

Gutachten RayGuard

MATERIALIEN UND VERFAHREN KULTIVIERTE LYMPHOZYTEN UND CEM

Menschliche Leukämie-T-Zelllinien CCRF-CEM wurden in einem Kulturboden RPMI 1640 mit Zusatz von FCS 10 % gezüchtet. Die Zellen wurden in Kulturkapseln mit einem Durchmesser von 8 cm in einer Dichte von 1×10^6 pro Kapsel gezüchtet und für 2, 4, 24 und 48 Stunden elektromagnetischen Feldern zu 900 MHz ausgesetzt. Dieselbe Zellmenge wurde als Kontrolle in demselben Inkubator außerhalb der TEM-Zelle eingesetzt. Als weiteres Kontrollsystem wurden die Zellen, die nicht den Feldern ausgesetzt waren, in einem anderen Inkubator als jenem inkubiert, der die TEM-Zelle enthielt.

EXPOSITIONSVORRICHTUNG (TEM-Zelle) EXPOSITIONSSYSTEM 900 MHz

Die Zellen wurden mit einem elektromagnetischen Feld bestrahlt, das von einem Generator mit einem Sinussignal zwischen 800 und 1000 MHz mit 5 dBm Ausgangsleistung produziert wurde, wobei im Inneren der TEM-Zelle ein berechnetes elektrisches Feld von 5 V/m erzeugt wurde. Das elektromagnetische Feld wurde mit einem Generator mit Breitbandsignal erzeugt und an eine TEM-Zelle (Transverse Electro Magnetic) in einem Frequenzbereich zwischen 800 und 1000 MHz gesendet, endend mit einer für Frequenzen von 850 bis 950 MHz entsprechend angepaßten Last mit einer charakteristischen Impedanz von 75 Ω . Das für die Exposition eingesetzte Blockschema bestand aus einem Signalgenerator (10 MHz - 18 GHz) Sweep RF HP - 8620C mit Flatness +/- 0,25 dB mit geglättetem max. Ausgang von + 13 dBm, verbunden mit einem Analysator mit Skalarnetz PM 1038 log amp/memory; außerdem wurde ein direktonaler Koppler HP 796D mit einer Düse vom Typ N und ein Fühlkopf PM 10-0328 verwendet, die mittels Litzen 50 Ω BNC den Generator und den Analysator mit dem Eingang der TEM zur Messung des Return Loss (RL) verbunden, der sich in der Charakterisierung im Vergleich zum offenen System (ohne Last) mit einer Funktion darstellte, wo das Maximum (22 dB) bei 900 MHz lag, um dann fast symmetrisch auf 1000 MHz abzusinken und auf diese Weise sehr niedrige Werte des Verhältnisses der stationären Welle Voltage Standing Wave Ratio (VSWR) zu sichern. Die in Abb. 1 dargestellte TEM-Zelle ist eine Übertragungslinie mit drei Ebenen und geschlossenen Seitenwänden, damit keine Energie nach außen abstrahlen kann und die elektromagnetische Isolierung der Umgebung gewährleistet ist. Sie ist für Frequenzen über 800 MHz und für eine charakteristische Impedanz von 75 Ω ausgelegt und erzeugt ein stabiles elektromagnetisches Feld im Inneren (0 - 2 dBm).

SHAM-EXPOSITION

Um die Einflüsse der Geräte auf die Zellen in der Kultur zu überprüfen, ohne aber ein Feld zu erzeugen, wurden Leukämiezellen (CEM) für 2, 4, 24 und 48 Stunden innerhalb und außerhalb der TEM-Zelle gezüchtet, ohne eine elektromagnetische Strahlung bei abgeschaltetem Generator zu erzeugen. Am Ende der Sham-Exposition verfuhr man wie mit den Mustern, die den Proliferationstests und der FACS-Analyse ausgesetzt waren.

ZELLPROLIFERATIONSTESTS

100 µl/Schacht Zellsuspension (5000 Zellen, die einer Exposition oder keiner Exposition unterzogen wurden) wurden auf einer ELISA-Platte zu 96 Schächten verteilt. Für jeden Expositionspunkt wurden 12 Ableeschächte vorbereitet, um statistisch gültige Werte zu erzielen. Jedem Schacht wurden 50 µg MTT (3-[4,4-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyl Tetrazolium Bromid) zugegeben, wonach eine 4-stündige Inkubation bei 37 °C folgte. MTT wird NADP/NADPH-abhängig von metabolisch aktiven Zellen in Formazansalze gespalten, welche nicht wasserlöslich sind und violette Niederschläge erzeugen. Anschließend wurden 100 Mikroliter Buffer zur Solubilisation (0,01 M HCl, 10 % SDS) hinzugefügt und sie wurden über Nacht bei 37 °C erneut inkubiert. Die Formazankristalle werden so solubilisiert und spektrofotometrisch (550 nm - 690 nm) und mit einem Ableser mit ELISA-Platten quantifiziert. Die Intensität der Färbung steht in direktem Zusammenhang mit der Menge der metabolisch aktiven Zellen im Schacht zum Zeitpunkt der Zugabe von MTT. Der Proliferationsindex wurde berechnet, indem das Verhältnis zwischen der direkten Messung des untersuchten Musters und eines Referenzmusters hergestellt wurde. Die Standardabweichung wurde nach den klassischen Regeln der Fehlerfortpflanzung berechnet.

ZYTOFLUORIMETRISCHE FLUSSANALYSE (FACS)

Zwecks Bestimmung der DNA-Menge wurden die Zellen für 24 und 48 Stunden gezüchtet, sie wurden mit und ohne DXR in Äthylalkohol zu 70 % bei 4 °C für 30 Minuten fixiert. Die Kerne wurden mit 25 µg/ml Propidiodid gefärbt und mit 1 mg/ml Rnase für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Der Kerngehalt an DNA wurde mit einem Zytofluorimeter bestimmt.

TEMPERATURKONTROLLEN

Die Experimente wurden unter ständigem Monitoring der Temperatur mittels Alkoholthermometern durchgeführt, die in die Kulturböden eingetaucht waren. Eine weitere Kontrolle bestand in der Verwendung von Sonden mit Thermoelement, die nur nach vorübergehender Abschaltung des Strahlenfeldes abgelesen wurden.

RAYGUARD-EXPOSITION

Die RayGuard-Vorrichtung wurde in die TEM-Zelle eingeführt, während die Zelle einem elektromagnetischen Feld ausgesetzt wurde. Die Präsenz der RayGuard-Vorrichtung hatte keine Auswirkung auf die Uniformität des Feldes, wobei die Rückwelle analysiert wurde, um die Uniformität des Feldes bei den kultivierten Zellen zu prüfen.

ERGEBNISSE

Proliferationstest bei normalen Lymphozyten

Die normalen Lymphozyten, die über einen Zeitraum von 2, 24 und 48 Stunden einem Magnetfeld von 900 MHz ausgesetzt wurden, wiesen folgende Änderungen bei der Proliferationsrate (Abb. 1a, exp. 12) auf:

Nach 2 Stunden wurde kein wesentlicher Unterschied zwischen der Proliferationsrate der Kontrollgruppe und der exponierten Zellen festgestellt.

Nach 24 Stunden kam es zu einem deutlichen Anstieg der Proliferationsrate bei den exponierten Lymphozyten im Vergleich zu den nicht exponierten Zellen der Kontrollgruppe.

Nach 48 Stunden war die Proliferationsrate der exponierten Lymphozyten deutlich geringer als jene der nicht exponierten Zellen der Kontrollgruppe.

Die Präsenz der RayGuard-Vorrichtung in der TEM-Zelle, welche¹ die kultivierten Zellen enthält, **neutralisierte die Auswirkungen des elektromagnetischen Feldes** auf die Proliferation der Lymphozyten. Die Anzahl der Zellen blieb bei einem Vergleich zwischen den behandelten und den nicht behandelten Zellen der Kontrollgruppe (Abb. 1b, exp 11) gleich.

Proliferationstests bei lymphoblastoiden Tumorzellen (CEM)

T-leukaemia CEM-Zellen, die über einen Zeitraum von 2, 24 und 48 Stunden 900 MHz ausgesetzt wurden (Abb. 2a, exp 5a) zeigen folgende Veränderungen:

Kein wesentlicher Unterschied zwischen der Proliferationsrate der Kontrollgruppe und der exponierten Zellen nach 2 und nach 24 Stunden. Erst nach 48 Stunden verringerte sich die Proliferationsrate der exponierten T-leukaemia Tumorzellen deutlich im Vergleich zu den nicht exponierten Zellen der Kontrollgruppe.

Die Präsenz der RayGuard-Vorrichtung innerhalb der TEM-Zelle, welche die kultivierten CEM-Zellen enthält, neutralisierte die Auswirkungen des elektromagnetischen Feldes auf die Proliferation der T-leukaemia Tumorzellen (Abb. 2b, exp 4). Die Anzahl der behandelten Zellen und der Zellen der Kontrollgruppe blieb unverändert.

FACS-Analyse bei normalen Lymphozyten

Die FACS-Analyse der normalen Lymphozyten (von einem gesunden Spender), die **elektromagnetischen Feldern mit 900 MHz ausgesetzt wurden**, zeigte eine **Veränderung beim Prozentsatz der Zellzyklusphasen** in jener Zellpopulation auf, die 24 und 48 Stunden exponiert wurde. Nach 48 Stunden Behandlung stieg die Anzahl der zirkulierenden Zellen (proliferierende und² aktivierte Zellen) im Vergleich zu den Zellen der Kontrollgruppe an (Abb. 6 vom 15.01).

Die FACS-Analyse der normalen Lymphozyten mit und ohne (Kontrollzellen) Exposition in Form eines elektromagnetischen Feldes **bei gleichzeitiger Präsenz einer RayGuard-Vorrichtung** zeigt keine Veränderung beim G0/G1, S und G2/M Zellzyklusphasenprozentsatz.

FACS-Analyse bei lymphoblastoiden Tumorzellen (CEM)

Bei der FACS-Analyse hat sich nach 24 und 48 Stunden Exposition durch ein elektromagnetisches Feld im Vergleich zu den Zellen der Kontrollgruppe ein erhöhter Prozentsatz an proliferierenden Zellen ergeben (S und G2/M-Phase). Die Präsenz der RayGuard-Vorrichtung innerhalb der TEM-Zelle stellt die normale Proliferationsrate mit einem Prozentsatz der Zellen in den G1, S und G2/M-Phasen wieder her, der jenem der nicht exponierten Zellen der Kontrollgruppe entspricht (Abb. 2c). Die Ergebnisse, die erzielt wurden, indem die Zellen einem elektromagnetischen Feld bei Präsenz einer RayGuard-Vorrichtung ausgesetzt worden sind, waren mit Ergebnissen von Sham exponierten Zellen (Abb. 2d, exp 3) vergleichbar.

¹ Der englische Ausgangstext ist hier – wie an vielen anderen Stellen – sprachlich inkorrekt. Es ist nicht klar, worauf sich das „which“ bezieht, zumal das Zeitwort „contain“ in der Mehrzahlform steht.

² Sollte „end“ kein Tippfehler sein, müßte die Übersetzung wie folgt lauten: proliferierende Zellen mit aktiviertem Ende..

ZUSAMMENFASSUNG

Elektromagnetische Felder mit 900 MHz wirken sich auf die Proliferation von normalen Lymphozyten und lymphoblastoiden Tumorzellen aus. Unsere Untersuchungsergebnisse beweisen, daß der Zeitablauf des Zellzyklus und die Anzahl der teilenden Zellen durch das elektromagnetische Feld verändert werden. Die Präsenz einer RayGuard-Vorrichtung in einer elektromagnetischen TEM-Zellumgebung führt zu einer Umkehr der durch das elektromagnetische Feld verursachten Auswirkungen auf die Zellproliferation. Das elektromagnetische Feld könnte eine nach oben/nach unten verlaufende Modulierung von Genen auslösen, die in die Zellzykluskontrolle involviert sind, wobei unseren Untersuchungsergebnissen zufolge dieser modifizierte Genausdruck durch die RayGuard-Vorrichtung wieder hergestellt werden könnte. Weitere Untersuchungen der hypothetischen Genregulierung sollten durchgeführt werden, um die damit in Zusammenhang stehenden biologischen Mechanismen abzuklären. Diese vorläufigen Untersuchungsergebnisse zeigen eine interessante Auswirkung der RayGuard-Vorrichtung, die – sollten sie durch unterschiedliche Bedingungen der Exposition durch ein elektromagnetisches Feld oder durch in vivo Experimente bestätigt werden - nützlich sein können, um ³biologische Auswirkungen des elektromagnetischen Feldes zu vermeiden.

CNR BOLOGNA

³ Im Ausgangstext steht "same biological effects". Da zuvor dieser Begriff jedoch nicht vorkommt, ist die Bezugnahme durch den Ausdruck „same“ nicht geklärt. Aus diesem Grund erfolgte keine Übersetzung dieses Wortes (die ansonsten im angegebenen Kontext wie folgt lauten müßte: ..um gleiche biologische Auswirkungen des elektromagnetischen Feldes zu verhindern...)