlung ohne Spule durch Anfärbung mit dem Ki-67-Fluoreszenzfarbstoff nach 72 h

(M1: Ki-67 negative HeLa-Zellen, M2 : Ki-67 positive HeLa-Zellen)

3.2.2. Bestimmung der Apoptoserate

Die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate der HeLa-Zellen wurde nach 72h vorgenommen und mit dem Fluoreszenz markierten Annexin V-Antikörper am FACScan durchgeführt (siehe 2.3.4.). Die Ergebnisse zeigen keine signifikante Erhöhung der Apoptoserate bei den bestrahlten Zellen gegenüber den nicht bestrahlten (siehe Tab. 9). Im folgenden sind Histogrammbeispiele zur Annexin V Messung aufgeführt (Abb. 19, 20 und 21). In Abb. 21 ist das Histogramm des Samples B (Gruppe: Bestrahlt) dargestellt, es zeigt einen Anteil der gefärbten HeLa-Zellen von 4,69%, was der Apoptoserate entspricht. Bei der Messung des Samples 6 (Gruppe: nicht bestrahlt mit Spule) liegt der Anteil der apoptotischen Zellen bei 8,0% (siehe Abb. 20) und bei Sample 3 (Gruppe: nicht bestrahlt ohne Spule) bei 5,81%.

Gruppe	Sample (Apoptose)	Sample (Apoptose)	Sample (Apoptose)
Bestrahlt	A (5,55%)	B (4,69%)	C (4,60)
Kontrolle ohne Spule	1 (4,23%)	2 (6,97%)	3 (5,81%)
Kontrolle mit Spule	4 (5,26%)	5 (9,57%)	6 (8,0%)

Tab. 9, Auflistung der Annexin V-angefärbten (apoptotischen) HeLa-Zellen (Angabe in Prozent)

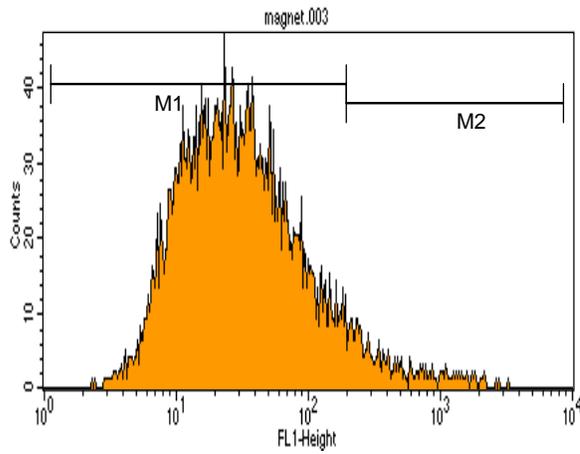


Abb. 19, Annexin V Messung, Sample: Kontrolle 3, ohne Spule (nicht bestrahlt)

(M1: Annexin V negative HeLa-Zellen, M2 : Annexin V positive HeLa-Zellen)

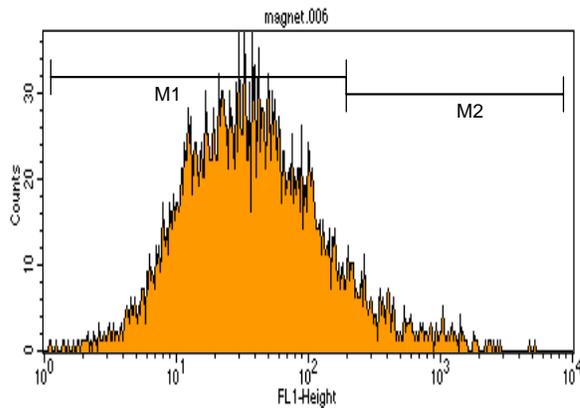


Abb. 20, Annexin V Messung, Sample: Kontrolle 6, mit Spule (nicht bestrahlt)

(M1 : Annexin V negativ gefärbte HeLa-Zellen, M2 : Annexin V positive HeLa-Zellen)

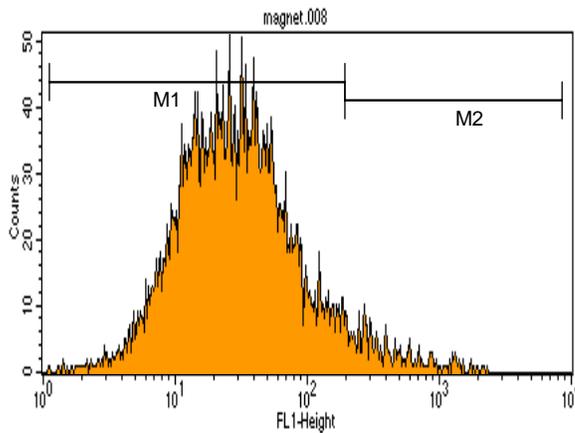


Abb. 21, Annexin V Messung, Sample: B (bestrahlt)

(M1: Annexin V negativ gefärbte HeLa-Zellen, M2: Annexin V positiv gefärbte HeLa-Zellen)

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1. *In - vitro* Modell :

Das Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss schwebender Magnetwellen auf HeLa-Zellen, die aufgrund der guten Reproduzierbarkeit und Kultivierbarkeit ausgewählt wurden, nach unterschiedlichen Bestrahlungszeiten und Frequenzen zu prüfen. Des Weiteren sollte für diese Fragestellung ein standardisiertes Verfahren entwickelt werden, da es auf diesem Gebiet bisher keine Grundlagenforschung gibt. Außerdem wurden Apoptose- und Proliferationsrate der bestrahlten Zellen und der Kontrollen untersucht.

Die Apoptose, die den Zelltod steuert, ist charakterisiert durch morphologische Veränderungen, wie „Schrumpfen“ des Zytoplasmas und Aufbrechen des Zellkerns (Karyohexis), die Zerstörung des Zytoskeletes durch „Zelltod – Proteasen“ und durch das „Budding“ – Phänomen, bei dem vor der Zerstörung des Zytoskeletes Pseudopodien ausgebildet werden (C. B. Thompson, 1995). Der Apoptoseablauf unterliegt der Regulation anderer Zellen. Diese Zellen senden „Tötungs – oder Überlebenssignale“ aus (siehe 1.6.) . Durch diese Signale kann das Apoptoseprogramm sowohl aktiviert, als auch inhibiert werden (D. F. Mangan, S. M. Wahl, 1991, M. Raff, 1992). Aus diesen Erkenntnissen ergibt sich die Notwendigkeit, möglichst reine Zelllinien zu untersuchen, damit unkontrollierte Interaktionen zwischen den zu untersuchenden Zellen unterbunden werden. Problematisch gestaltet sich allerdings die Erhaltung einer so reinen Zellkultur, da das natürliche Umfeld der Zellen nicht mehr gegeben ist und physiologische Interaktionen der Zellen ebenso nicht mehr stattfinden. Es unterbleiben somit nicht nur die störenden Interaktionen, sondern auch die lebenserhaltenden (G. Hodge et al., 2000).

Für diese Arbeit verwendeten wir die Tumorzelllinie HeLa S3 (siehe 1.4. und 2.1.1.).

4.1.2. Durchflusszytometrie, Apoptose und Proliferation :

Um die Apoptoserate und den Proliferationsindex der bestrahlten Zellen und der Kontrollen zu bestimmen, wurde die Durchflusszytometrie angewandt.

Zur Bestimmung der Apoptoserate in der frühen Phase ist die Durchflusszytometrie (mit Annexin V) gut geeignet, da man apoptotische von nekrotischen Zellen differenzieren und quantifizieren kann (siehe 2.3.4.) (Vermees et al.,1995).

Um die apoptotischen HeLa – Zellen in der Messung zu erfassen, wurde FITC – konjugiertes Annexin V eingesetzt (siehe 2.3.4.). Dieses Calcium – abhängige Phospholipidbindungsprotein hat eine hohe Affinität zu Phosphatidylserin, das in der frühen Phase des Apoptosevorgangs von der inneren zur äußeren Zellmembranseite transloziert wird. Die Zellmembran ist zu diesem frühen Zeitpunkt der Apoptose noch unversehrt (Darzynkiewicz et al., 1997, van Engeland et al., 1998). Es kann aber auch

Annexin an Phosphatidylserin binden, das von nekrotischen Zellen stammt, deren Zellmembran defekt ist. Dies führt zu einem „falsch positiven“ Ergebnis. Es wurde deshalb Propidiumjodid eingesetzt, ein Farbindikator für die DNA im Zellkern. Durch diese Methode kann die Unversehrtheit der Zellmembran nachgewiesen werden.

Wir bestimmten die Zellproliferation mit dem monoklonalen Antikörper Ki-67, der an das humane Ki-67 Antigen bindet, welches sich im Zellkern proliferierender Zellen befindet (siehe 2.3.3.). In der Ruhephase des Zellzyklus wird kein Ki-67 Antigen gebildet (Gerdes et al., 1984). Für die Messung der Proliferation mittels Durchflusszytometrie werden die Zellen permeabilisiert und fixiert, damit die monoklonalen Ki-67 Antikörper in den Zellkern gelangen können.

4.1.3 Wachstumsbestimmung mit Alamar Blue :

Die Untersuchung der Wachstumsreduktion mittels Alamar Blue Assay (Fa. Biosource, USA) ist ein gut zu reproduzierendes Verfahren (siehe 2.3.2.), da die Menge des Farbwachstumsindikators genau abgemessen und der Zellsuspension zugeführt werden kann. Die optimale Verteilung des Alamar Blue Assay in der Zellsuspension wird schon durch einmaliges Schwenken der Zellschale erreicht und ist somit ebenfalls bei jeder Messreihe identisch. Alamar Blue kann ebenso zur quantitativen Proliferationsbestimmung von verschiedenen menschlichen- und tierischen Zelllinien, wie auch von Pilz- und Bakterienkulturen verwendet werden (Fields and Lancaster, 1993).

4.1.4. Bestrahlung :

Es ist bei der Entwicklung der Methode darauf geachtet worden, durch Nachbesserungen die Stör- und Fehlerquellen abzustellen und eine reproduzierbare Methode zu entwickeln. Zum einen gab es Probleme mit der unter Hochspannung stehenden Spule, bei der es durch die Feuchtigkeit im Inkubator zu Kurzschlüssen kam. Es wurde eine feuchtigkeitsundurchlässige Isolation des Kabels, durch eine mehrfache Beschichtung mit Klebstoff (Fa. Henkel) und die Ummantelung mit Gummischläuchen erreicht und somit

diese Fehlerquelle eliminiert. Die Spule hat eine Grösse, die es uns erlaubt, sogar mehrere in den Inkubatorschrank zu stellen. Der Versuchsaufbau (siehe 2.2. und 2.3.) ist eine kostengünstige und gut strukturierte Methode, um die Zielsetzung dieser Arbeit zu verfolgen.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Am häufigsten und damit am besten untersucht ist der Frequenzparameter 60,3 Hz, welchen wir ebenso wie die übrigen Frequenzparameter mit zwei verschiedenen Stromstärken (85 mA und 250 mA) gemessen haben. Bei einzelnen Messungen zeigte sich eine deutliche Beeinflussung (Verringerung) der Wachstumsraten der verwendeten Tumorzelllinie (HeLa S3), wobei die höhere Stromstärke auch eindeutig eine höhere Wirkung zeigte („dosisabhängig“). Diese Erkenntnis bestätigt die Ergebnisse eines Tests mit der Bestrahlung von Leuchtbakterien (J. Axmann, Fa. Graviton, Berlin, 2003), der eine Wachstumsreduktion bei diesem Frequenzfenster beobachtete. Die regelmäßige Reproduzierbarkeit dieses hemmenden Einflusses der Bestrahlung auf das Wachstumsverhalten der HeLa-Zellen war allerdings nicht möglich.

Um den Einfluss der Hochspannung auf das Zellwachstum zu prüfen, wurde eine Messreihe ohne angelegte Hochspannung (nur mit 50V) durchgeführt (siehe Abb. 7). Da die Ergebnisse aller Gruppen in den Tagen 1 bis 3 keine signifikanten Unterschiede zeigten, am 4. Tag allerdings das Wachstum der Gruppe „Bestrahlt“ gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt ist, bleibt zu klären, ob das Wachstum hochspannungsabhängig ist. Wahrscheinlich begründet sich das Messergebnis des Tages 4 auf das generell hohe Wachstum der Zellen zu diesem späten Zeitpunkt der Messungen.

Signifikante Änderungen wurden bei der Frequenz $\Delta f = 60,3$ Hz, 85 mA und 5,6kV gemessen. Die Gruppe „Bestrahlt“ zeigt am Tag 4 bei den Zweistundenwerten eine höchst signifikante Wachstumsreduktion (p-Wert: 0,001). Bei den Vierstundenwerten wurde auch eine signifikante Reduktion gemessen (p-Wert: 0,003 und 0,005). Bei der Frequenz

$\Delta f = 51$ Hz, 85 mA und 5,6 kV wurde allerdings am Tag 3 bei den Zwei- und Vierstundenwerten eine signifikante Wachstumsreduktion der Kontrolle im Vergleich zu den bestrahlten Zellen gemessen (p-Wert: 0,05 (2h) und 0,05 (4h)). Gegensätzliche signifikante Änderungen fanden sich bei der Frequenz $\Delta f = 42,7$ Hz, 85 mA und 5,6 kV. Am Tag 3 zum Zeitpunkt 4h war das Wachstum der Kontrollgruppe im Gegensatz zur Gruppe „Bestrahlt“ signifikant erniedrigt (p-Wert: 0,05) und am Tag 4 zum Zeitpunkt 2h das Wachstum der Gruppe „Bestrahlt“ gegenüber der Gruppe Kontrolle (p-Wert: 0,05).

Die hohe Schwankung von Experiment zu Experiment spiegelt sich in der hohen Standardabweichung wieder und ist kritisch zu betrachten. Die genaue Ursache dafür ist unbekannt. Verantwortlich hierfür könnte die schwer reproduzierbare Anzahl von Zellen pro Schale, sowie die damit verbundene nicht – vorkonfluente Besiedelung der Schalen sein. In Zukunft sollte die Zellzahlschwankung durch ein weiterentwickeltes standardisiertes Verfahren weitgehend ausgeschlossen werden können. Ebenso sollte die Erweiterung der Geräte um weitere Spulen (Bestrahlungsgeräte) erwogen werden, um möglichst viele Parameter parallel untersuchen zu können.

Ausblick : Es gibt bisher keine experimentellen Daten zu Auswirkungen eines Magnetfeldes auf humane Tumorzellkulturen in Petrischalen. In dieser Grundlagenstudie ist es gelungen, ein Modell zu installieren, das hemmende Frequenzen mit unterschiedlicher Wirkung auf humane Zellen mit Ergebnissen untersucht. Zellwachstumshemmende Frequenzen zu finden, ist generell schwieriger, als wachstumsstimulierende, da es weniger hemmende Frequenzfenster gibt. Dies zeigt sich an Studien, die Magnetwellen nutzen, um z.B. unreife Knochenzellen schneller zu „erwachsenen“ Knochenzellen ausreifen zu lassen. Ebenso konnte dies bei Studien mit Bakterienkulturen, die sich als geeigneter für die Bestrahlung zeigten, nachgewiesen werden. Es sollten weitere Frequenzparameter auf ihre Wirkung auf das Wachstumsverhalten der Zelllinie untersucht werden, da in dieser Studie die ideale Frequenz noch nicht gefunden wurde. Ebenso kann die Untersuchung interessanter Frequenzparameter fortgeführt werden (z.B. 60,3 Hz, 250 mA und 85 mA, 5,6 kV). Der Einsatz anderer Zelllinien, z.B. Fibroblasten oder Lymphozyten, ist ebenfalls denkbar, da je nach Zelllinie eine gewünschte Wachstumsreduktion oder Wachstumsproliferation

erzielt werden könnte. Weitere Parameter, zB. Cytokinproduktion, können untersucht werden, um herauszufinden, wie sich die Bestrahlung auf molekularer Ebene auswirkt.

5. Zusammenfassung

Die zur Bestrahlung der HeLa-Zellen verwendeten schwebenden Magnetwellen (Δf), entstehen aus sich überlagernden Sinusschwingungen unterschiedlicher Frequenz (f_1 und f_2) in einer Magnetspule. Das schwebende Magnetfeld erhält durch das Anlegen einer statischen Hochspannung an einer isolierten Platte nahe der Spule einen „elektrischen Vektor“. Die verwendeten „Frequenzfenster“ entsprechen denjenigen aus einer Studie der Firma Graviton, die Hemmversuche mit Pilzkulturen durchgeführt hat (J. Axmann, Fa. Graviton, Berlin, 2003). Die Intention für die Bestrahlung von Tumorzellen liegt darin begründet, ein neues Verfahren zur Wachstumskontrolle von Zellen zu finden. Aktuell bestehen mehrere Möglichkeiten der elektromagnetischen Tumorbestrahlung. Da bei den heutzutage eingesetzten Verfahren in der Strahlentherapie einige Behandlungsrisiken, Nebenwirkungen und Komplikationen bestehen, ist es unter Umständen möglich, eine Therapieform zu entwickeln, die schonender für den Patienten ist.

Der Versuchsaufbau ist so konzipiert, dass jeweils drei Zellkulturschalen mit HeLa-Zellen in der Spule (mit angelegter Frequenz und Hochspannung) 72 Stunden bestrahlt werden, während sechs weitere Petrischalen als nicht bestrahlte Kontrollen dienen. Von den Kontrollschalen stehen drei unter einer baugleichen Spule, allerdings ohne angelegte Spannung und drei stehen „frei“ (ohne Einfluss einer Spule). Zusätzlich wurden für die Zellproliferations- und Apoptosemessung noch zwei Meßkorrekturschalen hinzugefügt. Das Zellwachstum wurde mittels Alamar Blue Assay (Fa. Biosource, USA) als Farbwachstumsindikator durchgeführt. Zum Zeitpunkt des Zellansatzes, nach zwei, vier und sechs Stunden wurden Aliquats entnommen und im Photometer die Extinktionen gemessen. Die Zellproliferation ist mittels des monoklonalen Antikörpers Ki-67 im FAC SCAN bestimmt worden.

Die Ergebnisse der Zellwachstums- und der Zellproliferationsbestimmungen zeigen leider wenige Tendenzen und Signifikanzen, ebenso wie die Bestimmung der Apoptoserate. Im Folgenden sind Ergebnisse aus der Zellwachstumsmessung mit Alamar Blue Assay aufgeführt.

Um die Auswirkungen der Spule auf die Zellen ohne angelegte Hochspannung zu ermitteln, wurde mit 50 Volt, statt mit 5,6 kV gemessen. Aus der Auswertung ist ersichtlich, dass am vierten Tag der Kontrollmessung ohne Hochspannung mit der Frequenz 60,3 Hz, der Stromstärke 250 mA und 50 Volt Spannung das Wachstum der Gruppe „Bestrahlung“ gegenüber der Kontrolle signifikant erniedrigt ist. Die Zweistundenwerte der Frequenz 60,3 Hz, der Stromstärke 85 mA und 5.6 kV, der Tage 1-4, die an Tag 4 zeigen eine signifikante Erniedrigung des Wachstums der Gruppe „Bestrahlt“.

Bei der Messreihe mit der Frequenz (Δf) 60,3 Hz, einer Stromstärke von 85 mA ist das Zellwachstum der Gruppe „Kontrolle“ im Vergleich zur Gruppe „Bestrahlt“ an Tag 3 bei den Zwei- und Vierstundenwerten signifikant erniedrigt. Bei der Messung der Frequenz 42,7 Hz, 85 mA und 5,6 kV zeigt sich an den Vierstundenwerten des dritten Tages, dass hier die Gruppe „Kontrolle“ im Zellwachstum signifikant erniedrigt ist im Vergleich zur Gruppe „Bestrahlt“.

Als Ergebnis dieser Arbeit lässt sich festhalten, dass die verschiedenen „Frequenzfenster“ (verschiedene Frequenzen, Stromstärken und Spannungen) vereinzelt Signifikanzen im Hinblick auf die erhoffte Wachstumsreduktion der HeLa-Zellen lieferten. Vor allem zeigten vereinzelte Wochenmessungen mit der Frequenz $\Delta f = 60,3 \text{ HZ}$ und 250mA eine deutlich hemmende Wirkung auf das Wachstumsverhalten der HeLa-Zellen.

Folgestudien sind nötig, um die Bedeutung der Daten weiter zu verifizieren. So könnte man weitere Frequenzfenster in ihrem Einfluss auf das Wachstumsverhalten von HeLa-Zellen untersuchen. Das Messverfahren kann weiterentwickelt werden um eine noch geringere Zellzahlschwankung zu ermöglichen. Eine klinische Verwertbarkeit erscheint auf Grund der vorliegenden Ergebnisse nicht ausgeschlossen.

6. Literaturnachweis

B. Alberts, D. Bray, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter : Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 2. korrigierte Auflage, WILEY-VCH

J. Axmann, 2003 : Pilzhemmversuche, Persönliche Mitteilung

C.S. Brown, F.W. Ling, J.Y. Wang, A.A. Pilla, 2002 : Efficacy of static magnetic field therapy in chronic pelvic pain: a double-blind pilot study (Am J Obstet Gynecol. 2002 Dec;187(6):1581-7)

Z. Darzynkiewicz, G. Juan, W. Gorczyca, T. Murakami, F. Traganos, 1997: Cytometry in Cell Necrobiology : Analysis of Apoptosis and Accidental Cell Death (Cytometry 27 : 1 – 20)

N.K. Eccles, H. Hollinworth, 2006 : A pilot study to determine whether a static magnetic device can promote chronic leg ulcer healing (J Wound care. 2006 May;15(5):208;author reply 208-9;discussion 209-10)

E. Endl, C. Hollman, J. Gerdes, 2001 : Antibodies against the Ki-67 Protein : Assessment of the Growth Fraction and Tools for Cell cycle Analysis (*Meth Cell Biol* 63: 399 – 418)

M. van Engeland, L.-J. Nieland, F.-C. Ramaekers, B. Schutte, C.-P. Reutelingsperger, 1998 : Annexin V-affinity assay : a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure (Cytometry 31: 1-9)

R. D. Fields, M. V. Lancaster, 1993 : Dual attribute continuous monitoring of cell proliferation/toxicity. American Biotechnology Laboratory : 11 (4) 48-50

J. Gerdes, H. Lemke, H. Baisch, H.-H. Wacker, U. Schwab, H. Stein, 1984 : Cell cycle Analysis of a cell Proliferation-associated human nuclear Antigen defined by the monoclonal Antibody Ki-67 (*J Immunology* 133 : 1710 – 15)

M. S. George, 1995 : Neuro Report 6, 1995, 1853

M.R. Hinman, J. Ford, H. Heyl, 2002 : Effects of static magnets on chronic knee pain and physical function: a double-blind study (Altern Ther Health Med. 2002 Jul-Aug; 8(4): 50-5)

G. Hodge, S. Hodge, P. Han, 2000 : Increased levels of apoptosis of leukocyte subsets in cultured PBMC`s compared to whole blood as shown by annexin – V binding : relevance to cytokine production (Cytokine 12 (12) : 1763 – 1768)

<http://de.wikipedia.org/wiki/HeLa-Zellen>

M. V. Lancaster, and R. D. Fields, 1996 : Antibiotic and Cytotoxic Drug Susceptibility Assays using Resazurin and Poising Agents, Biosource Alamar Blue Assay Product Description, U.S. Patent No. 5,501,959

G. Löffler : Replikation und Gentechnik, Apoptose oder der programmierte Zelltod, G. Löffler, P. E. Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, 1975, Berlin : Springer Verlag, 6. Auflage, 1998

D. F. Mangan, S. M. Wahl, 1991 : Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro – inflammatory cytokines (J Immunol 147 (10) : 3408 – 3412)

M. Raff , 1992 : Social controls on cell survival and cell death (Nature 356 : 397 – 400)

U.-N. Riede, H.-E. Schaefer : Allgemeine und spezielle Pathologie, 4. Auflage, Thieme, 1999

Rolf Sauer, 2003 : Strahlentherapie und Onkologie, 4. Auflage, Urban & Fischer

C. Schlüter, M. Duchrow, C. Wohlenberg, M. Becker, G. Key, H. Flad, J. Gerdes, 1993 : The cell proliferation – associated antigen of antibody Ki – 67 : a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cyclemaintaining proteins (J Cell Biol 123 (3) : 513 – 522)

N.A. Segal, et al., 2002 : Two configurations of static magnetic fields for treating rheumatoid arthritis of the knee: a double-blind clinical trial (Arch Phys Med Rehabil. 2002 Jan;83(1):144)

J. K. Szor, P. Holewinski, 2002 : Lessons learned in research: an attempt to study the effects of magnetic therapy (Ostomy Wound Manage 2002 Feb;48(2):24-9)

W. Telford, L. E. King, P. J. Fraker, 1998 : Simultaneous analysis of DNA content and surface immunophenotype using gentle ethanol fixation techniques (J. P. Robinson , Hirschgraben Verlag : Purdue Cytometrie CD-Rom Series 4, Purdue University Cytometry Laboratories, West Lafayette, USA)

C. B. Thompson, 1995 : Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease (Science 267 : 1456 – 1462)

R. Verheijen, H.J. Kuijpers, R.O. Schlingemann, A.L. Boehmer, R. van Driel, G.J. Brakenhoff, F.C. Ramaekers, 1989 : Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. Intracellular localization during interphase (J Cell Sci, **92**: 123-130)

I Vermes, H. Clemens, H. Steffens-Nakken, C.-P. Reutelingsperger, 1994 : A novel Assay for apoptosis : Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V (J Immunol Meth 184 : 39-51)

M. H. Winemiller, R. G. Billow, E. R. Laskowski, W. S. Harmsen, 2005 : Effect of magnetic vs. sham-magnetic insoles on non-specific foot pain in the workplace

M. I. Weintraub, 1999 : Am J Pain Manage 9, 1999, 8

M.I. Weintraub, G.I. Wolfe, R.A. Barohn et al., 2003 : Static magnetic field therapy for symptomatic diabetic neuropathy (Arch Phys Med Rehabil, 84 (5):736-46)

M.I. Weintraub, S.P. Cole, 2004 : Pulsed magnetic field therapy in refractory neuropathic pain secondary to peripheral neuropathy: electrodiagnostic parameters- pilot study (Neurorehabil Neural Repair.2004 Mar;18(1):42-6)

P.M. Wolsko et al., 2004 : Double-blind placebo-controlled trial of static magnets for the treatment of osteoarthritis of the knee: results of a pilot study (Altern Ther Health Med, 2004 Mar-Apr;10(2):36-43)

J. Zittlau, 2001 : Magnettherapie – da scheint wirklich was dran zu sein (Ärztezeitung, 05.02.2001)

J.H. van Dierendonck, RKeijzer, C.J. van de Velde, C.J. Cornelisse, 1989: Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells (Cancer Res, 49: 2999-3006)

Annexin V – FITC apoptosis detection kit I, Fa. BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Product – information, 2001

7. Abkürzungen

Δ : Delta

μ : mikro

% : Prozent

°C : Grad Celsius

Abb. : Abbildung

Cdk. : Cydin depend. Kinase

CO₂ : Kohlenstoffdioxid

DNS : Desoxyribonukleinsäure

f : Frequenz

Fa. : Firma

FITC : Fluorescein Iso Thio Cyanat

G₀ : Gap 0-Phase (Ruhephase)

G₁ : Gap 1-Phase (Wachstumsphase)

HPV : humanes Papillomavirus

Hz : Hertz

kV : Kilovolt

l : Liter

mA : Milliampere

MHz : Megahertz

ml : Milliliter

n : Anzahl

nm : Nanometer

Rb : Retinoblastoma

Tab. : Tabelle

Vergl. : Vergleich

8. Anhang

8.1. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 : Geräteaufbau (schematisch), Seite 16

Abb. 2 : Geräteaufbau zur Erzeugung von schwebenden Magnetwellen, Seite 17

Abb. 3 : Aufbau der zu bestrahlenden Petrischalen in der Spule, Seite 18

Abb. 4 : Aufbau : Kontrollschälchen und Kontrollschälchen in der Spule, Seite 19

Abb. 5. : Alamar Blue Assay Absorbtion, Seite 20

Abb. 6, Annexin V-Färbung (schematisch), Seite 24

Abb. 7 : Vierstundenwerte (Extinktionsbestimmungen 4h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 60,3 Hz, der Stromstärke 250 mA und 50 Volt Spannung (ohne angelegte Hochspannung), Seite 26

Abb. 8 : Zweistundenwerte (Extinktionsbestimmungen 2h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 60,3 Hz, der Stromstärke 250 mA und 5.6 kV, Seite 27

Abb. 9 : Vierstundenwerte (Extinktionsbestimmungen 4h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 60,3 Hz, der Stromstärke 250 mA und 5.6 kV, Seite 28

Abb. 10 : Zweistundenwerte (Extinktionsbestimmungen 2h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 60,3 Hz, der Stromstärke 85 mA und 5.6 kV, Seite 29

Abb. 11 : Vierstundenwerte (Extinktionsbestimmungen 4h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 60,3 Hz, der Stromstärke 85 mA und 5.6 kV, Seite 29

Abb. 12 : Zweistundenwerte (Extinktionsbestimmungen 2h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 51 Hz, der Stromstärke 85 mA und 5.6 kV, Seite 30

Abb. 13 : Vierstundenwerte (Extinktionsbestimmungen 4h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 51 Hz, der Stromstärke 85 mA und 5.6 kV, Seite 31

Abb. 14 : Zweistundenwerte (Extinktionsbestimmungen 2h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 42,7 Hz, der Stromstärke 85 mA und 5.6 kV, Seite 32

Abb. 15 : Vierstundenwerte (Extinktionsbestimmungen 4h nach Zugabe von Alamar Blue) an den Tagen 1-4 der Messreihe unter der Bestrahlung mit der Frequenz 42,7 Hz, der Stromstärke 85 mA und 5.6 kV, Seite 32

Abb. 16 : Beispiel der FACS-Analyse der Proliferationsrate der HeLa-Zellen aus der Gruppe Bestrahlt (hier Sample A) durch Anfärbung mit dem Ki-67-Fluoreszenzfarbstoff nach 72 h, Seite 35

Abb. 17 : Beispiel der FACS-Analyse der Proliferationsrate der HeLa-Zellen aus der Gruppe (6) ohne Bestrahlung unter Spule durch Anfärbung mit dem Ki-67-Fluoreszenzfarbstoff nach 72 h, Seite 36

Abb. 18 : Beispiel der FACS-Analyse der Proliferationsrate der HeLa-Zellen aus der Gruppe (1) ohne Bestrahlung ohne Spule durch Anfärbung mit dem Ki-67-Fluoreszenzfarbstoff nach 72 h, Seite 37

Abb. 19 : Annexin V Messung, Sample: Kontrolle 3, ohne Spule (nicht bestrahlt), Seite 39

Abb. 20 : Annexin V Messung, Sample: Kontrolle 6, mit Spule (nicht bestrahlt), Seite 39

Abb. 21 : Annexin V Messung, Sample: B (bestrahlt), Seite 40

8.2. Tabellenverzeichnis

Tab. 1 : Beimpfen der Flaschen, Seite 13

Tab. 2 : Frequenzparameter, Seite 16

Tab. 3 : Übersicht Messreihe, Seite 21

Tab. 4 : Signifikanzen (p-Werte) der Frequenz (Δf) 60,3 Hz, 250 mA, 5,6 kV, Seite 27

Tab. 5 : Signifikanzen und Tendenzen (p-Werte) der Frequenz (Δf) 60,3 Hz, 85 mA, 5,6 kV, Seite 28

Tab. 6 und 7: Standardabweichungen der vierten Messtage, Seite 33

Tab. 8 : Auflistung der Ki-67 positiv angefärbten (proliferierenden) HeLa-Zellen (Angabe in Prozent), Seite 34

Tab. 9 : Auflistung der Annexin V positiv angefärbten (apoptotischen) HeLa-Zellen (Angabe in Prozent), Seite 38

8.3. Materialien

- HeLa-Medium :

450ml DMEM-Medium (inkl. 5ml L-Glutamin)

+ 50ml inakt. FKS

+ 5ml 25% Glucose

+ 5ml Pen- Streptomycin

+ 3ml 1MOL Hepes

(+ 1ml Geniticin)

- Alamar Blue Medium :

Dubeccos Medium without Phenol Red

+ 50ml FKS

+ 5ml L-Glutamin

+ 5ml Pen- Streptomycin

+ 5ml Glucose

+ 3ml Hepes

- Trypsin :

Trypsin / EDTA (1x) (Fa. PAA, Pasching, Deutschland)

0,5g Trypsin (1:250) per Lit, in PBS (1x)

0,2g EDTA per Lit, -20°C

- FKS :

Fetal Bovine Serum (inaktiv gefroren)

- PBS :

Dulbeccos PBS (1x), without Ca + Mg

- DMEM :

Low Glucose (1x), with L-Glutamine (Endotoxin Tested, Sterile
Filtered)

8.4. Geräte

- Becton Dickinson FACS-Röhrchen
- Hameg, Programmable Funktion Generator HM 8130
- Hettich Zentrifugen, Rotanta 46 RS
- Kendro Laboratory Products, Inkubator CO₂-Auto-Zero, Heraeus
- Kenwood, HiFi- Verstärker, KA – 660 D
- logo electron, 10 kV Generator
- Magnetspule, Firma Graviton, Berlin
- Voltcraft, Oszilloskop 622 FG, 20 MHz

8.4.1. Software

-CellQuest Version 3.2 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

-SPSS Version 13.0 (Fa. SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

8.5. Statistik

8.5.1. Frequenz 43 Herz mit der Stromstärke 85mA

Tag 1 und 2, Gruppe Bestrahlt (a-c):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
a-c N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	-,0091	25,8437	56,8101	69,0145	2,8564	71,5864	77,9805	66,0816
Standardabweichung	,48600	3,88487	5,18414	10,73408	2,17216	2,10671	1,16956	37,17925
Minimum	-,56	21,42	51,17	56,70	,83	69,63	76,64	23,22
Maximum	,35	28,69	61,36	76,36	5,15	73,82	78,81	89,61
Perzentile 25	-,5612	21,4185	51,1657	56,6962	,8262	69,6281	76,6424	23,2194
Perzentile 50	,1801	27,4192	57,9059	73,9838	2,5959	71,3157	78,4916	85,4116
Perzentile 75	,3538	28,6933	61,3588	76,3634	5,1471	73,8154	78,8076	89,6140

Tag 1 und 2, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
k1-k3 N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	,2969	26,8169	53,0643	61,4015	1,7312	65,3581	74,0509	81,9231
Standardabweichung	,19052	7,02453	7,79677	5,20001	,03056	6,51835	4,33234	5,07025
Minimum	,09	18,87	44,45	56,06	1,70	57,88	69,16	76,47
Maximum	,47	32,21	59,64	66,45	1,76	69,80	77,41	86,49
Perzentile 25	,0913	18,8735	44,4497	56,0617	1,7019	57,8755	69,1611	76,4654
Perzentile 50	,3318	29,3669	55,1062	61,6932	1,7288	68,3948	75,5812	82,8167
Perzentile 75	,4675	32,2102	59,6369	66,4494	1,7629	69,8040	77,4105	86,4871

Tag 3 und 4, Gruppe Bestrahlt (a-c):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
a-c N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	4,9458	71,4798	95,3041	104,7693	1,9410	70,0872	90,5879	84,8650

Standardabweichung	1,82828	4,64327	3,94665	4,65887	,62091	5,43894	5,03194	9,00023
Minimum	2,89	66,13	90,75	99,57	1,23	64,03	86,02	78,94
Maximum	6,40	74,41	97,61	108,55	2,39	74,56	95,98	95,22
Perzentile 25	2,8934	66,1261	90,7471	99,5650	1,2323	64,0339	86,0192	78,9388
Perzentile 50	5,5439	73,9056	97,5504	106,1918	2,2011	71,6644	89,7633	80,4344
Perzentile 75	6,4001	74,4078	97,6149	108,5511	2,3895	74,5632	95,9812	95,2216

Tag 3 und 4, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
k1-k3 N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	3,3182	67,4899	85,3283	93,2504	2,5545	82,0494	92,5712	93,0928
Standardabweichung	,35505	4,55681	2,82117	5,59895	,30335	2,80700	,31488	,64416
Minimum	2,91	64,62	82,74	87,67	2,29	79,63	92,26	92,35
Maximum	3,55	72,74	88,34	98,87	2,89	85,13	92,89	93,52
Perzentile 25	2,9095	64,6203	82,7445	87,6685	2,2910	79,6314	92,2614	92,3520
Perzentile 50	3,4937	65,1052	84,9022	93,2166	2,4865	81,3891	92,5614	93,4054
Perzentile 75	3,5513	72,7442	88,3383	98,8662	2,8861	85,1277	92,8910	93,5210

Statistik für Test^b

	Tag1h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
Mann-Whitney-U	3,000	3,000	3,000	2,000	3,000	1,000	1,000	4,000
Wilcoxon-W	9,000	9,000	9,000	8,000	9,000	7,000	7,000	10,000
Z	-,655	-,655	-,655	-1,091	-,655	-1,528	-1,528	-,218
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,513	,513	,513	,275	,513	,127	,127	,827
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,700 ^a	,700 ^a	,700 ^a	,400 ^a	,700 ^a	,200 ^a	,200 ^a	1,000 ^a

	Tag3h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
Mann-Whitney-U	3,000	1,000	,000	,000	1,000	,000	3,000	3,000
Wilcoxon-W	9,000	7,000	6,000	6,000	7,000	6,000	9,000	9,000
Z	-,655	-1,528	-1,964	-1,964	-1,528	-1,964	-,655	-,655
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,513	,127	,050	,050	,127	,050	,513	,513
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,700 ^a	,200 ^a	,100 ^a	,100 ^a	,200 ^a	,100 ^a	,700 ^a	,700 ^a

- a. Nicht für Bindungen korrigiert
b. Gruppenvariable: Gruppe

Statistik für Test^c

Gruppe		Tag2h2- Tag1h2	Tag3h2- Tag1h2	Tag4h2- Tag1h2	Tag2h4- Tag1h4	Tag3h4- Tag1h4	Tag4h4- Tag1h4	Tag2h6- Tag1h6	Tag3h6- Tag1h6	Tag4h6- Tag1h6
k1-k3	Z	-1,604 ^a								
	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109
a-c	Z	-1,604 ^a	,000 ^b	-1,604 ^a	-1,604 ^a					
	Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	,109	,109	,109	,109	,109	,109	1,000	,109	,109

- a. Basiert auf negativen Rängen.
- b. Die Summe der negativen Ränge ist gleich der Summe der positiven Ränge.
- c. Wilcoxon Test

8.5.2. Frequenz 43 Hz mit der Stromstärke 250mA

Tag 1 und 2, Gruppe Bestrahlt (a-c):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
a-c N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	,2033	27,8133	53,7567	72,3667	,8767	41,0267	61,1467	70,0900
Standardabweichung	,19009	1,59954	2,60277	1,88216	,09074	9,85249	10,47288	3,59003
Minimum	,01	26,42	51,95	70,62	,78	29,65	49,06	66,00
Maximum	,39	29,56	56,74	74,36	,96	46,73	67,53	72,72
Perzentile 25	,0100	26,4200	51,9500	70,6200	,7800	29,6500	49,0600	66,000
Perzentile 50	,2100	27,4600	52,5800	72,1200	,8900	46,7000	66,8500	71,5500
Perzentile 75	,3900	29,5600	56,7400	74,3600	,9600	46,7300	67,5300	72,7200

Tag 1 und 2, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
k1-k3 N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	,4067	28,6733	55,1633	72,0500	,9167	32,7233	56,3700	69,6667
Standardabweichung	,50461	2,22487	2,56270	3,15197	,39879	4,25781	8,58465	6,08935
Minimum	,03	26,75	53,58	69,58	,62	27,95	47,56	62,66
Maximum	,98	31,11	58,12	75,60	1,37	36,13	64,71	73,68
Perzentile 25	,0300	26,7500	53,5800	69,5800	,6200	27,9500	47,5600	62,6600
Perzentile 50	,2100	28,1600	53,7900	70,9700	,7600	34,0900	56,8400	72,6600
Perzentile 75	,9800	31,1100	58,1200	75,6000	1,3700	36,1300	64,7100	73,6800

Tag 3 und 4, Gruppe Bestrahlt (a-c):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
a-c N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	1,3400	48,2000	71,3767	85,5667	3,0167	38,9300	83,0233	89,6867
Standardabweichung	,12490	15,91643	9,83180	3,06441	1,35810	10,38911	11,63007	3,23373
Minimum	1,20	36,83	61,23	82,06	1,45	30,40	72,23	86,73
Maximum	1,44	66,39	80,86	87,73	3,86	50,50	95,34	93,14
Perzentile 25	1,2000	36,8300	61,2300	82,0600	1,4500	30,4000	72,2300	86,7300
Perzentile 50	1,3800	41,3800	72,0400	86,9100	3,7400	35,8900	81,5000	89,1900
Perzentile 75	1,4400	66,3900	80,8600	87,7300	3,8600	50,5000	95,3400	93,1400

Tag 3 und 4, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
k1-k3 N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	,9800	54,6467	77,1133	86,2533	1,6567	46,8500	89,4833	91,7500
Standardabweichung	,15395	6,84621	2,81681	2,02599	1,34389	8,40386	4,49774	6,88592
Minimum	,85	46,76	74,24	84,36	,16	39,73	86,37	86,73
Maximum	1,15	59,06	79,87	88,39	2,76	56,12	94,64	99,60
Perzentile 25	,8500	46,7600	74,2400	84,3600	,1600	39,7300	86,3700	86,7300
Perzentile 50	,9400	58,1200	77,2300	86,0100	2,0500	44,7000	87,4400	88,9200
Perzentile 75	1,1500	59,0600	79,8700	88,3900	2,7600	56,1200	94,6400	99,6000

Statistik für Test^b

	Tag1h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
Mann-Whitney-U	3,500	3,000	2,000	4,000	3,000	2,000	2,000	4,000
Wilcoxon-W	9,500	9,000	8,000	10,000	9,000	8,000	8,000	10,000
Z	-,443	-,655	-1,091	-,218	-,655	-1,091	-1,091	-,218
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,658	,513	,275	,827	,513	,275	,275	,827
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,700 ^a	,700 ^a	,400 ^a	1,000 ^a	,700 ^a	,400 ^a	,400 ^a	1,000 ^a

	Tag3h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
Mann-Whitney-U	,000	3,000	3,000	4,000	2,000	2,000	3,000	4,500
Wilcoxon-W	6,000	9,000	9,000	10,000	8,000	8,000	9,000	10,500
Z	-1,964	-,655	-,655	-,218	-1,091	-1,091	-,655	,000
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,050	,513	,513	,827	,275	,275	,513	1,000
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,100 ^a	,700 ^a	,700 ^a	1,000 ^a	,400 ^a	,400 ^a	,700 ^a	1,000 ^a

- a. Nicht für Bindungen korrigiert
b. Gruppenvariable: Gruppe

Statistik für Test^c

Gruppe	Tag2h2- Tag1h2	Tag3h2- Tag1h2	Tag4h2- Tag1h2	Tag2h4- Tag1h4	Tag3h4- Tag1h4	Tag4h4- Tag1h4	Tag2h6- Tag1h6	Tag3h6- Tag1h6	Tag4h6- Tag1h6
k1-k3 Z	-1,069 ^a	-1,604 ^a	-1,604 ^a	-,535 ^a	-1,604 ^a	-1,604 ^a	-,535 ^b	-1,604 ^a	-1,604 ^a
Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	,285	,109	,109	,593	,109	,109	,593	,109	,109
a-c Z	-1,604 ^a	-1,604 ^a	-1,604 ^a	-1,069 ^a	-1,604 ^a	1,604 ^a	-,535 ^b	-1,604 ^a	-1,604 ^a
Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	,109	,109	,109	,285	,109	,109	,593	,109	,109

- Basiert auf negativen Rängen.
- Die Summe der negativen Ränge ist gleich der Summe der positiven Ränge.
- Wilcoxon Test

8.5.3. Frequenz 51Hz mit der Stromstärke 85mA

Tag 1 und 2, Gruppe Bestrahlt (a-c):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
a-c N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	-,2967	7,6567	14,1933	22,4200	,9933	23,6000	47,4267	60,6833
Standardabweichung	,25325	2,34291	4,95538	7,14695	,50521	8,75504	15,33263	12,02248
Minimum	-,49	5,04	9,11	16,29	,41	17,37	36,65	51,09
Maximum	-,01	9,56	19,01	30,27	1,29	33,61	64,98	74,17
Perzentile 25	-,4900	5,0400	9,1100	16,2900	,4100	17,3700	36,6500	51,0900
Perzentile 50	-,3900	8,3700	14,4600	20,7000	1,2800	19,8200	40,6500	56,7900
Perzentile 75	-,0100	9,5600	19,0100	30,2700	1,2900	33,6100	64,9800	74,1700

Tag 1 und 2, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
k1-k3 N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	-,2233	8,6867	15,8400	25,2667	,4067	26,0900	53,9633	67,5633
Standardabweichung	,28729	1,68055	4,56047	5,91869	,45654	3,27909	4,61586	5,55880
Minimum	-,55	7,34	12,86	20,36	-,07	22,31	48,67	61,16
Maximum	-,01	10,57	21,09	31,84	,84	28,17	57,15	71,15
Perzentile 25	-,5500	7,3400	12,8600	20,3600	-,0700	22,3100	48,6700	61,1600
Perzentile 50	-,1100	8,1500	13,5700	23,6000	,4500	27,7900	56,0700	70,3800
Perzentile 75	-,0100	10,5700	21,0900	31,8400	,8400	28,1700	57,1500	71,1500

Tag 3 und 4, Gruppe Bestrahlt (a-c):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
a-c N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	,5700	35,7500	57,5933	72,2467	2,3333	24,2400	49,2400	65,1000
Standardabweichung	,50269	3,58774	5,14996	4,21485	,78373	7,44148	14,52767	13,30448
Minimum	,04	31,82	51,98	67,92	1,47	18,90	37,95	54,03
Maximum	1,04	38,85	62,10	76,34	3,00	32,74	65,63	79,86
Perzentile 25	,0400	31,8200	51,9800	67,9200	1,4700	18,9000	37,9500	54,0300
Perzentile 50	,6300	36,5800	58,7000	72,4800	2,5300	21,0800	44,1400	61,4100
Perzentile 75	1,0400	38,8500	62,1000	76,3400	3,0000	32,7400	65,6300	79,8600

Tag 3 und 4, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
k1-k3 N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	1,9300	21,7400	39,6767	62,5967	,3067	31,0433	61,3067	75,9067
Standardabweichung	2,09638	1,96731	4,11167	4,90830	,30892	3,26204	7,03592	5,22240
Minimum	,67	19,72	36,66	56,94	,03	27,85	54,11	71,40
Maximum	4,35	23,65	44,36	65,73	,64	34,37	68,17	81,63
Perzentile 25	,6700	19,7200	36,6600	56,9400	,0300	27,8500	54,1100	71,4000
Perzentile 50	,7700	21,8500	38,0100	65,1200	,2500	30,9100	61,6400	74,6900
Perzentile 75	4,3500	23,6500	44,3600	65,7300	,6400	34,3700	68,1700	81,6300

Statistik für Test^b

	Tag1h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
Mann-Whitney-U	4,500	4,000	4,000	3,000	2,000	3,000	3,000	3,000
Wilcoxon-W	10,500	10,000	10,000	9,000	8,000	9,000	9,000	9,000
Z	,000	-,218	-,218	-,655	-1,091	-,655	-,655	-,655
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	1,000	,827	,827	,513	,275	,513	,513	,513
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	1,000 ^a	1,000 ^a	1,000 ^a	,700 ^a	,400 ^a	,700 ^a	,700 ^a	,700 ^a

	Tag3h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
Mann-Whitney-U	2,000	,000	,000	,000	,000	2,000	2,000	2,000
Wilcoxon-W	8,000	6,000	6,000	6,000	6,000	8,000	8,000	8,000
Z	-1,091	-1,964	-1,964	-1,964	-1,964	-1,091	-1,091	-1,091
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,275	,050	,050	,050	,050	,275	,275	,275

seitig)									
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,400 ^a	,100 ^a	,100 ^a	,100 ^a	,100 ^a	,400 ^a	,400 ^a	,400 ^a	,400 ^a

- a. Nicht für Bindungen korrigiert
b. Gruppenvariable: Gruppe

Statistik für Test^b

Gruppe	Tag2h2- Tag1h2	Tag3h2- Tag1h2	Tag4h2- Tag1h2	Tag2h4- Tag1h4	Tag3h4- Tag1h4	Tag4h4- Tag1h4	Tag2h6- Tag1h6	Tag3h6- Tag1h6	Tag4h6- Tag1h6
k1-k3 Z	-1,604 ^a								
Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109
a-c Z	-1,604 ^a								
Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109

- a. Basiert auf negativen Rängen.
b. Wilcoxon Test

8.5.4. Frequenz 51Hz mit der Stromstärke 250mA

Tag 1 und 2, Gruppe Bestrahlt (a-c):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
a-c N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	2,6067	28,8800	46,7700	63,0433	3,1067	38,4867	67,5700	72,0367
Standardabweichung	,78309	5,35723	6,66340	2,08989	,73323	2,52809	3,91830	,33081
Minimum	2,12	25,41	41,60	60,72	2,26	36,27	63,28	71,72
Maximum	3,51	35,05	54,29	64,77	3,53	41,24	70,96	72,38
Perzentile 25	2,1200	25,4100	41,6000	60,7200	2,2600	36,2700	63,2800	71,7200
Perzentile 50	2,1900	26,1800	44,4200	63,6400	3,5300	37,9500	68,4700	72,0100
Perzentile 75	3,5100	35,0500	54,2900	64,7700	3,5300	41,2400	70,9600	72,3800

Tag 1 und 2, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
k1-k3 N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	2,2333	37,2367	55,8867	69,6467	4,0400	39,4567	63,6333	75,4233
Standardabweichung	,43143	7,33870	8,97587	3,73551	3,38643	3,30819	1,25779	2,32543
Minimum	1,74	29,09	45,62	65,65	1,62	37,17	62,59	73,90
Maximum	2,54	43,33	62,25	73,05	7,91	43,25	65,03	78,10
Perzentile 25	1,7400	29,0900	45,6200	65,6500	1,6200	37,1700	62,5900	73,9000
Perzentile 50	2,4200	39,2900	59,7900	70,2400	2,5900	37,9500	63,2800	74,2700
Perzentile 75	2,5400	43,3300	62,2500	73,0500	7,9100	43,2500	65,0300	78,1000

Tag 3 und 4, Gruppe Bestraht (a-c):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
a-c N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	1,6367	59,7067	69,2833	72,1300	3,8933	39,2800	65,2067	74,4733
Standardabweichung	1,61593	7,10333	1,47737	1,25096	,95553	18,64216	1,34745	1,06604
Minimum	,14	54,46	67,76	70,78	2,92	19,51	63,68	73,55
Maximum	3,35	67,79	70,71	73,25	4,83	56,54	66,23	75,64
Perzentile 25	,1400	54,4600	67,7600	70,7800	2,9200	19,5100	63,6800	73,5500
Perzentile 50	1,4200	56,8700	69,3800	72,3600	3,9300	41,7900	65,7100	74,2300
Perzentile 75	3,3500	67,7900	70,7100	73,2500	4,8300	56,5400	66,2300	75,6400

Tag 3 und 4, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
k1-k3 N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	1,8700	55,8600	70,7833	69,3833	2,4867	48,4533	65,9867	70,6067
Standardabweichung	,40037	2,10473	,81002	4,18073	,41065	1,49387	,50521	1,87127
Minimum	1,41	54,03	69,91	64,63	2,09	46,73	65,49	68,56
Maximum	2,14	58,16	71,51	72,49	2,91	49,38	66,50	72,23
Perzentile 25	1,4100	54,0300	69,9100	64,6300	2,0900	46,7300	65,4900	68,5600
Perzentile 50	2,0600	55,3900	70,9300	71,0300	2,4600	49,2500	65,9700	71,0300
Perzentile 75	2,1400	58,1600	71,5100	72,4900	2,9100	49,3800	66,5000	72,2300

Statistik für Test^b

	Tag1h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
Mann-Whitney-U	4,000	1,000	1,000	,000	4,000	3,500	1,500	,000
Wilcoxon-W	10,000	7,000	7,000	6,000	10,000	9,500	7,500	6,000
Z	-,218	-1,528	-1,528	-1,964	-,221	-,443	-1,328	-1,964
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,827	,127	,127	,050	,825	,658	,184	,050
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	1,000 ^a	,200 ^a	,200 ^a	,100 ^a	1,000 ^a	,700 ^a	,200 ^a	,100 ^a

	Tag3h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
Mann-Whitney-U	4,000	3,000	1,000	3,000	,000	3,000	3,000	,000
Wilcoxon-W	10,000	9,000	7,000	9,000	6,000	9,000	9,000	6,000
Z	-,218	-,655	-1,528	-,655	-1,964	-,655	-,655	-1,964
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,827	,513	,127	,513	,050	,513	,513	,050
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	1,000 ^a	,700 ^a	,200 ^a	,700 ^a	,100 ^a	,700 ^a	,700 ^a	,100 ^a

- a. Nicht für Bindungen korrigiert.
b. Gruppenvariable: Bruppe

Statistik für Test^c

Gruppe	Tag2h2- Tag1h2	Tag3h2- Tag1h2	Tag4h2- Tag1h2	Tag2h4- Tag1h4	Tag3h4- Tag1h4	Tag4h4- Tag1h4	Tag2h6- Tag1h6	Tag3h6- Tag1h6	Tag4h6- Tag1h6
k1-k3 Z	,000 ^a	-1,604 ^b	,000 ^a	-,535 ^b					
Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	1,000	,109	,109	,109	,109	,109	,109	1,000	,593
a-c Z	-1,604 ^b	-1,604 ^b	-1,069 ^b	-1,604 ^b					
Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	,109	,109	,285	,109	,109	,109	,109	,109	,109

- a. Die Summe der negativen Ränge ist gleich der Summe der positiven Ränge.
- b. Basiert auf negativen Rängen
- c. Wilcoxon-Test

8.5.5. Frequenz 60,3 Hz und der Stromstärke 85mA

Tag 1 und 2, Gruppe Bestrahlt (a-c):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
a-c N Gültig	18	18	15	12	18	18	18	15
Fehlend	18	18	21	24	18	18	18	21
Mittelwert	4,4556	18,1217	32,2107	42,6833	2,0050	19,3589	36,7433	48,2533
Standardabweichung	5,65111	10,94547	17,91681	20,05875	4,16259	10,86729	18,12231	17,79377
Minimum	-,45	6,32	9,74	16,26	-,44	5,06	12,33	22,14
Maximum	15,00	41,43	55,90	67,49	12,08	40,51	68,52	74,44
Perzentile 25	,3925	9,6175	13,4800	21,1575	-,1325	10,1175	19,8125	30,0600
Perzentile 50	1,4450	12,9350	29,1500	44,8100	,2550	16,4350	32,1350	48,2900
Perzentile 75	10,6350	28,1950	52,3800	63,9400	,8775	26,4175	50,0775	64,3300

Tag 1 und 2, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
k1-k3 N Gültig	18	18	15	12	18	18	18	15
Fehlend	18	18	21	24	18	18	18	21
Mittelwert	3,4756	19,2250	34,0180	42,5942	1,1361	20,9400	39,0578	52,7427
Standardabweichung	4,81587	12,57094	19,38101	20,92273	2,09080	8,67936	14,79172	17,58538
Minimum	-,31	4,38	6,74	10,20	-,42	5,99	12,61	23,48
Maximum	11,50	47,95	63,62	69,92	6,30	35,10	62,48	69,72
Perzentile 25	,0775	10,9300	20,3400	20,9525	-,1725	13,1650	27,0750	35,0800
Perzentile 50	,6750	14,8850	29,5800	45,4250	,4050	22,7600	42,0500	63,2100
Perzentile 75	10,1125	27,7450	53,0500	62,1525	1,3350	26,2850	47,3150	65,9100

Tag 3 und 4, Gruppe Bestrahlt (a-c):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
a-c N Gültig	18	18	18	15	15	15	15	6
Fehlend	18	18	18	21	21	21	21	30
Mittelwert	1,4289	25,9778	45,2789	54,3693	1,6853	35,8380	54,9307	61,9267
Standardabweichung	4,73928	13,28196	19,74271	19,95976	1,34137	13,36226	17,49740	18,19078
Minimum	-,88	7,11	15,65	25,17	,17	10,16	19,20	26,82
Maximum	20,02	54,22	75,80	81,17	4,32	55,45	78,60	76,08
Perzentile 25	-,5225	13,0300	27,1075	33,3600	,3700	24,6600	41,7900	52,1775
Perzentile 50	,2150	27,3900	52,5900	57,5200	1,6600	33,5700	56,3400	66,3150
Perzentile 75	1,4375	37,1700	59,6175	71,3300	3,1000	49,3800	71,0900	75,5700

Tag 3 und 4, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
k1-k3 N Gültig	18	18	18	15	15	15	15	6
Fehlend	18	18	18	21	21	21	21	30
Mittelwert	,4800	24,9906	43,6928	55,3607	3,0493	40,6833	59,3620	63,7817
Standardabweichung	,73232	12,86955	19,25350	21,92059	5,23603	14,57183	15,08987	14,50325
Minimum	-,55	4,18	10,50	20,20	,30	14,50	29,40	36,10
Maximum	1,74	41,25	66,06	79,46	21,62	61,24	79,11	78,57
Perzentile 25	-,2050	10,6600	26,2900	28,8700	1,0600	29,3800	45,5800	56,0575
Perzentile 50	,4950	27,2050	51,0100	66,3300	1,6400	33,2300	62,8100	68,1900
Perzentile 75	1,1575	36,9400	60,2325	74,6900	2,4000	56,3800	71,8000	71,3400

Statistik für Test^b

	Tag1h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
Mann-Whitney-U	140,500	159,000	106,000	72,000	161,500	141,000	150,000	93,000
Wilcoxon-W	311,500	330,000	226,000	150,000	332,500	312,000	321,000	213,000
Z	-,680	-,095	-,270	,000	-,016	-,664	-,380	-,809
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,496	,924	,787	1,000	,987	,506	,704	,419
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,501a	,938a	,806a	1,000a	,988a	,521a	,719a	,436a

	Tag3h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
Mann-Whitney-U	150,500	158,000	149,000	111,000	99,500	88,000	96,000	15,000
Wilcoxon-W	321,500	329,000	320,000	231,000	219,000	208,000	216,000	36,000
Z	-,364	-,127	-,411	-,062	-,539	-1,016	-,684	-,480
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,716	,899	,681	,950	,590	,310	,494	,631
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,719a	,913a	,696a	,967a	,595a	,325a	,512a	,699a

- a. Nicht für Bindungen korrigiert.
b. Gruppenvariable: Gruppe

Statistik für Test^b

Gruppe	Tag2h2- Tag1h2	Tag3h2- Tag1h2	Tag4h2- Tag1h2	Tag2h4- Tag1h4	Tag3h4- Tag1h4	Tag4h4- Tag1h4	Tag2h6- Tag1h6	Tag3h6- Tag1h6	Tag4h6- Tag1h6
k1-k3 Z	-1,459 ^a	-1,590 ^a	-3,351 ^a	-1,420 ^a	-1,306 ^a	-2,981 ^a	-1,244 ^a	-1,362 ^a	-1,604 ^a
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,145	,112	,001	,156	,191	,003	,214	,173	,109
a-c Z	-1,285 ^a	-1,720 ^a	-3,237 ^a	-1,533 ^a	-1,420 ^a	-2,824 ^a	-,889 ^a	-1,244 ^a	-1,604 ^a
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,199	,085	,001	,125	,156	,005	,374	,214	,109

- a. Basiert auf negativen Rängen.
b. Wilcoxon-Test

8.5.6. Frequenz 60,3 Hz mit der Stromstärke 250mA

Tag 1 und 2, Gruppe Bestrahlt (a-c):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
a-c N Gültig	12	12	9	12	12	12	12	12
Fehlend	12	12	15	12	12	12	12	12
Mittelwert	,0392	15,6317	38,5267	42,1575	,9350	16,0467	93,0433	138,5475
Standardabweichung	1,04702	11,43913	17,90757	28,68299	3,22261	13,49539	119,66852	190,63895
Minimum	-1,51	1,81	17,70	4,98	-1,63	2,10	5,50	7,85
Maximum	1,90	36,09	63,82	84,59	8,92	42,66	330,29	550,95
Perzentile 25	-,9925	4,3850	19,4850	13,0100	-,9900	7,3375	11,7675	18,7475
Perzentile 50	,1550	15,0450	44,3700	33,4950	-,0800	10,6050	39,0450	48,5750
Perzentile 75	,4875	21,6250	54,4150	67,9925	,8175	28,4350	173,0975	244,3500

Tag 1 und 2, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
k1-k3 N Gültig	12	12	9	12	12	12	12	12
Fehlend	12	12	15	12	12	12	12	12
Mittelwert	,3050	16,4842	40,3956	43,0442	,4092	21,9742	143,0233	193,1800
Standardabweichung	1,48105	12,39909	15,85706	27,04868	2,09577	16,92548	209,39602	277,21422
Minimum	-1,60	1,42	19,04	4,92	-1,48	6,16	9,00	17,67
Maximum	3,18	35,10	58,40	78,81	5,60	48,77	642,22	768,93
Perzentile 25	-,9975	3,5525	20,8500	14,0075	-1,1325	8,1550	11,7725	20,1375
Perzentile 50	,2500	16,6900	46,8800	43,4850	-,1850	15,1000	48,2000	59,1600
Perzentile 75	,7225	26,9675	53,3800	69,9250	1,1650	42,5350	276,3550	413,4025

Tag 1 und 2, Gruppe Kontrolle Spule (k4-k6):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
k4-k6 N Gültig	9	9	9	9	9	9	9	9
Fehlend	9	9	9	9	9	9	9	9
Mittelwert	1,3622	20,1189	40,0922	52,7867	,9167	20,9089	155,1922	218,1556
Standardabweichung	2,68415	9,47143	18,78398	21,82739	2,50946	12,94353	173,36255	254,51661
Minimum	,17	6,63	11,05	16,31	-1,27	5,59	12,00	18,85
Maximum	8,50	30,84	56,23	73,18	5,34	42,01	426,06	608,57
Perzentile 25	,2700	8,9400	17,6500	28,4550	-,8050	8,7200	17,1700	23,9150
Perzentile 50	,5500	22,4600	48,9500	63,5800	-,5100	17,6000	68,0900	76,6800
Perzentile 75	,7250	28,3650	54,1850	68,5450	3,4500	33,5450	361,3000	527,1850

Tag 3 und 4, Gruppe Bestrahlt (a-c):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
a-c N Gültig	12	12	12	12	12	12	12	12
Fehlend	12	12	12	12	12	12	12	12
Mittelwert	,4317	21,9158	36,3833	43,8967	1,2742	21,9242	33,0508	37,8492
Standardabweichung	1,25967	19,00539	28,91816	28,98656	1,60338	18,13378	23,99603	25,41319
Minimum	-1,39	1,25	2,66	3,19	-,93	1,18	1,63	2,84
Maximum	2,28	50,78	76,35	82,84	4,29	53,88	70,28	70,65
Perzentile 25	-1,0150	6,5175	14,5125	21,8000	-,4100	7,2900	12,6525	14,9025
Perzentile 50	,7000	9,9500	18,2300	30,0650	1,3250	12,3950	23,1350	33,7150
Perzentile 75	1,5600	42,4250	71,9475	78,0675	2,2850	41,4700	60,6150	65,1800

Tag 3 und 4, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
k1-k3 N Gültig	12	12	12	12	12	12	12	12
Fehlend	12	12	12	12	12	12	12	12
Mittelwert	,5292	29,8975	47,6600	54,3850	,6217	30,0625	45,0267	50,4858
Standardabweichung	1,26570	17,25965	21,84729	18,49173	1,01958	16,49431	16,85995	15,35032
Minimum	-1,37	7,18	17,88	25,61	-1,01	12,15	22,95	26,82
Maximum	2,12	54,80	74,50	75,61	2,36	58,07	68,24	66,88
Perzentile 25	-,7150	14,0975	24,6250	35,6675	-,2825	15,1500	25,7400	33,0525
Perzentile 50	,7150	26,2100	49,7750	59,6650	,5550	25,1650	44,9550	57,6250
Perzentile 75	1,8325	45,7900	68,4750	72,1300	1,3450	44,5250	61,6550	63,1175

Tag 3 und 4, Gruppe Kontrolle Spule (k4-k6):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
k4-k6 N Gültig	9	9	9	9	9	9	9	9
Fehlend	9	9	9	9	10	10	10	10
Mittelwert	1,2022	30,1578	50,2767	56,4411	,8188	40,4975	50,3738	54,7250
Standardabweichung	1,87894	17,47072	24,99905	24,68207	1,52276	24,51413	22,69275	18,00880
Minimum	-1,19	4,81	11,16	15,06	-1,14	9,32	18,24	29,09
Maximum	3,54	51,01	74,97	78,57	2,64	63,79	69,30	71,02
Perzentile 25	-1,1050	10,0150	22,3850	31,3900	-,8875	12,1575	22,8700	32,5725
Perzentile 50	1,5400	35,2400	60,0100	66,8200	1,3100	49,9300	63,3600	65,7050
Perzentile 75	2,7900	44,8050	71,4350	75,2800	2,2550	61,8500	68,2175	67,4575

Statistik für Test^b: Vergleich Gruppe Bestrahlt (a-c) mit Gruppe Kontrolle (k1-k3)

	Tag1h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
Mann-Whitney-U	67,000	69,000	36,000	67,000	67,000	54,000	62,000	62,000
Wilcoxon-W	145,000	147,000	81,000	145,000	145,000	132,000	140,000	140,000
Z	-,289	-,173	-,397	-,289	-,289	-1,039	-,577	-,577
Asymptotische Signifikanz	,773	,862	,691	,773	,773	,299	,564	,564

(2-seitig)								
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,799 ^a	,887 ^a	,730 ^a	,799 ^a	,799 ^a	,319 ^a	,590 ^a	,590 ^a

	Tag3h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
Mann-Whitney-U	67,000	45,000	50,000	52,000	51,500	44,000	45,000	54,000
Wilcoxon-W	145,000	123,000	128,000	130,000	129,500	122,000	123,000	132,000
Z	-,289	-1,559	-1,270	-1,155	-1,184	-1,617	-1,559	-1,039
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,773	,119	,204	,248	,236	,106	,119	,299
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,799 ^a	,128 ^a	,219 ^a	,266 ^a	,242 ^a	,114 ^a	,128 ^a	,319 ^a

- a. Nicht für Bindungen korrigiert.
b. Gruppenvariable: Gruppe

Statistik für Test^b: Vergleich Gruppe Bestrahlt (a-c) mit Gruppe Kontrolle Spule (k4-k6)

	Tag1h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
Mann-Whitney-U	29,000	40,000	39,000	48,000	50,000	40,500	38,000	40,000
Wilcoxon-W	107,000	118,000	84,000	126,000	95,000	118,500	116,000	118,000
Z	-1,777	-,995	-,132	-,426	-,284	-,960	-1,137	-,995
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,076	,320	,895	,670	,776	,337	,256	,320
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,082 ^a	,345 ^a	,931 ^a	,702 ^a	,808 ^a	,345 ^a	,277 ^a	,345 ^a

	Tag3h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
Mann-Whitney-U	35,000	43,000	47,000	47,000	42,000	25,000	26,500	28,000
Wilcoxon-W	113,000	121,000	125,000	125,000	78,000	103,000	104,500	106,000
Z	-1,350	-,782	-,497	-,497	-,463	-1,774	-1,659	-1,543
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,177	,434	,619	,619	,643	,076	,097	,123
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,193 ^a	,464 ^a	,651 ^a	,651 ^a	,678 ^a	,082 ^a	,098 ^a	,135 ^a

- a. Nicht für Gruppen korrigiert.
b. Gruppenvariable: Gruppe

Statistik für Test^b: Vergleich Gruppe Kontrolle (k1-k3) mit Gruppe Kontrolle Spule (k4-k6)

	Tag1h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
Mann-Whitney-U	33,500	44,000	39,000	46,000	53,000	53,000	44,000	50,000
Wilcoxon-W	111,500	122,000	84,000	124,000	98,000	98,000	122,000	128,000
Z	-1,458	-,711	-,132	-,569	-,071	-,071	-,711	-,284

Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,145	,477	,895	,570	,943	,943	,477	,776
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,148 ^a	,508 ^a	,931 ^a	,602 ^a	,972 ^a	,972 ^a	,508 ^a	,808 ^a

	Tag3h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
Mann-Whitney-U	37,000	53,000	49,000	49,000	43,000	36,000	38,000	33,000
Wilcoxon-W	115,000	98,000	127,000	127,000	121,000	114,000	116,000	111,000
Z	-1,209	-,071	-,355	-,355	-,386	-,926	-,772	-1,157
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,227	,943	,722	,722	,700	,355	,440	,247
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,247 ^a	,972 ^a	,754 ^a	,754 ^a	,734 ^a	,384 ^a	,473 ^a	,270 ^a

- a. Nicht für Bindungen korrigiert.
b. Gruppenvariable: Gruppe

Statistik für Test^c

Gruppe	Tag2h2- Tag1h2	Tag3h2- Tag1h2	Tag4h2- Tag1h2	Tag2h4- Tag1h4	Tag3h4- Tag1h4	Tag4h4- Tag1h4	Tag2h6- Tag1h6	Tag3h6- Tag1h6	Tag4h6- Tag1h6
k1-k3 Z	-1,883 ^a	-2,981 ^a	-2,667 ^a	-2,192 ^a	-2,547 ^a	-1,599 ^a	-2,589 ^a	-2,040 ^a	-1,020 ^a
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,060	,003	,008	,028	,011	,110	,010	,041	,308
a-c Z	-,078 ^a	-1,177 ^a	-1,255 ^a	-1,955 ^a	-,533 ^a	-,059 ^a	-1,883 ^a	-,549 ^a	-,510 ^b
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,937	,239	,209	,051	,594	,953	0,060	,583	,610
k1-k3 Z	-,059 ^a	-2,194 ^a	-2,521 ^a	-2,310 ^a	-2,310 ^a	-2,521 ^a	-1,836 ^a	-1,125 ^a	-1,120 ^a
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,953	,028	,012	,021	,021	,012	,066	,260	,263

- a. Basiert auf negativen Rängen.
b. Basiert auf positiven Rängen.
c. Wilcoxon-Test

8.5.7. Frequenz 60,3 Hz mit der Stromstärke 250mA, ohne Hochspannung (50V)

Tag 1 und 2, Gruppe Bestrahlt (a-c):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
a-c N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	,4167	11,5433	27,4567	39,8333	,2800	20,0700	38,2867	57,4733
Standardabweichung	,70493	2,17978	5,32918	6,51350	,18248	,92418	1,64366	2,35924
Minimum	-,19	10,25	24,33	35,56	,16	19,23	36,71	54,87
Maximum	1,19	14,06	33,61	47,33	,49	21,06	39,99	59,47
Perzentile 25	-,1900	10,2500	24,3300	35,5600	,1600	19,2300	36,7100	54,8700
Perzentile 50	,2500	10,3200	24,4300	36,6100	,1900	19,9200	38,1600	58,0800
Perzentile 75	1,1900	14,0600	33,6100	47,3300	,4900	21,0600	39,9900	59,4700

Tag 1 und 2, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
k1-k3 N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	-,1967	11,2667	26,6500	39,2967	,3933	19,9667	38,2233	58,3467
Standardabweichung	,15948	,56801	1,42853	2,12491	,32716	2,92842	5,67710	8,10009
Minimum	-,38	10,89	25,14	37,60	,02	16,63	31,78	49,27
Maximum	-,09	11,92	27,98	41,68	,63	22,11	42,49	64,84
Perzentile 25	-,3800	10,8900	25,1400	37,6000	,0200	16,6300	31,7800	49,2700
Perzentile 50	-,1200	10,9900	26,8300	38,6100	,5300	21,1600	40,4000	60,9300
Perzentile 75	-,0900	11,9200	27,9800	41,6800	,6300	22,1100	42,4900	64,8400

Tag 1 und 2, Gruppe Kontrolle Spule (k4-k6):

Gruppe	Tag1,h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
k4-k6 N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	,2833	10,6167	25,1033	36,9100	,6367	20,2033	38,4833	59,9067
Standardabweichung	,29838	,41065	1,51001	1,61081	,29297	,80872	2,19978	3,13168
Minimum	-,06	10,22	24,03	35,53	,42	19,64	36,83	57,44
Maximum	,48	11,04	26,83	38,68	,97	21,13	40,98	63,43
Perzentile 25	-,0600	10,2200	24,0300	35,5300	,4200	19,6400	36,8300	57,4400
Perzentile 50	,4300	10,5900	24,4500	36,5200	,5200	19,8400	37,6400	58,8500
Perzentile 75	,4800	11,0400	26,8300	38,6800	,9700	21,1300	40,9800	63,4300

Tag 3 und 4, Gruppe Bestrahlt (a-c):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
a-c N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	-2,0400	32,0233	60,9167	83,3233	1,2633	41,7800	65,3667	1240,5167
Standardabweichung	,11269	7,15318	9,22329	5,52034	,34356	10,74666	11,25687	83,03541
Minimum	-2,17	24,22	50,76	77,55	1,06	29,51	52,47	1146,42
Maximum	-1,97	38,27	68,77	88,55	1,66	49,52	73,22	1303,51
Perzentile 25	-2,1700	24,2200	50,7600	77,5500	1,0600	29,5100	52,4700	1146,4200
Perzentile 50	-1,9800	33,5800	63,2200	83,8700	1,0700	46,3100	70,4100	1271,6200
Perzentile 75	-1,9700	38,2700	68,7700	88,5500	1,6600	49,5200	73,2200	1303,5100

Tag 3 und 4, Gruppe Kontrolle (k1-k3):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
k1-k3 N Gültig	3	3	3	3	3	3	3	3
Fehlend	3	3	3	3	3	3	3	3
Mittelwert	-3,1833	32,1200	59,6667	79,6767	1,3833	42,8467	68,7500	1311,9667
Standardabweichung	,23502	5,20455	6,74512	4,31099	,02309	7,48553	7,25368	44,00800
Minimum	-3,42	26,45	52,31	75,42	1,37	35,03	60,82	1261,20
Maximum	-2,95	36,68	65,56	84,04	1,41	49,95	75,05	1339,29
Perzentile 25	-3,4200	26,4500	52,3100	75,4200	1,3700	35,0300	60,8200	1261,2000
Perzentile 50	-3,1800	33,2300	61,1300	79,5700	1,3700	43,5600	70,3800	1335,4100
Perzentile 75	-2,9500	36,6800	65,5600	84,0400	1,4100	49,9500	75,0500	1339,2900

Tag 3 und 4, Gruppe Kontrolle Spule (k4-k6):

Gruppe	Tag3,h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
k4-k6 N Gültig	2	2	2	2	2	2	2	2
Fehlend	4	4	4	4	4	4	4	4
Mittelwert	-2,5300	32,8350	61,3700	83,1450	1,4450	47,6950	70,3200	1266,4100
Standardabweichung	1,93747	,94045	,56569	,12021	,31820	5,76292	5,67100	33,06431
Minimum	-3,90	32,17	60,97	83,06	1,22	43,62	66,31	1243,03
Maximum	-1,16	33,50	61,77	83,23	1,67	51,77	74,33	1289,79
Perzentile 25	-3,9000	32,1700	60,9700	83,0600	1,2200	43,6200	66,3100	1243,0300
Perzentile 50	-2,5300	32,8350	61,3700	83,1450	1,4450	47,6950	70,3200	1266,4100
Perzentile 75	-1,1600	33,5000	61,7700	83,2300	1,6700	51,7700	74,3300	1289,7900

Statistik für Test^b : Vergleich Gruppe Bestrahlt (a-c) mit Gruppe Kontrolle (k1-k3)

	Tag1h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
Mann-Whitney-U	2,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000	3,000
Wilcoxon-W	8,000	9,000	9,000	9,000	9,000	9,000	9,000	9,000
Z	-1,091	-,655	-,655	-,655	-,655	-,655	-,655	-,655
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,275	,513	,513	,513	,513	,513	,513	,513
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,400 ^a	,700 ^a						

	Tag3h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
Mann-Whitney-U	,000	4,000	4,000	3,000	3,000	4,000	4,000	2,000
Wilcoxon-W	6,000	10,000	10,000	9,000	9,000	10,000	10,000	8,000
Z	-1,964	-,218	-,218	-,655	-,664	-,218	-,218	-1,091
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,050	,827	,827	,513	,507	,827	,827	,275
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,100 ^a	1,000 ^a	1,000 ^a	,700 ^a	,700 ^a	1,000 ^a	1,000 ^a	,400 ^a

- a. Nicht für Bindungen korrigiert.
b. Gruppenvariable: Gruppe

Statistik für Test^b : Vergleich Gruppe Bestrahlt (a-c) mit Gruppe Kontrolle Spule (k4-k6)

	Tag1h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
Mann-Whitney-U	4,000	4,000	4,000	3,000	1,000	4,000	4,000	3,000
Wilcoxon-W	10,000	10,000	10,000	9,000	7,000	10,000	10,000	9,000
Z	-,218	-,218	-,218	-,655	-1,528	-,218	-,218	-,655
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,827	,827	,827	,513	,127	,827	,827	,513
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	1,000 ^a	1,000 ^a	1,000 ^a	,700 ^a	,200 ^a	1,000 ^a	1,000 ^a	,700 ^a

	Tag3h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
Mann-Whitney-U	3,000	2,000	2,000	2,000	1,000	2,000	2,000	3,000
Wilcoxon-W	9,000	5,000	5,000	5,000	7,000	8,000	8,000	9,000
Z	,000	-,577	-,577	-,577	-1,155	-,577	-,577	,000
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	1,000	,564	,564	,564	,248	,564	,564	1,000
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	1,000 ^a	,800 ^a	,800 ^a	,800 ^a	,400 ^a	,800 ^a	,800 ^a	1,000 ^a

- a. Nicht für Bindungen korrigiert.
b. Gruppenvariable: Gruppe

Statistik für Test^b : Vergleich Gruppe Kontrolle (k1-k3) mit Gruppe Kontrolle Spule (k4-k6)

	Tag1h0	Tag1h2	Tag1h4	Tag1h6	Tag2h0	Tag2h2	Tag2h4	Tag2h6
Mann-Whitney-U	,000	2,000	1,500	2,000	4,000	3,000	4,000	4,000
Wilcoxon-W	6,000	8,000	7,500	8,000	10,000	9,000	10,000	10,000
Z	-1,964	-1,091	-1,328	-1,091	-,218	-,655	-,218	-,218
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	,050	,275	,184	,275	,827	,513	,827	,827
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	,100 ^a	,400 ^a	,200 ^a	,400 ^a	1,000 ^a	,700 ^a	1,000 ^a	1,000 ^a

	Tag3h0	Tag3h2	Tag3h4	Tag3h6	Tag4h0	Tag4h2	Tag4h4	Tag4h6
Mann-Whitney-U	3,000	3,000	3,000	2,000	3,000	1,000	3,000	1,000
Wilcoxon-W	9,000	9,000	9,000	2,000	3,000	1,000	3,000	1,000
Z	,000	,000	,000	-,577	,000	-1,155	,000	-1,155
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	1,000	1,000	1,000	,564	1,000	,248	1,000	,248
Exakte Signifikanz (2*(1-seitig Sig.))	1,000 ^a	1,000 ^a	1,000 ^a	,800 ^a	1,000 ^a	,400 ^a	1,000 ^a	,400 ^a

- a. Nicht für Bindungen korrigiert.
b. Gruppenvariable: Gruppe

Statistik für Test^b

Gruppe	Tag2h2- Tag1h2	Tag3h2- Tag1h2	Tag4h2- Tag1h2	Tag2h4- Tag1h4	Tag3h4- Tag1h4	Tag4h4- Tag1h4	Tag2h6- Tag1h6	Tag3h6- Tag1h6	Tag4h6- Tag1h6
k1-k3 Z	-1,604 ^a								
Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109
a-c Z	-1,604 ^a								
Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109	,109
k4-k6 Z	-1,604 ^a	-1,342 ^a	-1,342 ^a	-1,604 ^a	-1,342 ^a	-1,342 ^a	-1,604 ^a	-1,342 ^a	-1,342 ^a
Asymptotische Signifikanz (2- seitig)	,109	,180	,180	,109	,180	,180	,109	,180	,180

- a. Basiert auf negativen Rängen.
b. Wilcoxon-Test

9. Danksagung

Im Besonderen danke ich Herrn **Prof. Dr. H.-P. Bruch**, Direktor der chirurgischen Klinik der Universität zu Lübeck, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes im chirurgischen Forschungslabor.

Bei Herrn **PD Dr. S. Farke** bedanke ich mich für die Entwicklung der Grundidee dieser Arbeit, für die Hilfe bei der Korrektur und konstruktive Ratschläge.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. M. Duchrow** für die Überlassung des Themas bedanken und dafür, daß er mich in die Thematik und Methodik eingearbeitet hat, mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mich hervorragend bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt hat.

Für die Bereitstellung des Themas und die stets freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanke ich mich bei **Prof. Dr. R. Broll**.

Frau **C. Killaitis** danke ich für die Hilfe mit der statistischen Auswertung der Daten.

Ich bedanke mich auch bei Herrn **J. Axmann** für die Bereitstellung der Magnetbestrahlungsapparatur und die hilfreichen Ratschläge bei der Umsetzung des Versuchsaufbaus.

Vielen Dank an Herrn **Dr. Dr. Jens K. Habermann** für seine Korrekturvorschläge.

Sehr herzlich möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors bedanken. Im Besonderen bei **A. Aumüller, E. Gheribi, V. Grobleben, G. Grosser-Pape** und **R. Kaatz**. Ihr habt mich immer großartig unterstützt und ein hervorragendes Arbeitsklima geschaffen.

10. Lebenslauf

Name : Borberg

Vorname : Timo

Geburtsdatum : 28.07.1975

Geburtsort : Hannover

Eltern : Dr. Thomas Borberg
Karin Borberg-Thomalla geb. Richter

Staatsangehörigkeit : deutsch

Wohnort : Wahnstrasse 35-37, 23552 Lübeck

Schulabschluß : Allgemeine Hochschulreife 1996

Zivildienst : 1996/97 im HNO-OP der Medizinischen Hochschule Hannover

Studium : 1997/98 Studium der Chemie an der Universität Hannover

Studium der Humanmedizin :
1998 an der Georg-August-Universität Göttingen
1998-2002 an der Universität des Saarlandes
2002 Physikum
2002/03 an der Universidad de Valladolid
2003- 2006 an der Universität zu Lübeck

Praktisches Jahr : 2005/2006

Innere Medizin : Sana Klinik Lübeck
Chirurgie : Sana Klinik Lübeck
Radiologie : Universitätsklinikum Lübeck

2.Staatsexamen : Oktober/November 2006

Assistenzarzt in der Klinik für Radiologie und Nuklearmedizin an der Universtät zu Lübeck
seit Januar 2007

