

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik

Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Bernhard Wolf

## **Elektrisch induzierte Proliferationsbeeinflussung von Tumorzellen**

**Lilia Hafner**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr.-Ing. habil., Dr. h.c. Alexander W. Koch

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. Bernhard Wolf  
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Doris Schmitt-Landsiedel

Die Dissertation wurde am 22.12.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Elektrotechnik und Informationstechnik am 01.07.2016 angenommen.



## **Abstract**

Based on a hypothesis of Bingelli and Weinstein [32], that the transmembrane potential of different cells varies depending on the function of their stating proliferation, we analyzed the contrary effect and proved that the proliferation of cells is influenced by electric fields. So it should be ascertained whether long-term effects in human tumour cells can be achieved in this way and if therapeutically useful results are possible.

To explore whether and how electric fields effect the cellular metabolism, proliferation and morphology of tumour cells, we electrically stimulated human breast cancer cells (MCF-7) with low-frequency rectangular waving pulses at a frequency of 100Hz and harmonic field pulses of 100Hz and 150kHz. The analysis of the division of the MCF-7 cells, which were exposed to the low-frequency pulsed electrical fields, revealed that their proliferation was reduced by 20% in comparison to untreated cells. The metabolism measurements of the tumour cells, which were electrically stimulated with harmonic field pulses, showed an inhibitory effect on the cell metabolism (oxygen consumption) of the treated groups. In order to prevent electrochemically induced side effects within the direct stimulation, we also studied how the cells behave within the direct electrical stimulation compared to the stimulation with capacitive coupled electric fields. Using the finite element simulation, it could be estimated which field intensities occur in the cellular level. Furthermore it could be proved that the cell quantity reduction within the direct stimulation was not caused by cytotoxic effects or corrosive effects.

Moreover during the cell membrane potential measurements, the hyperpolarization of one half of a cells and the simultaneous depolarization of the other half could be ascertained. The potential fluctuation of the membrane (hyperpolarization/depolarization) seems to have a great influence on the proliferation of tumour cells. Therefore it can be suggested that the relation between the potential membrane variation, which was caused by the externally applied electrical field, and the cellular division activity, really exists. A connection between the ion channels, possible membrane variation evoked by these channels and an eventual tumour proliferation detention, is not determined yet.

It was also confirmed that acidosis in the extracellular range leads, on the one hand, to the inhibition of the proliferation and, on the other one, to membrane depolarization. This is probably caused by the intracellular pH-regulating mechanisms.

Further, the usage of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange carrier blocker (amiloride) was examined. It causes a slight membrane hyperpolarization within the increasing extracellular acidosis. The resulting proliferation inhibition is more determined than in the control group (untreated cells). Consequently it can be suggested that the connection between extracellular acidosis, membrane depolarization and the inhibition of proliferation really exists. However, the hypothesis of Binggeli and Weinstein [32] affirms the entity of correlation between the membrane hyperpolarization and the inhibition of proliferation. But this antithesis does not give us the sufficient understanding of the action mechanism between the membrane depolarization/hyperpolarization and the proliferation within the extracellular acidosis. Presumptively there are some mechanisms in vivo that cannot be acquired with the investigation of in vitro cell cultures.





## Zusammenfassung

Basierend auf einer Beobachtung von Binggeli und Weinstein [32], dass sich das Transmembranpotential verschiedener Zellen in Abhängigkeit ihrer Proliferation verändert, wurde im Rahmen dieser Arbeit der umgekehrte Effekt - die Proliferation von Zellen unter dem Einfluss von elektrischen Feldern - untersucht. Damit sollte geklärt werden, ob auf diese Weise langfristige Effekte an humanen Tumorzellen erzielt werden können und, ob sich daraus therapeutische Möglichkeiten ergeben.

Um zu untersuchen, ob und wie elektrische Felder den Metabolismus, das Teilungsverhalten und die Zellmorphologie von Tumorzellen beeinflussen, wurden humane Mammakarzinomzellen (MCF-7 Zellen) mit niederfrequenten gepulsten elektrischen Feldern mit einer Frequenz von 100Hz und sinusförmigen elektrischen Feldern mit einer Frequenz von 100Hz bzw. 150kHz befeldet. Die Untersuchung des Teilungsverhaltens der MCF-7 Zellen, welche einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld ausgesetzt waren, zeigte eine um 20% reduzierte Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Messung des Zellmetabolismus von mit sinusförmigen elektrischen Feldern stimulierten Tumorzellen zeigte einen inhibitorischen Effekt auf den Zellmetabolismus (Sauerstoffverbrauch) der behandelten Gruppen. Um elektrochemisch bedingte Nebeneffekte bei der direkten Stimulation zu vermeiden, wurde zudem analysiert, wie sich die Zellen bei einer direkten elektrischen Stimulation im Vergleich zu einer Stimulation mit einem kapazitiv eingekoppelten elektrischen Feld verhalten. Mit Hilfe der Finite Elemente Simulation konnte abgeschätzt werden, welche Feldstärken auf der Zellebene entstehen können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Zellzahlreduktion bei der direkten Stimulation nicht durch zytotoxische oder elektro-korrosive Effekte verursacht wurde.

Weiterhin konnte anhand der durchgeführten Zellmembranpotential-Messungen die Hyperpolarisation der einen und die gleichzeitige Depolarisation der anderen Zellhälfte unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes nachgewiesen werden. Die Membranpotential-Fluktuation (Hyperpolarisation/Depolarisation) scheint einen wichtigen Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen zu haben. Dies lässt vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen einer – durch ein extern appliziertes elektrisches Feld verursachten – Membranpotentialänderung und der zellulären Teilungsaktivität besteht. Der Zusammenhang zwischen den Ionenkanälen und der dadurch induzierten Membranpotentialänderung und einer potenziellen Tumorphiliferationshemmung ist noch nicht verstanden.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Azidose im extrazellulären Bereich einerseits zu einer Proliferationshemmung und andererseits zu einer Membrandepolarisation führt. Dies wird vermutlich durch die intrazellulären pH-Regulationsmechanismen verursacht. Weiterhin verursacht die Verwendung eines  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Karrierblockers (Amilorid) eine leichte Membranhyperpolarisation bei steigender extrazellulärer Azidose. Die Proliferationshemmung ist stärker ausgeprägt als bei unbehandelten Zellen. Dies lässt einen Zusammenhang zwischen extrazellulärer Azidose, Membrandepolarisation und Proliferationshemmung vermuten. Die Hypothese von Binggeli und Weinstein [32] besagt jedoch eine Korrelation zwischen Membranhyperpolarisation und Proliferationshemmung. Dieser Gegensatz zeigt unser nicht ausreichendes Verständnis der Wirkungsmechanismen zwischen der Membrandepolarisation/Membranhyperpolarisation und der Proliferation unter extrazellulärer Azidose. Es ist zu vermuten, dass es in vivo Mechanismen gibt, welche durch Untersuchungen an isolierten Zellen in vitro nicht ausreichend erfasst werden können.



## ***Danksagung***

Diese Dissertation entstand im Rahmen des von der Heinz Nixdorf-Stiftung geförderten Projekts EvoPot am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik der Technischen Universität München.

Ein großer Dank geht an meinen Doktorvater Herrn Professor Dr. Bernhard Wolf für die interessante Themenstellung, die Betreuung der Dissertation und die vielen konstruktiven und motivierenden Gespräche.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls sehr herzlich für die gute Zusammenarbeit, die diversen Diskussionen und Anregungen und das gute Arbeitsklima. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Brischwein für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen, Herrn Demmel für die Hilfestellungen mit dem IMR-System und die vielen Anregungen und Diskussionen in technischen Belangen, Frau Pfister für die Unterstützung bei den Simulationen, Herrn Michelfelder für die gute Verwaltung des Biolabors, Frau Remm für die Herstellung der Glas-Sensorchips und Herrn Dr. Peter Wolf für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen im Bereich der biologischen Experimente.

Ebenso danke ich allen Studenten, die mit ihren Arbeiten zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Zusätzlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern herzlich bedanken, die mich immer unterstützt haben.

*Meinen Eltern*

# **INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>Ausgangspunkt und Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>1</b>
1.1	Motivation .....	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit .....	4
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>5</b>
2.1	<b>Zellbiologische Grundlagen .....</b>	<b>5</b>
2.1.1	Zellaufbau .....	5
2.1.2	Zellzyklus .....	7
2.1.3	Zellmetabolismus.....	8
2.1.4	Zellmetabolismus in normalen und Tumorzellen.....	9
2.1.5	Intra- und extrazellulärer pH-Wert an Tumorzellen .....	11
2.1.6	Aufbau einer Zellmembran .....	13
2.2	<b>Ionenkanäle und Tumore .....</b>	<b>15</b>
2.2.1	Ionenfluss in einer biologischen Membran .....	15
2.2.2	Spannungssensitive Ionenkanäle und Tumore .....	16
2.2.3	Einfluss der Ionenkanäle auf die Proliferation und den Zellzyklus .....	18
2.2.4	Konzepte der Wachstumsregulation: Transmembranpotential, intrazelluläre Natriumkonzentration und Gap Junction .....	20
2.2.5	Membranpotential und Proliferation.....	21
2.2.6	Das Transmembranpotential .....	25
2.3	<b>Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf Zellen.....</b>	<b>27</b>
2.3.1	Elektrische Doppelschichten an Membranen .....	27
2.3.2	Passives elektrisches Verhalten einer Zelle .....	27
2.3.3	Erwarteter Verlauf des elektrischen Feldes .....	30
2.3.4	Wellenform und Art der Stimulation .....	32
2.4	<b>Messtechnische Grundlagen.....</b>	<b>33</b>
2.4.1	Elektrochemische Effekte am Elektrode-Elektrolyt-Übergang .....	33
2.4.2	Technik der Impedanzmessung bei verschiedenen Frequenzen.....	36
2.4.3	Messtechnik zur Bestimmung des Transmembranpotentials.....	40
2.4.4	Prüfstandfunktion des Glas-Sensorchips: Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate .....	44
2.4.5	Modernes Screening-System: Intelligent Microplate Reader (IMR) .....	45
2.5	<b>Stand der Forschung zur Elektrostimulation von Tumorzellen .....</b>	<b>50</b>
<b>3</b>	<b>Materialien und Methoden.....</b>	<b>53</b>
3.1	<b>Chemikalien und Lösungen.....</b>	<b>53</b>
3.2	<b>Zusammensetzung der angewendeten Medien.....</b>	<b>53</b>
3.3	<b>Geräte .....</b>	<b>53</b>
3.4	<b>Software .....</b>	<b>53</b>
3.5	<b>Zellbiologische Methoden.....</b>	<b>53</b>
3.5.1	Zellkultur .....	53
3.5.2	Zellzählung .....	55
3.5.3	Resazurintest.....	55

<b>3.6</b>	<b>Elektroden zur elektrischen Stimulation der Zellen .....</b>	<b>56</b>
3.6.1	Glas-Sensorchip .....	56
3.6.2	Chronoamperometrie.....	57
3.6.3	Impedanzspektroskopie zur Untersuchung des frequenzabhängigen Verhaltens der Elektroden.....	59
<b>3.7</b>	<b>Modellierung der räumlichen Spannungs- und Feldverteilung .....</b>	<b>61</b>
3.7.1	Modellbeschreibung: Direkte elektrische Stimulation, 100Hz, 150 kHz .....	62
3.7.2	Modellbeschreibung: Kapazitive elektrische Stimulation, 100 Hz, 150 kHz.....	63
<b>3.8</b>	<b>Applikation von elektrischen Feldern .....</b>	<b>65</b>
3.8.1	Direkte Feldeinspeisung .....	65
3.8.2	Kapazitive Feldeinspeisung.....	70
<b>3.9</b>	<b>Membranpotential-Messung an einer Zelle in einem elektrischen Feld.....</b>	<b>72</b>
3.9.1	Ermittlung der optimalen Farbstoffkonzentration.....	73
3.9.2	Erstellen einer Kalibrierungskurve zum Quantifizieren einer Änderung des Membranpotentials .....	77
3.9.3	Membranpotential-Messung an einer Einzelzelle.....	80
3.9.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	82
<b>3.10</b>	<b>Untersuchung des Zellmembranpotentials unter Verwendung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austausch-Karrierblockers Amilorid und Variation der extrazellulären pH-Werte .....</b>	<b>84</b>
3.10.1	Erstellen einer Kalibrierungskurve unter Variation der extrazellulären pH-Werte .....	85
3.10.2	Membranpotential-Messung an Zellen .....	86
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>87</b>
<b>4.1</b>	<b>Eigenschaften der Elektroden .....</b>	<b>87</b>
4.1.1	Impedanzspektroskopie.....	87
4.1.2	Ermittlung des Faraday'schen Stromanteils .....	89
4.1.3	Messungen mit MCF-7 Zellen .....	92
<b>4.2</b>	<b>Numerische Modellierung des Spannungs- und Feldverlaufs.....</b>	<b>94</b>
4.2.1	Direkte elektrische Stimulation: Sinusförmige elektrische Felder, 100 Hz und 150 kHz... ..	94
4.2.2	Kapazitive elektrische Stimulation: Sinusförmige elektrische Felder, 100Hz und 150 kHz .. ..	97
<b>4.3</b>	<b>Elektrische Stimulation: Direkte Feldeinspeisung, niederfrequente gepulste elektrische Felder, 100 Hz.....</b>	<b>99</b>
4.3.1	Teilungsverhalten: Zellzahlbestimmung bei stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (MDA-MB-231 Zellen) .....	99
4.3.2	Teilungsverhalten: Zellzahlbestimmung bei stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (MCF-7 Zellen).....	100
4.3.3	Temperaturkontrolle auf dem Glas-Sensorchip während der Stimulation.....	101
4.3.4	Nachweis membrangeschädigter Zellen mit Trypanblaufärbung .....	102
4.3.5	Metabolische Messung und Morphologie von MCF-7 Zellen .....	102
4.3.6	Morphologie von MCF-7 Zellen .....	104
<b>4.4</b>	<b>Elektrische Stimulation: Direkte Feldeinspeisung, sinusförmige elektrische Felder, 100Hz.....</b>	<b>105</b>
4.4.1	Metabolische Messung von MCF-7 Zellen .....	105
4.4.2	Morphologie von MCF-7 Zellen .....	107
<b>4.5</b>	<b>Elektrische Stimulation: Direkte Feldeinspeisung, sinusförmige elektrische Felder, 150kHz.....</b>	<b>108</b>

---

4.5.1	Metabolische Messung von MCF-7 Zellen .....	108
4.5.2	Morphologie von MCF-7 Zellen .....	111
<b>4.6</b>	<b>Elektrische Stimulation: Kapazitive Feldeinspeisung, sinusförmige elektrische Felder, 100 Hz und 150 kHz.....</b>	<b>112</b>
4.6.1	Untersuchung des Proliferationsverhaltens mittels fluorimetrischen Resazurin-Messungen und Zellzahlbestimmung von MCF-7 Zellen .....	112
4.6.2	Morphologie von MCF-7 Zellen .....	113
<b>4.7</b>	<b>Membranpotential-Messung .....</b>	<b>118</b>
4.7.1	Zelle in einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld von -2,3 kV/m .....	118
4.7.2	Zelle in einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Gegenfeld von 2,3kV/m .....	123
4.7.3	Zelle in einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld von -230 V/m .....	125
<b>4.8</b>	<b>Untersuchung der Proliferation und des Membranpotentials unter Verwendung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austausch-Karrierblockers Amilorid und Variation der extrazellulären pH-Werte .....</b>	<b>128</b>
4.8.1	Morphologie von MCF-7 Zellen .....	130
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>133</b>
<b>5.1</b>	<b>Eigenschaften der Stimulationselektroden .....</b>	<b>134</b>
5.1.1	Elektrodenverhalten.....	134
5.1.2	Einfluss der Passivierung .....	136
5.1.3	Einfluss des Zellbewuchses .....	137
<b>5.2</b>	<b>Einfluss der elektrischen Stimulation auf Tumorzellen .....</b>	<b>138</b>
5.2.1	Niederfrequente gepulste elektrische Felder: Direkte Feldeinkopplung.....	138
5.2.2	Sinusförmige elektrische Felder: Direkte und Kapazitive Feldeinkopplung .....	139
<b>5.3</b>	<b>Induktion möglicher biologischer Effekte durch ein elektrisches Feld: Beeinflussung des Membranpotentials .....</b>	<b>143</b>
<b>5.4</b>	<b>Proliferationshemmung unter Verwendung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austausch-Karrierblockers Amilorid und Variation der extrazellulären pH-Werte .....</b>	<b>147</b>
<b>5.5</b>	<b>Fazit .....</b>	<b>149</b>
<b>5.6</b>	<b>Ausblick: Therapeutischer Ansatz.....</b>	<b>150</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>152</b>
	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>183</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>193</b>
	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>205</b>
	<b>Veröffentlichungen.....</b>	<b>209</b>





# **1 AUSGANGSPUNKT UND ZIELSETZUNG DER ARBEIT**

## **1.1 Motivation**

Laut den Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind Tumore (13%) nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen (29%) und parasitären Infektionskrankheiten (19%) die dritthäufigste Todesursache weltweit [200, 210, 211]. Allein im Jahr 2010 kam es in Deutschland zu 477.300 Krebsneuerkrankungen. Das sind etwa 7500 Patienten mehr als im Jahr 2008 [11]. Viele Tumore weisen einen epithelialen Ursprung auf. Die häufigsten, von Krebs verursachten Todesfälle bei Männern sind mit Lungenkrebs verbunden. Bei Frauen steht Brustkrebs auf Platz eins. Das Mammakarzinom macht deutlich mehr als 25% aller Krebsfälle aus. Die Sterberaten bei Krebs sind in Abhängigkeit des Region, des Alters und der Risikofaktoren signifikant verteilt [210].

Die gängige Behandlungsmethode für Tumore ist eine Kombination aus operativer Entfernung, Bestrahlung und Chemotherapie. Diese Behandlungsmethoden können jedoch eine große Anzahl an schwerwiegenden Nebenwirkungen verursachen. Die Vermeidung solcher Nebenwirkungen erfordert neue therapeutische Ansätze in der Tumorthherapie. Einen solchen neuen Ansatz in der Tumorthherapie verspricht die gezielte Beeinflussung von Zellen durch elektrische Felder. Die elektrische Stimulation wird seit langem bei verschiedenen Indikationen wie z.B. Wundheilung, Knochenheilung, Hirnstimulation, der Behandlung motorischer Störungen und Minderung chronischer Schmerzen klinisch eingesetzt. Zusätzlich verwendet man elektrische Felder in der Zellbiologie, um zelluläre Prozesse genauer zu untersuchen. Unter bestimmten Bedingungen sind diese Prozesse irreversibel und ein Einsatz in verschiedenen Gebieten der Medizin, vorrangig in der Onkologie, ist denkbar.

Daneben kann durch die Kombination der Chemotherapie mit elektrischen Feldern die Behandlungseffektivität durch synergetische Effekte gesteigert werden. Weiterhin könnte die Kombination der beiden Therapien die Verminderung der eingereicherten Dosis erlauben. So zeigten präklinische Studien den antimitotischen Effekt von sogenannten Tumor Treating Fields (TT-Felder), die Intensitäts- und Frequenz-abhängig sind und einen zusätzlichen oder synergetischen Effekt in der Kombination mit Chemotherapie aufweisen [61, 119, 191].

Außerdem ist bekannt, dass die Fähigkeit bösartiger Tumore, Metastasen zu bilden, die häufigste Todesursache ist. Viel seltener sterben erkrankte Menschen direkt an den Primärtumoren. Solche TT-Felder zeigen auch eine inhibitorische Wirkung auf Metastasen im Tiermodell [61].

Aus diesem Grund sind genauere Kenntnisse über den Einfluss der elektrischen Felder auf die Zellen erforderlich, um neue potenzielle tumortherapeutische Targets zu finden. Durch die elektrischen Felder können solche Prozesse wie z.B. Zellmigration, Zelldifferenzierung, Proliferation, Zellwachstum usw. beeinflusst bzw. beeinträchtigt werden.

Ein extern appliziertes elektrisches Feld kann sowohl den Ionendurchfluss durch die Membran als auch das Transmembranpotential beeinflussen. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass nicht nur die Aktionspotentiale von neuronalen Zellen eine funktionale Bedeutung aufweisen, sondern auch Transmembranpotentiale epithelialer Zellen mit funktionalen Zuständen korrelieren können [32, 116, 167, 179, 215]. Das Transmembranpotential ist ein grundlegendes biophysikalisches Signal in nicht-erregbaren Zellen, deren Modulation für solche Zellaktivitäten wie z.B. Proliferation von Bedeutung ist [236].

Ist eine Zelle einem elektrischen Feld ausgesetzt, führt das zu einer Membranpotentialänderung an der Zellmembran. Das Transmembranpotential ist von vielen Faktoren, wie z.B. von der Protonen- und Ionenzusammensetzung im intra- und extrazellulären Raum und deren Transport durch die Zellmembran, abhängig [193, 194, 196, 197]. Das alles kann zu Konformationszustandsänderungen an den Membranproteinen führen. Unter deren Einfluss ändern sich auch die Membranoberflächenladung, die Ionenverteilung an der Membran und die Ionenleitfähigkeit [130, 135, 192, 220]. Diese können zu vielfältigen Effekten auf die Signaltransduktion und den zellulären Metabolismus führen. Unter anderem kann dadurch Einfluss auf die Zellproliferation genommen werden. Diese kann man sowohl durch ein elektrisches Feld als auch durch den Einsatz von Kanalblockern beeinflussen.

Basierend auf verschiedenen Studien zeigten Binggeli und Weinstein, dass sich das Transmembranpotential verschiedener Zellen in Abhängigkeit von ihrer Proliferations-Tendenz verändert [32]. So weisen teilungsfähige Zellen, wie Tumorzellen oder embryonale Zellen, Transmembranpotentiale auf, die oberhalb eines Grenzwertes von ca.  $-37\text{mV}$  liegen. Die nicht teilungsfähigen Zellen, wie Muskel- und Nervenzellen, weisen Transmembranpotentiale auf, die zwischen  $-70\text{mV}$  und  $-90\text{mV}$  liegen [32]. In Abbildung 1-1 sind die Unterschiede der Transmembranpotentiale der Zellen dargestellt.

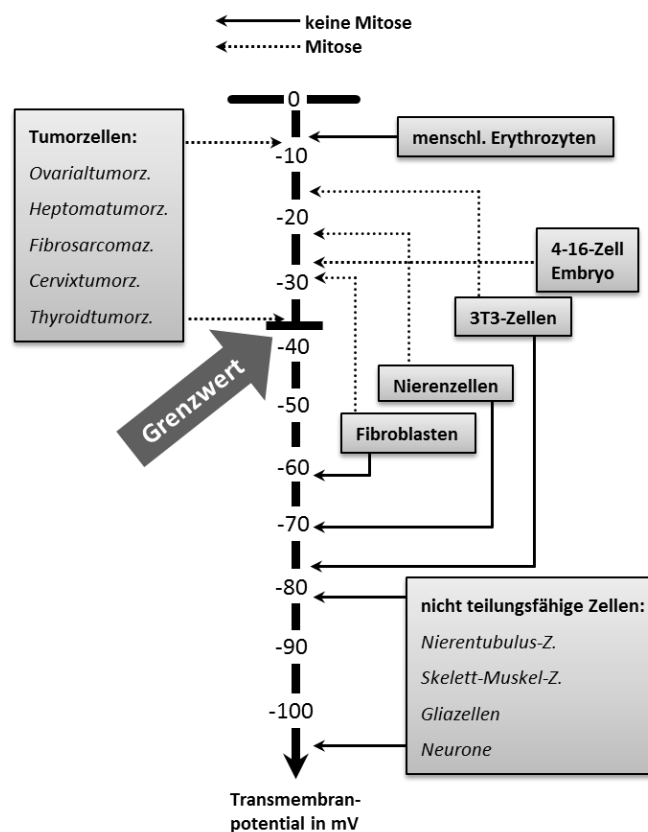


Abbildung 1-1: Transmembranpotentiale verschiedener Zellen und zellulärer Zustände. Das Transmembranpotential verschiedener Zellen verändert sich in Abhängigkeit von ihrer Proliferation. Die teilungsfähigen Zellen, wie Tumorzellen oder embryonale Zellen, weisen Transmembranpotentiale auf, die oberhalb eines Grenzwertes von ca.  $-37\text{mV}$  liegen. Die nicht teilungsfähigen Zellen, wie Muskel- und Nervenzellen, weisen Transmembranpotentiale auf, die zwischen  $-70\text{mV}$  und  $-90\text{mV}$  liegen. Erstellt nach einer Vorlage aus [80], basierend auf den Daten von [32].

Bislang gibt es für dieses Phänomen keine überzeugende Erklärung. Laut verschiedener Autoren können elektrische Effekte an Zellmembranen großen Einfluss auf die Proliferation haben [26, 76, 77, 82, 221]. Der Einfluss und die Aktivität von Ionenkanälen auf die Proliferation und das daraus folgende neoplastische Wachstum werden zunehmend diskutiert [71, 82, 130, 135]. Verschiedene metabolische Prozesse in der Zelle verursachen diverse Protonen- und Ionenbewegungen. Diese resultieren aus elektrischen Strömen und Feldern an und in einer Zelle [80]. Die zellulären Wirkungsmechanismen der elektrischen Felder sind sehr komplex und trotz vielzähliger Studien noch nicht komplett verstanden. Zusätzlich wurden in verschiedenen Literaturquellen widersprüchliche Ergebnisse erzielt [70, 117]. Bei der elektrischen Stimulation muss man allerdings einen Kompromiss zwischen dem erzielten Erfolg und unerwünschten Nebenwirkungen finden [89].

Die Erforschung eines Zusammenhangs zwischen den Änderungen des Membranpotentials, welche durch extern angelegte elektrische Felder verursacht werden und einer Proliferationshemmung bei humanen Mammakarzinomzellen, ist am Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik (HNLME) der Technischen Universität München im Rahmen des Projektes „EvoPot“ ausgeführt worden. In diesem Projekt wurde eine mögliche therapeutische Relevanz der Beeinflussung des Transmembranpotentials von Tumorzellen mittels multiparametrischer bioelektrischer Chipsysteme analysiert.

## 1.2 Zielsetzung der Arbeit

Der Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit ist die Beobachtung von Binggeli und Weinstein, die besagt, dass sich das Transmembranpotential verschiedener Zellen in Abhängigkeit von ihrer Proliferation verändert. Dabei sollen durch externe elektrische Felder induzierbare Einflüsse des Transmembranpotentials und des Ionendurchflusses auf die Zellproliferation exakt betrachtet werden. Zudem sollen die zellulären Signalwege auf die das elektrische Feld einwirkt, genauer analysiert werden.

Für die Erklärung einer möglichen Feldwirkung sollen verschiedene Herangehensweisen bei der Experimentplanung (verschiedene Befeldungsprotokolle) untersucht werden. Dafür werden die Zellen zum einen mit gepulsten niederfrequenten elektrischen Feldern und zum anderen mit sinusförmigen elektrischen Feldern im niederfrequenten und mittleren Frequenzbereich beaufschlagt, wobei die Wechselwirkungen zwischen diesen Feldern und zellulären Prozessen untersucht werden. Als Zellmodell wird eine humane Mammakarzinom-Zelllinie (MCF-7 Zelllinie) dienen. Um die möglichen elektrochemischen Nebenwirkungen zu untersuchen, stimuliert man die Zellen zusätzlich mit einem kapazitiv eingekoppelten elektrischen Feld. In beiden Fällen (direkte bzw. kapazitive elektrische Stimulation) soll mit Hilfe des Simulationsprogramms COMSOL Multiphysics abgeschätzt werden, welche Feldstärken auf der Zellebene entstehen können.

Die elektrische Stimulation der Zellen muss einerseits zu den gewünschten stimulierenden Effekten führen, andererseits müssen zytotoxische Effekte oder elektro-korrosive Effekte an den Stimulationselektroden vermieden werden [47, 152]. Für die gemessenen biologischen Effekte stehen nicht die elektrochemischen Prozesse sondern die Effekte im Elektrolytmedium im Vordergrund. Aus diesem Grund sollen der Ladungstransfer und die Stromdichten, die beim Anlegen einer Stimulationsspannung an den Elektroden entstehen, ermittelt werden.

Zunächst wird eine Änderung des Transmembranpotentials als eine Antwort auf die Wirkung eines elektrischen Feldes untersucht. Durch ein extern appliziertes elektrisches Feld konnten mehrere Signalwege aktiviert werden. Folglich wird die Proliferation der Zelle als Antwort auf den Einfluss von elektrischen Feldern (niederfrequente monopolare Rechteckpulse mit einer Frequenz von 100Hz) untersucht. Damit soll geklärt werden, ob langfristige Effekte an humanen Tumorzellen erzielt werden können und ob sich daraus therapeutische Möglichkeiten ergeben.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es aufzuklären, ob sich die Proliferation, der Metabolismus und die Morphologie von Tumorzellen durch das Anlegen elektrischer Felder (sinusförmige Feldpulse mit einer Frequenz von 100Hz bzw. 150kHz) beeinflussen bzw. inhibieren lassen. Anhand von Literatur [244], die zeigt, dass die extrazellulären pH-Werte einen Einfluss auf das Membranpotential aufweisen und unter Berücksichtigung möglicher therapeutischer Aspekte sollen weiterhin am Beispiel der MCF-7 Zellen Effekte von verschiedenen extrazellulären pH-Werten auf den Metabolismus und das Transmembranpotential unter Verwendung von Kanalblockern wie Amilorid (Blocker des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Carriers) untersucht werden.

## **2 EINLEITUNG**

### **2.1 Zellbiologische Grundlagen**

Eine Zelle stellt ein hoch komplexes, sich selbst erhaltendes System dar und ist die kleinste Einheit aller lebenden Organismen. Sie versorgt sich selbstständig mit Nährstoffen und kann durch Teilung für ihren Fortbestand sorgen.

#### **2.1.1 Zellaufbau**

Im Laufe der Evolution haben sich zwei Gruppen von Zellen gebildet, die sich in ihrem Aufbau stark unterscheiden: Prokaryonten und Eukaryonten.

*Prokaryonten* sind einfach aufgebaute Zellen ohne Zellorganellen, wie z.B. Zellkern oder Mitochondrium. Sie besitzen einen einzigen cytoplasmatischen Bereich mit DNA, RNA und Proteinen. Prokaryontische Zellen sind unizelluläre Lebewesen und zwischen 1 und 10 Mikrometer groß.

*Eukaryonten* sind dagegen dazu wesentlich komplexer aufgebaut. Sie besitzen membranbegrenzte Strukturen (z.B. Mitochondrien oder Chloroplasten), sogenannte Organellen, und einen Zellkern, in dem sich das Erbgut befindet. Ihre Größe kann in Abhängigkeit von Zelltyp zwischen 10µm und 100µm variieren. Bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Pantoffeltierchen) leben Eukaryontenzellen in einem differenzierten Zellverband, in dem jeder Zelltyp eine bestimmte Funktion erfüllt. Zu den Eukaryonten zählen Tiere, Pflanzen und mehrzellige Pilze.

Der Aufbau einer Krebszelle ist in Abbildung 2-1 dargestellt.

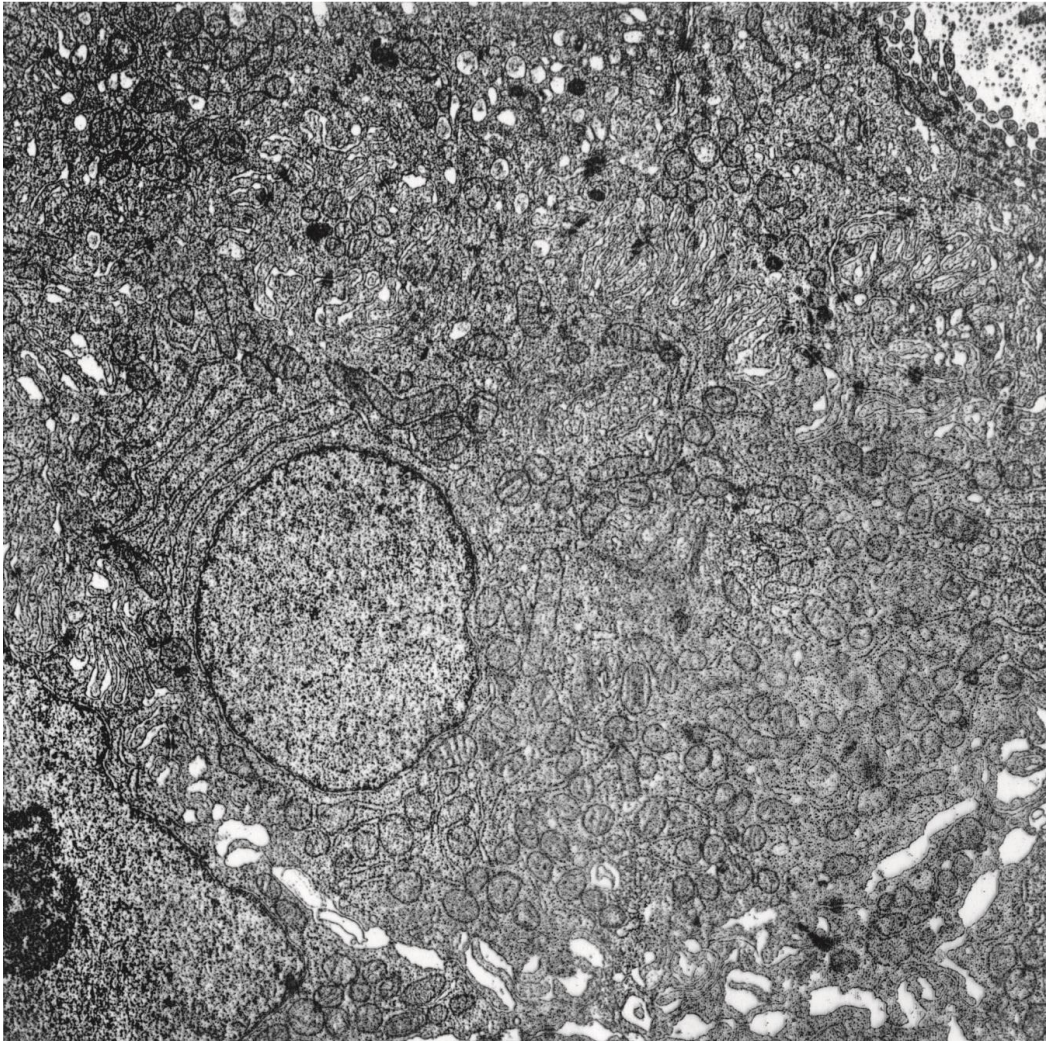


Abbildung 2-1: Der Aufbau einer Krebszelle (Kolorektales Karzinom). Elektronenmikroskopische Aufnahme (TEM). Der Zellkern, die Mitochondrien, die Ribosomen und die Zellmembran sowie weitere Zellorganellen sind deutlich zu erkennen. Nicht nur die Zellmembran selbst, sondern auch die intrazellulären Membranen stellen die strukturbildenden Elemente in Zellen dar und zeigen elektrische Effekte. Aufnahme: B. Wolf [25].

Der Aufbau der Tierzelle wird im Folgenden durch die Beschreibung einzelner Kompartimente genauer erläutert:

*Doppellipidschicht-Zellmembran:* Ort vieler biochemischer Prozesse (Lipidstoffwechsel, oxidative Phosphorylierung), bildet umschlossene Kompartimente, Transport spezifischer Metaboliten;

*Zellkern:* steuert alle Lebensvorgänge innerhalb der Zelle, enthält das Genom (sowie Mitochondrien- und Chloroplasten-DNA), Syntheseort für DNA (Erbinformation) und RNA (Übertragung der Erbinformation ins Plasma), Bildung der Ribosomen, Stoffaustausch;

*Ribosomen:* Synthese löslicher Proteine, integraler Membranproteine, Herstellung von Lipiden, Speicherort für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen.

*Endoplasmatisches Reticulum (ER):* Transport der Proteine, die bei der Eiweißsynthese entstanden sind, Herstellung der Lipiden, Stoffaustausch zwischen Zellkern und Zytoplasma, Stofftransport, Speicherung, Stoffumwandlung;

*Raues ER:* hält auf seiner Membran viele Ribosomen gebunden;

*Glattes ER:* ER-Bereiche ohne gebundene Ribosomen;

*Golgi-Apparat:* besteht aus Golgi-Zisternen, empfängt Lipide und Proteine vom ER und transportiert diese weiter zu Zielorten. Kovalente Modifizierung von Molekülen;

*Mitochondrien:* Erzeugung von ATP-Molekülen („Energiekraftwerke“ der Zelle), Wärmeproduktion;

*Lysosomen:* Abbau von funktionsuntüchtigen Makromolekülen und Partikeln mit Hilfe von Verdauungsenzymen;

*Endosomen:* Durchlauf des durch Endozytose aufgenommenen Materials weiter zu Lysosomen;

*Peroxisomen:* kleine vesikuläre enzymhaltige Kompartimente, in denen oxidative Reaktionen stattfinden;

*Cytosol:* Hauptort der Proteinsynthese, des Proteinabbaus und zellulären Intermediärstoffwechsels;

*Cytoplasma:* besteht aus Cytosol und cytoplasmatischen Organellen

*Cytoskelett:* mechanischen Stabilisierung und Formgebung der Zelle. Außerdem ist es für die Bewegung der ganzen Zelle sowie für Transportvorgänge im Zellinneren verantwortlich. Es ist aus mehreren Filamenten aufgebaut: Aktinfilamente (6-8nm), Intermediärfilamente (10nm) und Mikrotubli (25nm).

## 2.1.2 Zellzyklus

Durch die Proliferation entstehen zwei genetisch identische Tochterzellen. Diese Vermehrung geschieht meistens durch die mitotische Zellteilung.

Der eukaryotischen Zellzyklus kann in vier Phasen eingeteilt werden; G1-, S-, G2- und M-Phase. G1-, S- und G2-Phase werden als Interphase bezeichnet.

Während der S-Phase werden die Chromosomen verdoppelt. Das ist eine wichtige Voraussetzung für die Zellteilung. Auf die S-Phase folgt die M-Phase, in der zwei wesentliche Vorgänge, wie die Teilung des Zellkerns (Mitose) und die Teilung des Cytoplasmas (Cytokinese), erfolgen. Nach der S-Phase sind zwei neue genetisch identische Zellen entstanden. Zwischen S-Phase und M-Phase liegen G-Phasen (Gap-Phasen): Die G1-Phase zwischen M-Phase und S-Phase und die G2-Phase zwischen S-Phase und M-Phase. In beiden Zwischenphasen vergleicht die Zelle interne und externe Parameter, um sicher zu gehen, dass der Übergang in die nächste Phase möglich ist. Zusätzlich haben die G-Phasen die Funktion eines Verzögerungselements, was wiederum das Zellwachstum ermöglicht. Zum Schluss der G1-Phase entscheidet sich die Zelle, in den Zellzyklus einzutreten und die Chromosomen zu verdoppeln. Zum Schluss der G2-Phase wird überprüft, ob die Zelle bereit ist, in die M-Phase über zu gehen, wodurch eine vollständige DNA-Duplikation sichergestellt wird.

Bei einem 24-h-Zellzyklus einer tierischen Zelle würde die Interphase ca. 23h betragen und die M-Phase nur 1h. Das Zellwachstum geschieht in der Interphase. In der Mitose findet die Zellteilung statt [20].

Im Falle von ungünstigen Umweltbedingungen ist es möglich, dass die Zellen in der G1-Phase anhalten und sogar in eine G0-Phase (Ruhezustand) übergehen. In diesem Zustand können sie von Tagen bis zu Jahren verharren. Viele Zellen, wie z. B. Nervenzellen, befinden sich über die ganze Lebenszeit des Organismus in der G0-Phase.



### 2.1.3 Zellmetabolismus

Die Zellen sind von der Zufuhr von Energie abhängig. Diese Energie benötigt man zum Überleben. Sie wird aus Nahrungsmolekülen gewonnen. Die Energiegewinnung untergliedert sich in die folgenden Schritte: die enzymatische Verdauung, die Glykolyse im Cytosol, den Zitronensäurezyklus in den Mitochondrien und die oxidative Phosphorylierung an der Innenmembran der Mitochondrien. Wir betrachten zuerst den Zellmetabolismus einer normalen Zelle.

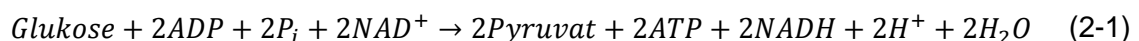
#### **Enzymatische Verdauung**

Im ersten Schritt, der sogenannten enzymatische Verdauung, werden die großen Polymere im Darmtrakt in ihre Monomere abgebaut. So werden Proteine zu Aminosäuren, Lipide zu Fettsäuren und Glycerin und Polysaccharide zu Zucker abgebaut. Nach dem Abbau werden die Moleküle durch das Blut zu den Zellen transportiert, genauer gesagt in deren Cytosol, wo die Oxidation beginnt.

#### **Glykolyse**

Bei der Verwertung von Zuckern ist der nächste Schritt der Energiegewinnung die Glykolyse. Dabei wird ein Glukosemolekül mit C<sub>6</sub>-Körper in zwei Pyruvat Moleküle mit jeweils drei Kohlenstoffatomen umgewandelt. Durch die Glykolyse werden zwei Moleküle Adenosintriophosphat (ATP) und zwei Moleküle Nicotinamidadenindunukleotid (NADH) als Energieträger erzeugt. Der Abbau erfolgt in zehn enzymkatalysierten Einzelreaktionen. Die Glykolyse findet im Cytoplasma der Zelle statt. Die Reaktion ist anaerob, benötigt also keinen Sauerstoff.

Zusammengefasst ist die Bilanz dieser Reaktion:



#### **Gärung**

Bei anaeroben oder schlecht mit Sauerstoff versorgten Organismen wird die Energie durch die Gärung gewonnen. Sowohl das durch die Glykolyse erzeugte Pyruvat als auch der Energieträger NADH verbleiben im Cytosol. Das Pyruvat wird durch NADH zu Laktat reduziert. Durch diese Reduktion wird NADH (NADH+H<sup>+</sup>) zu NAD<sup>+</sup> oxidiert. Das saure Laktat wird von der Zelle abgegeben und kann mit entsprechender pH-Sensorik erfasst werden.

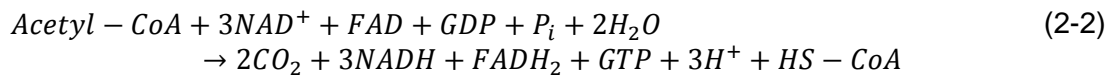
#### **Zitronensäurezyklus**

Unter aeroben Bedingungen wird in Cytosol produziertes Pyruvat in den Mitochondrien zu Acetyl-CoA oder Oxalacetat umgewandelt und dann in den Zitronensäurezyklus eingespeist. Der Zitronensäurezyklus führt zur Oxidation der Kohlenstoffatome der Acetylgruppe. Dabei entstehen als Endprodukte CO<sub>2</sub> und energiereiche Transportmetaboliten in Form von NADH und FADH<sub>2</sub>. Das CO<sub>2</sub> wird aus dem Mitochondrium als Abfallprodukt ausgeschieden und von



der Zelle an ihre Umgebung abgegeben. Die energiereichen Elektronen von NADH und  $FADH_2$  werden in die membrangebundene Elektronentransportkette eingeschleust.

Die Gesamtreaktion lautet:



Bei diesem Zyklus entstandenes  $\text{CO}_2$  äußert sich ebenfalls in einer Änderung des extrazellulären pH-Werts, welcher mit einer entsprechenden Sensorik quantifiziert werden kann.

### **Oxidative Phosphorylierung**

Im letzten Schritt des Zellmetabolismus wird die meiste chemische Energie freigesetzt. Bei diesem Vorgang werden energiereiche Transportelektronen von NADH und  $FADH_2$ , die durch die Oxidation anderer Moleküle entstanden sind, in die Elektronentransportkette eingeschleust. Während der Bewegung von Elektronen entlang dieser Kette wird Energie freigesetzt, da die Elektronen einen immer niedrigeren energetischen Zustand annehmen. Durch die Energie der Elektronen kann der Proteinkomplex Protonen in den Intermembranraum der Mitochondrien pumpen. Der dabei entstehende Protonengradient treibt die ATP-Synthase an, welche ATP synthetisiert. Nach dem Durchlaufen der Atmungskette werden die energiearmen Elektronen auf Sauerstoff übertragen, der aus dem Cytosol in die Mitochondrien diffundiert. Zusammen mit Protonen bildet dieser Sauerstoff dann Wasser als Endprodukt.



Die vollständige Oxidation eines Moleküls Glucose zu  $\text{H}_2\text{O}$  und  $\text{CO}_2$  produziert ca. 30 ATP-Molekülen. In der Glykolyse wird Glukose zu Pyruvat abgebaut und dabei werden 2 ATP-Moleküle produziert. Im ersten Fall liegt der Wirkungsgrad bei 60%, im zweiten Fall bei ungefähr 5% [20, 98, 128].

#### **2.1.4 Zellmetabolismus in normalen und Tumorzellen**

Wie oben beschrieben, erfolgt in normalen Zellen die ATP-Produktion durch zwei metabolische Wege: Glykolyse und oxidative Phosphorylierung. In der Glykolyse wird ein Glukose zu 2 Mol Pyruvat abgebaut und dabei werden 2 Mol ATP produziert. Unter anaeroben Bedingungen wird Pyruvat zu Lactat reduziert. Unter aeroben Bedingungen wird Pyruvat über den Zitratzyklus umgesetzt, was zur Produktion von 30 ATP-Molekülen führt. Im Vergleich zu normalen Zellen betreiben die Tumorzellen verstärkt Glykolyse. Das passiert auch in Anwesenheit von Sauerstoff. Dieses Phänomen wird als aerobe Glykolyse (Warburg-Effekt) bezeichnet [57, 104, 113, 218]. Diese scheinbare Verschwendung von Energie hat jedoch entscheidende Vorteile für die Tumorzelle. Zum einen läuft die Glykolyse sehr schnell ab, wodurch viel Glukose verwertet werden kann. Zum anderen stellt die Glykolyse wichtige Bausteine für die Synthese dringend für die Zellvermehrung benötigter

Stoffe bereit. Hierdurch kann die Tumorzelle unabhängig von den Sauerstoffbedingungen schnell wachsen [129].

Die erhöhte Laktatproduktion durch verstärkte aerobe Glykolyse und eine mangelhafte Vaskularisierung des Tumors führt zu einer Übersäuerung der Tumormikroumgebung [126, 207].

Ein weiteres Problem bei Tumoren ist die mangelnde Neubildung von Blutgefäßen in Tumoren. Das führt zu einer zeitlichen und räumlichen Fluktuation von Sauerstoff innerhalb des Tumors. Dadurch entsteht hypoxischer Stress. Als Antwort darauf wird in den Zellen das Protein HIF (hypoxia-inducible transcription factor) stabilisiert, was ein Transkriptionsprogramm initiiert. Die Energiegewinnung wird auf aerobe Glykolyse umgestellt und glykolytische Enzyme, Glukosetransporter und Inhibitoren des mitochondrialen Metabolismus werden überexprimiert. Unter anderem stimuliert HIF die Angiogenese, der Körper wird so zur Bildung neuer Blutgefäße stimuliert [169].

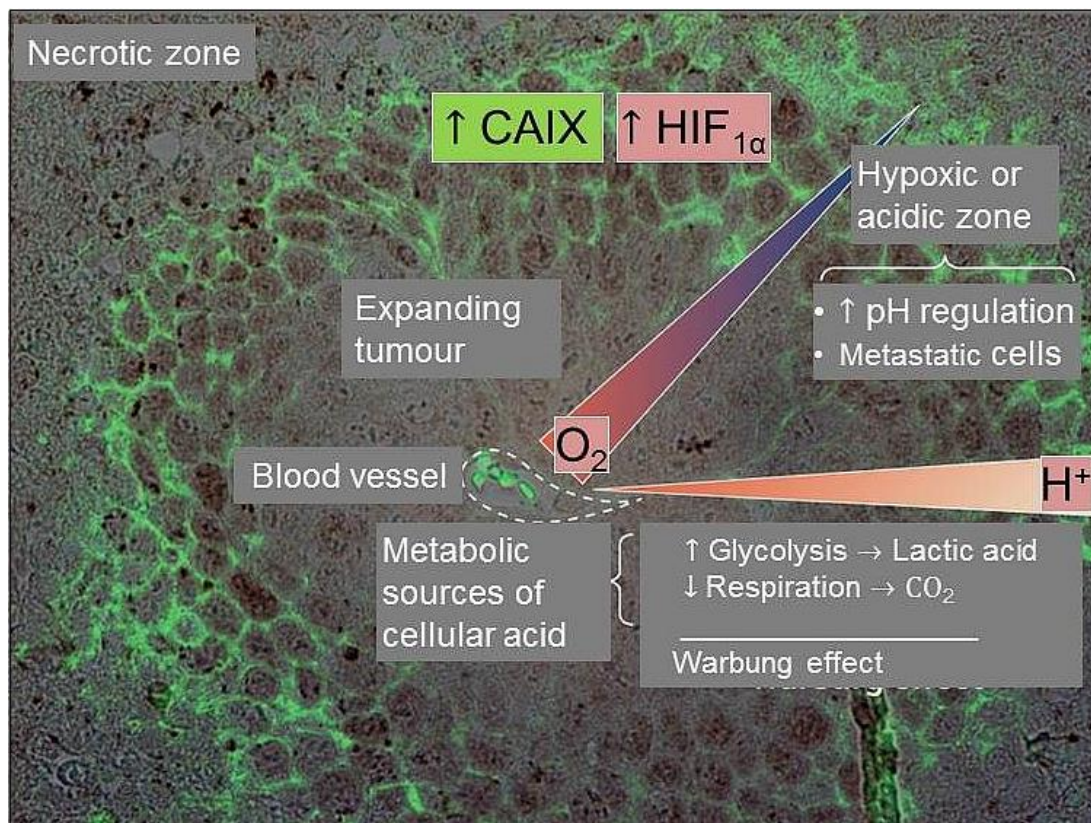


Abbildung 2-2: Tumormikroumgebung, welche die Tumorentwicklung begünstigt. Die Abbildung zeigt am Beispiel eines Adenokarzinoms die Aktivierung des Schlüsselproteins für Gefäßwachstum (hypoxia-inducible factor-1, HIF1 $\alpha$ ) und der carbonischen Anhydrase IX. Entnommen aus [169].

Generell unterscheidet sich eine Tumorzelle von einer normalen Zelle durch ein unbeschränktes Proliferationspotential, Apoptose-Resistenz, Angiogenese, Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren, Gewebeinvasion und Metastasierung sowie Insensitivität gegenüber der Wachstumshemmung [36, 107].

### 2.1.5 Intra- und extrazellulärer pH-Wert an Tumorzellen

Der extrazelluläre pH-Wert ist bei den meisten Tumorzellen niedriger als bei normalen Zellen, da der Tumorzellmetabolismus im sauerstoffarmen Milieu zur Umwandlung von Glucose und anderen Substraten zu Milchsäure (Warburg-Effekt) führt [227, 231]. Im extrazellulären Raum zeigt der pH-Wert der Tumorzellen dagegen im Vergleich zu normalen Zellen eine deutliche Erniedrigung (Azidose) auf. Die extrazellulären pH-Werte in Tumorzellen liegen im Bereich von  $pH_{ex.}=6,2-6,9$  und in normalen Zellen bei  $pH_{ex.}=7,3-7,4$ . Im intrazellulären Raum weisen Tumorzellen dagegen im Vergleich zu normalen Zellen einen höheren pH-Wert auf. Die pH-Werte im intrazellulären Raum der Tumorzellen liegen im Bereich von  $pH_{in.}=7,12-7,77$  und in normalen Zellen bei  $pH_{in.}=6,99-7,05$  [107, 127, 192].

#### ***Hemmung der Proliferation durch den Ionenkanalblocker Amilorid***

Tumorzellen weisen eine Überexpression der  $Na^+/H^+$ -Austausch-Carrier auf. Diese sind in der Plasmamembran integriert und für die Regulation des intrazellulären pH-Wertes zuständig. Der  $pH_{in}$ -Wert reguliert wiederum zelluläre metabolische Prozesse, insbesondere die Zellproliferation. Bisher wurden sechs Isoformen des  $Na^+/H^+$ -Austausch-Carriers bekannt (NHE1-6) [162, 201, 234].

NHE1-Antiporter werden in Tumorzellen stärker exprimiert als in normalen Zellen und sind in den meisten Tumorzellen nachgewiesen [53, 234]. Der NHE1-Antiporter ist ein integrales Membranprotein, das für die Mechanismen zur Regulation des pH-Werts zuständig ist. Die Expression der Kanäle wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren, Hormone und die metabolische Mikroumgebung (niedriges Serumgehalt, extrazelluläre Azidose oder Hypoxie) verstärkt [107].

Die  $Na^+/H^+$ -Austausch-Carrier sind für die Regulation des pH-Werts und des Zellvolumens zuständig. Unter anderem kann auch die Zellproliferation beeinflusst werden [130, 234]. Die Verwendung eines Kanalblockers könnte zu einem Zellzyklusarrest führen. Einen Überblick über den Einfluss des erhöhten intrazellulären pH-Werts und der Expressierung des  $Na^+/H^+$ -Antiporters auf die Tumorentwicklung zeigt Abbildung 2-3 [95]. Es gibt aber auch andere Mechanismen für eine Zelle, ihren pH-Wert zu regulieren [130, 192].

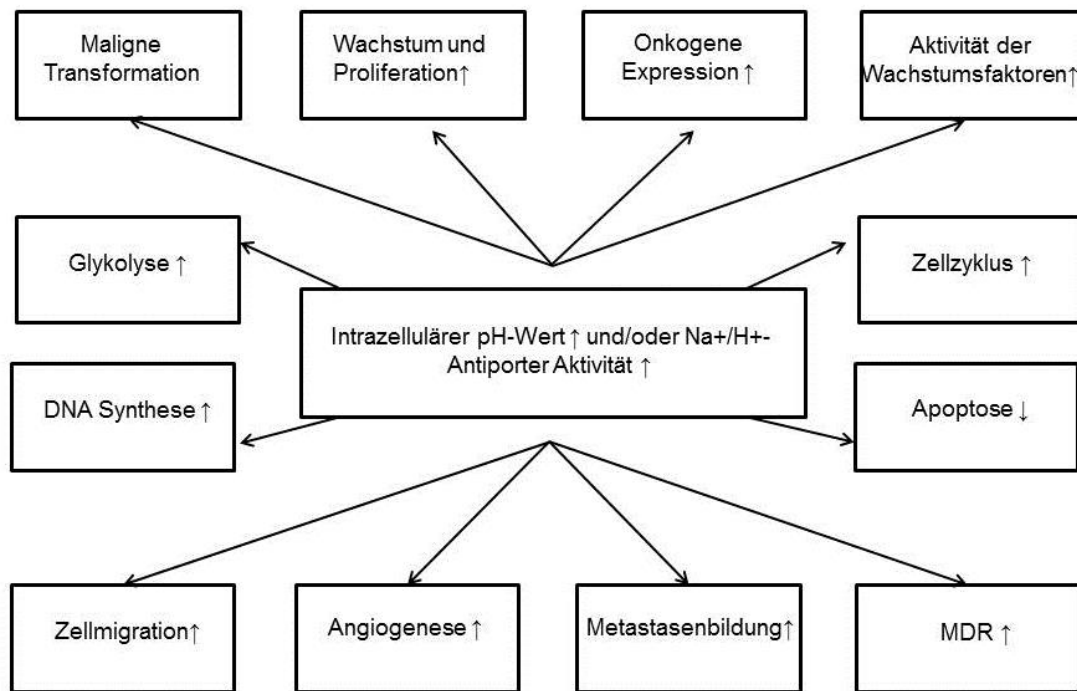


Abbildung 2-3: Überblick über den Einfluss der erhöhten intrazellulären pH-Werte und der Expressierung der Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Antipporter auf die Tumorentwicklung. Die Expression der Kanäle führt zu intrazellulärer Alkalinisation und extrazellulärer Azidose. Nur die Apoptose wird bei der Erhöhung dieser beiden Parameter unterdrückt. Entnommen aus [95].

Der extrazelluläre und der intrazelluläre pH-Wert spielen eine wichtige Rolle für das zelluläre Wachstum. Beide sind eng miteinander verbunden. Eine extrazelluläre Azidose führt zu Azidose im intrazellulären Raum. Im Gegensatz dazu bedeutet eine Abnahme des pH-Werts im cytosolischen Bereich eine Abnahme der metabolischen Aktivität und verursacht die Apoptose [85, 95, 107, 130]. Die Effekte des extrazellulären pH-Werts auf den Metabolismus und das Transmembranpotential von Zellen können mit geeigneten Kanalblockern, wie z. B. Amilorid, untersucht werden [122, 198].

Amilorid (N-Amidino-3,5-diamino-6-chlorpyrazin-2-carboxamid) ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der kaliumsparenden Diuretika. Es wird zur Behandlung eines Kaliummangels infolge von Herzinsuffizienz sowie gegen Bluthochdruck eingesetzt [22].

Die Amilorid-Strukturformel ist in Abbildung 2-4 gezeigt.

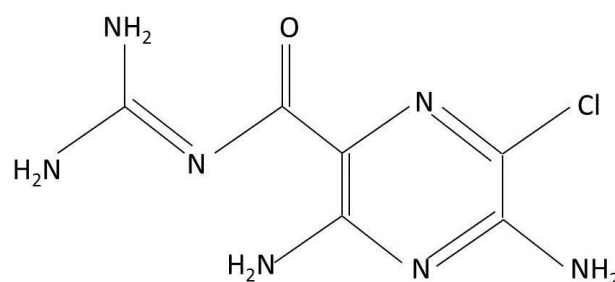


Abbildung 2-4: Amilorid: Strukturformel. Es ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der kaliumsparenden Diuretika. Die Verwendung von Amilorid führt zur Blockierung des epithelialen Natriumkanals (ENaC). Durch die Hemmung der Natrium-Wiederaufnahme führt Amilorid zu einem erhöhten Natrium- und Wasserverlust. Dabei wird die Kaliumausscheidung nicht erhöht. Entnommen aus [22].

Die Verwendung von Amilorid führt zur Blockierung des epithelialen Natriumkanals (ENaC). Durch die Hemmung der Natrium-Wiederaufnahme führt Amilorid zu einem erhöhten Natrium- und Wasserverlust. Dabei wird die Kaliumausscheidung nicht erhöht [22]. Physikalische Einschränkungen (extrazelluläre Azidose oder Verwendung eines Kanalblockers wie z.B. Amilorid), die zum Zelltod bzw. Zellzyklusarrest führen können, zeigt Abbildung 2-5.

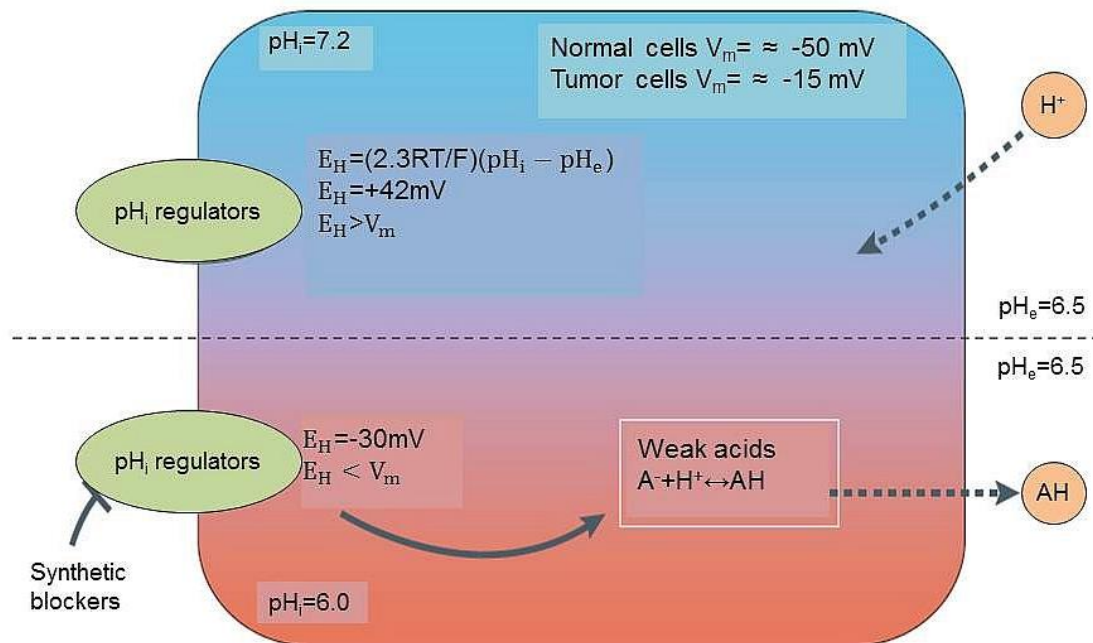


Abbildung 2-5: Physikalische Einschränkungen für die wirksame Reduktion des intrazellulären pH-Werts, die zum Zelltod führen können. Die Reduktion des intrazellulären pH-Werts unter Verwendung eines Kanalblockers z. B. Amilorid (untere Hälfte der schematischen Zelle) führt zu einem veränderten Gleichgewicht des Nernst-Potentials für  $H^+$  ( $E_H$ ). Der passive Ausstrom von schwachen Säuren ( $H^+$ -Ausstrom) könnte helfen, den  $pH_{in}$ -Wert auf einem Niveau zu halten, dass dadurch keinen Zelltod sondern einen Zellzyklusarrest verursacht wird. Dieser passive Ausstrom wird auch durch das weniger negative Membranpotential an Tumorzellen begünstigt (sich nicht teilende, normale Zellen weisen ein weniger positives Membranpotential auf). Generell tritt ein zytotoxischer Effekt erst ab  $pH_{ex} < 6,5$  auf. Entnommen aus [169].

### 2.1.6 Aufbau einer Zellmembran

Jede Zelle ist von einer Membran umgeben. Sie dient der Trennung und dem Schutz des Inneren der Zelle vor äußeren Einflüssen. Zudem werden auch lebenswichtige Unterschiede zwischen dem intra- und extrazellulären Raum aufrechterhalten (Ionengradienten über Membranen (ATP-Synthese, Transport gelöster Stoffe), Auslösung und Weiterleitung elektrischer Signale usw.).

Die Grundstruktur einer solchen Membran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht (etwa 50% der Membranmasse und ca. 5nm dick), die durch nicht kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten wird. Die Anzahl der Lipidmoleküle auf einer  $1\mu m^2$ -Fläche der Lipid-Doppelschicht beträgt ca.  $5 \times 10^6$  [20].



Phospholipide sind die häufigsten Membranlipide. Sie werden hauptsächlich im cytosolischen Monolayer des Endoplasmatischen Retikulums gebildet und bestehen aus einer polaren (hydrophilen) Kopfgruppe und zwei unpolaren (hydrophoben) Kohlenwasserstoffschwänzen.

Eine Lipidmembran ist fluide und kann demnach vereinfacht als zweidimensionale Flüssigkeit betrachtet werden, in der die Lipidmoleküle innerhalb des Monolayers frei beweglich sind. Die Zellmembran ist trotz ihrer Flexibilität mechanisch sehr stabil und lässt kaum hydrophile Stoffe passieren. Aus diesem Grund ist sie für kleine ungeladene Moleküle wie Sauerstoff, Kohlendioxid und Wasser durchlässig und für Ionen undurchlässig.

Weitere essentielle Bestandteile der Zellmembran sind die Membranproteine. Diese sind in die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran eingebettet. Die Proteine betragen ca. 50% der Zellmembranmasse. Verschiedene Proteine in der Zellmembran verleihen der Zelle charakteristische Eigenschaften. Die wichtigsten Proteine sind Enzyme, Transportproteine und spezifische Rezeptoren.

Einige Transportmembranproteine durchqueren die Membran als einzelne  $\alpha$ -Helix (Einfad-Proteine), bei anderen durchspannt die Proteinkette die Membran mehrmals mit  $\beta$ -Faltblättern (Multipfad-Proteine). Einige Proteine sind nur an einer Seite der Membran lokalisiert und durch die Verbindung mit einem Transmembranprotein oder einer Lipidgruppe in der Membran verankert. Durch die Kopplung zwischen Membranproteinen und dem Zytoskelett werden strukturelle Funktionen aufgebaut.

Der äußere Teil der Doppelschicht ist mit komplexen Polysacchariden überzogen, die in ihrer Gesamtheit als Glykokalix bezeichnet wird. Die Struktur der Glykokalix ist genetisch festgelegt und für jede Zelle spezifisch. Sie dient der Erkennung und der Kommunikation der Zellen untereinander [20, 121, 124]. In Abbildung 2-6 ist der schematische Aufbau einer Zellmembran gezeigt.

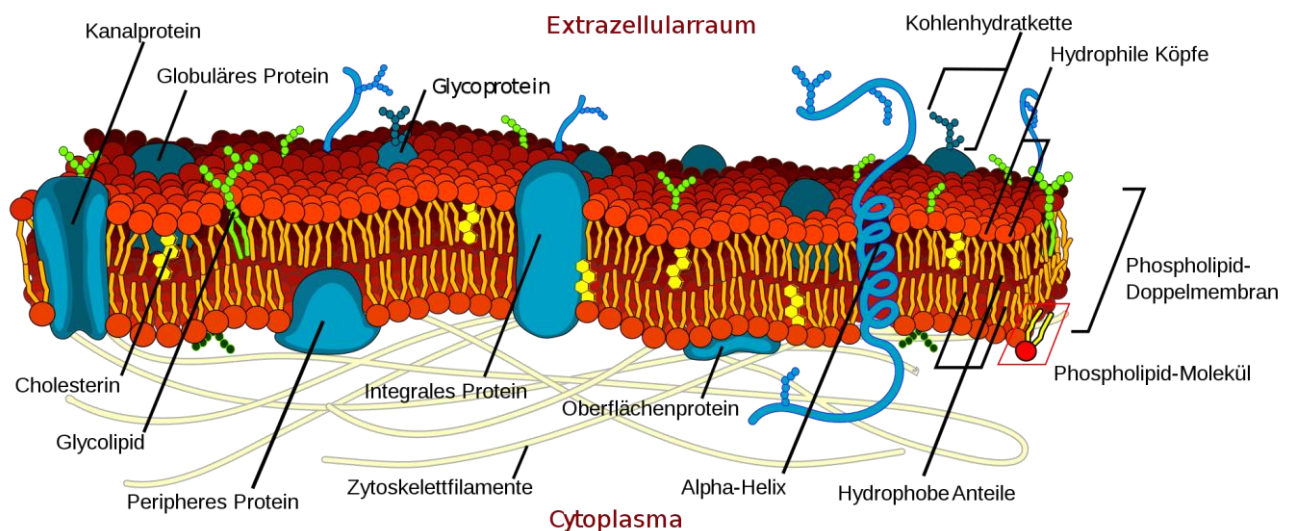


Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Zellmembran: Die Grundstruktur einer solchen Membran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht (etwa 50% der Membranmasse und ca. 5nm dick), die durch nicht kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten wird. Weitere essentielle Bestandteile der Zellmembran sind die Membranproteine. Diese sind in die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran eingebettet. Der äußere Teil der Doppelschicht ist mit komplexen Polysacchariden überzogen, die in ihrer Gesamtheit als Glykokalix bezeichnet wird. Entnommen aus [146].

## 2.2 Ionenkanäle und Tumore

### 2.2.1 Ionenfluss in einer biologischen Membran

Mechanismen wie die Regulation des pH-Werts, des zellulären Volumens und der  $Ca^{2+}$ -Konzentration sind eng mit dem Ionentransport verbunden. Diese Mechanismen, so wie auch das elektrische Membranpotential, haben Einfluss auf die Steuerung des Wachstums [80].

Eine Übersicht über Systeme des Ionentransportes durch biologische Membranen ist in Tabelle 2-1 dargestellt.

	passiver Transport				aktiver Transport	
	Diffusion (Uniport)		Cotransport		Transport-ATPase	
	Pore	Kanal	Symport	Antiport		
elektroneutral			$Na^+, K^+$ $2Cl^-$ $K^+-Cl^-$ $Na^+-Cl^-$	$Cl^-HCO_3^-$ $Cl^- - Cl^-$ $Na^+-H^+$ $K^+-H^+$		$Na^+-H^+$ - ATPase
rheogen	$Na^+, K^+$ , $Cl^-$	$Na^+, K^+$ , $Cl^-$		$3Na^+-Ca^{2+}$ $H^+-Ca^{2+}$	$H^+-ATPase$ $Ca^{2+}-ATPase$	$3Na^+-2K^+$ - ATPase

Tabelle 2-1: Übersicht über Systeme des Ionentransportes durch biologische Membranen. Ein passiver Transport erfolgt entweder durch Diffusion oder den Cotransport. Bei der Diffusion wird ein Solut von einer Seite der Membran zur anderen durch Poren oder Kanäle transportiert. Solche Transporter bezeichnet man als Uniporter. Zum anderen kann der passive Transport durch Cotransport erfolgen, wobei man zwischen dem Symport und dem unterscheidet. Ebenfalls als passiven Transport betrachtet man die Elektrodifffusion für  $Na^+$ - und  $K^+$ - Kanäle. Im Falle des aktiven Transports ist das Transportsystem an einen energielieferenden Prozess gebunden. Dabei passiert der Transport gegen einen elektrochemischen Gradienten. Den größten Teil solcher Transporter bilden die sogenannten Transport-ATPasen, wobei die Energie aus der Hydrolyse des ATP zu ADP gewonnen wird. Aktive Transporter können sowohl elektroneutral als auch rheogen sein. Entnommen aus [80].

Es gibt zwei Mechanismen des Ionentransports. Zum einen die Vermittlung durch ein Trägermolekül, zum anderen den Transport durch einen Kanalbildner. Ein Kanalbildner ist ein Protein, das Poren erzeugt, durch die Ionen wandern können. Diese Proteine sind extrem selektiv. Daher wird für jede Ionenspezies ein eigenes Kanalprotein benötigt. Die Öffnung eines solchen Kanals kann entweder durch die Potentialdifferenz zwischen Außen- und Innenseite der Membran oder durch die Bindung eines Effektor-Moleküls an eine spezifische Rezeptorstelle gesteuert werden [20].

In Zellmembranen sind verschiedene Ionenkanäle integriert, die einer Zelle den Ionenaustausch sowie den Eintritt größerer Moleküle ermöglichen. Durch diese gesteuerten Kanäle können Ionen wie Kalium, Kalzium, Natrium oder Chlorid passieren.

Der Ionentransport kann in zwei großen Gruppen eingeteilt werden: In den aktiven und den passiven Transport.

Ein passiver Transport erfolgt entweder durch Diffusion oder den Cotransport. Bei der Diffusion wird ein gelöster Stoff von einer Seite der Membran zur anderen durch Poren oder

Kanäle transportiert. Solche Transporter bezeichnet man als Uniporter. Zum anderen kann der passive Transport durch Cotransport (gekoppelter Flux zweier oder mehrerer Ionen) erfolgen, wobei man zwischen dem Symport (gleichgerichteten Flux zweier gegengeladenen Teilchen) und dem Antiport (in Gegenrichtung zwei gekoppelten Fluxe gleichsinnig geladener Ionen) unterscheidet. Ebenfalls als passiven Transport betrachtet man die Elektrodifusion für  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Kanäle [80].

Im Falle des aktiven Transports ist das Transportsystem an einen energieliefernden Prozess gebunden. Dabei passiert der Transport gegen einen elektrochemischen Gradienten. Den größten Teil solcher Transporter bilden die sogenannten Transport-ATPasen, wobei die Energie aus der Hydrolyse des ATP zu ADP gewonnen wird. Aktive Transporter können sowohl elektroneutral als auch rheogen sein. Bei rheogenen aktiven Transporten entstehen im extrazellulären Raum elektrische Ströme und Felder [20, 80].

Ionentransporte durch Elektrodifusion verursachen eine Änderung des Transmembranpotentials der Zelle. Dies führt zu einer sofortigen Verschiebung der Balance sämtlicher Ladungsträger-Flüsse [80].

## 2.2.2 Spannungssensitive Ionenkanäle und Tumore

Man findet spannungskontrollierte Kalium-, Kalzium- und Natriumkanäle in einigen Zelltypen, die nicht elektrisch aktiv sind. Diese beeinflussen die Entwicklung verschiedener Krankheiten, wie z. B. Hyperkaliämie, Epilepsie und verschiedene Herzrhythmusstörungen. In letzter Zeit befassen sich mehrere Studien mit dem Einfluss von solchen Ionenkanälen auf die Tumorentwicklung [71]. Unter Anderem spielen spannungssensitive Ionenkanäle eine wichtige Rolle in der Entstehung, Proliferation und Malignität verschiedenen Tumore [111, 145, 176, 223]. Viele Studien zeigen, dass die Blockierung oder die Reduktion von solchen Kanälen zur Heilung von Tumorerkrankungen führen kann [71]. Die Arbeitsgruppe von Chan zeigte eine höhere Expression von  $\text{K}_v3.4$  Kanälen der Plattenepithelkarzinomzellen im Vergleich zu normalen nicht neoplastischen Zellen [44]. Kaliumkanalblocker wie Dequalinium und Amiadaron führen zur Proliferationshemmung in Darmkrebs [16].

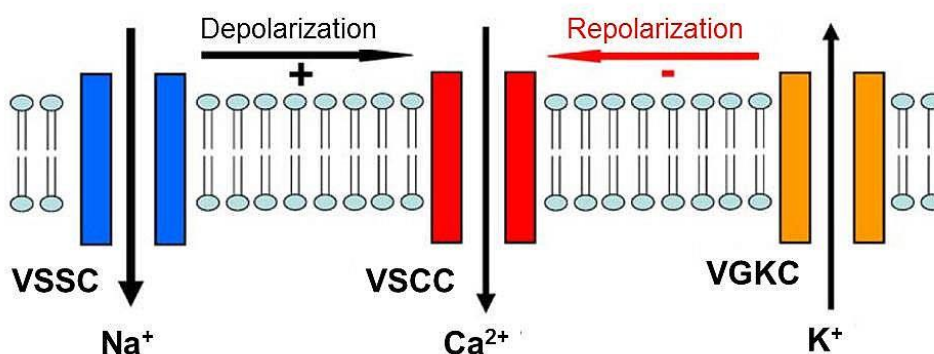


Abbildung 2-7: Ein möglicher Synchronisationsmechanismus von spannungssensitiven Ionenkanälen in Tumoren. Die Aktivierung der spannungssensitiven Natriumkanäle führt zum Einstrom von Natrium. Dies könnte zur Depolarisation der Membran und gleichzeitig zur Aktivierung der spannungssensitiven Kalziumkanäle führen. Dieses resultiert in einem Einstrom von Natrium und Kalzium und in der Aktivierung der spannungssensitiven Kaliumkanäle. Durch den Ausstrom von Kalium wird die Zellmembran repolarisiert und die spannungssensitiven Natrium- und Kalziumkanäle werden inaktiviert [71].



Bisher wurden die spannungssensitiven Kaliumkanäle (VGKCs oder  $K_v$ ) in erregbaren und nicht erregbaren Zellen nachgewiesen. Sie sind für die Regulation des Membranpotentials verantwortlich. Eine lokale Depolarisation der Plasmamembran öffnet die  $Na_v$  Kanäle und  $Na^+$  Ionen fließen in die Zelle, was zu Depolarisation der kompletten Plasmamembran führen kann (siehe Abbildung 2-7).

Spannungssensitive Natriumkanäle (VSSCs oder  $Na_v$ ) wurden in Brust- und Prostatatumoren nachgewiesen.  $Na_v$  spielt wichtige Rolle in der Zellproliferation, Migration, Adhäsion und Muskelkontraktion [71].

Spannungssensitive Kalziumkanäle (VSCC oder  $Ca_v$ ) wurden bisher in Prostata-, Kolontumoren, Fibrosarkoma und Neuroblastoma nachgewiesen. Diese Kanäle sind in 6 Gruppen (L-, N-, P-, Q-, R- und T-Typ) unterteilt. T-Typ Kanäle werden durch die Membrandepolarisation aktiviert. Eine kleine Membrandepolarisation reicht bereits aus. Sie werden jedoch sehr schnell wieder inaktiviert. Die Zunahme an spannungssensitiven Kalziumkanälen beeinflusst die Proliferation der Prostatakarzinome (T-Typ  $Ca_v$ ), die Differenzierung der Darmkrebszellen (L-Typ  $Ca_v$ ) und die Motilität von Fibrosarkomazellen [71].

Verschiedene Einflüsse der spannungssensitiven Ionenkanäle auf die zellulären Prozesse an Tumorzellen sind in Abbildung 2-8 gezeigt.

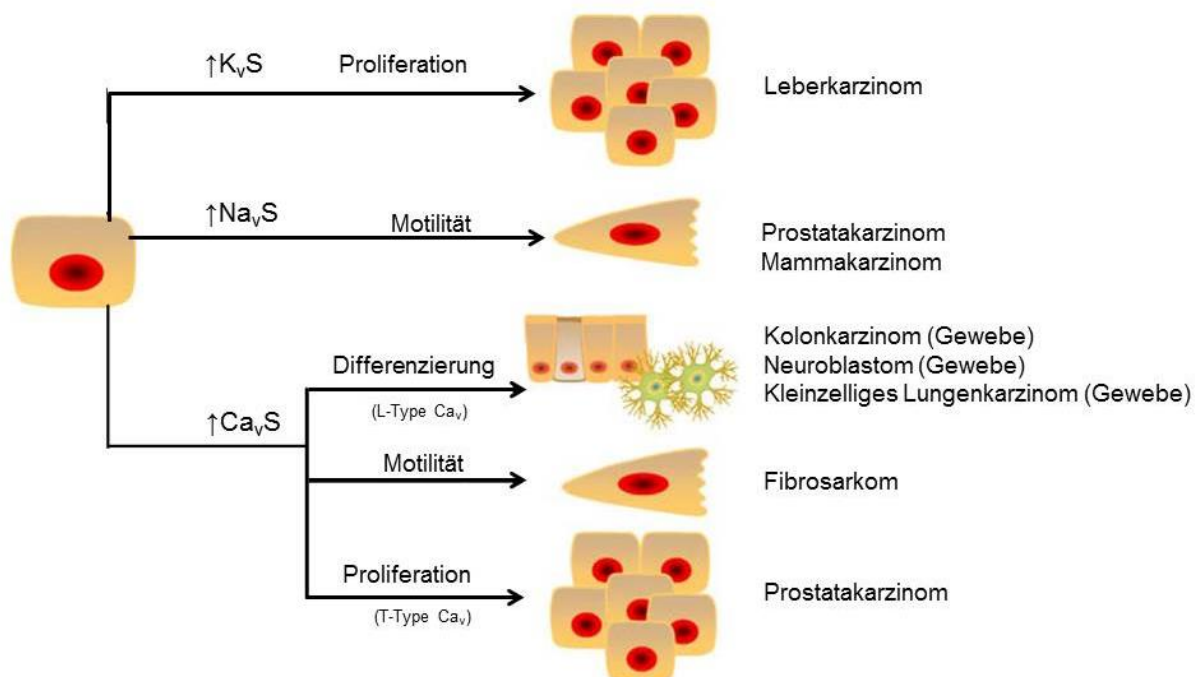


Abbildung 2-8: Einfluss der spannungssensitiven Ionenkanäle auf zelluläre Prozesse in Tumorzellen. Die spannungssensitiven Kaliumkanäle ( $K_v$ ) sind für die Regulation des Membranpotentials verantwortlich. Sie wurden in Leberkarzinom nachgewiesen. Die spannungssensitiven Natriumkanäle ( $Na_v$ ) wurden in Brust- und Prostatatumoren nachgewiesen.  $Na_v$  spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation, Migration, Adhäsion und Muskelkontraktion. Die spannungssensitiven Kalziumkanäle ( $Ca_v$ ) wurden bisher in Prostata-, Kolontumoren, Fibrosarkoma und Neuroblastoma nachgewiesen. Diese Kanäle sind in 6 Gruppen (L-, N-, P-, Q-, R- und T-Typ) unterteilt. T-Typ Kanäle werden durch die Membrandepolarisation aktiviert. Eine kleine Membrandepolarisation reicht bereits aus. Sie werden jedoch sehr schnell wieder inaktiviert. Die Zunahme an spannungssensitiven Kalziumkanälen beeinflusst die Proliferation der Prostatakarzinome (T-Typ  $Ca_v$ ), die Differenzierung der Darmkrebszellen (L-Typ  $Ca_v$ ) und die Motilität von Fibrosarkomazellen. [71]

### 2.2.3 Einfluss der Ionenkanäle auf die Proliferation und den Zellzyklus

Man vermutet, dass einige Ionenkanäle das Potential haben, die Proliferation zu unterstützen. Ionenkanäle sind für die Regulierung von homöostatischen Parametern wie intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$ , pH und Zellvolumen notwendig. Die Höhe dieses Potentials ist von den zellspezifischen Eigenschaften und Umgebungsfaktoren abhängig [130]. Allerdings führt die Expression von Kaliumkanälen zur Membranhyperpolarisation (statt Depolarisation), was wiederum eine Hemmung der Proliferation bewirken kann [224]. Ionenkanäle für  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Cl}^-$  spielen eine wichtige Rolle in der Proliferation. Dies könnte auf einen Einfluss auf die Tumorentwicklung hindeuten.

#### Kaliumkanäle

Vor 18 Jahren beschrieben Wonderlin und Strobel in einem Review den Einfluss von verschiedenen Kaliumkanälen auf die Proliferation und den Zellzyklus [232]. In einem Review von Wang, das auf mehreren Studien basiert, ist die Präsenz von Kaliumkanälen in verschiedenen Tumoren zusammengefasst [224].

Durch die Transformation von normalen Epithelzellen zu Tumorzellen treten verschiedene genetische Änderungen auf. Diese führen zu einer weiteren Entwicklung von Ionenkanälen und Änderungen in deren Aktivitäten, besonders an Ionenströmungen [130]. Diese Aktivität kann die Proliferation der Tumorzellen unterstützen. Die Mechanismen der Proliferation von Tumorzellen sind noch immer nicht vollständig verstanden. Die Arbeitsgruppe von Wang hat einige Hypothesen des Kaliumstromeinflusses auf die Zellproliferation entwickelt, die in Abbildung 2-9 erfasst sind [224].

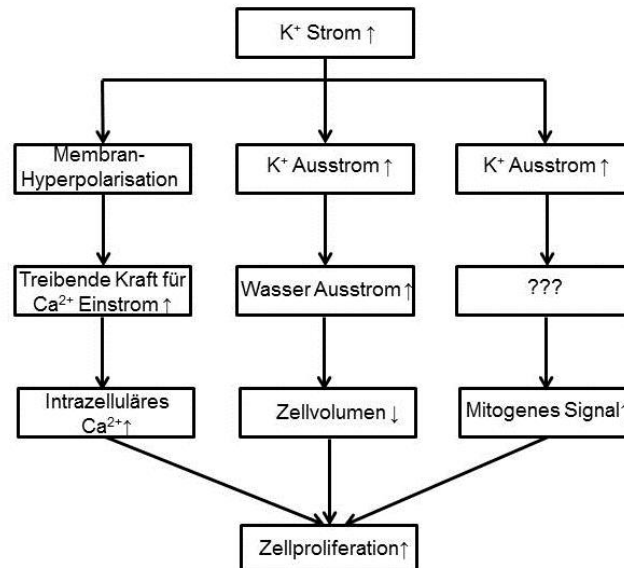


Abbildung 2-9: Einfluss des Kaliumstroms auf die Proliferation von Tumorzellen. Zum einen verursacht die Zunahme die Hyperpolarisation der Membran. Dadurch steigt die Konzentration an intrazellulärem Kalzium  $\text{Ca}^{2+}$  in der späteren G1-Phase und S-Phase. Diese Erhöhung wirkt als Trigger-Mechanismus auf die Proliferation. Die Zunahme des intrazellulären Kalziums kann aber auch die Apoptose hervorrufen. Zum anderen wird durch die Zunahme des Kaliumstroms das Zellvolumen gemindert, was zu einem Anstieg der Zellproliferation führt. Weiterhin hat die Zunahme des Kaliumstromes einen Einfluss auf die Zunahme der mitogenen Signale. Entnommen aus [224].

Verschiedene Einflusswege auf die Proliferation von Tumorzellen durch die Zunahme des Kaliumstroms erkennt man aus der Abbildung 2-9. Zum einen verursacht die Zunahme die Hyperpolarisation der Membran. (Das Transmembranpotential wird vorwiegend über den Fluss von Kalium-Ionen definiert.) Dadurch steigt die Konzentration an intrazellulärem Kalzium  $[Ca^{2+}]_{in}$  in der späteren G1-Phase und S-Phase [130]. Diese Erhöhung wirkt als Trigger-Mechanismus auf die Proliferation. Die Zunahme des intrazellulären Kalziums kann aber auch die Apoptose hervorrufen. Welchen Weg die Zelle geht (Proliferation oder Apoptose) ist offenbar von dem Betrag von  $[Ca^{2+}]_{in}$  und dem funktionalen Stand der Zelle abhängig [133]. Zum anderen wird durch einer Zunahme des Kaliumstroms das Zellvolumen gemindert, was zu einem Anstieg der Zellproliferation führt. Dubois und Mitarbeiter haben auf der Basis von durchgeführten Studien vermutet, dass die Kaliumkanäle durch die Regulation des Zellvolumens die für die Zellzyklusregulation verantwortliche Proteine kontrollieren [188, 224]. So zeigt sich bei einer Zunahme des Zellvolumens um 25%, dass die Proliferation komplett eingestellt wird [188].

Viele weitere Studien weisen den Einfluss von spannungssensitiven Kaliumkanälen auf die Proliferation von Tumorzellen (besonders Tumore epithelialer Herkunft) nach. Spannungssensitive Kaliumkanäle wie Ether a-go-go Kanäle (EAG), die einen Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus haben, zeigen bei nicht erregbarem Gewebe signifikante Expression in Tumorzellen, was in normalen Zellen nicht der Fall war [66]. Ähnlich wie bei EAG Kanälen zeigen kalziumaktivierte Kaliumkanäle wie z. B. h1K1 zellzyklusabhängige Expression in der späten G1-Phase und S-Phase. Andere kalziumaktivierte Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit (die sogenannte BKCa, welche in Brusttumoren nachgewiesen sind) zeigen auch eine höhere Expression in der S-Phase. Höhere Aktivität von solchen Kanälen führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran, welche den Einstrom von  $Ca^{2+}$  in das Zellinnere unterstützt [165]. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass kalziumaktivierte Kaliumkanäle einen Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen haben.

### **Kalzium- und andere Kationenkanäle**

Kalzium spielt in der Zellzyklusregulation und Zellproliferation eine bedeutende Rolle. Eine erhöhte Expression der spannungssensitiven L-Type Kalziumkanäle ist in Darmtumoren zu beobachten [223]. Das führt zum Anstieg an intrazellulärem Kalzium. Weiterhin spielen spannungssensitive T-Type Kalziumkanäle eine große Rolle in der kapazitiven Signalübertragung in Tumorzellen [83]. Eine wichtige Rolle spielen TRP-Kanäle (transient receptor potential channels). Diese wurden in Prostata Tumoren nachgewiesen [229]. Sie ermöglichen die Signalübertragung durch Kalziumeinfluss und eventuell Membrandepolarisation, was zu einem Kalziumeinstrom durch die spannungsgesteuerten Kalziumkanäle führt [130].

### **Chloridkanäle**

Der Einfluss von Chloridkanälen auf die Proliferation und den Zellzyklus wird in mehreren Berichten postuliert. Wie schon beschrieben, ist die  $Ca^{2+}$ -Oszillation das wichtigste Anzeichen der Zellproliferation. Es könnte eine Expression von kalziumaktivierten Chloridkanälen während des Zellzyklus erwartet werden. Die volumenregulierenden Chloridkanäle wurden in der Prostatakarzinomzelllinie und in Lungentumorzellen

nachgewiesen [106, 202]. Die zellzyklusabhängige Kanalexpression wurde, ähnlich wie bei den Kaliumkanälen, beobachtet.

#### **2.2.4 Konzepte der Wachstumsregulation: Transmembranpotential, intrazelluläre Natriumkonzentration und Gap Junction**

Im Jahr 1969 wurde von Cone ein Konzept postuliert, das einen Zusammenhang zwischen dem Transmembranpotential und der mitotischen Aktivität normaler Zellen und Tumorzellen herstellt. Eine wichtige Rolle spielt dabei die intrazelluläre Ionenkonzentration [32, 49]. Diese Idee wurde später von mehreren Autoren durch den Nachweis des wenig negativen Transmembranpotentials an Tumorzellen unterstützt [32].

Ein weiteres Konzept besagt, dass normalproliferierende Zellen und Tumorzellen eine höhere intrazelluläre Konzentration an Natriumionen im Vergleich zu nicht proliferierenden Zellen aufweisen [105, 154]. Viele Studien zeigten eine erhöhte Natriumpermeabilität und einen erhöhten Natriumeinstrom bei Tumorzellen [32, 105, 151]. So zeigen proliferierende Zellen (sowohl normale Zellen als auch Tumorzellen) eine 2-3-mal höhere intrazelluläre Natriumionenkonzentration als nicht proliferierende Zellen [32, 105]. Kornberg bewies einen eindeutigen Zusammenhang zwischen der Natriumionenkonzentration und der Unterdrückung der DNA Synthese [125]. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte intrazelluläre Natriumionenkonzentration zu einer Erhöhung der DNA Synthese [63] und der Mitose [226] führt. Zudem wird ein Anstieg an intrazellulärem Natrium für die Proliferation benötigt [32]. Daneben wurde ein direkter Effekt von Serum und verschiedenen Wachstumsfaktoren auf den erhöhten Natriumeinstrom gezeigt [189]. Wie genau eine erhöhte Natriumionenkonzentration die DNA Synthese unterstützt, ist noch nicht bekannt.

Binggeli und Weinstein zeigten in der Zellkultur einen Membranpotentialabfall an der Zelle kurz vor der Bildung eines Zell-Zell-Kontaktes. Sie vermuten, dass dieser Abfall die Mitose nicht inhibiert. Er kann jedoch zur Reduktion der DNA Synthese führen [32].

Außerdem wurde ein Einfluss von Gap Junctions auf das Zellwachstum gezeigt. Ein elektrischer Strom kann über eine Mikroelektrode in die Zelle geleitet werden. Dabei kann man die Änderung des Transmembranpotentials messen. Diese Änderung wird auch an benachbarten Zellen, z.B. in epithelialen Zellverbänden, registriert. Die Arbeitsgruppe von Loewenstein zeigte, dass nicht nur Ionen, sondern auch größere Moleküle (mit einer Molekülmasse bis zu 1kDA), von einer Zelle zu einer anderen wandern können [121]. Die Zellen sind unter anderem auch über Gap Junctions elektrisch gekoppelt. Diese bilden in Plasmamembranen Kanäle, die sogenannten Connexone. Sie haben die Form von hexagonal angeordneten Hexameren. Die Membranen von benachbarten Zellen bilden eine Art von Kopf-Kopf-Kontakt [121]. Gap Junctions spielen eine wichtige Rolle in der Zellwachstumskontrolle. Viele Arbeitsgruppen zeigten eine reduzierte Anzahl oder veränderte Struktur an Gap Junctions in Tumorzellen [110, 150, 170].

Die wichtigen Konzepte zur Wachstumsregulation von normalen und Tumorzellen sind in Abbildung 2-10 zusammengefasst.

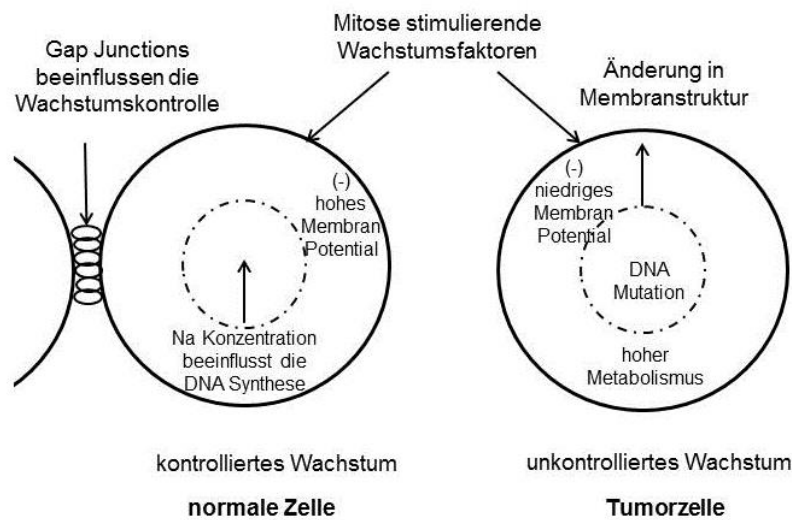


Abbildung 2-10: Zusammenfassung der wachstumsregulierenden Konzepte einer normalen Zelle im Vergleich zu einer Tumorzelle. Es wurde einen Zusammenhang zwischen dem Transmembranpotential und der mitotischen Aktivität normaler Zellen und Tumorzellen hergestellt. Eine wichtige Rolle spielt dabei die intrazelluläre Ionenkonzentration [32, 49]. Diese Idee wurde später von mehreren Autoren durch den Nachweis des wenig negativen Transmembranpotentials an Tumorzellen unterstützt [32]. Ein weiteres Konzept besagt, dass normalproliferierende Zellen und Tumorzellen eine höhere intrazelluläre Konzentration an Natriumionen im Vergleich zu nicht proliferierenden Zellen aufweisen [105, 154]. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte intrazelluläre Natriumionenkonzentration zu einer Erhöhung der DNA Synthese [63] und der Mitose [226] führt. Binggeli und Weinstein zeigten in der Zellkultur einen Membranpotentialabfall an der Zelle kurz vor der Bildung eines Zell-Zell-Kontaktes. Sie vermuten, dass dieser Abfall die Mitose nicht inhibiert. Er kann jedoch zur Reduktion der DNA Synthese führen [32]. Außerdem wurde ein Einfluss von Gap Junctions auf das Zellwachstum gezeigt. Erstellt nach einer Vorlage aus [32].

Die Zusammenfassung von diesen drei Konzepten lässt auf einen Zusammenhang zwischen dem Membranpotential und der Proliferation vermuten. Dieser wurde in einer Hypothese von Binggeli und Weinstein, die in Kapitel 2.2.5 beschrieben wird, aufgestellt.

## 2.2.5 Membranpotential und Proliferation

Binggeli und Weinstein stellten in ihrer Arbeit eine Hypothese auf, die für die Erklärung verschiedener Phänomene im Zellwachstum von normalen und neoplastischen Zellen wichtig ist. Sie besagt, dass ein Schwellenwert im Membranpotential (Ruhemembranpotential) zwischen ruhenden und normal proliferierenden Zellen bzw. Tumorzellen existiert [32]. Alle proliferierenden Zellen weisen ein stark in die positive Richtung verschobenes Transmembranpotential auf. Dabei ist es unbedeutend, ob die sich teilenden Zellen regulären oder neoplastischen Ursprungs sind [32]. Basierend auf verschiedenen Studien wurde dieser Schwellenwert bei  $-37\text{mV}$  definiert. Man vermutet, dass ab diesem Schwellenwert eine DNA-Synthese initiiert wird. Diese führt bei Tumorzellen, die ein Transmembranpotential über dem Schwellenwert von  $-37\text{mV}$  aufweisen, zu einer weiteren Zellteilung [32]. Die Arbeitsgruppe von Kiefer hat auch vermutet, dass das wenig negative Membranpotential eine mitotische Aktivität initiiert [92]. In Abbildung 2-11 sind die Unterschiede der Transmembranpotentiale der Zellen dargestellt.

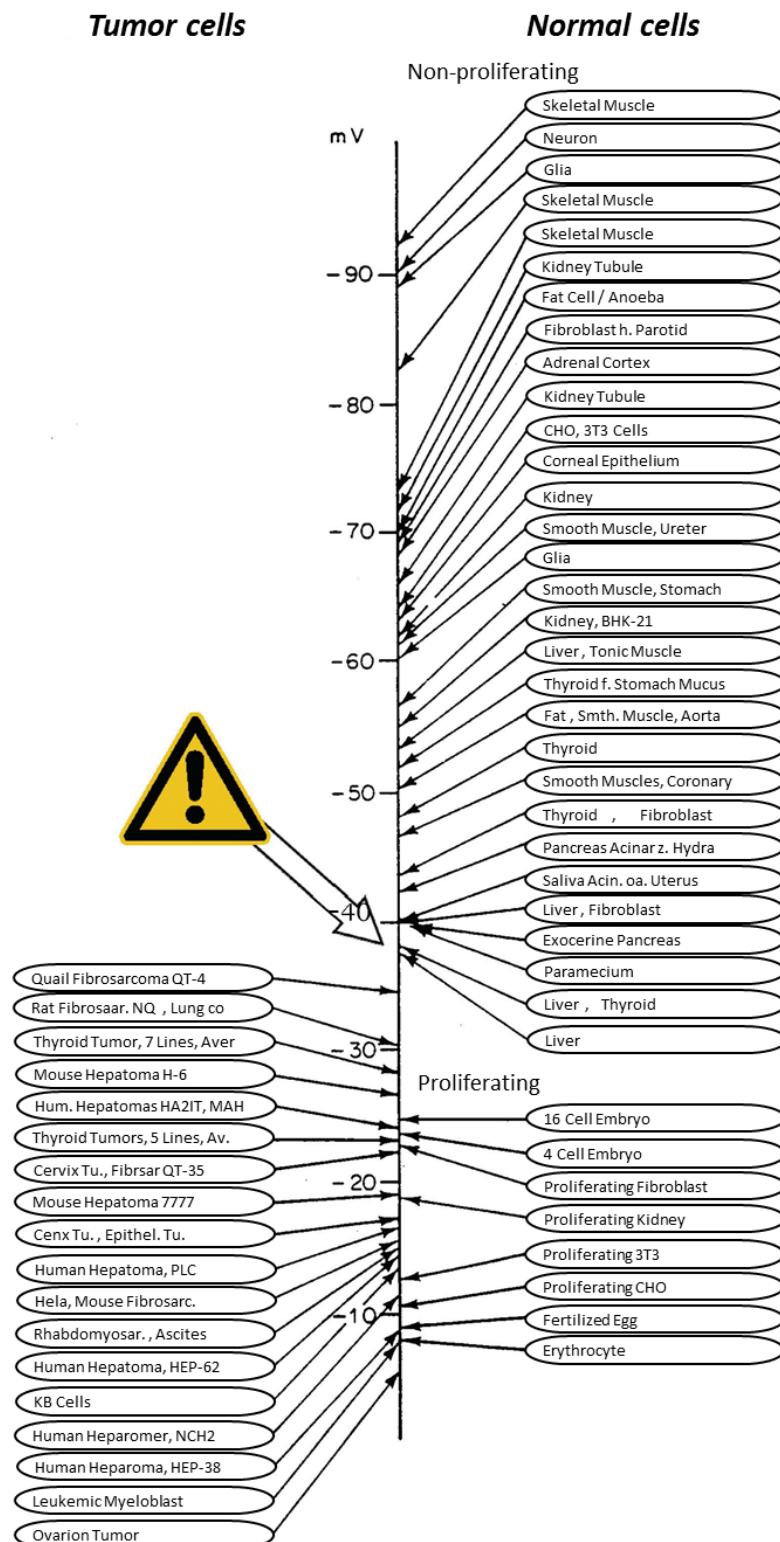


Abbildung 2-11: Transmembranpotentiale verschiedener Zellen und zellularer Zustände. Das Transmembranpotential verschiedener Zellen verändert sich in Abhängigkeit von ihrer Proliferation. Die teilungsfähigen Zellen, wie Tumorzellen oder embryonale Zellen, weisen Transmembranpotentiale auf, die oberhalb eines Grenzwertes von ca. -37mV liegen. Die nicht teilungsfähigen Zellen, wie Muskel- und Nervenzellen, weisen Transmembranpotentiale auf, die zwischen -70mV und -90mV liegen. Leicht modifiziertes Diagramm nach Binggeli und Weinstein, erstellt nach einer Vorlage aus [32].

Normale nicht-proliferierende Zellen weisen ein Membranpotential im Bereich von -40mV bis -90mV auf [32]. Das Membranpotential von erregbaren Zellen wie Muskel- und Nervenzellen liegt im Bereich von ca. -70mV bis -90mV [19, 102]. Die Werte des Membranpotentials von Nierentubuluszellen, Zellen der Nebennierenrinde und Fettzellen liegen im Bereich von -55mV bis -72mV [32, 212]. Epithelialgewebe wie Leber, Schilddrüse sowie Fibroblasten weisen ein höheres Membranpotential im Bereich von ca. -40mV bis -55mV auf [172, 183]. Aus diesen Studien geht hervor, dass potentiell sich teilende Zellen (z.B. Fibroblasten) ein weniger negatives Membranpotential als potentiell sich nicht teilende Zellen (z.B. Nerven-, Muskelzellen) besitzen [49].

Weitere Studien belegen diese Hypothese. Zum Beispiel weisen proliferierende Fibroblasten, Nierenzellen, Hamster-Ovarienzellen und 3T3 Mausfibroblasten ein Membranpotential im Bereich von -10mV bis -22mV auf [48].

Den Einfluss möglicher Parameter, die zur Entwicklung von einer normalen Zelle zu einer Tumorzelle führen können, ist in hypothetischer Reihenfolge in Abbildung 2-12 gezeigt.

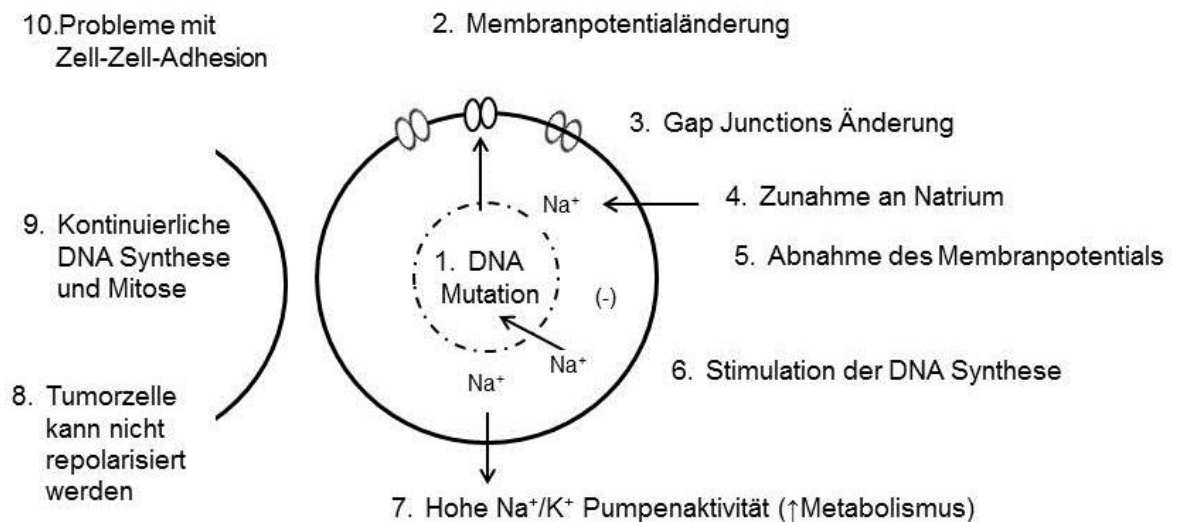


Abbildung 2-12: Einfluss verschiedener Parameter auf das Tumorwachstum. Die DNA-Mutationen können die Signalkette auslösen, die zum Tumorwachstum führt. Man vermutet, dass ab einem Schwellenwert von -37mV eine DNA-Synthese initiiert wird. Diese führt bei Tumorzellen, die ein Transmembranpotential über dem Schwellenwert aufweisen, zu einer kontinuierlichen DNA Synthese und Mitose. Daraus folgen die Probleme mit der Zell-Zell-Adhesion. Erstellt nach einer Vorlage aus [32].

Zusammenfassend zeigen viele Studien einen Einfluss verschiedener Ionenkanäle wie Kalzium-, Natrium- und in erster Linie Kaliumionenkanäle auf die Proliferation und das Membranpotential [130]. So nimmt Kalzium sowohl im extrazellulären als auch im intrazellulären Bereich einen Einfluss auf die Ionenkanaldurchlässigkeit und das Transmembranpotential. Dadurch kann man die Differenzierung, die Motilität, die Apoptose und die Proliferation beeinflussen [192]. So hat sowohl die Depolarisation als auch die Hyperpolarisation einer Zellmembran eine wichtige Bedeutung auf die Kalziumsignalgebung und deren Einfluss auf die Regulation der zytosolischen pH-Werte, was sich in der Proliferation widerspiegelt [130]. Der Kalziumgehalt kann sowohl durch die

spannungssensitiven Kalziumkanäle als auch durch die kalziumaktivierten Kaliumkanäle beeinflusst werden. Die Kalziumabnahme kann Grund für die höhere Natriumdurchlässigkeit sein und zur Membrandepolarisation führen [32]. Weiterhin kann die Zunahme an intrazellulärem Kalzium zu Hyperpolarisation sowohl bei normalen als auch bei Tumorzellen führen [32]. Die Aktivierung der Kaliumkanäle verursacht eine Hyperpolarisation der Membran. Dadurch steigt die Konzentration an intrazellulärem Kalzium  $[Ca^{2+}]_{in}$  in der späteren G1-Phase und S-Phase [130]. Diese Erhöhung wirkt als Trigger-Mechanismus für die Proliferation.

Daneben führt die Zunahme an intrazellulärem Kalzium zu einer Durchlässigkeitsabnahme von Kanälen wie den Gap Junctions [32]. Dies spielt eine wichtige Rolle für die elektrische und biochemische Signalübertragung zwischen den Zellen [126]. Viele Studien zeigen deren Abnahme oder sogar ein komplettes Verschwinden in Tumorzellen [24, 141]. Weiterhin erhöht die Zunahme an extrazellulärem Kalzium nicht nur das Transmembranpotential, sondern reduziert auch die Zytotoxizität von natürlichen Killerzellen [32].

Weitere Studien zeigen einen Einfluss der Kaliumionenkanäle auf die Proliferation und das Membranpotential [130]. Auf Grund von diversen Studien vermutet man, dass verschiedene Kaliumionenkanäle das Potential haben, das Tumorstadium bzw. die Tumorstadiumproliferation zu unterstützen [17, 31, 43, 65, 130]. Sowohl viele Tumore als auch humane Prostata- und Mammakarzinomzellen weisen eine Expression von solchen Kaliumkanälen wie spannungssensitiven Kaliumkanälen ( $K_v$ ), Kaliumionenkanälen großer Leitfähigkeit (BK), kalziumaktivierten Kaliumkanälen mittlerer Leitfähigkeit (IK1) und ATP-empfindlichen Kaliumkanälen ( $K_{ATP}$ ) auf [130]. So weisen die spannungssensitiven Kaliumkanäle einen Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen (besonders Tumore epithelialer Herkunft) auf [130]. Spannungssensitive Kaliumkanäle wie Ether a-go-go Kanäle (EAG), die einen Einfluss auf die Zellzyklusregulation haben, zeigen bei nicht erregbarem Gewebe eine signifikante Expression in Tumorzellen, was in normalen Zellen nicht der Fall ist [65]. Ähnlich wie bei EAG Kanälen zeigen kalziumaktivierte Kaliumkanäle wie z. B. h1K1 eine zellzyklusabhängige Expression in späterer G1-Phase und S-Phase. Andere kalziumaktivierte Kaliumkanäle großer Leitfähigkeit, die so genannten BK, die in Brusttumoren nachgewiesen werden können, zeigen auch eine höhere Expression in der S-Phase. Eine höhere Aktivität von solchen Kanälen führt zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran, was den Einfluss von  $[Ca^{2+}]_{in}$  in das Zellinnere unterstützt [164]. Diese Ergebnisse demonstrieren, dass kalziumaktivierte K-Kanäle ebenso Einflüsse auf die Proliferation von Tumorzellen aufweisen. Die Inhibierung von solchen Kaliumkanälen kann zur Proliferationshemmung führen [15]. So zeigten Nilius und Wohlrab, dass die Kaliumstromblockade zur Proliferationshemmung an Melanomzellen und humanen Mammakarzinomzellen führt [156, 224].

Zusätzlich weisen Tumorzellen einen höheren intrazellulären  $Na^+$ -Gehalt als normale nicht teilende Zellen auf. Dadurch bleibt der Kalium-Level viel stabiler [154]. So kann sich ein erhöhter Natriumgehalt als ein Marker für die Depolarisation in sich schnell teilenden Tumorzellen gelten. Die Proliferations-Mechanismen, die von Ionenkanälen abhängig sind, sind in mehreren Quellen beschrieben [163, 177, 224]. Es kann einen Zusammenhang zwischen der Aktivität der Ionenkanälen, dem Transmembranpotential, dem intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Signaling und der Proliferation gezeigt werden [236]. Weiterhin können Kaliumkanäle apoptosehemmende Proteine Mcl-1 aktivieren, die zur Membranhyperpolarisation führen können. Die Membranhyperpolarisation kann zudem zu einem Substrattransport führen. Die Nährstoffe werden in diesem Fall entlang eines elektrochemischen Natriumgradienten transportiert [130, 232].



Von den verschiedenen Parametern, die einen Einfluss auf das Tumorstadium haben, wird die Änderung des Membranpotentials und deren Einfluss auf die Proliferation in dieser Arbeit genauer analysiert. Die Änderungen des Membranpotentials kann man durch extern applizierte elektrische Felder oder extrazelluläre Azidose hervorrufen.

## 2.2.6 Das Transmembranpotential

Ladungen können die Zellmembran mittels eines aktiven oder passiven Transportwegs passieren. In tierischen Zellen leisten passive Ionenbewegungen (elektrogene Pumpen) den größten Beitrag zum Transmembranpotential [20]. Dieses beschreibt eine Potentialdifferenz zwischen den elektrischen Ladungen auf den inneren und äußeren Seiten der Membran. Das Membranpotential kann mit der Goldman-Hodgkin-Katz Gleichung beschrieben werden [81, 103]:

$$V_m = V_{in} - V_{ex} \quad (2-4)$$

$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \frac{[P_K(K)_{ex} + P_{Na}(Na)_{ex} + P_{Cl}(Cl)_{in}]}{[P_K(K)_{in} + P_{Na}(Na)_{in} + P_{Cl}(Cl)_{ex}]} \quad (2-5)$$

Mit:  $V_m$ : Transmembranpotential

$V_{in}$ ,  $V_{ex}$ : inneres und äußeres Membranpotential

R: universale Gaskonstante,  $R=8,3144621 \frac{J}{mol K}$

T: absolute Temperatur

F: Faraday-Konstante,  $F=96485,336 \frac{C}{mol}$

$P_K$ ,  $P_{Na}$ ,  $P_{Cl}$ : Permeabilität von K-, Na- und Cl-Ionen

(K), (Na), (Cl): äußere und innere Ionenkonzentration.

Die Membranen der nicht erregbaren Zellen zeigen die größte Permeabilität für  $K^+$ -Ionen. Daraus folgt, dass das Transmembranpotential zum Großteil von  $K^+$ -Ionen bestimmt wird (siehe Abbildung 2-13).



## 2.3 Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf Zellen

### 2.3.1 Elektrische Doppelschichten an Membranen

Betrachten wir die elektrostatische Struktur einer Membran, um zu verstehen, welche elektrischen Felder in und an einer Zelle entstehen.

Eine Membran besteht aus Festladungen, die eine elektrische Doppelschicht bilden, und beweglichen statisch angezogenen Gegenionen [80]. Durch die thermische Bewegung bildet sich eine diffuse Doppelschicht, deren elektrisches Potential mit steigendem Abstand von der Grenzfläche exponentiell abfällt. Abbildung 2-14 zeigt die Potentialverteilung an einer Membran.

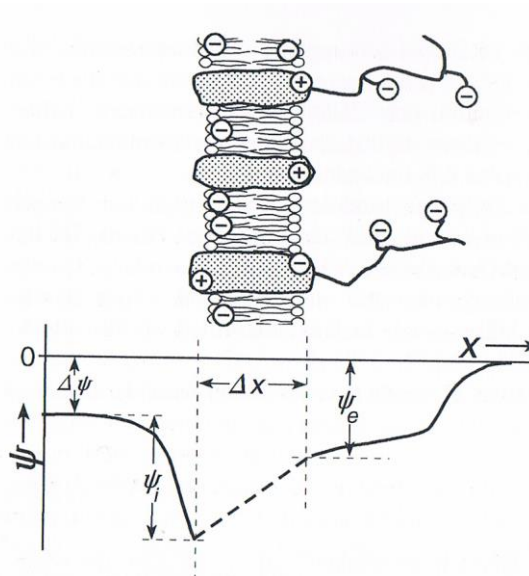


Abbildung 2-14: Schematische Darstellung der Ladungs- und Potentialverteilung an einer Membran:  $\Delta\psi$ : das Transmembranpotential als Differenz der Potentiale beider Phasen (inneres und äußeres Membranpotential);  $\Delta x$ : Membrandicke. Entnommen aus [80].

Die Membran besteht aus fixierten Ladungen wie Carboxylgruppen der Neuraminsäuren der Glykoproteine. Proteine mit ihren polaren Anteilen sind der wässrigen Phase zugewandt. Weitere Ladungsträger sind polare Köpfe einiger Phospholipide. Ladungen der Glykokalix, die kovalent an die Membranproteine und Membranlipide gebunden sind, bilden eine Raumladungsdichte. Diese wird als Funktion des Abstandes von der Membran beschrieben. Sie hat einen Einfluss auf die Berechnung des Potentialverlaufs. Zusammenfassend kann man sagen, dass die effektive Reichweite des elektrischen Potentials der Zelloberfläche von Parametern wie der Dicke der Glykokalix und den elektrostatischen Wechselwirkungen innerhalb der Glykokalix, dem Zustand der Zelle, dem Umgebungsmileau und der Debye-Hückel-Länge abhängt. [80]

### 2.3.2 Passives elektrisches Verhalten einer Zelle

Verschiedene metabolische Prozesse in einer Zelle verursachen diverse Ionenbewegungen. Diese sind die Folge von Strömen und Feldern an und in einer Zelle. Parameter wie Widerstand der Membranen, Zytoplasma und Membrankapazität bestimmen die passiven elektrischen Eigenschaften einer Zelle [80].

Eine Zelle in einem elektrischen Feld kann vereinfacht durch folgendes Modell dargestellt werden: Die Zelle befindet sich in einer Elektrolytlösung und hat eine kugelige Form. Das zugehörige Ersatzschaltbild ist in Abbildung 2-15 schematisch dargestellt.

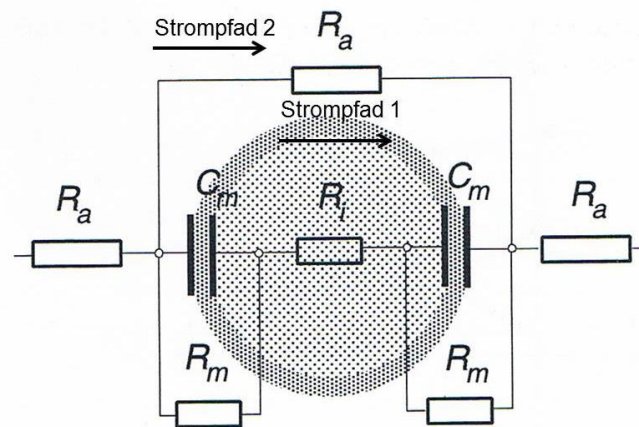


Abbildung 2-15: Darstellung eines Ersatzschaltbildes für den Stromfluss durch eine kugelförmige Zelle.  $R_a$ : Widerstand des Außenmediums;  $R_i$ : Widerstand des Zellplasmas;  $R_m$ : Membranwiderstand;  $C_m$ : Membrankapazität. Entnommen aus [80].

Die Zellmembran kann stark vereinfacht als passiver Zweipol betrachtet werden.  $R_m$  beschreibt den Widerstand der Ionenkanäle und  $C_m$  – die Membrankapazität,  $R_a$  und  $R_i$  sind die Widerstände des Außen- und Innenmediums. Die Leitfähigkeit des Außen- und des Innenmediums ist siebenmal höher als die der Membran. Nach dem Kirchhoffschen Gesetz umfließt ein Gleichstrom die Zelle weitgehend durch das Medium. Bei Wechselstrom fließt der Strom zusätzlich über die Membrankapazität (Kondensator).

Der kapazitive Widerstand ist frequenzabhängig und sinkt mit steigender Frequenz. Dadurch steigt der Anteil des durch die Zelle fließenden Stromes. Seine Amplitude ist von dem Verhältnis zweier Widerstände abhängig: dem effektiven Wechselstromwiderstand (Strompfad 1) und dem Widerstand des Außenmediums (Strompfad 2). Den effektiven Wechselstromwiderstand eines RC-Kreises bezeichnet man als Impedanz. [80]

Aufgrund des frequenzabhängigen Systems ist zusätzlich die Phasenverschiebung zwischen dem Signalverlauf von Strom und Spannung zu beachten.

Damit ergibt sich die Impedanz eines parallel zueinander geschalteten  $R_m C_m$ -Kreises zu:

$$Z = \frac{R_m}{1 + \omega^2 C_m^2 R_m^2} - i \frac{\omega C_m R_m^2}{1 + \omega^2 C_m^2 R_m^2} \quad (2-6)$$

Die Beschreibung der Gesamtimpedanz eines biologischen Gewebes ist viel komplexer als die Impedanz einer einzelnen Zelle. Das Analogschaltbild von solchen Geweben betrachtet man als leitfähiges Dielektrikum in einem Kondensator. Die Impedanzmessung in biologischem Gewebe ist in Abbildung 2-16 dargestellt.

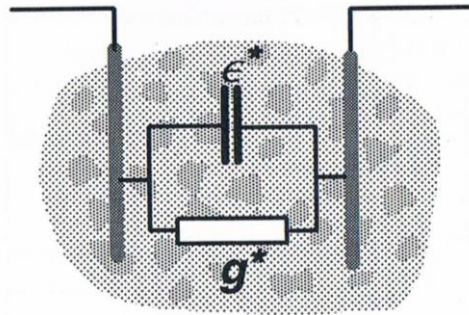


Abbildung 2-16: Darstellung eines Ersatzschaltbildes von biologischem Gewebe.  $\epsilon^*$ : Komplexe Dielektrizitätskonstante;  $g^*$ : Komplexe spezifische Leitfähigkeit. Entnommen aus [80].

Die Impedanzwerte werden durch folgende Parameter definiert:

$$g^* = g + i\epsilon\epsilon_0\omega \tag{2-7}$$

$$\epsilon^* = \frac{g}{\epsilon_0\omega} + i\epsilon_0\omega \equiv \epsilon' + i\epsilon'' \tag{2-8}$$

Mit:  $g^*$ : komplexe spezifische Leitfähigkeit  
 $\epsilon^*$ : komplexe Dielektrizitätskonstante.

Aus diesen Formeln ergibt sich die Frequenzabhängigkeit von heterogenen Strukturen in biologischem Gewebe.

Betrachtet man beide komplexen Parameter im ganzen Frequenzspektrum, so kann man bestimmte Frequenzbereiche, die sogenannten Dispersionsgebiete ( $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Dispersion) erkennen [80]. Auf Grund von unterschiedlichen Zeitkonstanten der Umladungsprozesse kann das System dem Wechsel des äußeren Feldes nicht mehr folgen, was zu Dispersionen führt [80]. Die entsprechenden Frequenzbereiche für die Dispersionen sind in Abbildung 2-17 gezeigt.

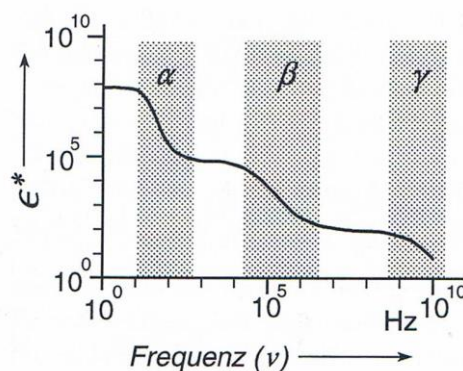


Abbildung 2-17: Darstellung der Frequenzbereiche für die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Dispersion am Beispiel der Abhängigkeit der Kurve der komplexen Dielektrizitätskonstante für ein biologisches Gewebe. Entnommen aus [80].

Aus Abbildung 2-17 sieht man, dass die  $\alpha$ -Dispersion unterhalb von 10 kHz liegt. Diese bezieht sich auf die Ionenbewegungen um die Zelle oder interzelluläre Räume. Die  $\beta$ -Dispersion wird auf Relaxationsphänomene an Zellen und die  $\gamma$ -Dispersion auf Relaxationsphänomene an Makromolekülen zurückgeführt [80].

### 2.3.3 Erwarteter Verlauf des elektrischen Feldes

Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes ändert sich die Ionenzusammensetzung innerhalb und außerhalb der Zelle. Die Zellmembran lädt sich wie ein Kondensator auf. Wie stark die Zellmembran aufgeladen wird, hängt von verschiedenen Faktoren wie z. B. dem Zellradius und der Membranorientierung im äußeren Feld ab. Dadurch entsteht eine Potentialdifferenz, die sich mit dem Transmembranpotential überlagert. Diese führt zu einer Gesamtspannung zwischen Zellinnen- und Zellaußenseite. Diese Gesamtspannung führt zur Entstehung eines elektrischen Feldes in der Zellmembran und zur Ausrichtung der Phospholipide in diesem Feld [153].

Ein elektrisches Feld kann die Zelle beeinflussen. Diese kann dadurch verformt, fusioniert oder anderweitig verändert werden. Um zu sehen, welche Potential- und E-Feldverläufe an einer kugelförmigen Zelle entstehen, betrachten wir diese in einem elektrostatischen Feld. Die Leitfähigkeit einer Zelle in so einem Feld ist sehr gering. Das äußere Feld, in dem sich die Zelle befindet, führt zu ihrer Polarisation. Dadurch wird im Inneren der Zelle ein elektrisches Gegenfeld erzeugt, welches das äußere Feld mit der Zeitkonstante von  $\tau=2,5 \times 10^{-7}$  s kompensiert [80]. Dieses Feld addiert sich auf einer Seite zu dem Zellmembranpotential und subtrahiert sich von ihm auf der anderen Seite. Diese Polarisation beeinflusst das Transmembranpotential der Zellen und ist ortsabhängig. Aus Abbildung 2-18 geht hervor, dass die Zelle das äußere Feld verzerrt. Die Feldstärke innerhalb der Zelle ist relativ klein. Aus diesem Grund können im Gleichfeld und im niederfrequenten Feld Polarisationserscheinungen vernachlässigt werden. [80]

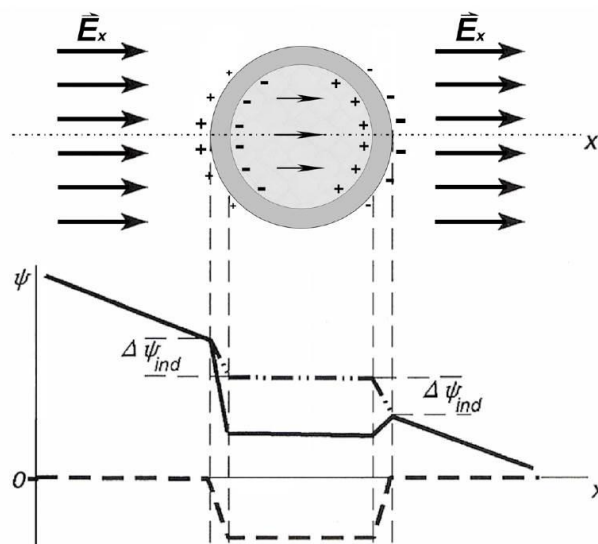


Abbildung 2-18: Zelle in einem elektrostatischen Feld und entsprechender Ladungs-, Potential- und Feldverlauf an dieser Zelle. Im oberen Bildteil wird die Richtung und die Stärke des elektrischen Feldes durch Pfeile charakterisiert. Im unteren Bildteil ist der Potentialverlauf über die x-Achse dargestellt. — — : Membranpotential ohne Feldeinwirkung; — .. — : Durch E-Feld induzierter Potentialverlauf,  $\Delta\psi_{ind}$ ; — — — : Resultierender Potentialunterschied. Entnommen aus [80].



Unter der Annahme, dass  $\sigma \gg \omega \varepsilon \varepsilon_0$  und  $d \ll r$  ist, kann das induzierte Membranpotential wie folgt berechnet werden:

$$\Delta\varphi_{ind} = \frac{1,5Er}{1 + (rC_m(\rho_{in} + 0,5\rho_{ex}))} \frac{1}{1 + j\omega\tau} \cos(\alpha) \quad (2-9)$$

Mit:  $E$ : äußeres elektrisches Feld

$r$ : Radius der Zelle

$C_m$ : Kapazität der Zellmembran

$\rho_{in}$  und  $\rho_{ex}$ : äußerer und innerer spezifischer Widerstand

$\tau$ : Zeitkonstante

$\omega$ : Kreisfrequenz

$\alpha$ : Winkel zwischen einem Punkt der Membran und dem ungestörten Feldvektor.

Unter der Annahme, dass die Zellmembrankapazität klein ist, kann der Term  $R_m C_m$  vernachlässigt werden. Dadurch berechnet man die induzierte Potentialdifferenz nach:

$$\Delta\varphi_{ind} = \frac{1,5E \cos(\alpha)}{\sqrt{1 + (\omega\tau)^2}} \quad (2-10)$$

In niederfrequenten Wechselfeldern ( $f < 10^5$  Hz) und in Gleichfeldern vereinfacht sich diese Gleichung zu:

$$\Delta\varphi_{ind} = 1,5 Er \cos(\alpha) \quad (2-11)$$

Für eine kugelförmige Zelle mit einem Zellradius von  $r = 10\mu m$ , die einem elektrischen Feld von  $E = 10^5 V/m$  ausgesetzt ist (die Stelle an der Membran, wo die Feldlinien senkrecht zu Membran stehen), ändert sich das Membranpotential um 1,5V [80].

Betrachten wir jetzt eine Zelle in elektrischen Wechselfeldern.

In Abbildung 2-19 ist der Feldverlauf um eine kugelförmige Zelle, die sich in einem homogenen elektrischen Wechselfeld befindet, gezeigt.

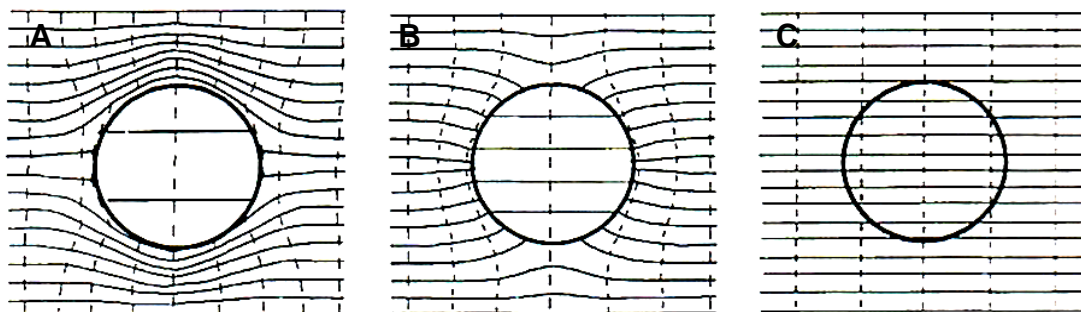


Abbildung 2-19: Feldverlauf um und in einer kugelförmigen Zelle in einem homogenen elektrischen Wechselfeld (entnommen aus Glaser, Abb. 3.41, Seite 185) Äquipotentiallinien(---) und Feldlinien(—); (A) Feldverlauf bei niedriger Frequenz; (B) Feldverlauf bei hoher Frequenz, Leitwert des Umgebungsmilieus niedriger als in Zelle; (C) Feldverlauf bei hoher Frequenz; Leitwert im intra- und extrazellulären Raum gleich [80].

Mit steigender Frequenz ist die Zelle zunehmend kapazitiv gebrückt und ab ca. 1MHz kann das elektrische Feld die Zelle ungehindert passieren. Falls die Elektrizitätskonstanten des Mediums innerhalb und außerhalb der Zelle annähernd gleich sind, wird der Verlauf der Feldstärke von den Verhältnissen der Leitfähigkeiten innerhalb und außerhalb der Zelle bestimmt. [80]

### 2.3.4 Wellenform und Art der Stimulation

Eine Zelle kann elektrisch oder magnetisch stimuliert werden. Die Reizenergie kann dabei induktiv, kapazitiv oder über direkte elektrische Stimulation (Faraday'sche Prozesse) eingekoppelt werden.

Bei der induktiven Energieeinspeisung werden in den Zellen durch die zeitlich veränderlichen Magnetfelder elektrische Wirbelströme induziert. Sie induzieren wiederum elektrische Felder. Die Verteilung solcher Felder ist stark von der Geometrie der Spule, den elektrischen Parametern der Zelle und auch deren Geometrie abhängig. Aus diesem Grund können die Einflussparameter nicht oder nur ungenau verallgemeinert werden. Weiterhin ist es unmöglich, über eine induktive Energieeinspeisung rechteckige Signale in den Zellen zu erzeugen. Dies folgt aus den Maxwell-Gleichungen: je steiler die Flanke eines Pulses ist, desto höher ist die induzierte Feldstärke. Bei der magnetischen Stimulation lässt sich die induzierte elektrische Feldstärke in den Zellen nicht exakt kontrollieren. Man muss einen Kompromiss zwischen steiler Flanke, die für kurze Zeit hohe Ströme induziert, und flacher Flanke, die für längere Zeit geringe Ströme induziert, finden. [89, 216]

Bei der kapazitiven Feldeinkopplung werden die Ladungen in der elektrischen Doppelschicht in Abhängigkeit von dem eingespeisten Signal verteilt. Unter anderem ist diese Verteilung auch von der Ladung der Elektronenoberfläche abhängig. Selbst an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt findet keine Elektronenübertragung statt. Die induzierte Ladungsmenge wird durch die Ladungsmenge der Doppelschicht, der sog. Doppelschichtkapazität, limitiert. [89, 216]

Durch die direkte elektrische Stimulation werden die Ladungen im Medium durch die Faraday'sche Prozesse erzeugt. Das verursacht in der Folge einen Fluss von Ionenladungen im Medium bzw. in den Zellen. Dabei kann mit Hilfe von Elektroden der Feldverlauf in Elektrodennähe kontrolliert werden. Bei dieser Art der Stimulation muss ein Kompromiss zwischen der Feldstärkenhöhe und den daraus resultierenden elektrochemischen Reaktionen gefunden werden [80, 89, 91].

In der Praxis werden verschiedene Signalformen und Arten der Feldeinkopplung verwendet. Wenn die Zellen mit rechteckförmigen elektrischen Feldpulsen stimuliert werden sollen, kann das Feld am besten über direkte elektrische Stimulation in die Zelle eingespeist werden. Dafür ist die induktive Feldeinkopplung nicht geeignet. Bei der kapazitiven Feldeinkopplung kommt es zu einer Verzerrung der Pulsform und Phasenverschiebung. Für die Stimulation mit harmonischen Wellen ist dagegen sowohl induktive und kapazitive Feldeinspeisung als auch die direkte Energieeinspeisung anwendbar [89].



## 2.4 Messtechnische Grundlagen

### 2.4.1 Elektrochemische Effekte am Elektrode-Elektrolyt-Übergang

Unter einer Elektrode versteht man ein elektrisch leitendes System von hintereinander geschalteten Phasen, an dem ein Transfer von Ladungsträgern stattfindet.

Dadurch werden komplexe Reaktionen an der Elektrodenoberfläche hervorgerufen. Einige Ionen, die dicht an der Grenzfläche liegen, bilden die sogenannte Helmholtz Doppelschicht (starre Doppelschicht). Innerhalb dieser Schicht fällt das Potential linear ab. Die Breite der Helmholtz-Schicht ist von der Ionenstärke der Lösung abhängig. Je höher die Ionenstärke ist, desto stärker ist die Besetzung der Helmholtz-Schicht. Danach beginnt eine diffuse Doppelschicht, in der das Potential exponentiell abfällt [80]. Die effektive Breite der diffusen Doppelschicht definiert man durch die Debye-Hückel-Länge ( $1/\kappa$ ). Das ist die Entfernung, in der das Potential auf  $1/e$  abfällt [80]. Abbildung 2-20 zeigt eine elektrische Doppelschicht.

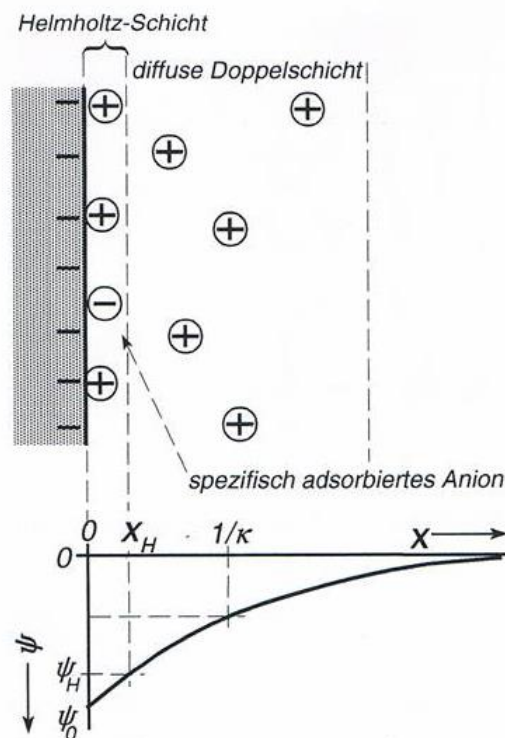


Abbildung 2-20: Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt. Oben: Ladungen und Gegenladungen an einer Grenzflächen; Unten: Potentialverlauf entsprechend dem Modell nach Stern:  $\psi_0$ : Oberflächenpotential;  $\psi_H$ : Potential am Ende der Helmholtzschicht;  $x_H$ : Dicke der Helmholtzschicht;  $1/\kappa$ -Debye-Hückel-Länge als Maß für die effektive Dicke der diffusen Doppelschicht. Entnommen aus [80].

In der Regel ist bei den Elektroden eine Phase elektronenleitend (Festkörper) und eine Phase ionenleitend (Elektrolyt). Man unterscheidet zwei Typen von Elektroden-Prozessen. Zum einen gibt es Prozesse mit Ladungstransfer über die Phasengrenze, die mit Faraday - Strömen verbunden sind. Solche Prozesse können mit Redoxreaktionen beschrieben werden [91]:



Mit  $S_{ox}$ : oxidiertes Zustand  
 $S_{red}$ : reduzierter Zustand  
 $n$ : Wertigkeit der Elektrodenreaktion.

Diese Elektronenverschiebung führt zum thermodynamischen Gleichgewichtspotential der Redoxelektrode, das mit der Nernstschen Gleichung beschrieben wird.

Andere Prozesse verlaufen ohne Ladungstransfer über die Phasengrenze. Solche Prozesse sind mit Auf- und Entladung der elektrochemischen Doppelschicht verbunden. Ein zusätzlicher Strom, der über eine solche Elektrode fließt, führt zu Polarisationserscheinungen. Dadurch wird ein Elektrodenpotential verändert. [91]

Eine Grenzfläche, an der elektrochemische Reaktionen mit einem zeitabhängigen Signal stattfinden, kann mit einem Ersatzschaltbild aus einer Serienschaltung von Durchtrittswiderstand  $R_D$  und Warburg-Impedanz  $Z_W$  dargestellt werden (siehe Abbildung 2-21). Die Warburg-Impedanz besteht aus einer Serienschaltung von einem Konzentrationswiderstand  $R_K$  und einer Konzentrationskapazität  $C_K$  und beschreibt diffusionsbegrenzte Vorgänge in der Grenzfläche. In dem Ersatzschaltbild sind zudem die Doppelschichtkapazität  $C_D$  und der Elektrolytwiderstand  $R_E$  zu berücksichtigen [91].

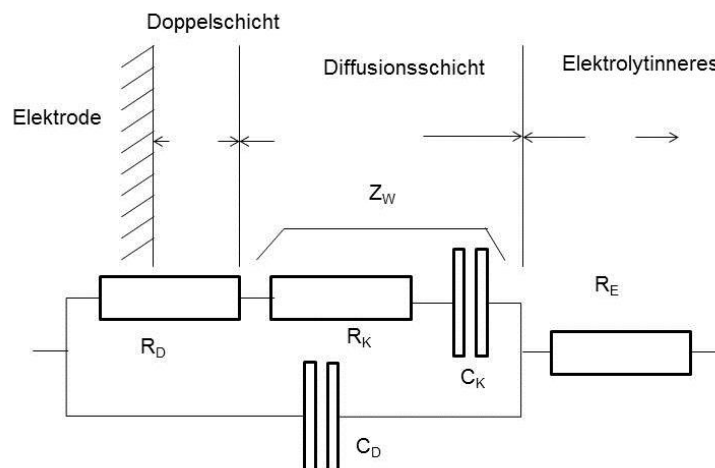


Abbildung 2-21: Ersatzschaltbild der Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt:  $R_D$ : Durchtrittswiderstand;  $Z_W=R_K+1/(i\omega C_K)$ : Warburg-Impedanz;  $R_E$ : Elektrolytwiderstand;  $C_D$ : Doppelschichtkapazität. Entnommen aus [91].

Elektrische und elektrochemische Systeme zeigen einige Unterschiede. Die elektrochemischen Systeme sind nicht linear und zeigen eher ein exponentielles Verhältnis zwischen Strom und Spannung, das mit der Butler-Volmer-Gleichung beschrieben werden kann. Dagegen zeigen elektrische Systeme ein lineares Verhältnis, das über das Ohmsche Gesetz beschrieben wird [89, 91]. Parameter wie die Rauigkeit der Elektrodenoberfläche, inhomogene Reaktionsraten und Überspannungen an der Oberfläche sind mögliche Ursachen für die Entstehung von nicht linearen Systemen. Das Frequenzverhalten kann häufig mit einem sogenannten Constant Phase Element (CPE) beschrieben werden. Das CPE ist ein virtuelles Element, mit dem das Verhalten realer Systeme dargestellt werden kann und das die Kurvenverläufe bei realen Messergebnissen einem physikalischen Effekt zuordnet, wobei die nicht linearen Eigenschaften sowohl der kapazitiven als auch der ohmschen Grenzflächenelemente berücksichtigt werden [56, 155].

Das Faraday'sche Gesetz beschreibt den Zusammenhang zwischen der umgesetzten Masse  $m$  eines Stoffes und der ausgetauschten Ladungsmenge  $Q$  in einer elektrochemischen Reaktion.

$$Q = znF \quad (2-13)$$

Mit:  $Q$ : Ladung

$z$ : Anzahl der übertragenen Elektronen

$n$ : Stoffmenge des oxidierten Metalls

$F$ : Faraday Konstante.

Bei der Übertragung von Elektronen zwischen Elektrode und Elektrolyt finden verschiedene Redoxreaktionen an den Elektroden statt. Einige Substanzen werden dabei reduziert oder oxidiert. Diese Reaktionen können reversibel oder irreversibel sein. Unter Oxidation versteht man einen Prozess, bei dem eine gelöste redoxaktive Substanz Elektronen auf eine Elektrode (die sog. Anode) überträgt. Bei einer Reduktion werden umgekehrt Elektronen von einer Elektrode (der sog. Kathode) auf eine gelöste redoxaktive Substanz übertragen. Eine Elektrode, an welcher Reduktion (Elektronen-Aufnahme,  $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$ ) erfolgt und eine negative Ladung in den Elektrolyt übergeht ( $Cl_2 + 2e^- \rightarrow 2Cl^-$ ), bezeichnet man als Kathode. An der Anode erfolgt die Oxidation (Elektronen-Abgabe,  $2H_2O \rightarrow O_2 \uparrow + 4H^+ + 4e^-$ ) und Elektronen werden von der Lösung auf die Elektrode übertragen ( $2Cl^- \rightarrow Cl_2 + 2e^-$ ) [91]. An der Anode kann das zur Entstehung von gasförmigen Sauerstoff und Chlor führen, die beide zur Absenkung des pH-Werts beitragen. An der Kathode wird in erster Linie gasförmiger Wasserstoff gebildet, was zu einer Alkalisierung der Umgebung führen kann. Welche Reaktion an der Kathode und Anode stattfindet, bestimmt die Lage des thermodynamischen Gleichgewichtspotentials  $E_0$ . Die Werte des Gleichgewichtspotentials für die Sauerstoffbildung/Reduktion liegen bei 1,2V und für die Bildung/Reduktion von Chlorid bei 1,7V. Elektrodenpotentiale für mögliche Oberflächenoxidation/Reduktion an einer Platinelektrode mit verschiedenen Redoxpaaren liegen anfänglich bei +1,0V. [89, 185]

Die überwiegende elektrolytische Reaktion, die sich auf den Elektroden ereignet, ist die Zersetzung von Wasser und darin gelöster Bestandteile. Reicht die molekulare Menge an Sauerstoff und Wasserstoff aus, kommt es zur Gasblasenbildung. Wenn die Pulsfrequenz hoch genug ist, dass das gebildete gasförmige Produkt vor seiner Weg-Diffusion in der folgenden, kathodischen Halbwelle wieder in die Edukte zurückgebildet wird, entstehen keine Gasblasen. Zellen können die niederfrequente Stimulation aushalten, wenn diese nicht kontinuierlich ist [149].

Für die biologische Anwendung der Stimulationselektroden sollte das Elektrodenmaterial inert und biokompatibel sein. Für solche Zwecke wird sehr oft Platin eingesetzt. Durch die Platinisierung kann die Oberfläche vergrößert und damit die Stromdichte an der Elektrodenfläche vermindert werden. Das erlaubt es, die elektrochemischen Reaktionen länger im reversiblen Bereich zu halten [34].

## 2.4.2 Technik der Impedanzmessung bei verschiedenen Frequenzen

Unter der Annahme, dass eine Zelle als Komplex aus elektronischen Komponenten betrachtet werden kann, hat die Impedanz eine große Bedeutung für die Zellbiologie. Ein Zellbewuchs wird durch einen veränderten Impedanzwert charakterisiert. Durch die Impedanzmessung an einer mit adhärennten Zellen bewachsenen Elektrode entsteht ein Sensor, der empfindlich auf die Stärke der Adhäsion, Zellstrukturveränderungen, Zell-Zell-Verbindungen, Proliferation und Zelltod reagiert. Nur durch Wissen, das durch die Impedanzspektroskopie gewonnen wurde, kann man die Ergebnisse der elektrischen Stimulation richtig deuten [84].

Die Impedanz ist eine komplexe Größe, die über einen Realteil (Widerstand  $R$ ) und einen Imaginärteil (Reaktanz  $X$ ) beschrieben werden kann. Sie wird im rechtwinkligen Koordinatensystem in der Form  $R+jX$  oder alternativ im Polarkoordinatensystem mit Betrag und Phasenwinkel dargestellt. Die Reaktanz kann man induktiv ( $X_L = 2\pi fL$ ) oder kapazitiv ( $X_C = \frac{1}{2\pi fC}$ ) definieren.

Die Impedanzmessung wird in der Regel bei einer einzelnen Messfrequenz durchgeführt, während die Impedanzspektroskopie als Messung in einem bestimmten Frequenzbereich definiert ist. Durch die Impedanzspektroskopie lassen sich Rückschlüsse auf frequenzabhängige Leitungsvorgänge in einem System ziehen. Die Impedanz wird durch verschiedene Ladungstransportvorgänge im Medium und Oberflächeneffekte an den Elektrodenmaterialien beeinflusst. Bei Materialien, bei denen die ionische Leitfähigkeit dominiert, wird die Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) verwendet [91, 143].

Das in dieser Arbeit verwendete Elektrochemische Impedanzspektrometer ist eine Kombination aus einem phasensensitiven Voltmeter und einem Frequenzgenerator. Die EIS ist eine quasi stationäre elektrochemische Untersuchungsmethode, bei der an das zu untersuchende elektrochemische System ein sinusförmiges Anregungssignal mit kleiner Amplitude (ca. 30mV) angelegt wird. Die Antwort des linearen Systems ist ein sinusförmiges Signal mit gleicher Frequenz, aber unterschiedlicher Amplitude und Phase. Aus dem Verhältnis zwischen dem Anregungssignal und der Antwort des Systems wird die komplexe Impedanz des Systems berechnet. Durch Variationen der Anregungsfrequenz nimmt man ein Impedanzspektrum auf. Bei der Auswertung der gemessenen Impedanzspektren werden die spezifischen physikalischen Parameter des elektrochemischen Systems durch ein Ersatzschaltbild beschrieben (siehe Abbildung 3-8). EIS eignet sich als Methode sowohl zur Untersuchung von Grenzschichten als auch von Materialparametern.

Es gibt eine ganze Reihe von Methoden zur Impedanzmessung. All diese Methoden weisen ihre Vor- und Nachteile auf. Faktoren wie Frequenz, Messbereich und Messgenauigkeit sind für die Wahl der einen oder anderen Methode entscheidend. Bei der Wahl muss immer ein Kompromiss eingegangen werden. Es existieren folgende Impedanzmessmethoden: Brücken Methode, Resonanz Methode, I-V Methode und Automatisch abgleichende Messbrücken Methode. Bei den Elektrodenanordnungen für die Impedanzmessung unterscheidet man eine bipolare, tripolare oder tetrapolare Anordnung [143].

### Impedanzmessung mit bipolarer Elektrodenanordnung

Bei der bipolaren 2-Elektroden-Anordnung wird mit einem AC Signal im linearen Bereich gearbeitet (siehe Abbildung 2-22). Es wird keine DC Polarisierung der Elektroden vorgenommen. Die Messung erfolgt mit dem Impedance/Gain-phase Analyzer 1260A (Solartron Analytical, Ametek Inc.).

Bei der 2-Elektroden-Anordnung wird eine Wechselspannung im definierten Frequenzbereich angelegt und die frequenzabhängige Wechselstromantwort des Systems gemessen. Die Schaltung ist wie folgt aufgebaut:

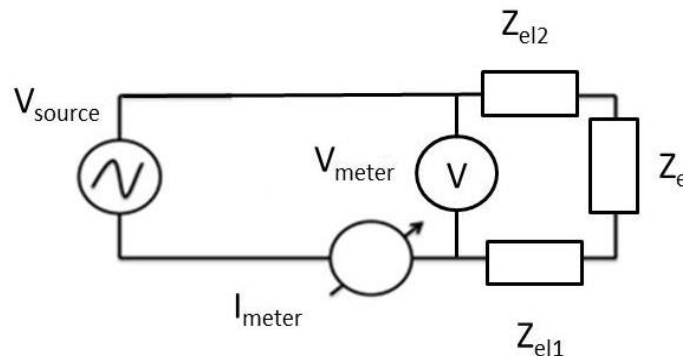


Abbildung 2-22: Impedanzmessung: Schaltung bipolarer Messaufbau. Bei der 2-Elektroden-Anordnung wird eine Wechselspannung im definierten Frequenzbereich angelegt und die frequenzabhängige Wechselstromantwort des Systems gemessen. Zu den Vorteilen der 2-Elektroden-Impedanzmessung gehören der einfache Messaufbau und Messtechnik. Zusätzlich liegt das Messobjekt vollständig in der Messstrecke. Zu den Nachteilen zählen folgende Faktoren: Zum einen prägen Impedanzen von Leiterbahnen, Elektroden und dem Messobjekt die Gesamtimpedanz. Zum anderen können die Messdaten von einer frequenzabhängigen Polarisation der Elektroden verfälscht werden.

- Mit:  $V_{source}$ : Anregungsspannung  
 $Z_{el\ 1,2}$ : Impedanz der Elektroden  
 $Z_e$ : Impedanz des Elektrolyts  
 $V_{meter}$ : Spannungs-Messgerät (idealisiert)  
 $I_{meter}$ : Strom-Messgerät (idealisiert).

Die gemessene Impedanz errechnet sich aus:

$$Z_{mess} = \frac{V_{meter}}{I_{meter}} = Z_e + Z_{el1} + Z_{el2} \approx Z_{el1} + Z_{el2} = 2Z_{el} \quad (2-14)$$

Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten, die Stromdichte und deren Eindringtiefe im Bereich der Messelektroden zu beeinflussen. Die gemessene Stromstärke bzw. Stromdichte von zwei bipolaren Elektroden ist von dem Elektrodenabstand abhängig. Je größer der Elektrodenabstand ist, desto kleiner ist die gemessenen Stromstärke bzw. Stromdichte. Zusätzlich wird der relative Beitrag von den tiefliegenden Schichten zur Messung größer. Mit Hilfe von multiplen Planarelektroden ist es möglich, die Eindringtiefe zu reduzieren [84].

Zu den Vorteilen der 2-Elektroden-Impedanzmessung gehören der einfache Messaufbau und die Messtechnik. Zusätzlich liegt das Messobjekt vollständig in der Messstrecke. Zu den

Nachteilen zählen folgende Faktoren: Zum einen prägen Impedanzen von Leiterbahnen, Elektroden und dem Messobjekt die Gesamtimpedanz. Zum anderen können die Messdaten von einer frequenzabhängigen Polarisierung der Elektroden verfälscht werden.

### ***Impedanzmessung mit tripolarer Elektrodenanordnung***

Bei dieser Methode besitzen die stromführenden Leitungen gleiche Widerstände. Dabei müssen die Kontaktwiderstände klein sein. Der Spannungsabfall an den Leitungs- und Anschlusswiderständen lässt sich herausrechnen.

Die 3-Elektroden-Anordnung kann man mit potentiostatischer oder galvanostatischer Kontrolle durchführen. Wie der Name schon sagt, sind 3 Elektroden vorhanden: eine Arbeitselektrode (AE), eine Hilfelektrode (HE) und eine Referenzelektrode (RE). Der Strom wird zwischen AE und HE gemessen. Die RE ist hochohmig geschaltet und sorgt damit für eine konstante Spannung an der AE. Eine kontrollierte DC-Polarisierung der AE ist mit einem kleinen überlagerten AC-Signal möglich.

Diese Messmethode ist – im Vergleich zur 2-Elektroden-Anordnung – vielseitiger, aber auch anspruchsvoller im Aufbau (Position der Gegen- und Referenzelektrode) [84].

### ***Impedanzmessung mit tetrapolarer Elektrodenanordnung***

Die Impedanzmessung mit tetrapolarer Elektrodenanordnung bietet sich immer dann an, wenn die Leitungs- und Anschlusswiderstände die Messung verfälschen können, oder wenn eine Probe mit niedrigem Widerstand vermessen werden soll und die Leitungs- und Anschlusswiderstände nicht vernachlässigt werden können.

Bei der 4-Elektroden-Anordnung gibt es zwei Current Carrying (CC) Elektroden und zwei Pick Up (PU) Elektroden. Dabei wird die Messanordnung mit einem Anregungsstrom (Konstantstromquelle) durch die CC-Elektroden versorgt und die PU-Elektroden messen fast stromlos die im Messmedium abfallende Spannung. Die Spannung wird hochohmig abgegriffen, wobei die gemessene Impedanz als Transferimpedanz ermittelt wird [84].

Die Leitungswiderstände spielen bei dieser Methode keine Rolle, da die Spannungsabfälle an diesen Widerständen bei der Messung nicht berücksichtigt werden. Die Leitungs- und Anschlusswiderstände spielen aufgrund des hohen Innenwiderstands des Spannungsmessgerätes keine Rolle. In diesem Messkreis tritt kein Strom und als Folge kein Spannungsabfall an dem Leitungs- und Anschlusswiderständen auf [84, 143].

Die Schaltung eines tetrapolaren Messaufbaus ist in Abbildung 2-23 gezeigt.

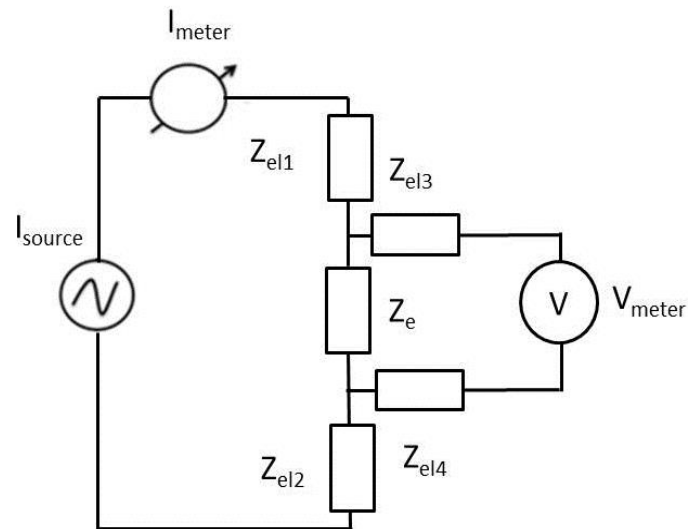


Abbildung 2-23: Schaltung eines tetrapolaren Messaufbaus. Dank dieser Methode ist die vollständige Kompensation der Effekte durch Elektroden und Zuleitungen möglich. Dies ermöglicht auch die Messung sehr niedriger Impedanzen. Weiterhin gewährleistet diese Messmethode eine räumliche Auflösung durch Mehrelektrodensysteme. Die Messtechnik mit Erregersystem und Antwortsystem ist jedoch aufwändiger als bei den anderen Messmethoden. Zusätzlich ist dieses Messsystem empfindlich gegenüber parasitären Kapazitäten an Elektroden.

Mit:  $I_{\text{source}}$ : Anregungsstrom  
 $Z_{\text{el}1, 2, 3, 4}$ : Impedanz der Elektroden  
 $Z_e$ : Impedanz des Elektrolyts  
 $I_{\text{meter}}$ : Strom-Messgerät (idealisiert)  
 $V_{\text{meter}}$ : Spannungs-Messgerät (idealisiert).

Die gemessene Impedanz errechnet sich aus:

$$Z_{\text{mess}} = \frac{V_{\text{meter}}}{I_{\text{meter}}} = Z_e \quad (2-15)$$

Dank dieser Methode ist die vollständige Kompensation der Effekte durch Elektroden und Zuleitungen möglich. Weiterhin gewährleistet diese Messmethode eine räumliche Auflösung durch Mehrelektrodensysteme. Die Messtechnik mit Erregersystem und Antwortsystem ist jedoch aufwändiger als bei den anderen Messmethoden. Zusätzlich ist dieses Messsystem empfindlich gegenüber parasitären Kapazitäten an den Elektroden.

### 2.4.3 Messtechnik zur Bestimmung des Transmembranpotentials

Das Membranpotential einer Zelle kann zum einen elektrophysiologisch mit Hilfe von der Patch Clamp Technik, zum anderen durch die Bestimmung der Verteilung von radioaktiv markierten Teilchen oder optisch (fluorimetrisch) gemessen werden.

#### ***Bestimmung des Membranpotentials mittels Patch Clamp Technik***

Mit Hilfe der Patch Clamp-Technik kann man einzelne Ionenkanäle und deren Eigenschaften untersuchen. Diese Technik erlaubt die hochauflösende Detektion des Ionenkanalstroms durch die Plasmamembran (bis auf wenige Pikoamper). Mit dieser Methode kann wahlweise der Strom in einem einzelnen Kanal oder in der gesamten Zellmembran gemessen werden [240]. Unter Anderem lässt sich damit auch das Membranpotential bestimmen. Man unterscheidet zwei verschiedene Patch Clamp Konfigurationen, die Abbildung 2-24 zeigt.

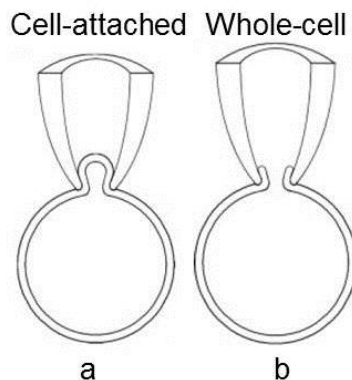


Abbildung 2-24: Darstellung der Patch Clamp-Konfigurationen: Cell-Attached-Konfiguration (a): Bei dieser Methode wird eine Glaspipette, die mit einer Elektrolytlösung gefüllt ist, auf die Zellmembran aufgesetzt. Zwischen der Pipettenspitze und der Zellmembran entsteht durch leichtes Ansaugen ein Abdichtwiderstand, das sogenannte Gigaseal. Das ermöglicht es, auftretende Leckströme zu vernachlässigen; Whole-Cell-Konfiguration (b): Dank des hohen Widerstands des Gigaseals fließt durch die Pipette ein Strom, der auch durch den Ionenkanal des Patches fließt. In die Pipettenlösung taucht eine Elektrode. Diese Elektrode ist an einen Verstärker angeschlossen. Durch verstärktes Ansaugen oder kurze Pulse elektrischer Spannung kann die Zellmembran eingerissen werden. Dabei bleibt die Membran nicht mehr intakt. Es entsteht eine Kontinuität zwischen dem Zellinneren und der Glaspipette. Entnommen aus [240].

Bei dieser Methode wird eine Glaspipette, die mit einer Elektrolytlösung gefüllt ist, auf die Zellmembran aufgesetzt. Zwischen der Pipettenspitze und der Zellmembran entsteht durch leichtes Ansaugen (Unterdruck) ein Abdichtwiderstand, das sogenannte Gigaseal (1-100GΩ). Das ermöglicht es, auftretende Leckströme zu vernachlässigen. Dadurch wird die Cell-Attached-Konfiguration der Patch Clamp-Technik erreicht (siehe Abbildung 2-24, a). Dank des hohen Widerstands des Gigaseals fließt durch die Pipette ein Strom, der auch durch den Ionenkanal des Patches fließt. In die Pipettenlösung taucht eine Elektrode. Diese Elektrode ist an einen Verstärker angeschlossen. Durch verstärktes Ansaugen oder kurze Pulse elektrischer Spannung kann die Zellmembran eingerissen werden. Dabei bleibt die Membran nicht mehr intakt. Es entsteht eine Kontinuität zwischen dem Zellinneren und der Glaspipette. Diese Konfiguration bezeichnet man als Whole-Cell-Konfiguration (siehe Abbildung 2-24, b).



Die Whole-Cell-Konfiguration erlaubt die Messung des Membranpotentials oder des Ganzzellstroms. Man unterscheidet zwei Patch Clamp-Technologien: konventionelle und planare Technik (siehe Abbildung 2-25).

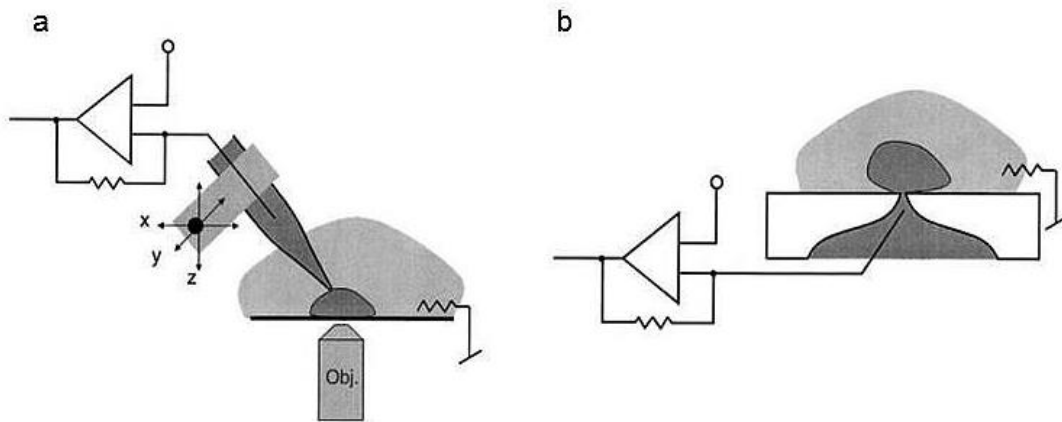


Abbildung 2-25: Schematischer Aufbau eines Patch-Clamp-Experiments in der Whole-Cell-Konfiguration: a) konventionelle Technik; b) planare Technik. Beim konventionellen Patchen wird die Pipette unter optischer Kontrolle auf einer adhärenen Zelle positioniert. Relativbewegungen zwischen Zelle und Pipette müssen vermieden werden. Dadurch bleibt die Verbindung intakt. Beim planaren Patchen wird die suspendierte Zelle auf ein Loch positioniert. Das wird mit Hilfe von Unterdruck ermöglicht. Dabei sind Relativbewegungen ausgeschlossen. Die planare Technik bietet den Vorteil, dass kein schwingungsgedämpfter Tisch, kein Mikroskop und keine Abschirmung für die Messungsdurchführung erforderlich sind. Entnommen aus [68].

Beim konventionellen Patchen wird die Pipette unter optischer Kontrolle auf einer adhärenen Zelle positioniert. Relativbewegungen zwischen Zelle und Pipette müssen vermieden werden. Dadurch bleibt die Verbindung intakt. Beim planaren Patchen wird die suspendierte Zelle auf ein Loch positioniert. Das wird mit Hilfe von Unterdruck ermöglicht. Dabei sind Relativbewegungen ausgeschlossen. Die planare Technik bietet den Vorteil, dass kein schwingungsgedämpfter Tisch, kein Mikroskop und keine Abschirmung für die Messungsdurchführung erforderlich sind. Die Patch Clamp-Methode ist eine sehr verbreitete, aber experimentell aufwändige Methode. Durch die Detailbetrachtung der Aktivität von Ionenkanälen und Transmembranpotentialen können mit einer einzelnen Zelle äußerst detaillierte elektrophysiologische Erkenntnisse gewonnen werden. Das erlaubt aber keine Erkenntnisse über mehrere Zellen im Zellverbund. [38, 68, 240]

### ***Bestimmung des Membranpotentials mittels Konzentrationsverteilung markierter Ionen***

Eine weitere Methode zur Bestimmung des Membranpotentials ist die Auswertung der Verteilung von radioaktiv markierten Teilchen. Diese Methode besitzt eine hohe Nachweisempfindlichkeit. Die verwendeten Substanzen weisen eine hohe Toxizität auf. Dadurch werden die Zellen geschädigt und Langzeitmessungen sind nicht möglich. [90]

### **Optisches Verfahren: Bestimmung des Membranpotentials mittels spannungssensitiver Farbstoffe**

Das Membranpotential kann man auch mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen ermitteln. Die Zellmembran ist zu den verwendeten Farbstoffen unterschiedlich permeabel. Bei einer Potentialänderung ändern verschiedene Mechanismen ihre optischen Eigenschaften wie das Absorptions- und Fluoreszenzverhalten [90]. Diese Methode kann immer dann eingesetzt werden, wenn die Verwendung von Elektroden nicht möglich ist.

Dank ihrer Anwendungsbreite hat die fluorimetrische Methode große Bedeutung. Sie ist sensitiv und bei vielen Zellarten anwendbar. Die meisten Farbstoffe wirken jedoch zytotoxisch. Schädigungen an den Zellen sind bei einigen Farbstoffen über den photodynamisch erzeugten Singulett-Sauerstoff möglich [60, 74, 75, 86, 140]. Diese Methode erlaubt es, Messungen an intakten und gleichzeitig an mehreren Zellen durchzuführen.

Potentialsensitive Fluoreszenzfarbstoffe sind bezüglich ihrer Fluoreszenzantwort auf die Potentialänderung in zwei Gruppen eingeteilt: Slow-Response und Fast-Response Farbstoffe. Zu den Fast-Response Fluorophoren gehören Farbstoffe, deren Reaktion auf die Potentialänderung im Mikrosekundenbereich liegt. Die Empfindlichkeit solcher Marker liegt im Bereich von 0,01%/mV. Die sind in der Regel nicht Membranpermeabel und lagern sich an die Außenseite der Membran an. Beispiele von Fast-Response Fluoreszenzfarbstoffe sind der Styrylpyridiniumfarbstoff Di-C<sub>5</sub>-ASP, die Aminonaphthylethenylpyridiniumfarbstoffe wie Di-4-ANEPPS, Di-8-ANEPPS. Diese Marker werden meistens für die Untersuchung von Nerven- und Muskelzellen eingesetzt. [72, 140]

Eine humane Tumorzelle vom Typ A-431, die sich in einem elektrischen Feld mit einer Feldstärke von 53V/cm befindetet, ist in Abbildung 2-26 dargestellt [87].

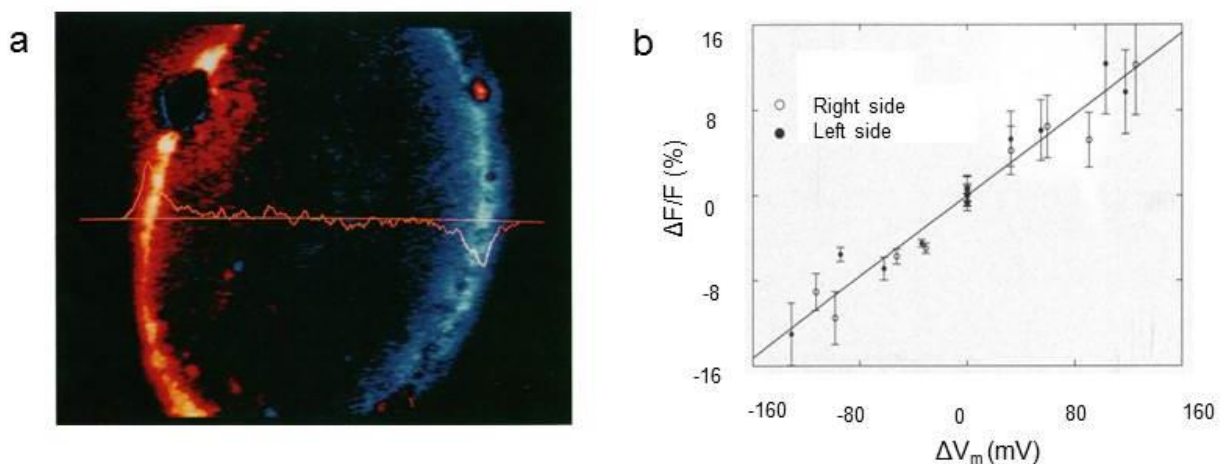


Abbildung 2-26: Membranpotential-Messung: Fluoreszenzintensitäts-Antwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von 53 V/cm in der Richtung von links nach rechts ausgesetzt ist (a) mit zugehöriger Fluoreszenzintensitäts-Tabelle (b). Die linke Zelhälfte ist hyperpolarisiert, die rechte Zelhälfte ist depolarisiert. Die Membranpotential-Messung ist in Pseudofarben dargestellt: Rot ist die positive Fluoreszenzänderung, blau die negative Fluoreszenzänderung. Die Farbintensität entspricht der Fluoreszenzintensität. Anhand einer Kalibrierungskurve wird die Fluoreszenzänderung in die Membranpotentialänderung umgerechnet. Entnommen aus [87].

Zu den Slow-Response Fluoreszenzfarbstoffen gehören membranpermeable kationische und anionische Farbstoffe. Die Potentialänderung erfolgt durch eine Umverteilung über Innen- und Außenseite der Membran. Der Farbstoff verteilt sich auf Grund seines Konzentrationsunterschieds und der über die Zellmembran aufgebauten Potentialdifferenz. Aus diesem Grund wird die stationäre Basis erst nach Minuten erreicht. Nach einer Zellmembranänderung verteilt sich der Farbstoff erneut, bis wieder ein Gleichgewicht erreicht wird. Das bedeutet eine Reaktionszeit auf eine Potentialänderung von Minuten. [41, 101, 208]

DiBAC<sub>4</sub>(3) und DiBAC<sub>2</sub>(3) sind die am meisten verbreiteten Oxonol-Farbstoffe für die Membranpotential-Messung [37, 139]. Die Farbstoffe enthalten delokalisierte negative Ladungen und gelangen durch Diffusion durch die Plasmamembran in die Zelle. In der Zelle bindet der Farbstoff an hydrophobe Gruppen von Proteinen und der Membran. Das führt zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität, was der Depolarisation der Zelle entspricht. Bei der Hyperpolarisation wird der Farbstoff von der Zelle abgestoßen, was zu einer Abnahme der Fluoreszenzintensität führt.

Die Sensitivität solcher Farbstoffe ist sehr hoch und beträgt 0,9-1,1% der Signaländerung pro 1mV der Potentialänderung. Ein Nachteil von solchen Farbstoffen ist oft eine hohe Toxizität, besonders bei den Carbocyaninen [112, 134].

Die Änderung des Membranpotentials kann durch Manipulationen wie der Zugabe eines Transportmoleküls (z.B. Valinomycin: Kaliumionen selektiver Ionophor), einer Kaliumlösung höherer Konzentration oder elektrischer Stimulation erfolgen. Die Wechselwirkung zwischen anionischen Oxonolen und dem kationischen Ionophor Gramicidin wird für die Kalibration der potentiometrischen Antwort verwendet. Das genaue Protokoll zum Erstellen einer Kalibrierungskurve ist ausführlich in Kapitel 3.9.2 beschrieben.

## 2.4.4 Prüfstandfunktion des Glas-Sensorchips: Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate

Zellen reagieren als empfindliche Mikrosysteme auf verschiedene Signale aus ihrer Umgebung. Sie können in Form von Synthese von bestimmten Proteinen, Aktivierung von Ionenpumpen und Kanalproteinen, Zellteilung oder Zelltod auf externe Signale antworten. In dieser Arbeit wurden die Einflüsse von extern applizierten elektrischen Feldern auf den Zellmetabolismus bzw. das Teilungsverhalten untersucht. Extrazelluläre und intrazelluläre Eingangssignale wie Wachstumsfaktoren, Hormone, Zell-Zell-Interaktionen oder elektrische Signale können eine Reihe von intrazellulären Signalkaskaden auslösen, die eine große Komplexität aufweisen [25]. In unten stehender Abbildung 2-27 sind verschiedene Signalveränderungsmechanismen an einer Zelle erfasst. Man betrachtet die verwendeten Zellen als „Black Box“ und beobachtet nur die Eingangs- und die Ausgangssignale. Wenn eine Zelle einem Eingangssignal ausgesetzt wird, generieren die zellinternen Signalstrukturen eine Antwort. Neben anderen Signalkaskaden spielt der Ionenaustausch zwischen intra- und extrazellulärem Raum eine wichtige Rolle. Abbildung 2-27 zeigt eine vereinfachte Zusammenfassung der Mechanismen der Signalveränderung und deren Dynamik. Die Dynamik der Signalveränderungen kann mit verschiedenen Sensoren (z.B. pO<sub>2</sub>-, pH-, Impedanz- und Temperatursensoren) erfasst werden.

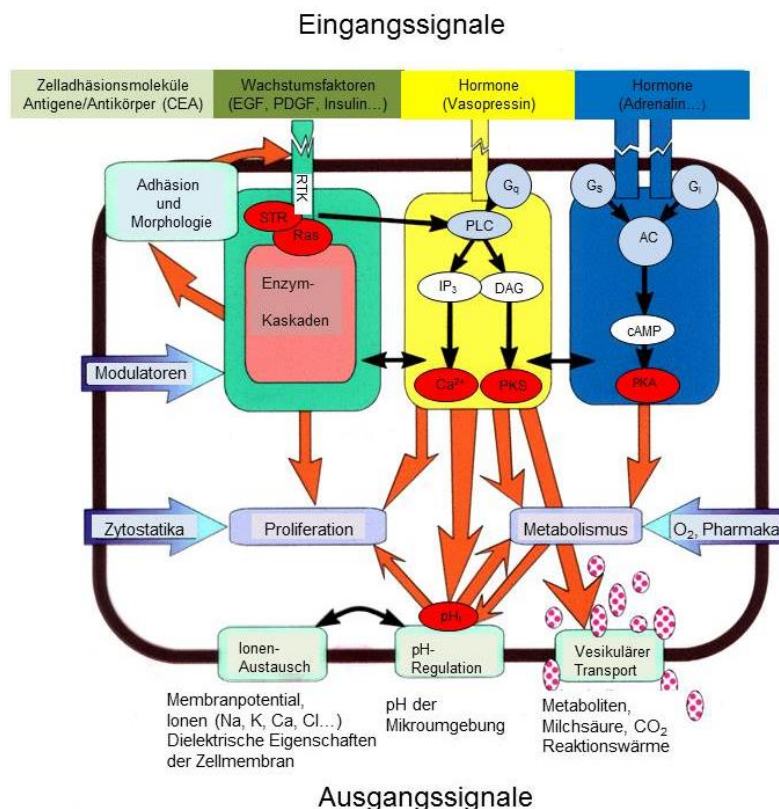


Abbildung 2-27: Eingangs- und Ausgangssignale lebender Zellen. Man betrachtet die verwendeten Zellen als „Black Box“ und beobachtet nur die Eingangs- und die Ausgangssignale. Durch die oxydative Phosphorylierung wird der Sauerstoff von den Zellen verbraucht. Zusätzlich wird durch die mitochondriale Aktivität CO<sub>2</sub> erzeugt und Laktat durch die Glykolyse gebildet. Diese Prozesse sind proportional zur intrazellulär verbrauchten Energie. Die sensorbasierte Messung ermöglicht es, die in einer Zelle ablaufenden Mechanismen zu erfassen. Durch diese Messung der Veränderungen des O<sub>2</sub>-Gehalts und des pH-Werts des extrazellulären Mediums können Rückschlüsse auf die mitochondriale und glykolytische Zellaktivität gezogen werden [25].

Die sensorbasierte Messung ermöglicht es, die in einer Zelle ablaufenden Mechanismen zu erfassen. Durch die oxydative Phosphorylierung wird der Sauerstoff von den Zellen verbraucht. Zusätzlich wird durch die mitochondriale Aktivität  $\text{CO}_2$  erzeugt und Laktat durch die Glykolyse gebildet. Diese Prozesse sind proportional zur intrazellulär verbrauchten Energie. Auf Grund dieser Messungen (Metabolismus, Morphologie und Proliferation) können zelluläre Vitalitätsänderungen, die z.B. durch elektrische Felder hervorgerufen wurden, analysiert werden [25, 245].

#### 2.4.5 Modernes Screening-System: Intelligent Microplate Reader (IMR)

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der sogenannte Intelligent Microplate Reader (IMR) verwendet [29, 217, 230]. Der IMR ist ein System, das am HNLME in Kooperation mit der Industrie (HP Medizintechnik GmbH) entwickelt wurde (siehe Abbildung 2-28). Dieses System ermöglicht eine markerfreie Erfassung verschiedener physiologischer Merkmale von vitalen Zellen in Echtzeit.

Mit Hilfe von opto-chemischen Sensoren (Optroden) können die Funktionsparameter des Zellmetabolismus, wie der Sauerstoffverbrauch und die extrazelluläre Ansäuerung, gemessen werden. Die Impedanz wird über eine geeignete Elektrodenstruktur erfasst. Basierend auf diesen Messungen können Rückschlüsse auf das zelluläre Wachstum, die morphologische Änderung sowie die elektrische Aktivität im Zellverbund geschlossen werden.

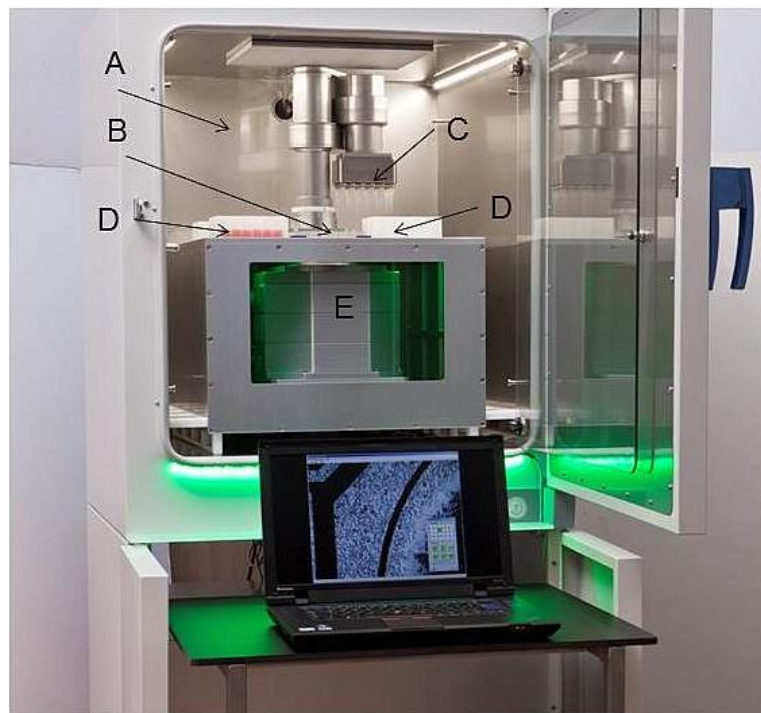


Abbildung 2-28: Der Intelligent Microplate Reader befindet sich in einem Zellkulturinkubator (A); Der Pipettierroboter (C) wechselt das Medium in den einzelnen Wells einer sensorbestückten Multiwellplatte (B) in definierten Zeitabständen aus. Das Medium stellt man in Vorrats- und Abfallgefäßen bereit (D). Das IMR-System beinhaltet ein inverses unter der Probe verfahrbares Mikroskop (E). Abbildung (modifiziert): Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik und HP Medizintechnik GmbH [4, 14].



Der Verlauf des Experimentes ist kontrollierbar und eventuelle Änderungen im Ablauf sind möglich. Dadurch bietet dieses System eine Datenauswertung in Echtzeit und stellt viele Anwendungsmöglichkeiten im Bereich der medizinischen und pharmazeutischen Forschung und Entwicklung zur Verfügung.

### **Sensorbestückte Multiwellplatte**

Die Zellkulturen werden in sensorbestückten Multiwellplatten kultiviert und über einen Pipettierroboter versorgt. Diese bestehen aus 24 beziehungsweise 96 einzelnen Wells, die sich jeweils aus drei miteinander verbundenen Kammern zusammensetzen. In dieser Arbeit wurden Multiwellplatten mit 24 Wells verwendet (siehe Abbildung 2-29). Die einzelnen Messkammern werden durch zwei Seitenkammern versorgt. Diese sind so ausgelegt, dass das Medium aufgrund hydrostatischer Druckunterschiede von der Einlasskammer zur Auslasskammer durch die Hauptkammer (Versorgung der Zellkultur) fließt. Die Versorgungs- und Abfallsmedien werden in Vorrats-Gefäßen gelagert.

Den Boden der Multiwellplatte bildet eine sensorbestückte Glasplatte, auf der die Zellen kultiviert werden. Über die Sensoren werden die metabolischen Parameter in Echtzeit erfasst. Die elektrische Impedanz wird elektro-chemisch über die interdigitalen Elektroden-Strukturen (IDES) bestimmt. Für die Weiterleitung der Impedanzwerte ist eine elektrische Kontaktierung an der Längsseite der Platten vorhanden.

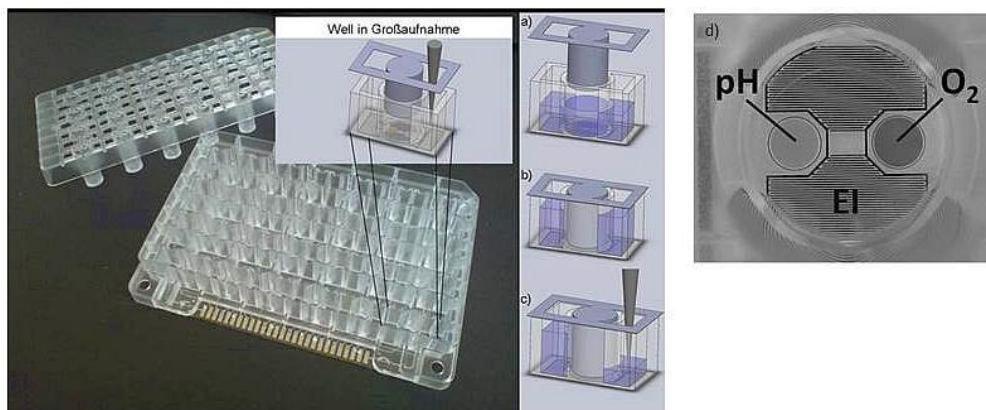


Abbildung 2-29: Multiwellplatte mit 24 Wells für die Zell- und Gewebekultur für das IMR-System und Glassubstrat mit Elektroden-Kontakten. Oben : Deckel der Platte mit Verdrängungskörpern. Ein Well der Multiwellplatte mit Einlass- und Auslasskammern mit Medium aufgefüllt (a); Aufgesetzter Deckel mit Verdrängungskörper, der ein Mikrovolumen von 23 µl gewährleistet (b); Die Seitenkammern sind mit Mittelkammer durch Mikrokanäle verbunden, was einen Medienaustausch ermöglicht (c); Layout eines Wells mit optochemischen Sensoren und IDES (d), über die die Zellen elektrisch stimuliert werden können. Entnommen aus [230].

Um eine ausreichende Sensitivität der Messungen zu gewährleisten, werden die Zellen in einem Mikroreaktionsvolumen (23µl) kultiviert. Das verbrauchte Messmedium wird alle 20min über den Pipettierroboter ausgetauscht. [230]

Die Sauerstoffverbrauchs- und Ansäuerungsrate sind Indikatoren für den Stoffwechsel. Die verwendeten Sensoren enthalten spezielle Farbstoffe, deren Fluoreszenzeigenschaften umgebungsabhängig sind. Auf opto-chemischer Basis ermittelt man eine Phasenverschiebung zwischen dem Anregungs- (von dem Gerät ausgesendeten Lichtsignal)

und Fluoreszenzsignal (von den Sensoren emittierten Signal) [174, 175]. Die optochemischen Sensoren werden auf die Glasplatte aufgetragen. Sie werden nicht von den Zellen bewachsen.

### **Berechnung der metabolischen Raten**

Durch die zelluläre metabolische Aktivität wird gelöster Sauerstoff aus dem Umgebungsmedium verbraucht und saure Stoffwechselprodukte werden an das Medium abgegeben. Letzteres führt zur Ansäuerung des Mediums. Zwischen den Pipettierzyklen nehmen die Sauerstoffkonzentration und der pH-Wert folglich ab. Wird das verbrauchte Medium im Mikrovolumen durch frisches Medium ausgetauscht, kehren die pH- und  $pO_2$ -Werte auf das Startniveau zurück [230]. Der Sauerstoffverbrauch wird in %/min und die Ansäuerungsrate in  $-pH/min$  angegeben. Abbildung 2-30 schildert das Prinzip der Ratenberechnung für den Sauerstoffverbrauch.

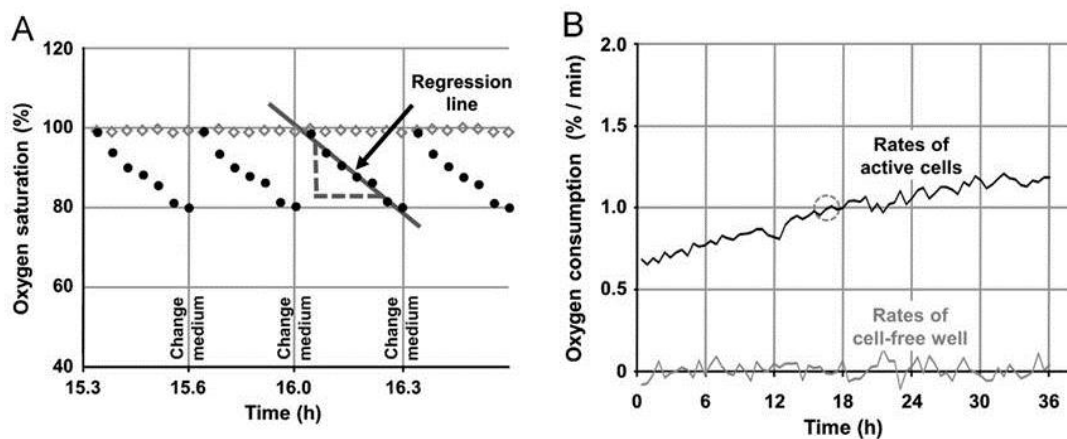


Abbildung 2-30: Berechnung der Sauerstoffverbrauchsrate von Zellen: Für jedes Well wird aus den gemessenen Rohdaten die Steigung zwischen den Pipettierzyklen berechnet (A). Die Sauerstoffverbrauchsrate werden für alle Zyklen berechnet und über die Zeit aufgetragen (B). Entnommen aus [230].

### **Mikroskop**

Das IMR-System beinhaltet ein inverses, unter der Probe verfahrbares Mikroskop (iMIC Digital Microscope, Till Photonics). Dieses ermöglicht die Messung der pH- und  $pO_2$ -Konzentrationen und die Bildgebung der biologischen Proben. Zusätzlich können auch weitere Fluoreszenzmessungen wie z.B. die Membranpotential-Messung gemacht werden. Das Mikroskop befindet sich auf einem xy-Verfahrtisch und verfügt über drei Freiheitsgrade. Es kann in jeder Richtung mit einer Auflösung von  $1\mu m$  beliebig unter den Proben positioniert werden (siehe Abbildung 2-31).

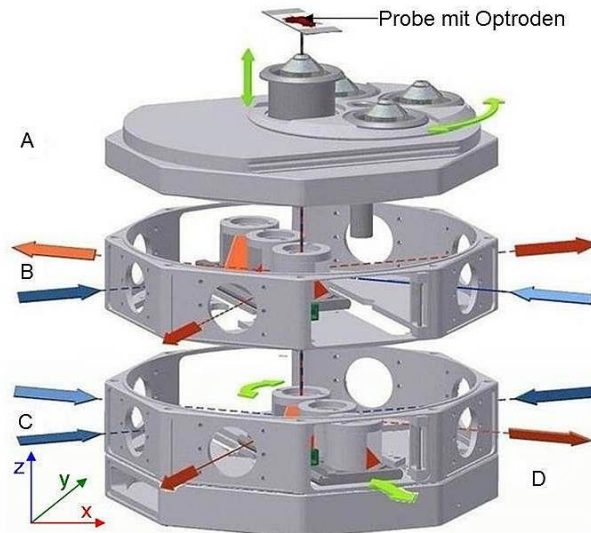


Abbildung 2-31: Mikroskop (ohne Kamera). Nutzungsmöglichkeiten sind die Messung der Optroden durch ein externes Messgerät und als weitere Option die Fluoreszenzmessung [3].

Das Mikroskop ist in 4 Ebenen aufgeteilt. In der Mitte des Aufbaus befindet sich die optische Achse, in die durch Filterschieber eingegriffen werden kann. In der obersten Objektivenebene A befindet sich Platz für vier Objektive. Auf der von oben gesehenen zweiten Ebene B, der Filterebene, befindet sich im Inneren des Mikroskops ein Filterschieber, der drei verschiedene Fluoreszenzfilterblöcke, Farbfilter oder Umlenkspiegel zur Einkopplung externer optischer Systeme aufnehmen kann. Dies ist in Abbildung 2-31 schematisch dargestellt, in dem Modell links wird der Strahl (Rot) ohne Ablenkung nach unten durchgeleitet und er trifft auf die Kamera. Auf diese Weise wird eine Durchlichtaufnahme (Standard) erzeugt. Für Durchlichtaufnahmen wird kein extra Filter benötigt, aber der Filterplatz muss frei bleiben. Im mittleren Fall (blau) wird der Strahl auf die mittlere Position in der ersten Ebene abgelenkt. Hier wird das Einkanal- Messgerät für die pH- und  $pO_2$ -Messung angeschlossen. Auf der rechten Position kann als Option ein Fluoreszenzfilterblock angebracht werden. In der dritten Ebene C ist die Kamera zur Aufnahme der Bilddaten angebracht. Sie befindet sich an der Rückseite des Mikroskops und bietet eine maximale Auflösung von  $1388 \times 1038$  Pixel, bei einer maximalen Wiederholrate von 30 Bildern / Sekunde. Die Bilder und Videos werden in den gängigen Kompressionsformaten JPEG und *Audio Video Interleave* (AVI) gespeichert. Die vierte Ebene ist die Steuerungsebene D, in der sich die Elektronik für das Mikroskop befindet. Als Beleuchtungsquelle für die Durchlichtaufnahmen dient ein diffuser LED-Flächenstrahler, der an der Decke des Inkubators angebracht ist und weißes Licht emittiert. Zur Verfügung gestellt von [3, 14].

Die folgenden Abbildungen (siehe Abbildung 2-32 und Abbildung 2-33) zeigen mögliche Anwendungsbeispiele des iMIC Digital Mikroskops. Abbildung 2-32 zeigt eine Durchlichtaufnahmen von Mausfibroblasten, aufgenommen mit einem iMIC Digital Mikroskop.



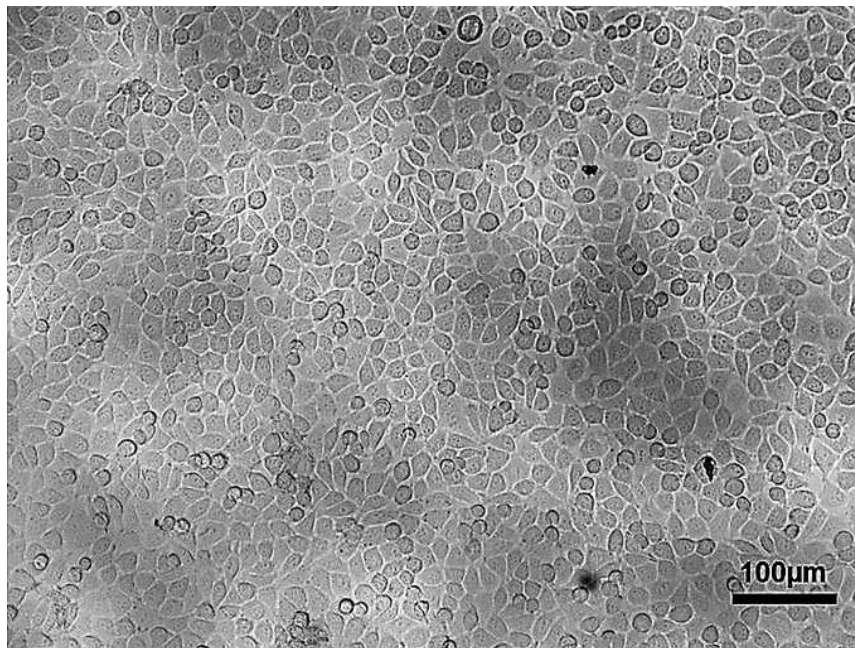


Abbildung 2-32: Mausfibroblasten (L929 Zellen), Monolayer. Durchlichtaufnahme. (Aufgenommen mit einem iMIC Digital Mikroskop, Objektivvergrößerung 10x).

Abbildung 2-33 zeigt eine Fluoreszenzaufnahme von Tumorzellen. Die Zellen sind mit einem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff für die Membranpotentialmessung DiBAC<sub>4</sub>(3) markiert.

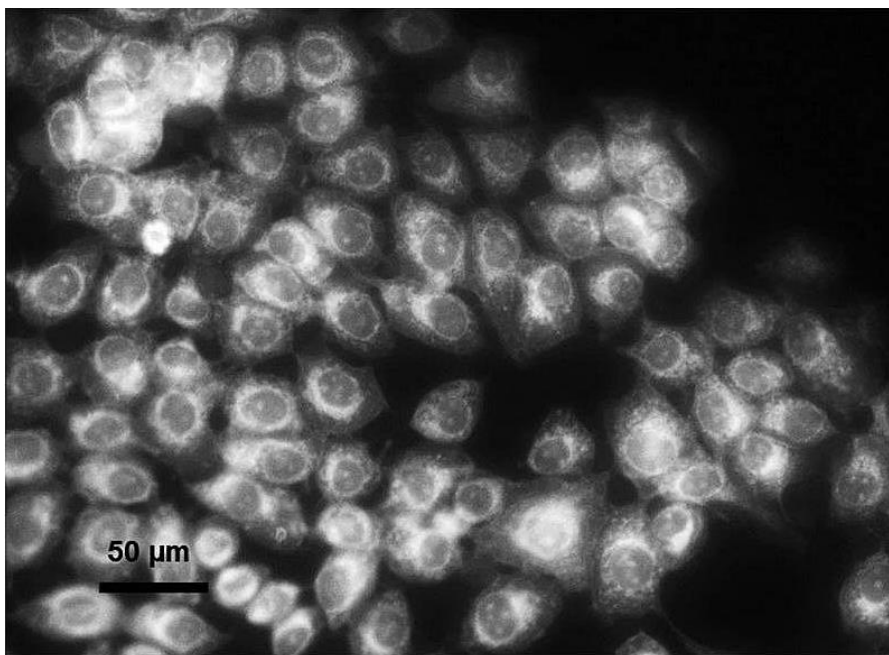


Abbildung 2-33: Fluoreszenzaufnahme von Tumorzellen (MCF-7 Zellen). Zellen sind mit einem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff für die Membranpotentialmessung DiBAC<sub>4</sub>(3) markiert. Aufgenommen mit einem iMIC Digital Mikroskop, Objektivvergrößerung 20x.

Neben dem IMR gibt es auf dem Markt eine Reihe von weiteren Messgeräten, die als Screening-Systeme für lebende Zellen bzw. für metabolische Messungen verwendet werden können [10, 12, 13, 21]. Solche Systeme finden ihre Hauptanwendung in der Chemosensitivitätstestung, dem Umweltmonitoring, der Pharmakologie usw.

## 2.5 Stand der Forschung zur Elektrostimulation von Tumorzellen

Verschiedene Labor- und klinische Untersuchungen zeigen einen großen Einfluss von elektrischen Feldern auf die lebende Organismen bzw. Zellen [26, 42, 52, 61, 71, 76, 77, 119, 120, 132, 135, 214, 219]. Als alternative Behandlungsmethode zu etablierten Tumorthérapien fand die Stimulation der Tumorzellen durch elektrische Felder in den letzten Jahren eine immer stärkere Beachtung. Diese Felder haben einen Einfluss auf Prozesse wie Zelladhäsion, Migration, Zelldifferenzierung, Zellproliferation und Wundheilung [23, 54, 55, 76, 77, 82, 114, 171, 179, 221]. Unter bestimmten Bedingungen ist ein Einsatz der elektrischen Stimulation in verschiedenen Gebieten der Medizin, vorrangig in der Onkologie, denkbar.

In dieser Hinsicht gewinnt die Frage, wie biologische Systeme bzw. Zellen von elektrischen Feldern zu beeinflussen sind, immer mehr Gewicht. Von zentraler Bedeutung sind hier die möglichen Wirkungsmechanismen auf zellulärer Ebene, die in Abbildung 2-34 erfasst sind.

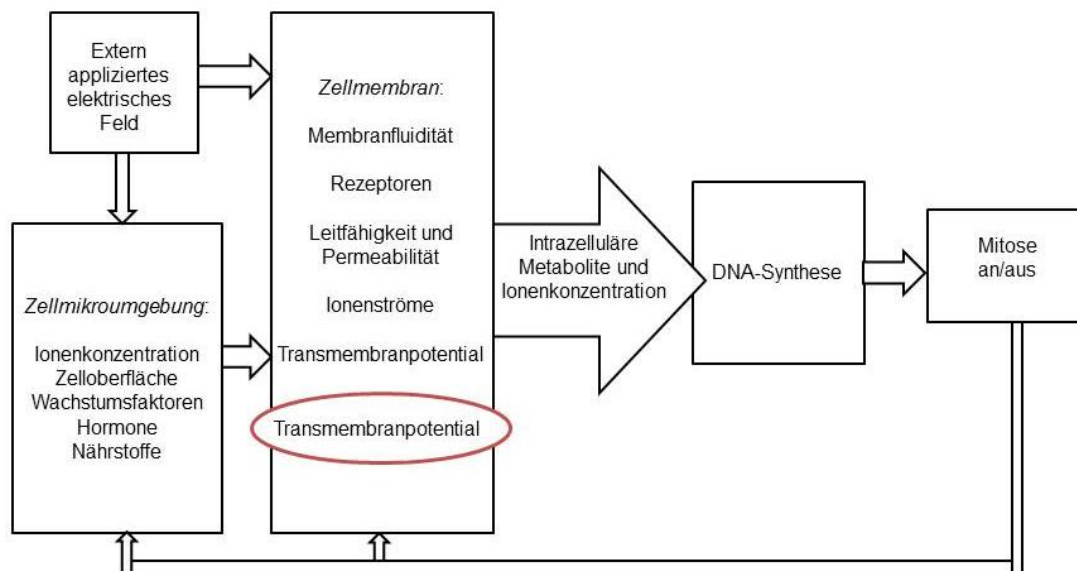


Abbildung 2-34: Ein Überblick von möglichen biologischen Effekten auf eine Zelle, die durch ein extern appliziertes elektrisches Feld hervorgerufen werden können (entnommen aus [220]). Ein extern appliziertes elektrisches Feld kann sowohl die Zellmembran als auch das Milieu der Zellmikroumgebung beeinflussen. Dadurch kann die Mitose beeinflusst werden.

Ein extern appliziertes elektrisches Feld kann zum einen die Zellmikroumgebung beeinflussen und sich dadurch auf die Ionenkonzentration, die Zelloberfläche, die Wachstumsfaktoren, die Hormone und die Nährstoffe auswirken. Gleichzeitig kann ein extern appliziertes elektrisches Feld auf die Zellmembran wirken und dadurch zur Änderung der Membranfluidität, der Rezeptoren, der Leitfähigkeit, der Permeabilität, des Ionenstroms und des Transmembranpotentials führen. Zusätzlich kann die durch ein externes elektrisches Feld geänderte Zellmikroumgebung Änderungen an der Zellmembran hervorrufen. All diese Faktoren können zur Änderung der Ionenkonzentration und zur Aktivierung bzw. Hemmung der intrazellulären Metaboliten führen, wodurch sich die DNA-Synthese lenken lässt und Einflüsse auf die Mitose genommen werden können. Dadurch wird die Zellproliferation beeinflusst bzw. beeinträchtigt. Die geänderte Mitose kann wiederum einen Einfluss auf die Zellmikroumgebung und die Zellmembran haben. Die Erforschung des Zusammenhangs zwischen den Änderungen des Membranpotentials, welche durch extern angelegte

elektrische Felder verursacht werden, und einer Proliferationshemmung steht im Vordergrund dieser Arbeit. Abbildung 2-34 schildert die Komplexität und die Synergetik der ablaufenden Prozesse, die sich schwer voneinander trennen lassen.

So kann ein extern appliziertes elektrisches Feld die Zellmigration beeinflussen. Unter Einfluss von elektrischen Feldstärken im Bereich von 0,1V/m bis 10V/m bewegen sich Zellen wie Neuralleistenzellen, Fibroblasten, Keratozyten, Chondrozyten, Prostatakrebszellen und einige Epithelzellen zur Kathode [77, 148, 157, 180, 186, 238]. Im Gegensatz dazu bewegen sich Zellen wie z.B. Hornhautendothelzellen, Rinderlinsenepithel oder menschliche Gefäß-Endothelzellen zur Anode. Die Geschwindigkeit und die Richtung der Bewegung sind von den Stimulationsparametern (Spannungsamplitude, Frequenz) abhängig [76].

Weiterhin kann ein elektrisches Feld die Zelle verformen [77, 100, 108]. Diese orientiert sich orthogonal zur Feldrichtung. Dadurch werden verschiedene Membranrezeptoren, Ionenkanäle und andere Moleküle beeinflusst. Eine mögliche Erklärung dafür ist die adhäsive Interaktion zwischen ECM Proteinen und Transmembranrezeptoren wie Integrin [58, 77, 78]. Unter Einfluss von elektrischen Feldern (bis zu 5V/cm) orientieren sich die Mikrotubuli in Mausfibroblasten (3T3) orthogonal zum Feld [96].

Ein elektrisches Feld kann auch die Wundheilung verbessern, wenn es mit einer Kathode über der Wunde generiert wird. Die Zellen migrieren durch den Einfluss des Feldes in Richtung des dermalen Wundbetts [77, 159, 159]. Chifflet et. al. zeigten einen Zusammenhang zwischen der Membrandepolarisation und dem Zytoskelett einer Epithelzelle bei Wundheilung [46, 77].

Ebenso hat ein elektrisches Feld Einfluss auf die intrazelluläre Signalkaskade. Es beeinflusst die intrazelluläre Kalziumkonzentration. So führt die Applikation von hohen elektrischen Feldern (14V/cm) zu einer kurzfristigen Erhöhung von intrazellulärem Kalzium (ca. 17s) [77]. Im Gegensatz dazu zeigen z.B. Osteoblasten eine Membranpotentialänderung und Änderung der intrazellulären pH-Werts unter Einfluss von sowohl hohen (14V/cm) als auch niedrigen (5V/cm) Feldstärken. Diese Beobachtung spricht dafür, dass die Zellmigration eher durch  $K^+$  und  $H^+$  bedingt ist [69, 77].

Weiterhin haben die Gap Junctions einen Einfluss auf die Signalübertragung. In vielen Zellgeweben sind die Zellen unter Anderem auch durch die Gap Junctions elektrisch gekoppelt. Dadurch wird die effektive elektrische Zellgröße erhöht und die Wahrnehmungsschwelle herabgesetzt. Die Membranen von benachbarten Zellen bilden eine Art Kopf-Kopf-Kontakt [121]. Gap Junctions spielen eine wichtige Rolle in der Zellwachstumskontrolle. Ein elektrischer Strom kann über eine Mikroelektrode in die Zelle geleitet werden. Dabei kann man die Änderung des Transmembranpotentials messen. Diese Änderung wird auch an benachbarten Zellen registriert. Die Arbeitsgruppe von Loewenstein zeigte, dass nicht nur Ionen, sondern auch größere Moleküle mit einer Molekülmasse von bis zu 1kDA von einer Zelle zu einer anderen wandern können [32, 142]. So können Second-Messenger wie Serotonin unter Einfluss von elektrischen Feldern durch die Gap Junctions transportiert werden und zum Aufbau eines chemischen Gradienten führen. Solche spannungssensitiven Transportmoleküle dienen als Aktivierungstrigger von anderen Signalkaskaden, wodurch das Zellmembranpotential geändert werden kann [18, 77, 135]. Viele Arbeitsgruppen zeigten eine reduzierte Anzahl oder veränderte Struktur von Gap Junctions in Tumorzellen [32, 109, 158, 170, 225].

Einige Forschungsarbeiten zeigen eine inhibitorische Wirkung von elektrischen Feldern auf die Proliferation von Tumorzellen. Bekannt ist, dass elektrische Felder mit bestimmten Frequenzen die Teilung von Tumorzellen sowohl in vivo als auch in vitro verzögern können [61, 64, 114, 241]. So beschrieb die Arbeitsgruppe von Wang einen proliferationshemmenden Effekt auf Endothelzellen und Linsenepithelzellen von einem

elektrischen Feld (2V/cm) konstanter Spannung, wobei die Zellen in eine G1/S Phase übergangen und eine Abnahme der E Zyklin Expression aufwiesen [221]. Die elektrische Stimulation von Mausfibroblasten (L929) mit harmonischen Feldern (ab 1V/cm, f unter 1kHz) zeigte ebenso eine Wachstumshemmung [89]. Niedrige Frequenzen ( $f \leq 1\text{kHz}$ ) können Teile der Membran depolarisieren und somit zu einer Schädigung der Zelle führen [119]. Speziell die Ionenkanäle reagieren hierbei empfindlich auf das E-Feld [54]. Es wurde auch die Proliferationshemmung bei Tumorzellen unter elektrischer Stimulation (2V/cm, 100-300kHz) beschrieben [239]. Innerhalb der spannungsgesteuerten Ionenkanäle reagieren bestimmte Moleküle auf Veränderungen im elektrischen Feld in der Zelle [30]. Ein veränderter Ionenfluss kann wiederum Auswirkungen auf das Membranpotential und damit das Teilungsverhalten der Zellen haben [32].

Weiterhin kann eine einzelne Zelle aufgrund von verschiedenen Proteinen und Glykolipiden (Glykokalix), die in die Membran integriert sind, unterschiedlich auf ein elektrisches Feld reagieren [77, 118].

Wie oben beschrieben, besteht eine Zelle aus verschiedenen Ionen, polaren Molekülen, Membranen und diversen Organellen. Ein gepulstes elektrisches Feld übt eine Kraft auf die Ionen und polaren Moleküle aus und bewegt sie in Richtung höherer Feldintensität. Dieses Feld und der resultierende Strom können die Zellen (z. B. Muskel-, Nervenzellen) dadurch beeinflussen. Nur sehr hohe elektrische Felder können zur Hitzeentwicklung führen und dadurch die Zelle beschädigen [27, 120, 173]. Unter Einfluss eines harmonischen elektrischen Feldes oszillieren Ionen und polare Moleküle der Frequenz entsprechend in diesem Feld [120]. Einige Studien zeigen keinen signifikanten biologischen Effekt eines harmonischen elektrischen Feldes auf Zellen in einem Frequenzbereich über 100kHz [120, 173]. Im Gegensatz dazu beschreiben andere Studien einen signifikanten Effekt eines harmonischen elektrischen Feldes auf die Zellteilung im Frequenzbereich von 100kHz bis 1MHz [119, 120].

Regenerationsmodelle, die durch elektrische Felder aktiviert werden, beinhalten verschiedene Molekularprozesse. Das erschwert eine genaue Aussage über die zuständigen Vermittlungsmechanismen von solchen elektrischen Feldern. Es könnten auch Überlagerungen von mehreren Prozessen sein. Häufig zeigen verschiedene Arbeitsgruppen widersprüchliche Ergebnisse [70, 89, 117].

### **3 MATERIALIEN UND METHODEN**

#### **3.1 Chemikalien und Lösungen**

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien sind in der Tabelle 6-1 zusammengefasst (siehe Anhang A, Kapitel 6.1.1).

#### **3.2 Zusammensetzung der angewendeten Medien**

Die verwendeten Medien sind in Anhang A zusammengefasst (siehe Anhang A, Kapitel 6.1.2).

#### **3.3 Geräte**

Die in der Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 6-3 präsentiert (siehe Anhang A, Kapitel 6.1.3).

#### **3.4 Software**

Die verwendete Software ist in Tabelle 6-4 zusammengefasst (siehe Anhang A).

#### **3.5 Zellbiologische Methoden**

##### **3.5.1 Zellkultur**

###### Humane Mammakarzinomzellen (MCF-7, MDA-MB-231):

Die adhärenente MCF-7 Zelllinie eignet sich für Brustkrebsstudien, da sich darin einige Eigenschaften des Brustepithels erhalten haben (siehe Abbildung 3-1). Die Zelllinie stammt von einer 69-jährigen kaukasischen Frau. Die Zellen sind beispielsweise Estrogen sensitiv und wenig invasiv. Sie stammen aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), ACC 115 [1].

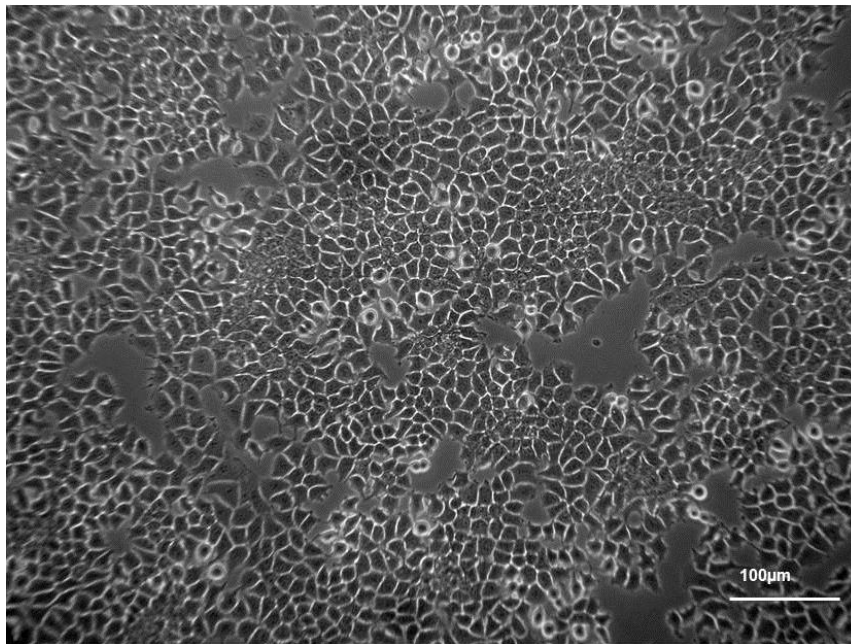


Abbildung 3-1: Durchlichtaufnahme von MCF-7 Zellen, adhärenente Monolayerkultur. Die Zellen wurden routinemäßig in Kulturmedium kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 10% CO<sub>2</sub>-Begasung.

Die adhärenenten MDA-MB-231 Zellen weisen eine spindelförmige Form auf und sind morphologisch den Epithelzellen ähnlich (siehe Abbildung 3-2). Im Gegensatz zu den MCF-7 Zellen besitzen die MDA-MB-231 Zellen keinen Estrogen-Rezeptor und sind bzgl. ihres Phänotyps hoch aggressiv [1].

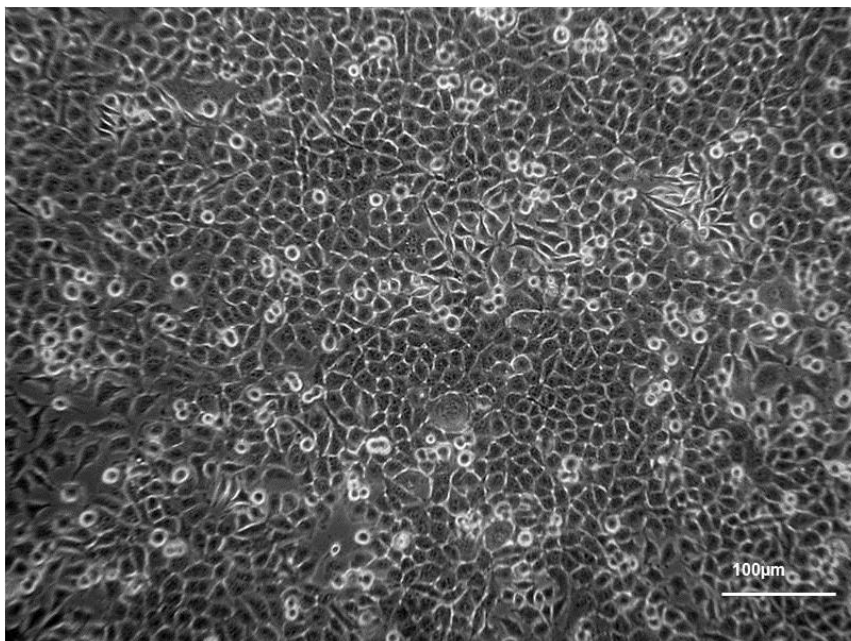


Abbildung 3-2: Durchlichtaufnahme von MDA-MB-231 Zellen, adhärenente Monolayerkultur. Die Zellen wurden routinemäßig in Kulturmedium kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 10% CO<sub>2</sub>-Begasung.

Die Zellen wurden routinemäßig in Kulturmedium kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 10% CO<sub>2</sub>-Begasung (Standard Randbedingungen).

Durch eine regelmäßige Passage können die Zellen länger kultiviert werden. Alle 7 Tage wurden die Zellen in neue 25mm<sup>2</sup> Kulturflaschen passagiert. Zur Ablösung der Zellen vom Untergrund gab man nach dem Absaugen des alten Mediums 1ml Accutase zum Vorwaschen und anschließend erneut 1ml Accutase hinzu. Dann inkubierte man die Zellen für 10 Minuten (Standard Randbedingungen). Dadurch wurden die Zell-Matrix-Verbindungen gelöst und die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert in einer Neubauer Zählkammer gezählt. Danach säht man sie in der gewünschten Konzentration in neuen Kulturflaschen in DMEM unter Zugabe von 5% FCS aus [209].

### 3.5.2 Zellzählung

Für die Reproduzierbarkeit von Messungen ist es wichtig, dass die ausgesäten Zellzahlen möglichst geringen Schwankungen unterliegen. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden aus einer Zellsuspension 10µl entnommen und die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer oder eines elektronischen Zellzähler (TC10<sup>TM</sup> Automated Cell Counter, Biorad, [33]) ermittelt. In dieser Arbeit verwendete man beide Methoden.

Zur Zellzahlbestimmung im Rahmen der Zellpassage verwendete man eine Neubauer-Zählkammer. Bei der elektrischen Stimulation und dem Resazurin-Test wurde die Zellzahl mit einem elektronischen Zellzähler bestimmt.

### 3.5.3 Resazurintest

Resazurin (7-hydroxy-10-oxido-phenoxazin-10-ium-3-one) ist ein blauer Farbstoff, welcher als Indikator der pH-Wert-Änderung und bei Redoxreaktionen eingesetzt wird. Resazurin dient der Messung der Zellviabilität und der metabolischen Aktivität, da der Farbstoff durch die mitochondriale Atmung kontinuierlich zu Resorufin umgewandelt wird. Mit Hilfe des Resazurin-Tests kann auf die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenase und der Anwesenheit von NADH/H<sup>+</sup> über die Umsetzung des Resazurins zu einem fluoreszierenden Produkt Resorufin geschlossen werden. Dies führt zu einem Farbumschlag von blau nach pink und kann fluorimetrisch gemessen werden (Fluorescence Microplate Reader FLUOstar Galaxy, [35] siehe Abbildung 3-3).



Abbildung 3-3: FLUOstar Galaxy, ein Fluoreszenz Microplate Reader zur Messung der Fluoreszenz-Intensität (z. B. im Resazurin-Assay), Firma BMG LABTECH (entnommen aus [35]).



Für die elektrische Stimulation mittels kapazitiver Feldeinspeisung wurde zur Bestimmung des Metabolismus eine wässrige Resazurinlösung (1g/l) verwendet. Dabei wurden 60µl Resazurin zu 3ml Kulturmedium in jedes Well einer 6-Well-Platte hinzugegeben. Nach 2h Inkubation wurde über eine Fluoreszenzmessung (Anregungswellenlänge 540nm, Emissionswellenlänge 590nm) die metabolische Aktivität der Zellen bestimmt. Zur Datenanalyse wurden die Referenzwerte von zellfreiem Medium von den Mittelwerten der behandelten Gruppen abgezogen.

Weiterhin wurde der Microplate Reader zur Messung des Membranpotentials an MCF-7 Zellen unter Variationen der extrazellulären pH-Werte verwendet.

## 3.6 Elektroden zur elektrischen Stimulation der Zellen

### 3.6.1 Glas-Sensorchip

Zur Messung des Membranpotentials während der elektrischen Stimulation der Zellen verwendete man Glas-Sensorchips in Dünnschichttechnologie. Diese wurden am HNLME gefertigt. Sie bestehen jeweils aus zwei Sauerstoffsensoren, pH-Metalloxid-Sensoren und Interdigitale Elektrodenstrukturen (IDES) aus Platin (siehe Abbildung 3-4). Die Abmessungen des Glas-Sensorchips betragen standardmäßig 24×33,8×0,5 mm. Mittels dieser Sensoren und Elektroden kann man Temperatur, pH-Wert, Gelöst-Sauerstoff und elektrochemische Impedanz messen. Zudem können die Elektroden zur elektrischen Stimulation der Zellen eingesetzt werden. In Blau ist die Fläche markiert, auf der die Zellen kultiviert werden. In Rot sind die Elektroden markiert, über die die Zellen elektrisch stimuliert wurden. Der mit Gelb markierte Bereich ist der Kontaktierungsbereich.

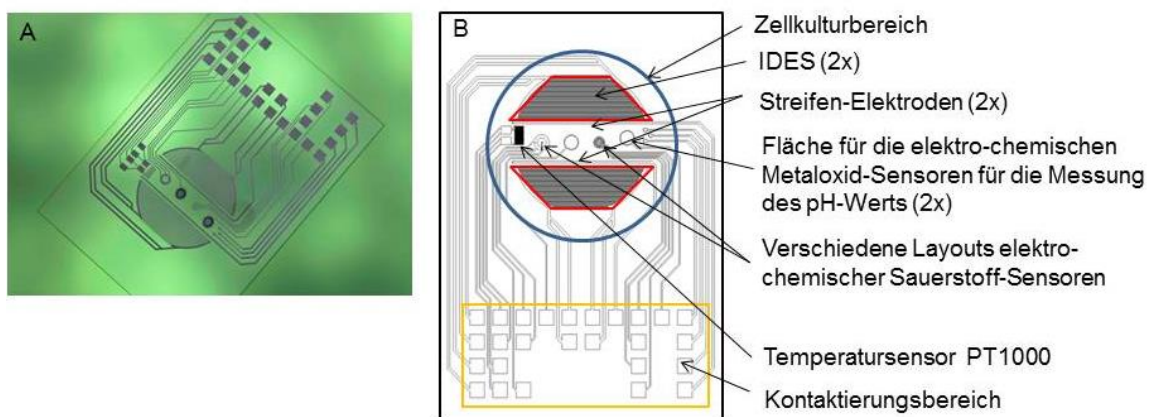


Abbildung 3-4: Multiparametrischer Glas-Sensorchip zur Messung des Membranpotentials während der elektrischen Stimulation von Zellen (A); Schematische Abbildung des Glas-Sensorchips (B). Der Glas-Sensorchip hat zwei Sauerstoffsensoren, zwei pH-Metalloxid-Sensoren und zwei Interdigitale Elektrodenstrukturen (IDES) aus Platin. In Blau ist die Fläche markiert, auf der die Zellen kultiviert werden. In Rot sind die Elektroden markiert, über die die Zellen elektrisch stimuliert wurden. Der mit Gelb markierte Bereich ist der Kontaktierungsbereich. [4]



### 3.6.2 Chronoamperometrie

Um die Elektrodenvorgänge an der Phasengrenze zwischen Elektrode und Elektrolyt zu untersuchen, wurden die elektrochemischen Methoden Chronoamperometrie und Impedanzspektroskopie verwendet.

Zum Abschätzen des Faraday'schen Stromanteils wurde in dieser Arbeit die Chronoamperometrie angewendet. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Relaxationsmethode, bei der ein Potentialsprung erzeugt und der sich ändernde Elektrolysestrom gemessen wird. Zuerst wird eine Ruhespannung von 0V an die Arbeitselektrode angelegt. Dadurch erfolgt kein Umsatz des Analyten. Durch einen Potentialsprung auf einen konstanten Wert beginnt ein elektrochemischer Strom zu fließen (Oxidation oder Reduktion an der Elektrodenoberfläche). Dieser hat unmittelbar nach dem Potentialsprung (Zeitpunkt  $t_0$ ) seinen maximalen Wert und fällt dann ab [91], siehe Abbildung 3-5.

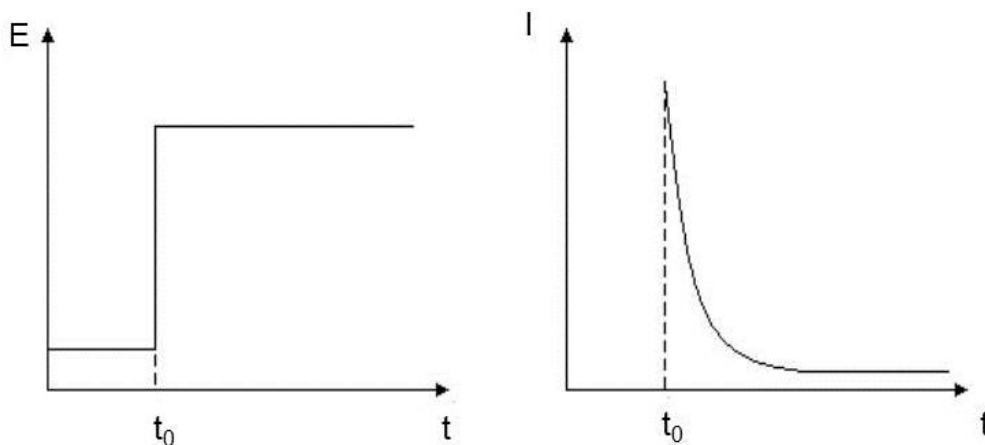


Abbildung 3-5: Chronoamperometrie: Potentialverlauf und resultierender Strom. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Relaxationsmethode, bei der ein Potentialsprung erzeugt und der sich ändernde Elektrolysestrom betrachtet wird. Zuerst wird eine Ruhespannung von 0V an die Arbeitselektrode angelegt. Dadurch erfolgt kein Umsatz des Analyten. Durch einen Potentialsprung auf einen konstanten Wert beginnt ein elektrochemischer Strom zu fließen (Oxidation oder Reduktion an der Elektrodenoberfläche). Dieser hat unmittelbar nach dem Potentialsprung (Zeitpunkt  $t_0$ ) seinen maximalen Wert und fällt dann ab [91].

Der zeitliche Stromdichteverlauf wird dabei durch die Cottrell-Gleichung beschrieben:

$$j = \frac{zF\sqrt{D}}{\sqrt{\pi t}} c \quad (3-1)$$

Mit  $j$ : Stromdichte; abhängig von Elektrodenfläche

$D$ : Diffusionskonstante

$z$ : Zahl der übertragenen Elektronen

$t$ : Zeit

$c$ : Ausgangskonzentration des umgesetzten Stoffes

$F$ : Faraday-Konstante (96,486 As/mol)

Die Diffusion der oxidierten und reduzierten Spezies erfolgt proportional zum steigenden Konzentrationsgradienten. Der Strom ist von der Stoffmenge, welche zur Elektrodenoberfläche diffundiert, abhängig [91].

Die elektrochemische Zelle baute man in den Versuchen mit 3 Elektroden auf: einer Messelektrode, einer Gegenelektrode und einer Referenzelektrode. Als Mess- und Gegenelektrode sind Platin-Elektroden vorgesehen (IDES).

Für diese Messung verwendete man den oben beschriebenen Glas-Sensorchip. Diese Glas-Sensorchips wurden dazu in einer Doppelwellkammer aus PEEK installiert und mittels eines Federkontaktsteckers kontaktiert (siehe Abbildung 3-6). Über die Federkontaktstifte legte man die Spannung an.

Die Messungen führte man sowohl mit unbewachsenen als auch mit Zellen bewachsenen Chips durch. Für die Bestimmung der bei einer angelegten Rechteckspannung auftretenden Stromdichte wurden sowohl die mit SU-8 Lack passivierten Glas-Sensorchips als auch die Glas-Sensorchips zur direkten Befeldung verwendet.

Um den Zellen das Anhaften zu erleichtern, behandelte man die Kulturfläche der Glas-Sensorchips vor der Aussaat der Zellen 30 Minuten mit FCS (400 $\mu$ l). Dadurch wird die Oberfläche des Chips hydrophiler. Für die Messung wurden  $2,0 \times 10^5$  MCF-7 Zellen ausgesät und für 24h vorinkubiert.

Als Medium verwendete man Kulturmedium (vorgewärmt auf 37°C) unter Zugabe von 25mM HEPES. Um die Umgebungstemperatur konstant auf 37°C zu halten und um mögliche Störströme zu vermeiden, fand der Versuch in einem Inkubator ohne CO<sub>2</sub>-Begasung statt. Der über die IDEs-Struktur (Elektrodenabstand  $d=50\mu\text{m}$ ) angelegte Impuls mit positiver Halbwelle hatte eine Periodendauer von 10ms bei einem Tastverhältnis von 1:15.

Zur Verhinderung (bzw. Minimierung) von irreversiblen Elektrolysereaktionen an der Übergangsgrenze Elektrode/Elektrolyt (Elektroden im Messmedium des Sensorchips ohne passivierte Elektroden) sind die angelegten Amplituden im Falle der direkte Stimulation nicht höher als 750mV.



Abbildung 3-6: Vorrichtung zur chronoamperometrischen Messung. Doppelwellkammer mit angeschlossenen Kontaktstecker: Die Wells sind mit DMEM + 5% FCS gefüllt (A); MCF-7 Zellen zwischen IDEs Strukturen auf Glas-Sensorchip (B). Die elektrochemische Zelle baute man in den Versuchen mit 3 Elektroden auf: einer Messelektrode, einer Gegenelektrode und einer Referenzelektrode. Als Mess- und Gegenelektrode wurden Platin-Elektroden verwendet (IDES). Die Glas-Sensorchips wurden in einer Doppelwellkammer aus PEEK installiert und mittels eines Federkontaktsteckers kontaktiert. Über die Federkontaktstifte legte man die Spannung an.

Die Messungen wurden mit einem Potentiostat PGZ 402 der Firma Volta Lab Instruments durchgeführt und die Messergebnisse als Stromdichteverlauf  $j(t)$  aufgezeichnet (siehe Abbildung 3-7).



Abbildung 3-7: Potentiostat PGZ 402, Firma Volta Lab Instruments. Der resultierende Stromdichteverlauf ist graphisch durch Volta Master 4 (Version 7.8.26338.3) aufgezeichnet worden (entnommen aus [9]).

### 3.6.3 Impedanzspektroskopie zur Untersuchung des frequenzabhängigen Verhaltens der Elektroden

Die Impedanzspektroskopie stellt eine erweiterte Methode zur Charakterisierung von elektrischen Eigenschaften leitendrn Stoffe und elektrochemischer Zellen dar. Dabei wird an den Ionenleiter eine Wechselspannung angelegt und aus der resultierenden Stromantwort der komplexe Wechselstromwiderstand (Impedanz) des Systems bestimmt.

Dadurch können Rückschlüsse über frequenzabhängige Leitungsvorgänge in einem System gezogen werden. An der Elektrodenoberfläche laufen dabei elektrische und chemische Prozesse wie Stofftransport (Diffusion, Konvektion), Elektronentransfer (Durchtrittsvorgang), Oberflächenreaktionen (Absorption, Kristallisation) und homogene oder heterogenkatalytische Reaktionen vor oder nach der Durchtrittsreaktion ab [91]. Eine wichtige Rolle spielen hier die Doppelschichtkapazität und der Polarisationswiderstand, die durch verschiedene Ladungstransportvorgänge im Medium und Oberflächeneffekten an Elektrodenmaterialien charakterisiert werden [84, 91].

Die elektrochemische Elektrodenimpedanz kann mit einem Randles Ersatzschaltbild beschrieben werden. Die Elektrode stellt sich als eine Reihe von RC-Gliedern dar, deren Impedanz sich während der Stimulation ändert. Diese Reihe von RC-Gliedern kann durch die Verwendung eines CPE zusammengefasst und dadurch über die gemessenen Spektren an das Ersatzschaltbild nach Randles angepasst werden [155]. Dieses Ersatzschaltbild ermöglicht es, reale Messergebnisse physikalischen Effekten zu zuordnen. Dabei ist der Durchtrittswiderstand  $R_D$  (Faraday'sche Widerstand) parallel mit der elektrochemischen Doppelschichtkapazität  $C_D$  geschaltet. Der Durchtrittswiderstand ist seriell mit der Warburg-Impedanz  $Z_W$  geschaltet. Das Ganze ist wiederum mit dem Elektrolytwiderstand  $R_E$  in Serie geschaltet (siehe Abbildung 3-8). Der relative Anteil der Doppelschicht-Impedanz an der Gesamtimpedanz ist frequenzabhängig und liegt in Serie zum Elektrolytwiderstand.

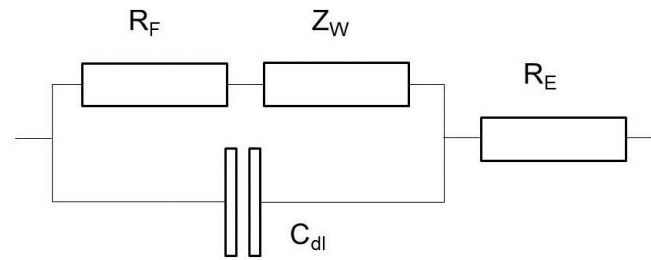


Abbildung 3-8: Die elektrochemische Elektrodenimpedanz kann mit einem Randles Ersatzschaltbild beschrieben werden. Dieses Ersatzschaltbild ermöglicht es, reale Messergebnisse physikalischen Effekten zuzuordnen. Dabei ist der Durchtrittswiderstand  $R_D$  (Faraday'scher Widerstand) parallel mit der elektrochemischen Doppelschichtkapazität  $C_D$  geschaltet. Der Durchtrittswiderstand ist zudem seriell zur Warburg-Impedanz  $Z_W$  geschaltet. Das Ganze ist wiederum mit dem Elektrolytwiderstand  $R_E$  in Serie geschaltet. Der relative Anteil der Doppelschicht-Impedanz an der Gesamtimpedanz ist frequenzabhängig und liegt in Serie zum Elektrolytwiderstand (entnommen aus [91]).

Bei der Messung des Impedanzspektrums wird jeweils eine Frequenz eingestellt, die entsprechende Impedanz gemessen und anschließend geht man zur nächsten Frequenz über. So erhält man für einen Satz von Frequenzen das Impedanzspektrum, das als Nyquist-Diagramm dargestellt wird. Im Folgenden ist der Nyquistplot des oben abgebildeten Ersatzschaltbildes gezeigt (siehe Abbildung 3-9).

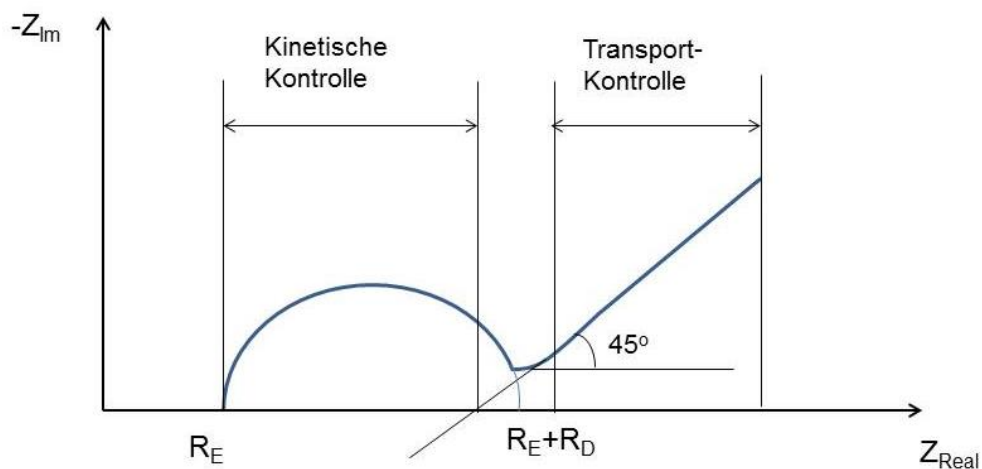


Abbildung 3-9. Nyquist-Diagramm eines Randles Ersatzschaltbildes:  $Z_{real}$ : Realteil der Impedanz;  $Z_{im}$ : Imaginärteil der Impedanz. Die Transportkontrolle ist mit dem Massentransport (Warburg Impedanz,  $Z_W$ ) und die kinetische Kontrolle mit Ladungstransfer über der Phasengrenze (Faraday'scher Widerstand  $R_D$ ) verbunden. Weitere Prozesse, die nicht mit Ladungstransfer in Zusammenhang stehen, spiegeln die elektrochemische Doppelschichtkapazität  $C_D$  wieder. Diese Prozesse erfolgen ohne Ladungstransfer über die Phasengrenze. Sie sind mit einer Auf- und Entladung der elektrochemischen Doppelschicht verbunden. Erstellt nach einer Vorlage aus [2, 143].

Die Elektrodenimpedanzen wurden mit dem Gerät Solartron 1260 [7] im Frequenzbereich 1 Hz bis  $10^6$  Hz gemessen. Für die Impedanzmessung verwendete man die Vier-Elektroden-Anordnung. Dabei wird die Messanordnung mit einem konstanten Anregerstrom durch die Stromelektrode (Current Carrying Elektroden) versorgt und die PU-Elektroden (Pick Up

Elektroden) messen annähernd stromlos die im Messmedium abfallenden Spannung. Der Messaufbau wird in Abbildung 3-10 dargestellt.

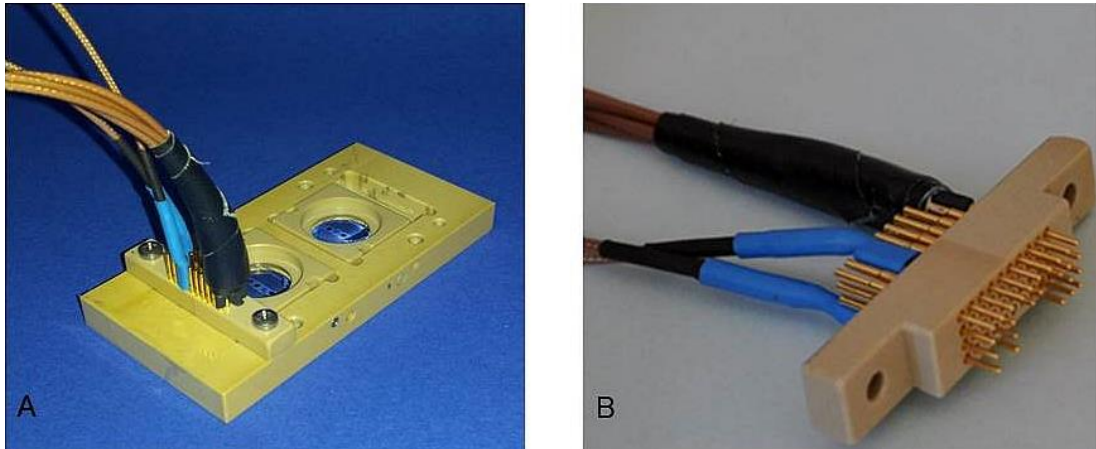


Abbildung 3-10. Vorrichtung zur Impedanzmessung; Doppelwellkammer mit Glas-Sensorchips mit an einer Seite angeschlossenen Kontaktstecker. Die Kultivierungsfläche ist mit DMEM+5% FCS gefüllt (A); Die Kontaktierung erfolgt über einen Federkontaktstecker, der am Impedanzmessgerät Solartron 1260 angeschlossen ist (B).

Zur Bestimmung der Elektrodenimpedanz wurden mehrere Messungen mit konstanter Amplitude (200mV, 500mV, 750mV) und einer kontinuierlichen Steigerung der Frequenz von 1Hz-10<sup>6</sup>Hz in Kulturmedium vorgenommen. Zur Fixierung diente die Doppelwellkammer. Es wurden eine Vergleichsmessung ohne Zellen sowie Messungen mit MCF-7 bewachsenen Glas-Sensorchips (direkte und kapazitive Befeldung) durchgeführt.

Die Zelldichte und Vorbehandlung der Glas-Sensorchips waren analog zu den chronoamperometrischen Messungen. Aufgrund der sehr kurzen Dauer (<1 min) der Messungen ist auf eine Temperierung mittels Inkubator verzichtet worden.

### 3.7 Modellierung der räumlichen Spannungs- und Feldverteilung

Für die Simulation des um eine Zelle auftretenden Spannungs- und Feldverlaufs bei Wechselspannungen durch direkte elektrische Stimulation wurde der Versuchsaufbau mit den Glas-Sensorchips vereinfacht modelliert. Dabei wurde die Software Comsol Multiphysics (Version 4.4) verwendet. Dabei handelt es sich um eine Software zur Simulation physikalischer Vorgänge, die mittels Differenzialgleichungen beschrieben werden können. Das Programm basiert auf der sogenannten Finite-Elemente-Methode (FEM). Neben einfachen FEM-Berechnungen ist eine Kopplung von verschiedenen physikalischen Problemen (Multiphysik) möglich.

Zur Reduktion des benötigten Rechenaufwands werden alle Modelle in zweidimensionalen Raum betrachtet. Dabei wird die Seitenansicht der Versuchsaufbauten bei 100Hz und 150kHz gezeigt. Die angelegte Spannungsamplitude betrug im Falle der direkten elektrischen Stimulation 750mV, bei der kapazitiven elektrischen Stimulation 15V. Die frequenzabhängige Verteilung von Spannungen und Feldern steht im Vordergrund.

Die gemessenen und recherchierten Daten wurden in das Computer-Modell eingetragen und simuliert. Dabei wurde das AC/DC Modul mit einer Frequency Domain Analyse benutzt.



### 3.7.1 Modellbeschreibung: Direkte elektrische Stimulation, 100Hz, 150 kHz

Im Folgenden ist ein Modell einer Zelle beschrieben, welche sich auf dem Boden eines Wells zwischen zwei Elektroden befindet. Das Well ist mit Zellkulturmedium befüllt. Die Zelle wurde dabei in der Seitenansicht modelliert, da es in der Draufsicht aufgrund der Dimensionen nicht möglich ist, das Feld um eine einzelne Zelle zu simulieren.

Das Modell ist in Abbildung 3-11 gezeigt, wobei der Abstand zwischen den Elektroden  $50\mu\text{m}$  und die Elektrodenlänge jeweils  $50\mu\text{m}$  beträgt. Zwischen den beiden Elektroden ist eine kugelförmige Zelle mit einem Durchmesser von  $15\mu\text{m}$  positioniert.

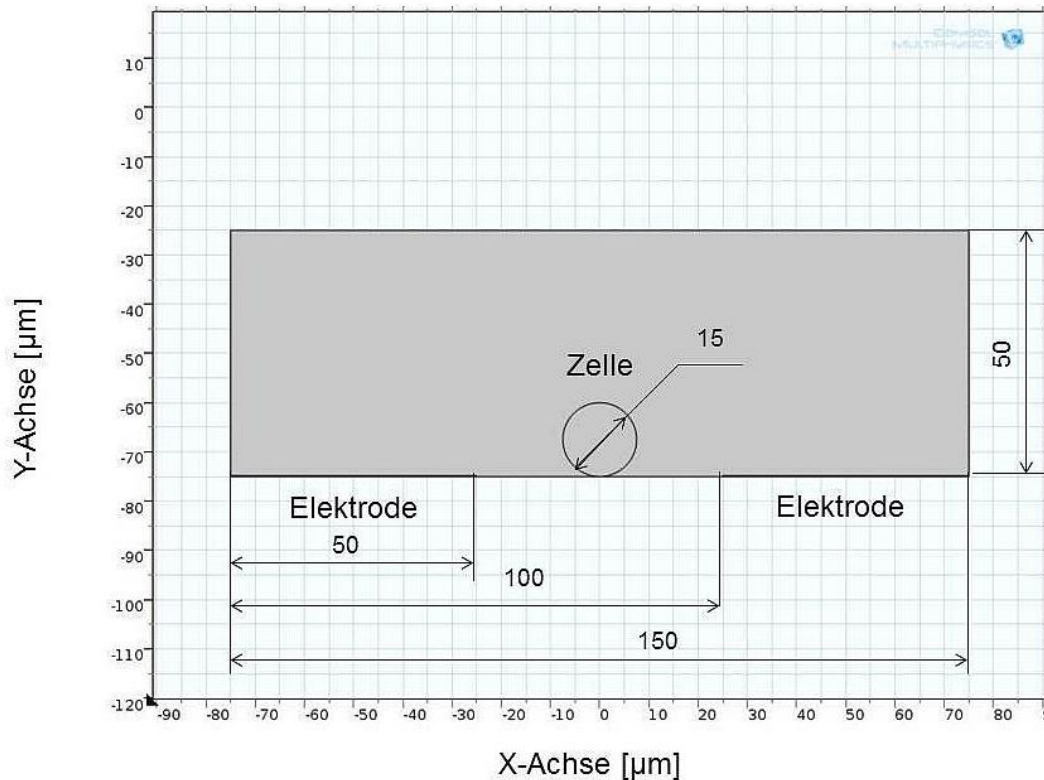


Abbildung 3-11. Simulationsmodell einer Zelle, welche sich auf dem Boden eines Wells zwischen zwei Elektroden befindet (Seitenansicht). Das Well ist mit Zellkulturmedium befüllt. Der Abstand zwischen den Elektroden beträgt  $50\mu\text{m}$  und die Elektrodenlänge ist jeweils  $50\mu\text{m}$ . Zwischen zwei Elektroden ist eine kugelförmige Zelle mit einem Durchmesser von  $15\mu\text{m}$  positioniert. Die Mediumhöhe beträgt  $50\mu\text{m}$ .

Links und rechts von der Zelle sind zwei Stimulationselektroden angebracht. Für die Platin-Elektroden wurden die Werte für die elektrische Leitfähigkeit  $\sigma = 8,9 \times 10^6 \frac{\text{S}}{\text{m}}$  und für die relative Dielektrizitätskonstante  $\varepsilon = 7$  aus der COMSOL Material Bibliothek entnommen. Für das Messmedium wurden Daten aus einer Literaturrecherche ( $\sigma = 1,2 \frac{\text{S}}{\text{m}}$ ,  $\varepsilon = 80$ ) entnommen [171]. Der gemessene Mediumwiderstand beträgt  $R_E = 12\Omega$ .

Die elektrochemische Doppelschicht bildet sich an Elektroden (Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt) aus. Für die Simulation der Grenzschicht Elektrode/Elektrolyt wird eine dünne Schicht an der Elektrode definiert, die resistive und kapazitive Eigenschaften aufweist. Die Simulationseingabe für Grenzschicht und Zelle benötigt einen spezifischen Flächenwiderstand  $\rho_s [\Omega\text{m}^2]$  und eine Flächenkapazität  $C_s [\frac{\text{F}}{\text{m}^2}]$ . Die Eingabeparameter werden aus der Literaturrecherche entnommen. Laut Literaturangaben beträgt der spezifische Flächenwider-

stand einer solchen Grenzschrift  $\rho_s=3,6 \times 10^{-4} \text{ } [\Omega\text{m}^2]$  und die Flächenkapazität  $C_s=1,6 \times 10^{-3} \text{ } [\frac{F}{\text{m}^2}]$  [155]. Die Zellmembran besitzt einen spezifischen Flächenwiderstand von  $\rho_{sm}=1 \times 10^4 \text{ } [\Omega\text{m}^2]$  und eine spezifische Kapazität von  $C_{sm}=1 \text{ } [\frac{\mu F}{\text{m}^2}]$  [80, 91, 228].

Die elektrischen Eigenschaften der Membran und die elektrochemischen Eigenschaften der Elektroden wurden in die Simulation integriert. Ziel der Stimulation war die Berechnung des Spannungs- und Feldverlaufs. Das System wurde als linear betrachtet. Die Elektroden sind parallel zum Kammerboden orientiert. Dies erlaubt eine homogene Feldverteilung in der Zellebene. Die Zellen sind vergleichbaren Feldstärken ausgesetzt.

### 3.7.2 Modellbeschreibung: Kapazitive elektrische Stimulation, 100 Hz, 150 kHz

Um auszuschließen, dass die gemessenen Reaktionen der Zellen auf irreversible Faraday'sche Stromeffekte zurückgehen, wurden die Zellen kapazitiv mit einem elektrischen Feld beaufschlagt. Dafür modellierte man diesen Versuchsaufbau.

Ebenso wie bei der direkten elektrischen Stimulation isoliert die Zellmembran das Innere der Zelle und verhindert das Auftreten einer Spannungsverschiebung und des damit verbundenen elektrischen Feldes.

Betrachten wir die Seitenansicht eines Wells einer auf die Befeldungsplatine gestellten 6-Well-Platte (siehe Kapitel 3.8.2). Eine Seitenansicht einer Tumorzelle auf dem Boden eines Wells der 6-fach-Platte ist in Abbildung 3-12 gezeigt. Diese Platine weist zwei verschiedene Layouts auf. Auf der Befeldungsplatine befinden sich zwei Stimulationselektroden. Diese haben einen Abstand von 1mm (3mm). Die Elektrodenquerschnittslänge beträgt ebenso jeweils 1mm (3mm). Dabei sind die Elektroden mit einer Lötstopplack-Schicht (Schichtdicke  $8\mu\text{m}$ ) beschichtet. Zwischen der Befeldungsplatine und dem Boden der 6-Well-Platte bildet sich ein Luftspalt mit einer Dicke von ca.  $90\mu\text{m}$ . Die Bodendicke der 6-Well-Platte beträgt 1mm. Auf dem Boden der 6-Well-Platte ist eine kugelförmige Zelle mit einem Durchmesser von  $15\mu\text{m}$  positioniert. Die simulierte Höhe des Mediums beträgt 1mm. Die elektrischen Eigenschaften der Membran wurden in die Simulation integriert.

Unten links und rechts sind zwei Stimulationselektroden zu sehen. Für die Platin-Elektroden wurden Werte für die elektrische Leitfähigkeit  $\sigma = 8,9 \times 10^6 \frac{\text{S}}{\text{m}}$  und für die relative Dielektrizitätskonstante  $\varepsilon = 7$  aus der COMSOL Material Bibliothek entnommen. Das Plattenmaterial ist Polystyrol. Die Werte für Polystyrol wurden ebenfalls aus der COMSOL Material Bibliothek entnommen: für die elektrische Leitfähigkeit  $\sigma = 1 \times 10^{-16} \frac{\text{S}}{\text{m}}$  und für die relative Dielektrizitätskonstante  $\varepsilon = 2,5$ . Die elektrische Leitfähigkeit und relative Dielektrizitätskonstante des Lötstopplacks betragen  $\sigma = 0,12 \times 10^{-16} \frac{\text{S}}{\text{m}}$  und  $\varepsilon = 3,28$  [219]. Die Zelle befindet sich auf den Boden des Wells. Für das Messmedium wurden die Daten aus einer Literaturrecherche ( $\sigma = 1,2 \frac{\text{S}}{\text{m}}$ ,  $\varepsilon = 80$ ) entnommen [171].

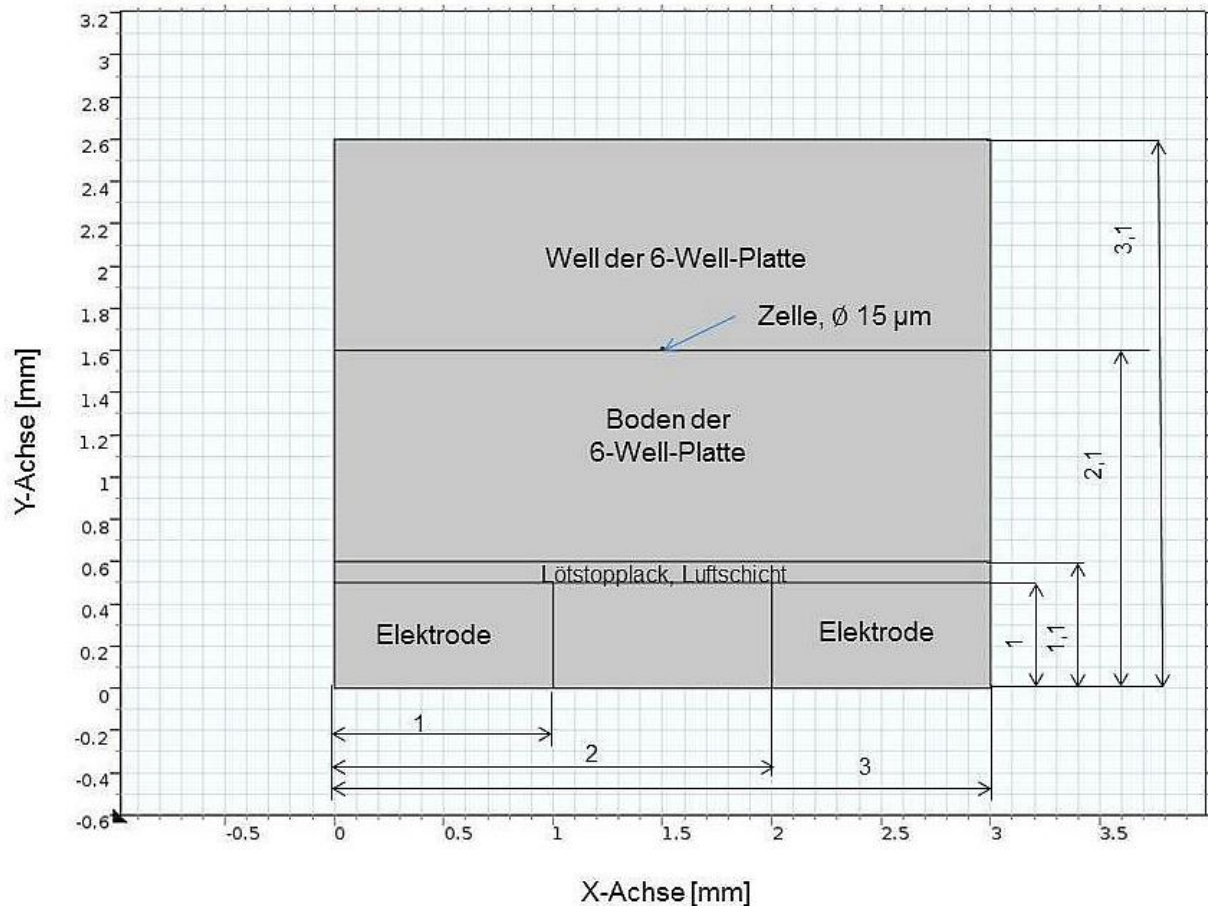


Abbildung 3-12. Seitenansicht eines Wells einer auf die Befeldungsplatine gestellte 6-Well-Platte. Simulationsmodell einer Zelle in einem Well der 6-Well-Platte (Seitenansicht). Auf dieser Platine befinden sich zwei Stimulationselektroden. Diese haben einen Abstand von 1mm (3mm). Die Elektrodenquerschnittslänge beträgt ebenso jeweils 1mm (3mm). Dabei sind die Elektroden mit einer Lötstopplack-Schicht (Schichtdicke  $8\mu\text{m}$ ) beschichtet. Die Bodendicke der 6-Well-Platte beträgt 1mm. Die Lötstopplack-Schicht und der Boden der 6-Well-Platte schwächen dabei die auftretende Spannung und das elektrische Feld ab. Auf dem Boden der 6-Well-Platte ist eine kugelförmige Zelle mit einem Durchmesser von  $15\mu\text{m}$  positioniert. Die simulierte Höhe des Mediums beträgt 1mm. Die elektrischen Eigenschaften der Membran wurden in die Simulation integriert.

Genauso wie im Fall direkter elektrischer Stimulation betrachtet man ein 2D-Modell. Die angelegte Spannungsamplitude beträgt dabei 15V.

Ziel der Simulation ist die Berechnung des Spannungs- und Feldverlaufs auf dem Boden des Wells. Das System wurde als linear angenommen. Damit die Zellen vergleichbaren Feldstärken ausgesetzt waren, wurden die Elektroden parallel zum Kammerboden orientiert.



## 3.8 Applikation von elektrischen Feldern

Für die Applikation von elektrischen Feldern verwendete man den IMR. Der ist ein automatisiertes und modular aufgebautes System für die Durchführung von Zell-Assays über längere Zeiträume. Es können Impedanz,  $pO_2$ , pH-Werte und Bilddaten in Echtzeit aufgezeichnet werden.

### 3.8.1 Direkte Feldeinspeisung

Für die elektrische Stimulation mittels der direkten Feldeinspeisung, also über Elektroden im direkten Kontakt zum flüssigen Medium, wurden die Versuche nach dem folgenden Protokoll durchgeführt. 24h vor dem geplanten Messbeginn wurden  $5 \times 10^4$  MCF-7 Zellen pro Well in 200 $\mu$ l Kulturmedium in einer Mikrotiterplatte ausgesät und 2h bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 10%  $CO_2$  inkubiert. Anschließend wurden die Wells mit Kulturmedium auf ein Volumen von 500 $\mu$ l aufgefüllt und für weitere 22h inkubiert.

Vor Beginn einer Messung mit dem IMR-System wurde unter sterilen Bedingungen der mit Spitzen bestückte Roboterkopf zur Versorgung der Zellen im IMR montiert. Der Inkubator ist auf 37°C temperiert. 24-Well Vorratsgefäße füllte man unter sterilen Bedingungen mit frisch hergestelltem Messmedium (DMEM D5030+4,5g/l D-Glucose+4mM L-Glutamin+50 $\mu$ g/ml Gentamycin+5% FCS) auf und stellte sie zur Akklimatisierung des Mediums mindestens 2h vor Start der Messung in den Inkubator.

Kurz vor dem Start der Messung wurde der Deckel auf die vorbereitete 24-fach Platte mit den Zellproben aufgesetzt. Die Messung wurde über die IMROS-Software gestartet. 12h nach Beginn der Messung wurde die Befeldung eingeschaltet. Die direkte Befeldung erfolgte durch einen an die IDES (Elektrodenabstand  $d=50\mu$ m) angeschlossenen Frequenzgenerator (siehe Abbildung 2-29, d). Die Versuche liefen jeweils über einen Zeitraum von 2 bzw. 5 Tagen, bei einem Mediumwechsel von 100 $\mu$ l alle 20 Minuten. Alle 24h wechselte der Pipettierroboter automatisch auf ein frisches Vorratsgefäß.

### ***Elektrische Stimulation der Zellen mit niederfrequenten gepulsten elektrischen Feldern***

Der zeitliche Ablauf von Messungen im IMR-System mit MCF-7 Zellen wird in Abbildung 3-13 gezeigt. Die Zellen wurden 24h vor dem Start des Versuchs auf die Platte ausgesät und im Inkubator (Standard Randbedingungen) inkubiert. Nach einer Vormesszeit von 12h wurden die Zellen für 30h mit einem Rechteck-Puls von 750mV, monopolar, Periodendauer 10ms und einem Tastverhältnis 1:15 stimuliert ( $t=12-42$ h). Nach der Stimulation und einer Nachmesszeit von 3h ( $t=42-45$ h) wurde der Versuch mit einem Tritonabschluss (0,1% Triton X-100) als Positivkontrolle beendet. Dieses Detergens, das die Zellmembranen auflöst, enthält keine Ionen. Somit ist sein Einfluss auf die Impedanzwerte unerheblich.

Während der Messung wurden der Sauerstoffverbrauch und die Ansäuerungsaktivität der Zellen gemessen und mit mikroskopischen Aufnahmen die Zellmorphologie erfasst. Um die Zellzahl zu quantifizieren, wurden die Zellen nach der Stimulation vom Glassubstrat abgelöst und gezählt. Dabei wurden die Zellzahlen stimulierter und nicht stimulierter Zellen (Kontrolle) verglichen.

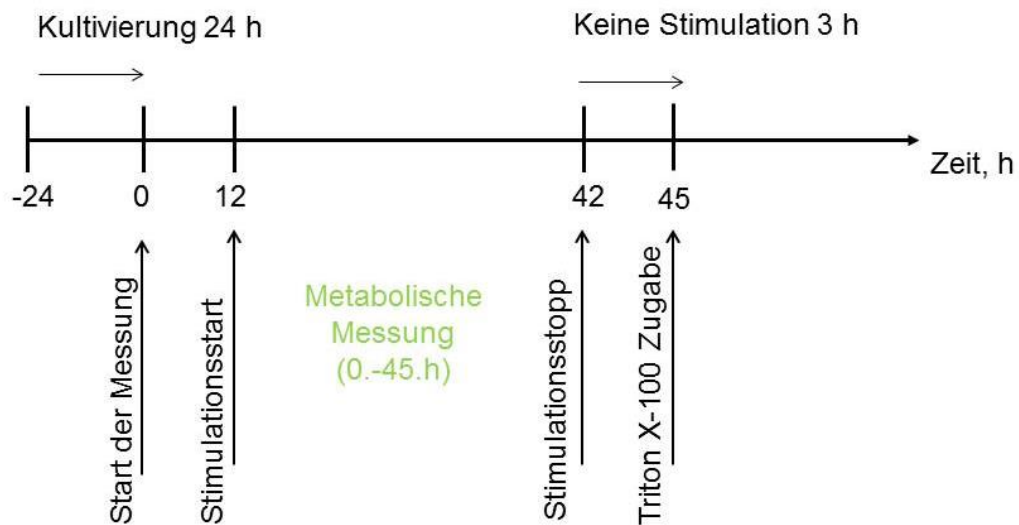


Abbildung 3-13. Schematischer zeitlichen Ablauf für die IMR-Messung von elektrisch stimulierten MCF-7 Zellen: Versuchsplanung. Die MCF-7 Zellen wurden mit niederfrequenten gepulsten elektrischen Feldern stimuliert. Die elektrische Stimulation wurde mittels der direkten Feldeinspeisung durchgeführt.

### **Elektrische Stimulation der Zellen mit sinusförmigen elektrischen Feldern**

Den Boden der Multiwellplatte bildet eine sensorbestückte Glasplatte, auf der die Zellen kultiviert werden. Für die Weiterleitung der applizierten elektrischen Felder benutzte man eine elektrische Kontaktierung an der Längsseite der Platte. Die Zellen wurden über die interdigitalen Elektroden-Strukturen (IDES) elektrisch stimuliert.

Man stimulierte die Zellen mit sinusförmiger Wechselspannung. Die angelegte Spannung hatte eine Amplitude von 1V, bei einer Frequenz von 100Hz, bzw. 150kHz. Durch verschiedene Vorwiderstände kommt es zu unterschiedlichen Spannungsstärken an den IDES. Jeweils drei Wells bilden dabei eine Gruppe durch identische Vorwiderstände. Abbildung 3-14 zeigt eine Vorbefeldungsplatine, die als ein Spannungsteiler am HNLME konzipiert wurde und die in bei diesen Versuchen verwendeten IMR-Messsystem statt der IDES Elektronik eingebaut wurde [4]. Die Kontaktierung mit der Messplatte erfolgte durch die Federkontaktstifte. Diese Platine wurde an einen extern angesteuerten Signalgenerator angeschlossen.

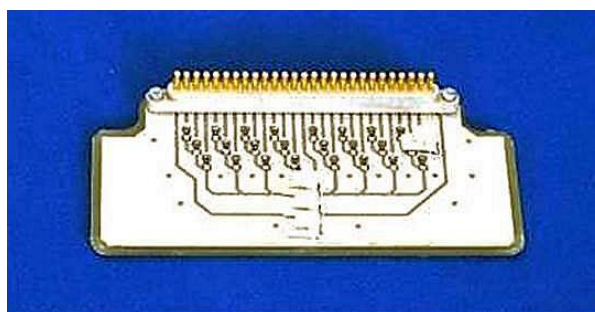


Abbildung 3-14. Vorbefeldungsplatine. Diese wurde als Spannungsteiler konzipiert und statt der IDES Elektronik in das IMR-System montiert. Goldfarbenen sind die Federkontaktstifte erkennbar, welche die Kontaktierung zu Messplatte gewährleisten [4].

Tabelle 3-1 zeigt die verwendete Spannungsamplitude an den einzelnen Wells.

Spannungsamplitude an den einzelnen Wells(in mV)											
Well1	835	Well2	715	Well3	10	Well4	2,5	Well5	2,5	Well6	2,5
Well7	25	Well8	715	Well9	25	Well10	200	Well11	200	Well12	200
Well15	10	Well14	25	Well15	715	Well16	50	Well17	50	Well18	50
Well19	835	Well20	10	Well21	835	Well22	335	Well23	335	Well24	335

Tabelle 3-1: IMR Spannungen an Wells. Durch verschiedene Vorwiderstände kommt es zu unterschiedlichen Spannungsstärken an den IDEs. Jeweils drei Wells bilden dabei eine Gruppe durch identische Vorwiderstände. Bei einer Spannungsamplitude von 750mV tritt eine Feldstärke von ca. 2,3kV/m auf.

Den zeitlichen Verlauf der Messungen zur elektrischen Stimulation mit sinusförmigen elektrischen Feldern im IMR-System mit MCF-7 Zellen zeigt Abbildung 3-15. Die Zellen wurden 24h vor dem Start des Versuchs auf der Platte ausgesät und im Inkubator (Standard Randbedingungen) inkubiert.

Nach 12h Monitoring im IMR ohne E-Feld wurden die Zellen für 108h elektrisch mit sinusförmiger Wechselspannung stimuliert und kontinuierlich überwacht. Als Positivkontrolle wurde der Versuch mit einem Tritonabschluss beendet.

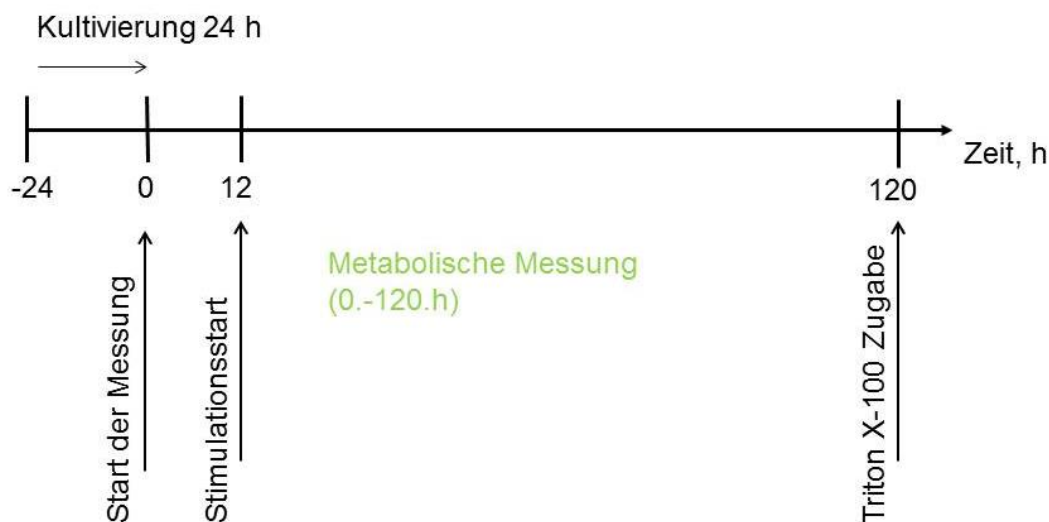


Abbildung 3-15. Schematischer zeitlichen Ablauf der IMR-Messungen an elektrisch stimulierten MCF-7 Zellen. Die MCF-7 Zellen wurden mit sinusförmigen elektrischen Feldern stimuliert. Die elektrische Stimulation wurde mittels der direkten Feldeinspeisung durchgeführt.

### 6-fach-Messkammer

Eine sogenannte 6-fach-Messkammer kann statt der 24-fach Multiwellplatten im IMR-System verwendet werden. Abbildung 3-16 zeigt die 6-fach Platte während eines Pipettiervorgangs im IMR-System. Sie besteht aus 6 Wells. Den Boden der Wells bilden sensorbestückte Glas-Sensorchips (siehe Abbildung 3-4). Die Glas-Sensorchips könnten beliebig mit elektrochemischen, elektrischen und/oder opto-chemischen Sensoren bestückt werden. Die Kontaktierung der elektrischen Sensoren erfolgt über einen Deckel mit einer integrierten Ring-

platine. Dieser Aufbau wurde für die Messung des Membranpotentials an MCF-7 Zellen benutzt.

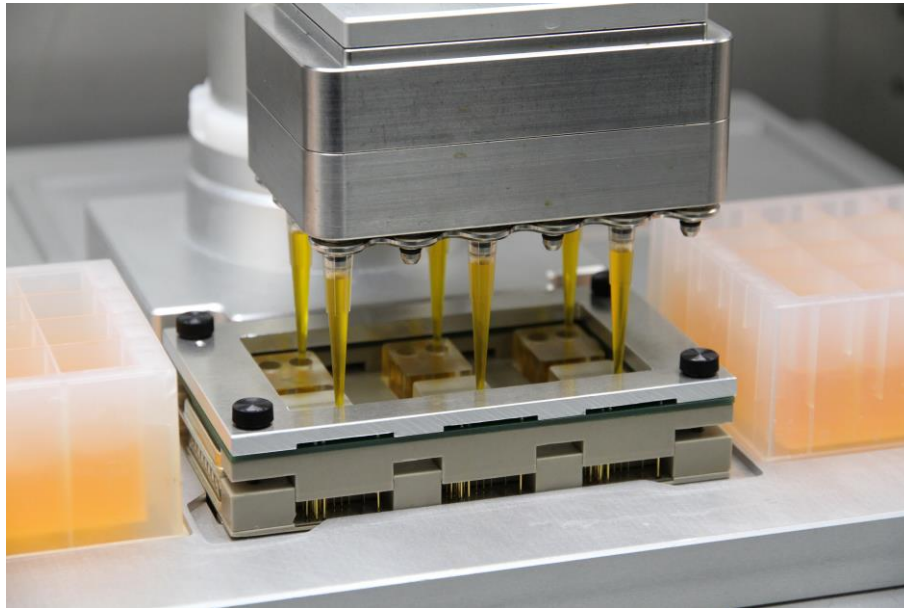


Abbildung 3-16: 6-fach Messsystem während eines Pipettiervorgangs im IMR-System. Ein montierter Deckel gewährleistet die elektrische Kontaktierung. Eine sogenannte 6-fach-Messkammer kann statt der 24-fach Multiwellplatten im IMR-System verwendet werden (entnommen aus [51]).

Die 6-fach-Messkammer, die aus einer Grundplatte, einem Rahmen für die Zellkammern und Fluidikeinsätzen besteht, zeigt Abbildung 3-17.

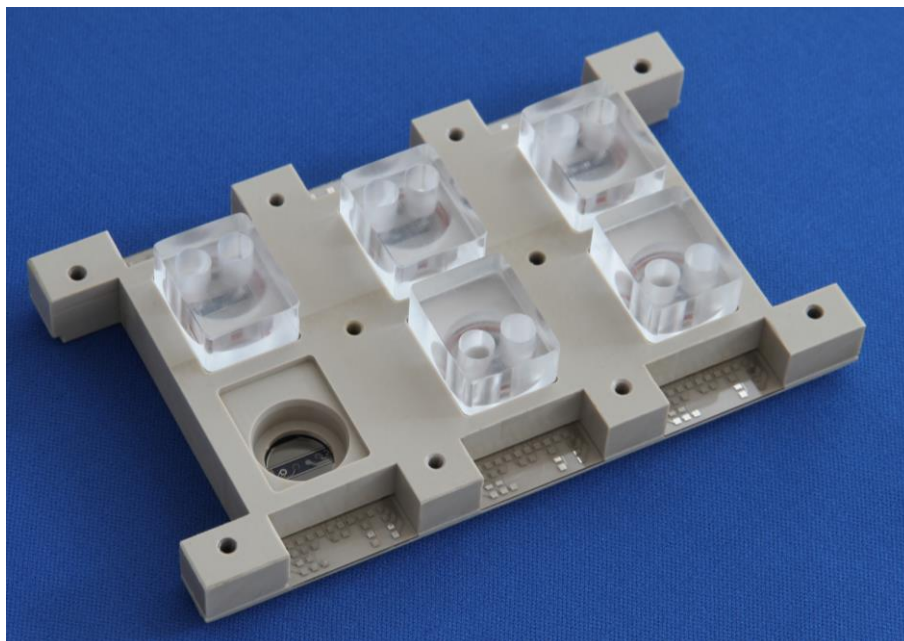


Abbildung 3-17: 6-fach-Messkammer mit aufgesetzten Fluidikköpfen. Sie besteht aus 6 Wells. Den Boden der Wells bilden sensorbestückte Glas-Sensorchips. Die Glas-Sensorchips könnten mit elektro-chemischen, elektrischen und/oder opto-chemischen Sensoren bestückt werden (entnommen aus [51]).

## Elektrische Kontaktierung

Die Glas-Sensorchips werden über Federstecker, welche in eine vierlagige Ringplatine eingelötet sind und mit Hilfe von zwei Steckerleisten zentriert werden, kontaktiert. Die 44-poligen Sub-D-Stecker wurden über Koaxialkabel mit dem extern angesteuertem Signalgenerator verbunden.

Der Deckel der Messkammer mit der integrierten Ringplatine und den Steckerleisten wird in Abbildung 3-18 gezeigt. Diese sind mit der Platine und dem Deckel verschraubt und das ganze Bauelement wird mit Schrauben an der Messkammer befestigt. Der Deckel ist so konzipiert, dass zwischen Deckel und den elektrisch leitfähigen Elementen der Platine kein elektrischer Kontakt entsteht. Die Ringplatine dient der Weiterleitung der Signale des Signalgenerators an die Federkontaktstifte über die Steckverbinder. Deshalb ist sie einerseits mit den Federkontaktstiften und andererseits mit den Sub-D-Steckern zur Weiterleitung der Signale verlötet. Die Leiterbahnen der Glas-Sensorchips (IDES und längliche Elektroden) eins bis drei werden auf den linken und die Leiterbahnen der Glas-Sensorchips vier bis sechs auf den rechten Sub-D-Stecker geleitet.

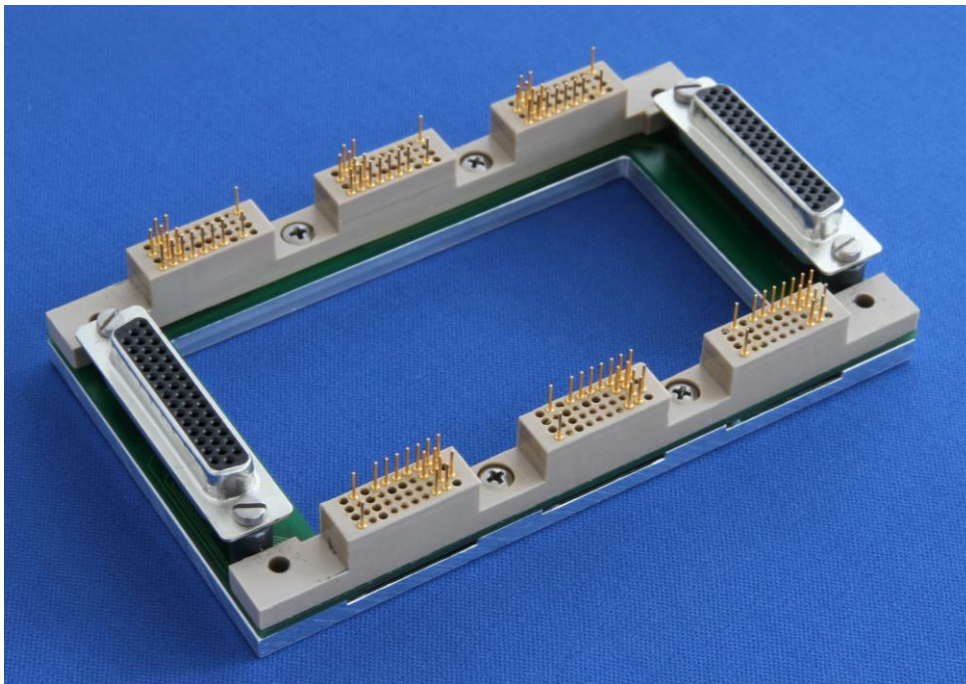


Abbildung 3-18: Deckel mit integrierter Ringplatine. Über die Federkontakte der Ringplatine wird die Spannung für die elektrische Stimulation der Zellen angelegt. Die Ringplatine dient der Weiterleitung der Signale des Signalgenerators an die Federkontaktstifte über die Steckverbinder. Deshalb ist sie einerseits mit den Federkontaktstiften und andererseits mit den Sub-D-Steckern zur Weiterleitung der Signale verlötet. Die Leiterbahnen der Glas-Sensorchips (IDES und Längselektroden) eins bis drei werden auf den linken und die Leiterbahnen der Glas-Sensorchips vier bis sechs auf den rechten Sub-D-Stecker geleitet.

Der Schaltplan der Ringplatine ist in Anhang G gezeigt.

Die 6-fach-Messkammer mit dem montierten Deckel, welcher die elektrische Kontaktierung beinhaltet, zeigt Abbildung 3-19.



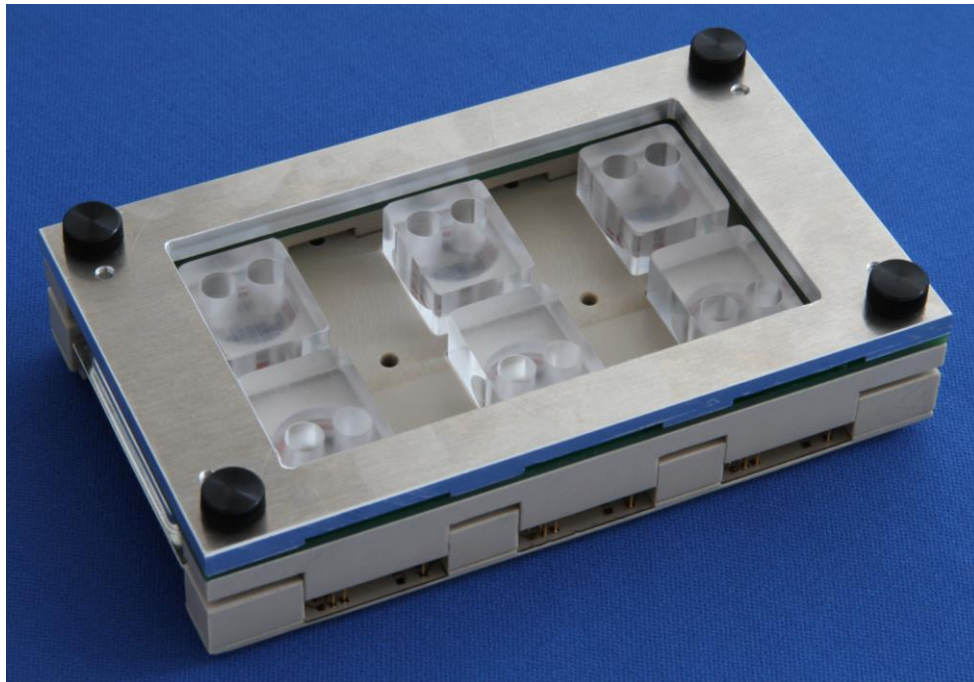


Abbildung 3-19: 6-fach-Messkammer mit dem montierten Deckel. Dieser beinhaltet die elektrische Kontaktierung (entnommen aus [51]).

### 3.8.2 Kapazitive Feldeinspeisung

Um auszuschließen, dass die gemessenen Reaktionen der Zellen (siehe Kapitel 4.3) durch elektrochemische Effekte infolge des direkten Kontakts der Elektroden mit dem Messmedium verursacht werden, wurde eine 6-Well-Platte auf eine Befeldungsplatine gestellt. An dieser Platine wurde wiederum ein Frequenzgenerator SG801 (HEB Rudolf Herzog Digitaltechnik, [97]) angeschlossen, der die Anregungsspannung (15V) erzeugte. Jeweils 3 Wells wurden mit der gleichen Feldstärke beaufschlagt (siehe Abbildung 3-20 und Abbildung 3-21). Der IDEs-Abstand beträgt jeweils 1mm und 3mm. Gleichzeitig stellte man eine weitere 6-Well-Platte als Kontrolle in den Inkubator. Die ist genauso mit Zellen besiedelt, ist aber mit keinem E-Feld beaufschlagt.

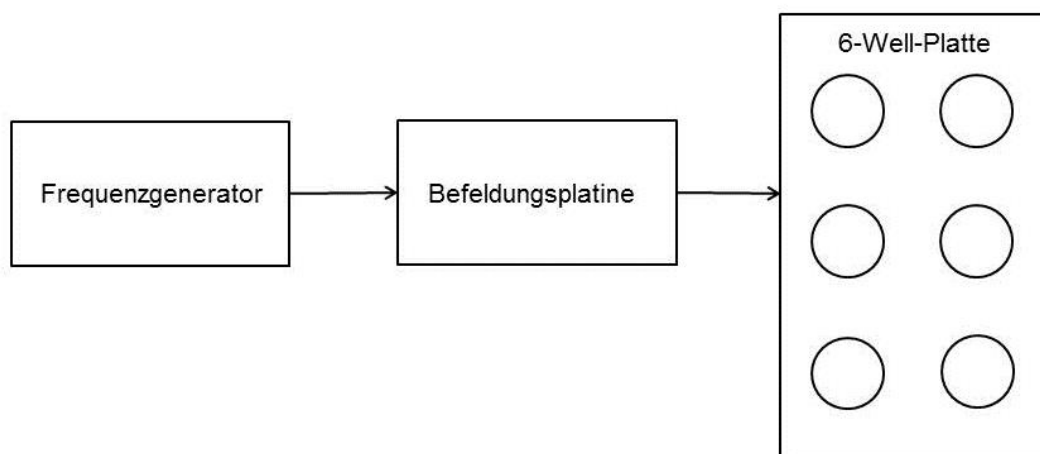


Abbildung 3-20: Schematische Darstellung des Signalwegs. An dieser Platine wurde wiederum ein Frequenzgenerator SG801 (HEB Rudolf Herzog Digitaltechnik, [97]) angeschlossen, der die Anregungsspannung (15V) erzeugte.

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 3-21 dargestellt.

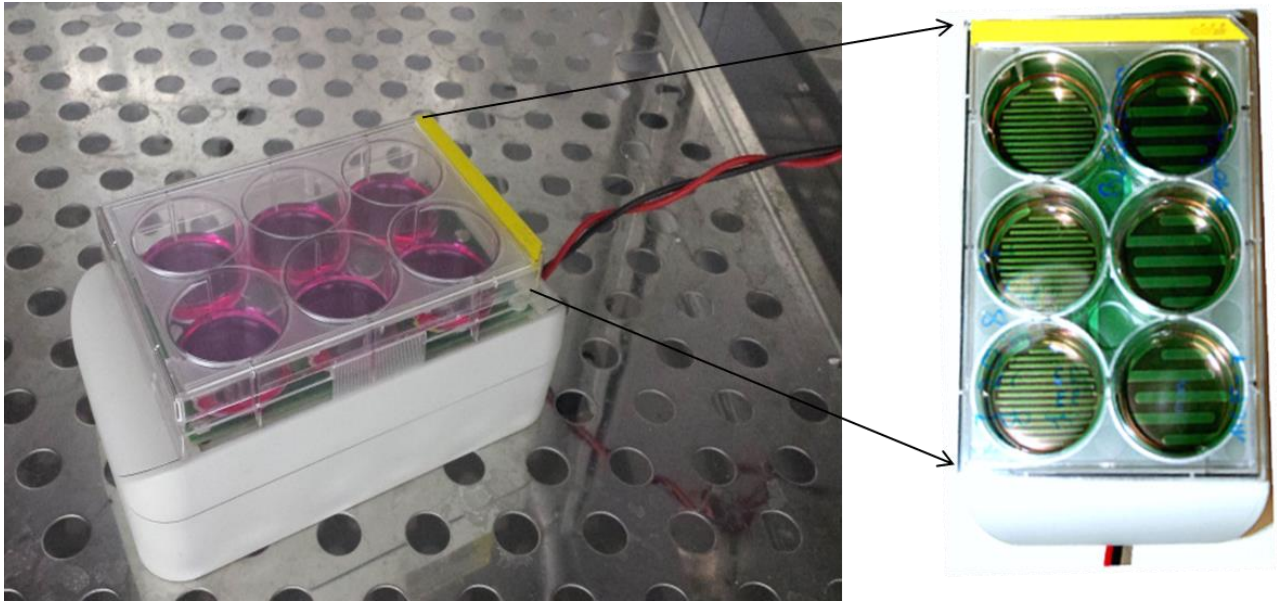


Abbildung 3-21: Versuchsaufbau: Elektrische Stimulation, kapazitive Feldeinspeisung. Die Kulturplatte (6-Well-Platte) ist auf eine Befeldungsplatine mit IDES-Abstand 1mm (links) und 3mm (rechts) gestellt. Jeweils 3 Wells wurden mit der gleichen Feldstärke beaufschlagt. Gleichzeitig stellte man eine weitere 6-Well-Platte als Kontrolle in den Inkubator. Die ist genauso mit Zellen besiedelt, ist aber mit keinem E-Feld beaufschlagt [4].

Durch die kapazitive Stimulation wird die Feldstärke sowohl am Boden der Wells als auch in der Zelle durch die isolierende Lötstopplack-Schicht und den Plastikboden der 6-Well-Platte wesentlich abgeschwächt. Aus diesem Grund müssen die Zellen mit einer viel höheren Spannung stimuliert werden, um die gleiche Feldstärke in und an den Zellen zu realisieren. Laut Simulation soll die Anregungsspannung bei ca. 10kV und einer Frequenz von 150kHz für die Zellen auf einem Foliensubstrat und einem Elektrodenabstand von 1mm liegen (siehe Anhang C). Da der zur Verfügung stehende Frequenzgenerator nicht exakt die errechnete Amplitude von Spannung liefern konnte, musste mit niedrigeren Feldstärken als im IMR Versuch gearbeitet werden. Aus diesem Grund wurden die Zellen mit einer Spannung von 15V stimuliert.

Der zeitliche Verlauf von Messungen mit einer kapazitiven Befeldung an MCF-7 Zellen wird in Abbildung 3-22 gezeigt. Die Zellen wurden 24h vor dem Start des Versuchs auf die 6-Well-Platte ( $5 \times 10^5$  MCF-7 Zellen pro Well in 2ml Kulturmedium) ausgesät und im Inkubator (Standard Randbedingungen) inkubiert. Danach wurden die Zellen für 96h mit einer sinusförmigen Wechsellspannung mit einer Amplitude von 15V bei einer Frequenz von 100Hz, bzw. 150kHz stimuliert ( $t=0-96h$ ).

Anschließend wurde der Zellmetabolismus mittels des Resazurin-Tests gemessen. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden dabei erfasst. Um die Zellzahl zu quantifizieren, wurden die Zellen nach der Stimulation vom Substrat abgelöst und gezählt. Dabei wurde die Zellzahl der elektrisch stimulierten MCF-7 Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollen bestimmt.

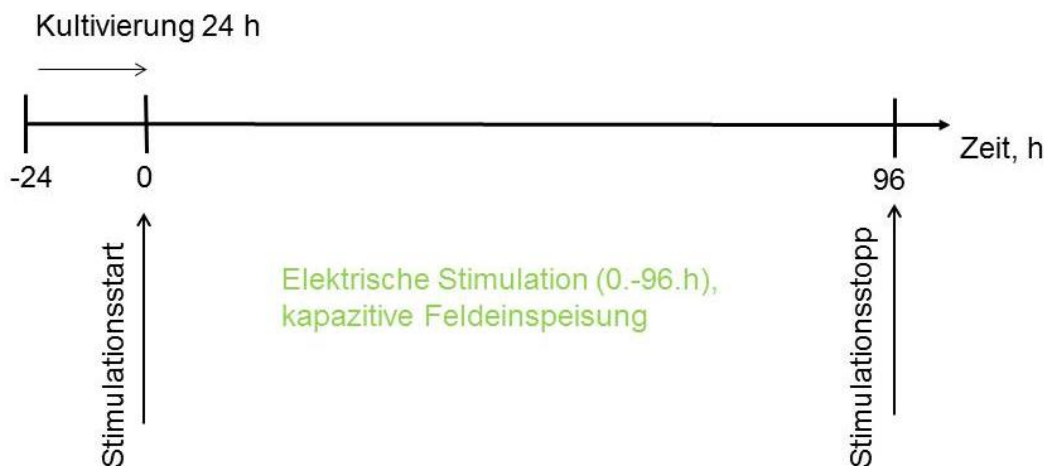


Abbildung 3-22: Schematischer zeitlichen Ablauf für die elektrische Stimulation von MCF-7 Zellen. Die MCF-7 Zellen wurden mit sinusförmigen elektrischen Feldern durch kapazitive Feldeinspeisung elektrisch stimuliert.

### 3.9 Membranpotential-Messung an einer Zelle in einem elektrischen Feld

Wenn eine Zelle einem elektrischen Feld ausgesetzt ist, führt dies zu einer Membranpotentialänderung an der Zellmembran. Die Amplitude dieses Membranpotentials ist proportional zur Amplitude des applizierten Feldes. Das Membranpotential kann man auch mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoffen ermitteln. Diese Methode erlaubt es, Messungen an intakten und gleichzeitig an mehreren Zellen durchzuführen.

Mittels einer fluorimetrischen Methode verfolgte man den zellulären Membranpotentialverlauf unter dem Einfluss der elektrischen Felder.

Die Messung des Membranpotentials an humanen Mammakarzinomzellen (MCF-7 Zellen) erfolgte mit dem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) (bis-(1,3-Dibutylbarbitursäure) Trimethinoxol, Molecular Probes, [137] siehe Abbildung 3-23).

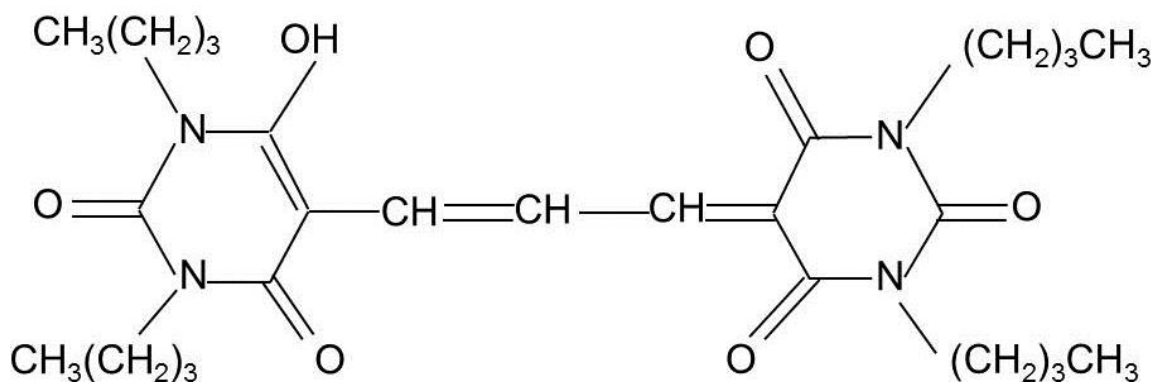


Abbildung 3-23: Spannungssensitiver Slow-Response Farbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3): Strukturformel [137].



Dieser ist ein spannungssensitiver Slow-Response Farbstoff, der bei Anlegen einer Spannung seine Farbe ändert. Die Sensitivität von solchen Farbstoffen ist sehr hoch und beträgt typisch 0,9-1,1% der Intensitätsänderung pro 1mV der Potentialänderung. Ein Nachteil von solchen Farbstoffen ist oft eine hohe Toxizität, besonders bei den Carbocyaninen. [28, 62, 134, 199, 235]

Für die Messung des Membranpotentials an MCF-7 Zellen wurden diese mit dem Farbstoff beladen. Dieser Farbstoff reagiert auf Hyperpolarisation mit einer Abnahme der Fluoreszenzintensität und mit einer Zunahme der Fluoreszenzintensität auf Depolarisation. [137]

### 3.9.1 Ermittlung der optimalen Farbstoffkonzentration

#### ***Toxizitätstest***

Zu den Nachteilen der bis-oxonolen Farbstoffe gehört eine mögliche Toxizität. Man führte ein Toxizitätstest durch, um eine unmittelbare toxische Wirkung des Farbstoffes auf die Zellen während des Experimentes auszuschließen. Damit ermittelte man die optimale Farbstoffkonzentration. Zunächst wurden die Zellen mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen (1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M und 20 $\mu$ M) markiert. Dabei wurde die metabolische Aktivität gemessen. Die folgenden Abbildungen (siehe Abbildung 3-24, Abbildung 3-25 und Abbildung 3-26) zeigen den Sauerstoffverbrauch, die Ansäuerungsrate und Impedanzwerte an den MCF-7 Zellen, die mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen angefärbt waren.

24h vor Messbeginn wurden  $5 \times 10^4$  MCF-7 Zellen pro Well in 200 $\mu$ l Kulturmedium 24 mittleren Kammern einer Mikrotiterplatte ausgesät und für 2h bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 10% CO<sub>2</sub> vorinkubiert. Anschließend wurden die Wells auf ein Volumen von 500 $\mu$ l aufgefüllt und weitere 22h inkubiert. Vor Beginn einer Messung mit dem IMR-System wurde der Pipettenkopf des Roboters unter sterilen Bedingungen mit Spitzen und im IMR montiert. Die Vorratsgefäße wurden unter sterilen Bedingungen mit frisch hergestelltem Messmedium (DMEM D5030+4,5g/l D-Glucose+4mM L-Glutamin+50 $\mu$ g/ml Gentamycin+5% FCS+DiBAC<sub>4</sub>(3) in verschiedenen Konzentrationen) befüllt und mindestens zwei Stunden vor Start der Messung in den Inkubator gestellt. Dadurch konnte sich das Medium ausreichend akklimatisieren. Das Messmedium beinhaltet kein Phenolrot und keinen Puffer.

Die Sauerstoffverbrauchsmessung an den MCF-7 Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10 und 20 $\mu$ M) von Membranpotentialfarbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) angefärbt wurden, zeigt Abbildung 3-24.

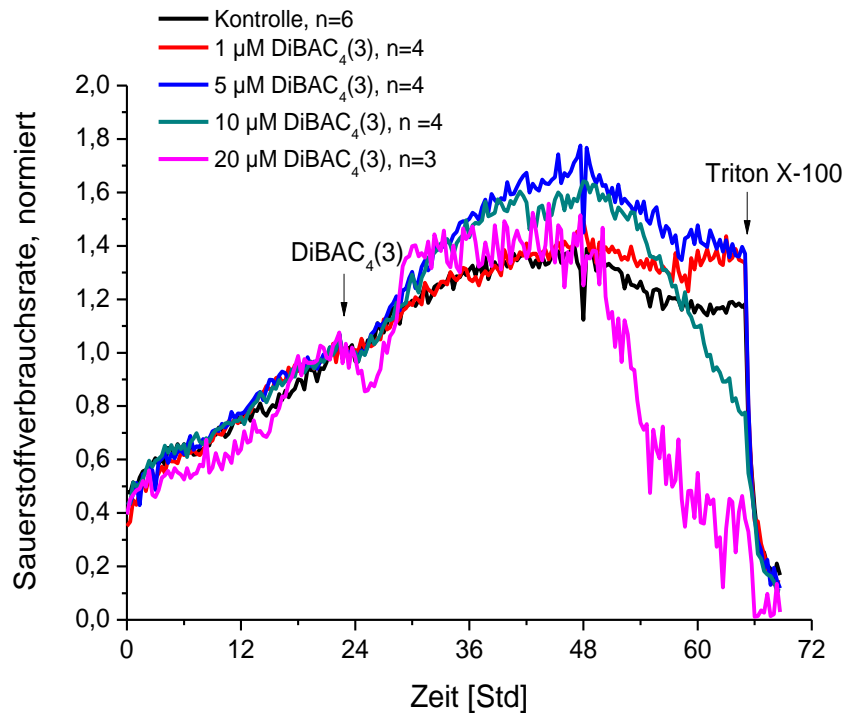


Abbildung 3-24: Sauerstoffverbrauchsmessung an den MCF-7 Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 20µM) des Membranpotentialfarbstoffs DiBAC<sub>4</sub>(3) markiert wurden. Die Werte sind auf den Wert von 24.h normiert. Gesamtzellzahl  $5 \times 10^4$  Zellen/Well.

Die Ansäuerungsrate an den MCF-7 Zellen, die mit gleichen Konzentrationen (1, 5, 10 und 20µM) des Membranpotentialfarbstoffs DiBAC<sub>4</sub>(3) angefärbt wurden, ist in Abbildung 3-25 gezeigt.

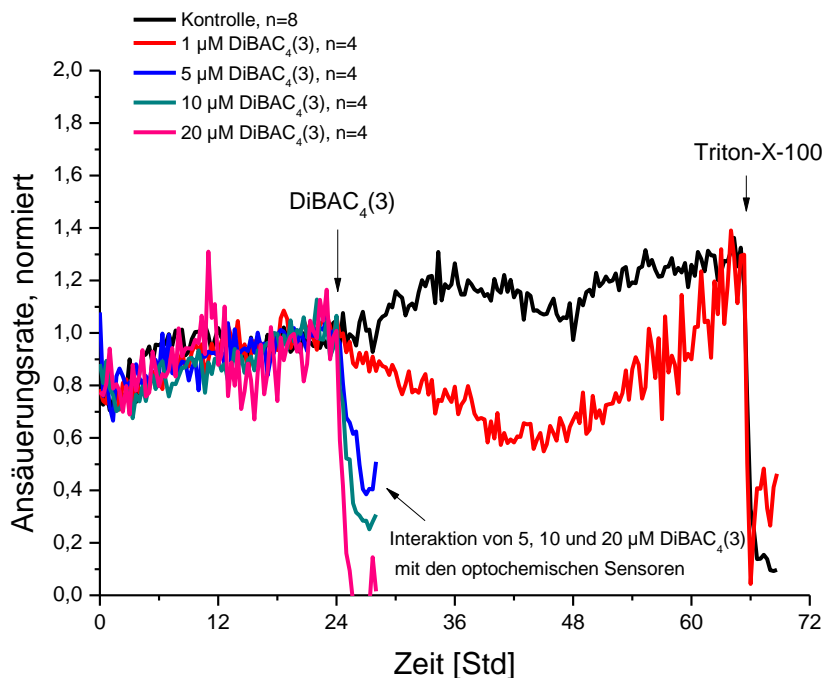


Abbildung 3-25: Ansäuerungsrate an den MCF-7 Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 20µM) von Membranpotentialfarbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) angefärbt wurden. Die Werte sind auf den Wert von 24h normiert. Gesamtzellzahl  $5 \times 10^4$  Zellen/Well. Ab der Konzentration von 5µM DiBAC<sub>4</sub>(3) wurden die pH-Spots verfärbt und es konnten keine weiteren opto-chemischen Signale erfasst werden.

Die Impedanz der MCF-7 Zellen, die mit gleichen Konzentrationen (1, 5, 10 und 20 $\mu$ M) des Membranpotentialfarbstoffs DiBAC<sub>4</sub>(3) markiert wurden, zeigt Abbildung 3-26.

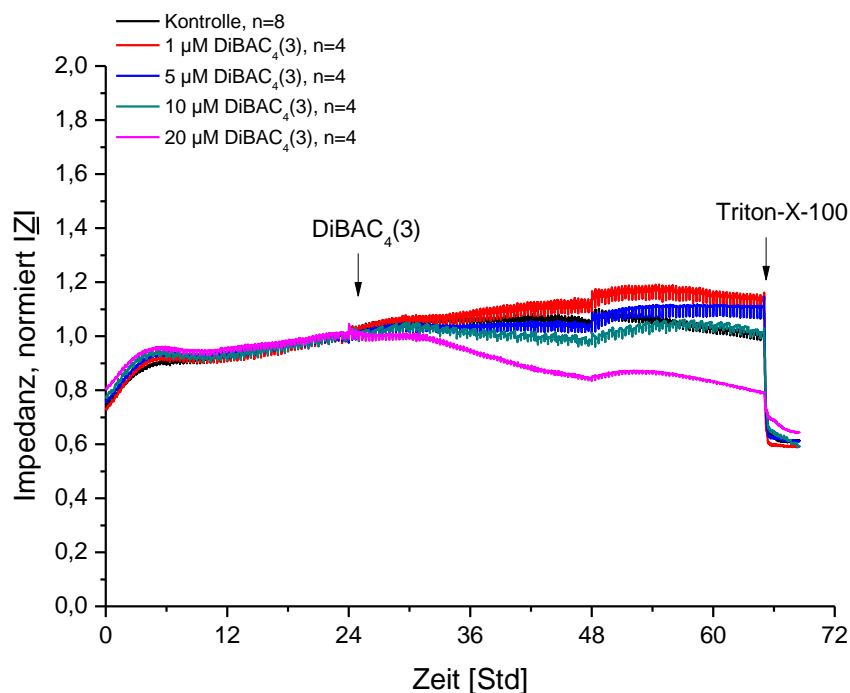


Abbildung 3-26: Impedanzwerte der MCF-7 Zellen, angefärbten mit verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 20 $\mu$ M) des Membranpotentialfarbstoffs DiBAC<sub>4</sub>(3). Die Werte sind auf den Wert von 24.h normiert. Gesamtzellzahl  $5 \times 10^4$  Zellen/Well.

Abbildung 3-24 und Abbildung 3-25 zeigen die toxische Wirkung des DiBAC<sub>4</sub>(3) Farbstoffs auf die Zellen in Konzentrationen von 10 $\mu$ M und 20 $\mu$ M. Die Ansäuerungsrate der Zellen konnte nur bei der 1  $\mu$ M DiBAC<sub>4</sub>(3) Konzentration gemessen werden. Bei höheren Konzentrationen von DiBAC<sub>4</sub>(3) wurden die pH-Spots verfärbt und es konnten keine weiteren optochemischen Signale erfasst werden. Die Messung hat 70h gedauert.

Die durchgeführten Messungen zeigen, dass DiBAC<sub>4</sub>(3) bis zu 5 $\mu$ M Konzentration keine oder nur geringe toxische Wirkung auf die Zellen aufweist. Deshalb wird in den folgenden Versuchen eine Konzentration von 5  $\mu$ M DiBAC<sub>4</sub>(3) verwendet.

### **Photodynamischer Test**

Zur Bestimmung der optimalen Konzentration des spannungssensitiven Farbstoffs DiBAC<sub>4</sub>(3) in Bezug auf die Zeitstabilität des Messsignals wurde ein photodynamischer Test vorgenommen.

Basierend auf den Ergebnissen der toxikologischen Messung wurden die Zellen mit den Farbstoffkonzentrationen 1, 2 und 5 $\mu$ M von DiBAC<sub>4</sub>(3) beladen.

Die photodynamischen Eigenschaften des Farbstoffes in verschiedenen Konzentrationen in Abhängigkeit von der Zeit zeigen Abbildung 3-27 und Abbildung 3-28.

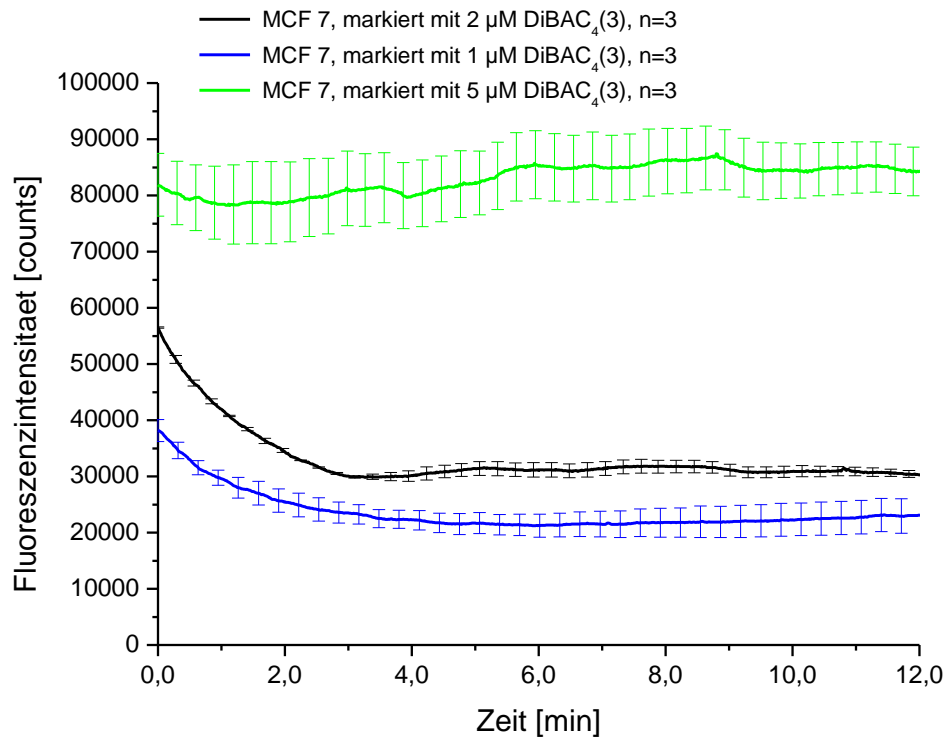


Abbildung 3-27: Die photodynamischen Eigenschaften des Farbstoffes in verschiedenen Konzentrationen: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zeit in mit 1, 2 und 5  $\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) markierten MCF 7 Zellen. Die Inkubationszeit betrug jeweils 45 min.

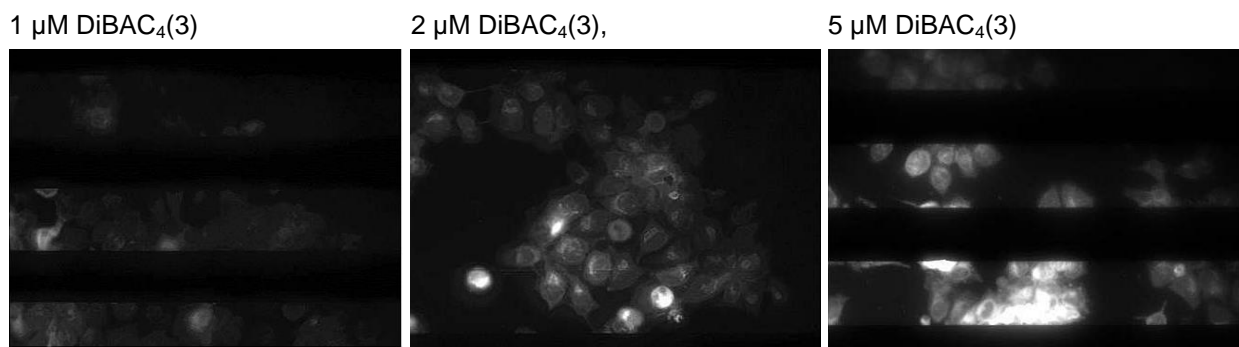


Abbildung 3-28: Fluoreszenzintensität von mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen markierten MCF-7 Zellen auf einem Glas-Sensorchip: a) 1  $\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3); b) 2  $\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3); c) 5  $\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3). Bei 5  $\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) Konzentration scheint das Fluoreszenz-Signal an den Zellen übersteuert und bei 1  $\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) Konzentration untersteuert zu sein. Folglich liegt die optimale Farbstoffkonzentration bei 2  $\mu\text{M}$ . Die Inkubationszeit betrug jeweils 45 min.

Bei 5  $\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) Konzentration scheint das Fluoreszenz-Signal an den Zellen übersteuert und bei 1  $\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) Konzentration untersteuert zu sein. Folglich liegt die optimale Farbstoffkonzentration bei 2  $\mu\text{M}$ .

Weiterhin wurde untersucht, wie zeitstabil das Fluoreszenzsignal während der Gesamtmessung (45 min) ist. Die Zellen wurden dazu mit 2  $\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) markiert und mit einem entsprechenden Fluoreszenzfilterset (Anregungsfilter EX 465-495nm, Dichroitischer Filter DM 505nm, EM 515-555nm) mit dem iMIC Mikroskop mit einem 20x Objektiv (Olympus, UPLSAPO20X, NA 0,75 [160]) mikroskopiert. DiBAC<sub>4</sub> (3) wurde mit einer Wellenlänge

von 488nm angeregt und das emittierte Licht (Wellenlänge  $>515\text{nm}$ ) mit einer Kamera erfasst. Die Bilder wurden mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ [5] analysiert. Abbildung 3-29 zeigt die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zeit an MCF-7 Zellen. Die Zellen sind mit  $2\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) markiert.

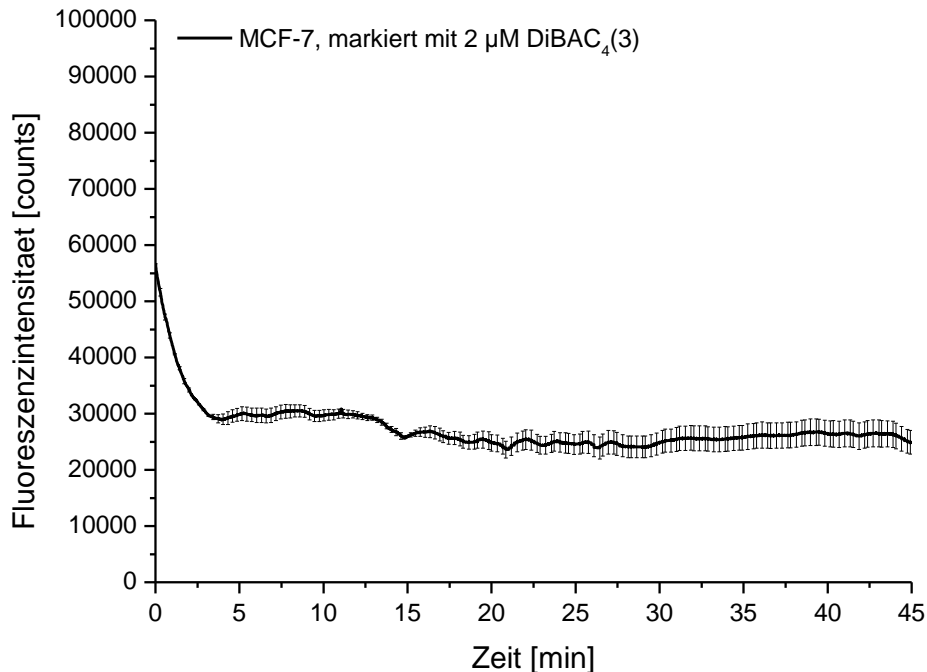


Abbildung 3-29: Die photodynamischen Eigenschaften des Farbstoffes: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zeit in mit  $2\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) beladenen MCF 7 Zellen. Messdauer 45 min. Die Inkubationszeit betrug 45 min.

In Abbildung 3-29 erkennt man, dass das Messsignal nach 3-4 min eingeschwungen ist und anschließend den sogenannten Steady State erreicht. Im Steady State ist der Verlauf stabil ( $\pm 7\%$ ).

### 3.9.2 Erstellen einer Kalibrierungskurve zum Quantifizieren einer Änderung des Membranpotentials

Um die Membranpotentialänderung quantifizieren zu können, erstellte man eine Kalibrierungskurve mit Hilfe des  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  Ionophors Gramicidin [205]. Dabei wurde die Farbstoffempfindlichkeit bestimmt. Zur Ermittlung der Potentialänderungen an elektrisch stimulierten MCF 7 Zellen wurde das Fluoreszenzsignal entsprechend der bei Langheinrich und Daut [134] angegebenen Methode kalibriert. Dabei wurden die Zellmembranen mit  $1\mu\text{M}$  des  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  Ionophors Gramicidin permeabilisiert und  $\text{Na}^+$  wurde in HEPES gepufferter physiologischer Lösung (HEPES-PS) durch das impermeable Kation NMDG (N-methyl-D-glucamin) [206] ersetzt. Die Zusammensetzung von HEPES-PS war folgende:  $1\text{mM}$   $\text{MgSO}_4$ ,  $2\text{mM}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $130\text{mM}$   $\text{NaCl}$ ,  $5\text{mM}$   $\text{KCl}$ ,  $0,33\text{mM}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $10\text{mM}$  HEPES,  $11\text{mM}$  D-Glucose. Um das Hintergrundrauschen zu minimieren, wurden die Messungen in FCS-freiem Medium durchgeführt.

In Gegenwart von DiBAC<sub>4</sub> (3) konnte das Membranpotential der Zellen durch Änderung der  $[\text{K}^+]_{\text{ex}}$  bestimmt werden, wobei die NMDG-Konzentration zur Erhaltung der Osmolarität ange-

glichen wurde. Es wurden fünf verschiedene  $[K^+]_{ex}$  Konzentrationen verwendet (5, 20, 40 und 60mM). Ausgehend von einer  $[K^+]_{in}$  Konzentration von 130mM wurde das Membranpotential entsprechend der Nernst-Gleichung zwischen -87mV und -21mV variiert.

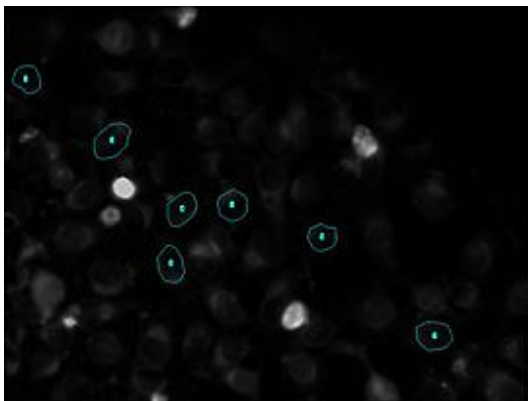
$$E_x = 61,5 \text{ mV} \times \log \frac{[X]_{ex}}{[X]_{in}}$$

Für die getesteten  $[K^+]_{ex}$  Konzentrationen ergeben sich folgende Potentiale:

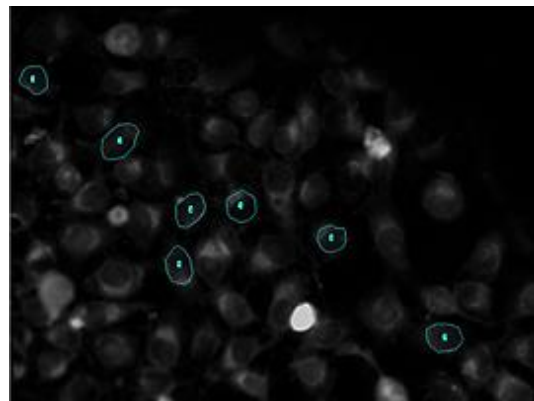
- 87mV bei  $[K^+]_{ex}=5\text{mM}$
- 50mV bei  $[K^+]_{ex}=20\text{mM}$
- 32mV bei  $[K^+]_{ex}=40\text{mM}$
- 21mV bei  $[K^+]_{ex}=60\text{mM}$

Nach dem Versuchsprotokoll wurden die mit dem Farbstoff angefärbten Zellen alle 10 min aufgenommen. Aus den Bildern geht hervor, dass die Farbstoffintensität kontinuierlich steigt (siehe Abbildung 3-30, d), was dem erwarteten Effekt (Abnahme der  $[K^+]_{in}$  Konzentration führt zur Fluoreszenzintensitätsabnahme) widerspricht.

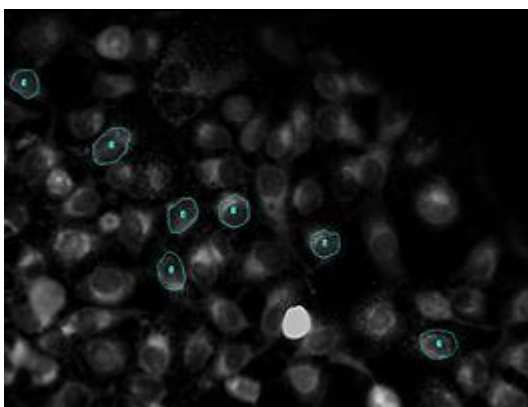
a) 5mM  $[K^+]_{ex}$



b) 20mM  $[K^+]_{ex}$



c) 40mM  $[K^+]_{ex}$



d) 5mM  $[K^+]_{ex}$

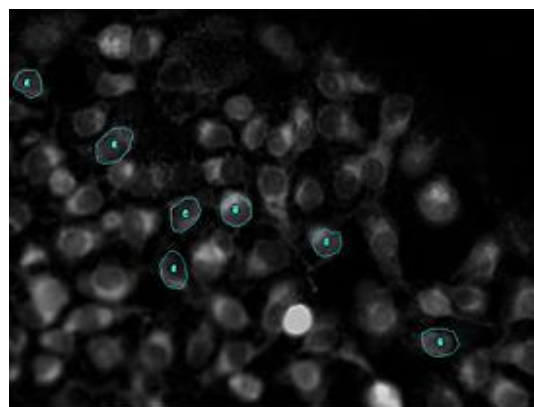


Abbildung 3-30: Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von  $[K^+]_{ex}$  in 2  $\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) markierten MCF 7 Zellen. Die Inkubationszeit betrug jeweils 20 min. In Blau sind die Region of Interest (ROIs) markiert, über die die Fluoreszenzintensität ermittelt wurde.

Aus diesem Grund wurde die Kalibrierungskurve neu erstellt. Bei früheren Messungen wurden die dynamischen Eigenschaften des Farbstoffes in die Auswertung (Fotobleaching) nicht mit einbezogen. Dementsprechend wurde das Versuchsprotokoll an die dynamischen Eigenschaften des Farbstoffes angepasst. Um eine statistisch signifikante Datenlage zu erzielen, wurden die Messungen im Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader FLUOStar Galaxy [35] durchgeführt. Die Zellen wurden in einer 96-Well-Platte mit gleicher Zelldichte wie auf dem Glas-Sensorchip kultiviert. Es wurden Eichungen durchgeführt und die bei den verschiedenen  $[K^+]_{ex}$  Konzentrationen und verschiedenen Zeitabständen gemessenen Fluoreszenzintensitäten in Prozent ermittelt (siehe Anhang, Inkubationszeit lag im Bereich von 20min bis 80min). Die optimalste Inkubationszeit lag bei 45min, wo die Fluoreszenzintensität ihr Maximum erreicht.

Die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in mit  $2\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) angefärbten MCF-7 Zellen bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen zeigt Tabelle 3-2.

Kalium extrazellulär, $[K^+]_{ex}$ , [mM]	5	20	40	60
Nernst-Potential [mV]	-87	-50	-32	-21
Fluoreszenz [%], Mittelwert	100 (n=12)	114 (n=12)	119 (n=12)	126 (n=12)
SEM, [%]	3,8	7,2	4,6	5,1

Tabelle 3-2: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in mit  $2\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) markierten MCF-7 Zellen bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Die Inkubationszeit betrug jeweils 45 min

Die durchgeführten Messungen haben ergeben, dass der Farbstoff im Bereich von  $5\text{mM}$   $[K^+]_{ex}$  bis  $60\text{mM}$   $[K^+]_{ex}$  einen linearen Charakter zeigt. Für die Korrelation der gemessenen Fluoreszenzintensität (in Prozent) und des errechneten Membranpotentials wurde eine Regressionsgerade berechnet. Die gefittete lineare Abhängigkeit ist in Abbildung 3-31 dargestellt.

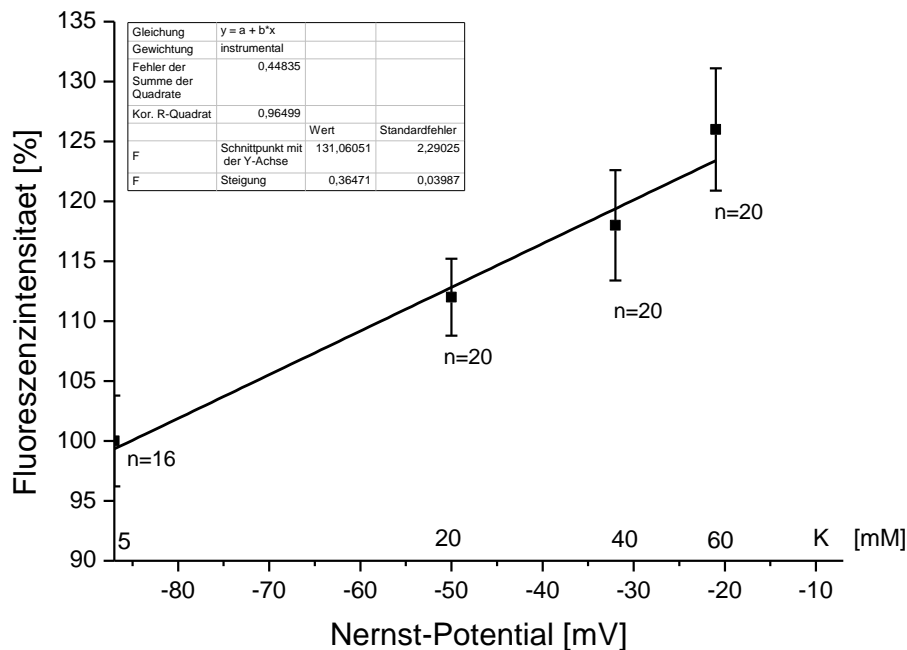


Abbildung 3-31: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in mit  $2\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) markierten MCF 7 Zellen. Kalibrierungskurve.

Gefittet wurde mit folgender Gleichung:  $y=kx+b$ , wobei  $k=0,36\pm 0,039$ ,  $b=128\pm 0,13$ ,  $r=0,96$ . Bei den Konzentrationen  $[\text{K}^+]_{\text{in}}=130\text{mM}$ ,  $[\text{K}^+]_{\text{ex}}=5, 20, 40$  und  $60\text{mM}$  betragen die berechneten Membranpotentiale  $-87\text{mV}$ ,  $-50\text{mV}$ ,  $-32\text{mV}$  und  $-21\text{mV}$ . Die durchgeführten Messungen ergaben, dass der Farbstoff im Bereich von  $5\text{mM}$  bis  $60\text{mM}$   $[\text{K}^+]_{\text{ex}}$  linearen Charakter besitzt und die Empfindlichkeit des Farbstoffes DiBAC<sub>4</sub>(3)  $0,36\pm 0,0039\ \text{\%mV}^{-1}$  betrug.

### 3.9.3 Membranpotential-Messung an einer Einzelzelle

#### Versuchsaufbau

Für die Messung des Membranpotentials an humanen Mammakarzinomzellen wurden die Zellen mit  $2\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) angefärbt und wie schon oben beschrieben mit einem entsprechenden Fluoreszenzfilterset (Anregungsfilter BP 465-495nm, Dichroitischer Filter HP 505nm, BP 515-555nm) mit dem iMIC Mikroskop mit einem 20x Objektiv mikroskopiert. 24h vor dem geplanten Messbeginn wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Glas-Sensorchip einer 6-fach-Messkammer in  $400\mu\text{l}$  Kulturmedium ausgesät und für 24h bei  $37^\circ\text{C}$ , 95% Luftfeuchtigkeit und 10%  $\text{CO}_2$  inkubiert. Vor Beginn einer Messung wurde das Kulturmedium gegen HEPES-PS unter Zugabe von  $2\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) ausgetauscht und bei  $37^\circ\text{C}$  ohne  $\text{CO}_2$ -Begasung für weitere 45 min inkubiert. Das Medium enthält kein Phenolrot und kein FCS, um das Hintergrundrauschen zu minimieren.



Zelle in einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld von 2,3 kV/m

Die Zellen auf einem Glas-Sensorchip wurden über die Elektroden mit einem extern angeschlossenen Frequenzgenerator 8202 (Voltcraft, [50]) elektrisch stimuliert. Die angelegte Spannung lag im Bereich von 750mV.

Das Elektrodenlayout des verwendeten Glas-Sensorchips und die Bezeichnung der Pads werden in Abbildung 3-32 gezeigt. In diesem Fall wurde die Spannung über die IDES angelegt. Die Kontakte I1.1, I1.2, I2.1, I2.2 dienen für die Weiterleitung der Anregungsspannung von dem Signalgenerator zu beiden IDES. Die für dieses Layout mittels FEM Simulation (Kapitel 4.2.1) berechnete Feldstärke liegt im Bereich von 2,3kV/m. Der Elektrodenabstand beträgt 50µm.

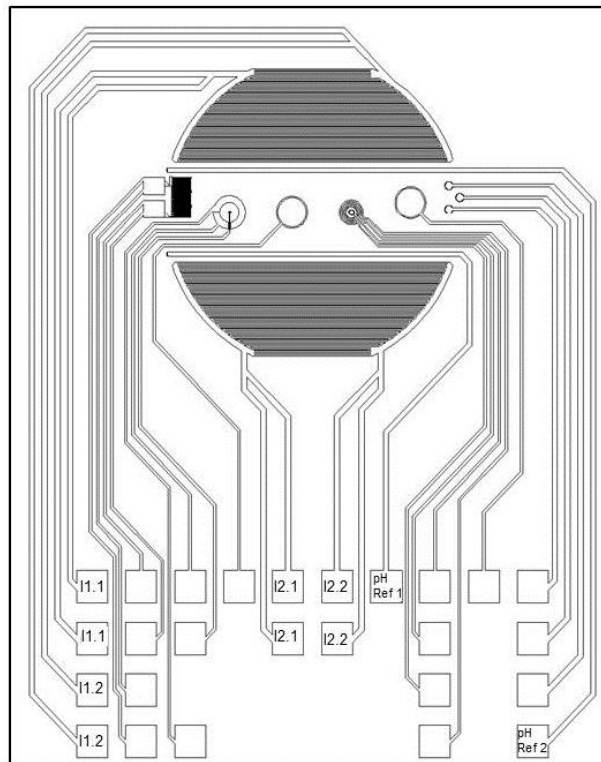


Abbildung 3-32: Multiparametrischer Glas-Sensorchip mit bioelektronischen Sensoren für pH, Sauerstoff und elektrische Impedanz, sowie für mikroskopische Analysen. Die Kontakte I1.1, I1.2, I2.1, I2.2 dienen für die Weiterleitung der Anregungsspannung von dem Signalgenerator zu beiden IDES. Die Kontakte pH Ref 1 und pH Ref 2 sind für die Weiterleitung der Anregungsspannung von dem Signalgenerator zu beiden Streifen-Elektroden vorgesehen. [4]

Zelle in einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld von 230V/m

Die Zellen wurden auf einem multiparametrischen Glas-Sensorchip kultiviert und über die Elektroden (Streifen-Elektroden) elektrisch stimuliert. Die Kontakte pH Ref 1 und pH Ref 2 sind für die Weiterleitung der Anregungsspannung von dem Signalgenerator zu beiden Streifen-Elektroden vorgesehen (siehe Abbildung 3-32).

Die simulierte Feldstärke liegt im Bereich von 230V/m (siehe Anhang C, Abbildung 6-5). Die Elektrodenabstand beträgt 3mm.

Die Zellen wurden mit einem Rechteck-Puls von 750mV, monopolar, Periodendauer 10ms und einem Tastverhältnis 1:15 elektrisch stimuliert. Am Beispiel eines vereinfachten Modells wurde simuliert, welche Feldstärke an einer Zelle unter Annahme von elektro-chemischen Elektrodeneffekten entsteht (siehe Kapitel 3.7.1). Abbildung 3-33 zeigt die abgegebene Signalform.

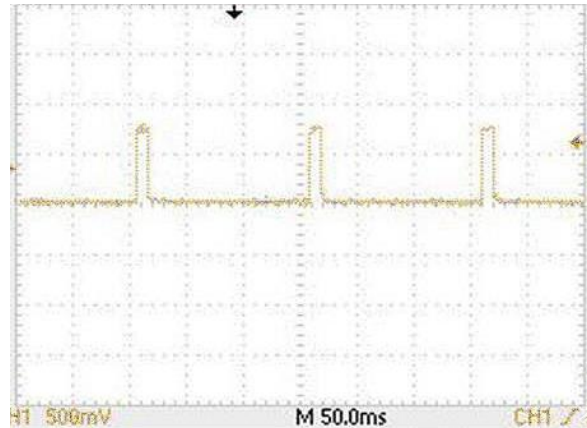


Abbildung 3-33: Abgegebene Anregungsspannung (gemessen an Glas-Sensorchip mit Messmedium). Rechteck-Puls von 750mV, monopolar, Periodendauer 10ms und einem Tastverhältnis 1:15.

Die Glas-Sensorchips wurden für die Messung des Membranpotentials in einer 6-fach-Messkammer befestigt. Der entsprechende Messaufbau ist in Kapitel 3.8.1 (6-fach-Messkammer) beschrieben.

### 3.9.4 Fluoreszenzmikroskopie

Bildgebende Fluoreszenzuntersuchungen erfolgten am IMR-System. Für Fluoreszenzaufnahmen steht ein Monochromator als Lichtquelle zur Verfügung. Das Anregungslicht wird über eine optische Schnittstelle in den Strahlengang des Mikroskops eingekoppelt.

Mit Hilfe des Monochromators und dem passenden Fluoreszenz-Filterblock können Proben, die fluoreszierende Farbstoffe enthalten, beobachtet und analysiert werden. Das Licht von dem Monochromator wird über einen Strahlteiler (dichroitischen Spiegel) zu einem 20x Objektiv (Olympus, UPLSAPO20X, NA 0,75 [160]) gelenkt. Durch dieses gelangt das Licht auf die Probe. Die mit einem Farbstoff markierte Probe emittiert längerwelliges Emissionslicht über das Objektiv zum dichroitischen Spiegel. Dieser lässt in der Richtung das längerwellige Emissionslicht passieren. Der kurzwellige Anteil wird zum größten Teil reflektiert. Anschließend wird das Fluoreszenzbild nach unten zur Kamera durchgelassen.

Zur Erzeugung der Anregungsstrahlung und zur Detektion des Emissionslichts bei der Messung des Membranpotentials verwendete man folgenden Filterblock: Anregungsfilter BP 465-495nm, Dichroitischer Filter HP 505nm, Emissionsfilter BP 515-555nm. Die mit DiBAC<sub>4</sub>(3) markierte Probe wurde mit einer Wellenlänge von 488nm angeregt und emittiertes Licht mit einer Wellenlänge von 515nm mit einer Kamera erfasst. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ (Version 1.48v) [5] und Origin (Version 8G) [161].

Den Versuch führte man nach folgendem Protokoll durch. Die Zellen wurden in HEPES-PS unter Zugabe von 2µM spannungssensitivem Farbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) für 45 min inkubiert und

weitere 45 min kontinuierlich dem Anregungslicht (Wellenlänge 488nm) ausgesetzt. In den ersten 10 min nach dem Start der Messung wurden die Zellen keinem elektrischen Feld ausgesetzt. Während dieser Phase erreichte das Fluoreszenzsignal seinen eingeschwungenen Zustand. 10 min nach dem Start der Messung wurden die Zellen für weitere 10 min einem elektrischen Feld (Anregungsspannung betrug 750 mV, die rechnerische Feldstärke über die IDES (siehe Abbildung 3-32, Kontakte I1.1, I1.2, I2.1, I2.2) betrug 2,3 kV/m, über die Streifen-Elektroden (siehe Abbildung 3-32, Kontakte pH Ref 1 und pH Ref 2) 230 V/m) in einer Richtung ausgesetzt. In den nächsten 10 min wurden die Zellen keinem elektrischen Feld ausgesetzt. Gleich im Anschluss zu dieser Pause wurden die Zellen für weitere 10 min einem elektrischen Feld in Gegenrichtung ausgesetzt. Die Zellen wurden mit einer Rate von 1 Aufnahme pro Sekunde aufgenommen. Der zeitliche Ablauf der Membranpotential-Messung wird in Abbildung 3-34 gezeigt.

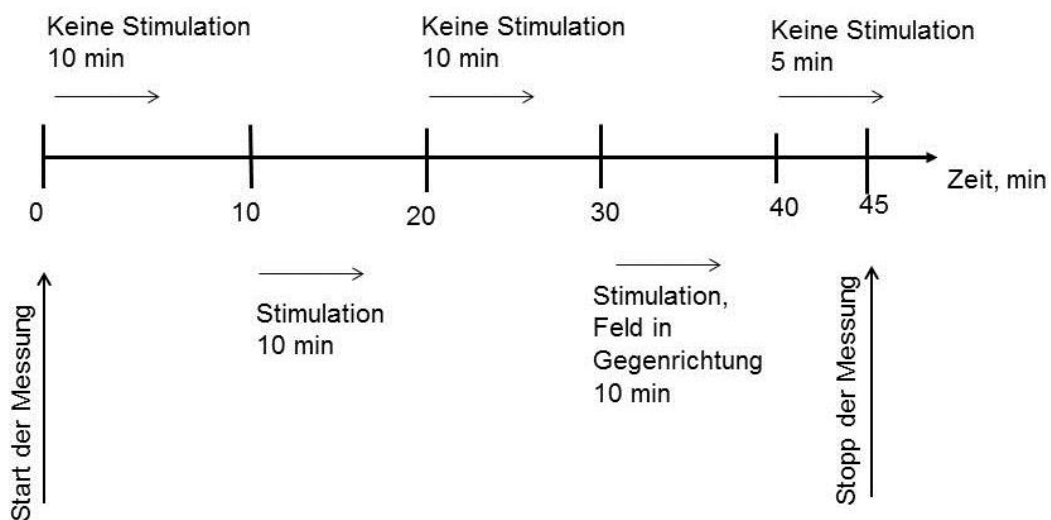


Abbildung 3-34: Schematischer zeitlichen Ablauf der Messung des Membranpotentials an MCF-7 Zellen während der elektrischen Stimulation. Die MCF-7 Zellen wurden mit niederfrequenten gepulsten elektrischen Feldern stimuliert. Die elektrische Stimulation wurde mittels der direkten Feldeinspeisung durchgeführt.

### 3.10 Untersuchung des Zellmembranpotentials unter Verwendung des $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Karrierblockers Amilorid und Variation der extrazellulären pH-Werte

Wie in [85, 123, 182, 234] gezeigt wurde, weist die Messung des Metabolismus an Tumorzellen unter Variationen der extrazellulären pH-Werte und Amilorid-Behandlung eine hemmende Wirkung auf. In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob diese Parameter auch einen Einfluss auf die Membranpotentialänderung der Tumorzellen haben.

Die Tumorzellen (MCF-7 Zellen) kultivierte man in Kulturmedium: DMEM D5646 [204]+ 3,9g/l  $\text{NaHCO}_3$ +5% FCS (vorgewärmt auf 37°C). Die Messung wurde in einer physiologischen Lösung (HEPES (MES) gepufferte physiologische Lösung mit verschiedenen pH-Werte (7,4; 7,0 und 6,5) durchgeführt. Die auf pH=7,4 und pH=7,0 eingestellten Lösungen wurden mit 10mM HEPES gepuffert. Die auf pH=6,5 eingestellte Lösung pufferte man mit 10mM MES.

Die HEPES und MES Pufferkonzentrationen wurden aus den Titrationskurven mit zwei verschiedenen Pufferkonzentrationen von 10mM und 25mM ermittelt (siehe Abbildung 3-35). Um das Hintergrundrauschen zu minimieren, wurden die Messungen in FCS-freiem Medium durchgeführt.

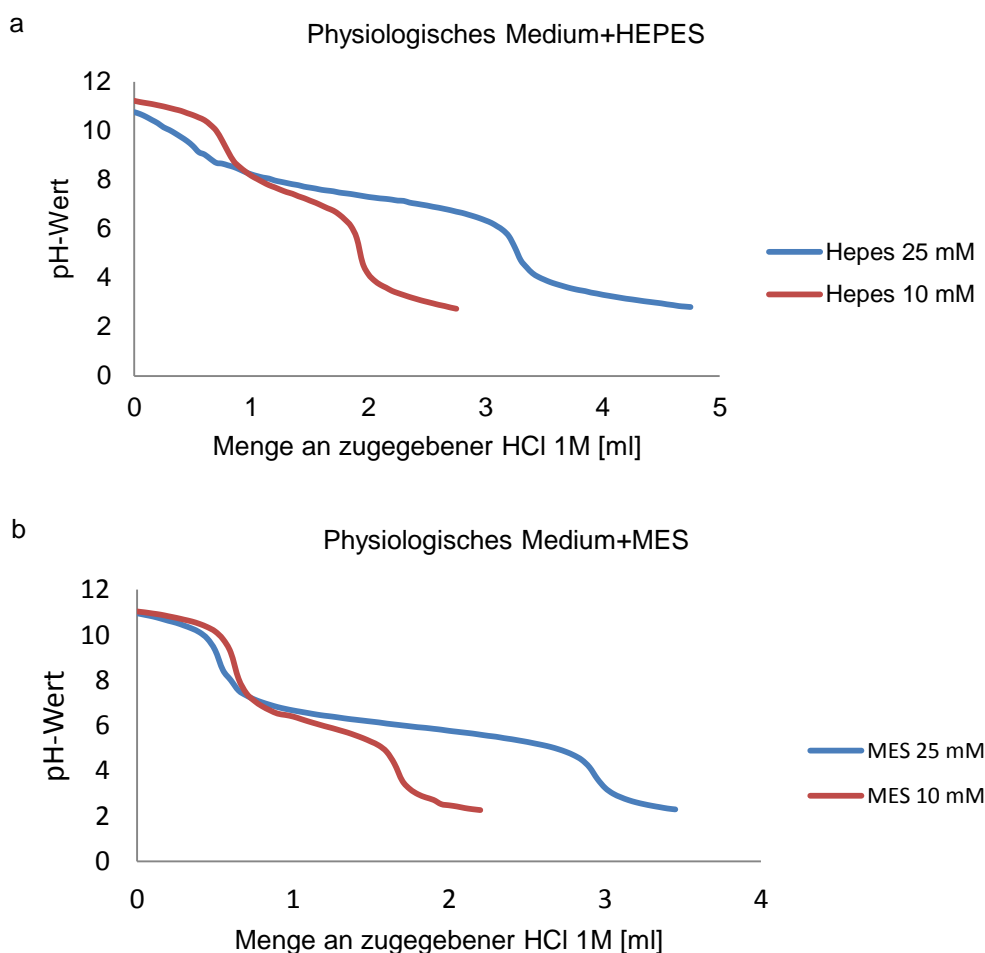


Abbildung 3-35: Titrationskurve: Ein physiologisches Medium a) HEPES-PS; b) MES-PS mit 1M HCL Lösung titriert. Die HEPES und MES Pufferkonzentrationen ermittelte man aus den Titrationskurven mit zwei verschiedenen Pufferkonzentrationen von 10mM und 25mM. Um das Hintergrundrauschen zu minimieren, wurden die Messungen in FCS-freiem Medium durchgeführt.

### 3.10.1 Erstellen einer Kalibrierungskurve unter Variation der extrazellulären pH-Werte

Die Messungen des Membranpotentials wurden mit einem Multiplaterader (Fluorescence Microplate Reader, FLUOstar Galaxy, [35]) durchgeführt. Zur Bestimmung der Potentialänderungen wurde das Fluoreszenzsignal bei verschiedenen pH-Werte der Eichlösung (7,4; 7,0 und 6,5) kalibriert. Die Membranpotentialbestimmung erfolgte durch die  $[K^+]_{ex}$  - Änderung (5, 20, 40 und 60 mM). Das entspricht dem Membranpotential von -87mV, -50mV, -32mV und -21mV (Kapitel 3.9.2). Abbildung 3-36 zeigt drei Kalibrierungskurven, die unter unterschiedlichen pH-Werte erstellt wurden.

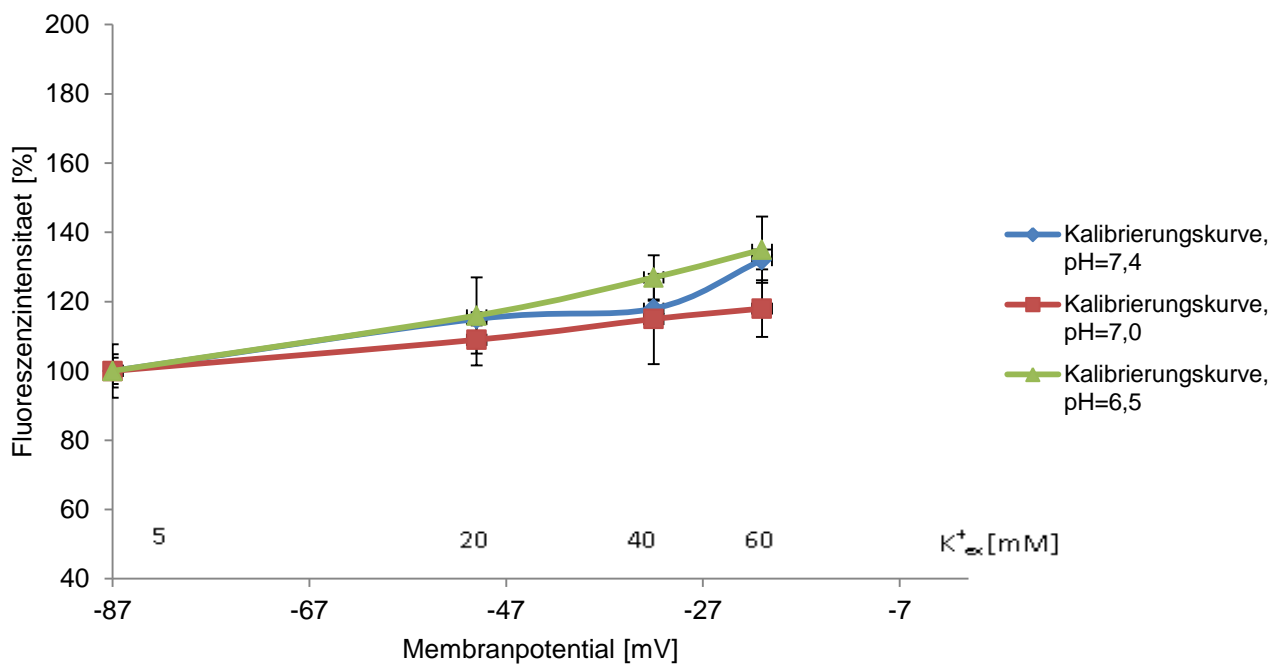


Abbildung 3-36: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in mit DiBAC<sub>4</sub>(3) markierten MCF 7 Zellen. Die Kalibrierlösung wurde auf drei unterschiedliche pH-Werte (7,4; 7,0 und 6,5) eingestellt.

Aus der Kurve kann man die Farbstoffempfindlichkeit ermitteln:

$$S_f = \left[ \left( 1 - \frac{F_{min}}{F_{max}} \right) / (E_{max} - E_{min}) \right] \times 100 \quad (3-2)$$

$$S_f = 0,37 \pm 0,03 \% / mV$$

Aus diesen Messungen geht hervor, dass mit einer Verschiebung des  $pH_{ex}$ -Wertes im Bereich von 6,5 bis 7,4 die Empfindlichkeit des Farbstoffes erhalten bleibt. Die Empfindlichkeit des Farbstoffes bei verschiedenen pH-Werte beträgt  $0,37 \pm 0,03 \% / mV$ .

Nachdem die Farbstoffempfindlichkeit bei unterschiedlichen pH-Werten ermittelt wurde, maß man das Membranpotential an den Zellen unter Variation der extrazellulären pH-Werte und Amilorid-Behandlung. Durch die metabolischen Messungen wurde die optimale Amiloridkonzentration von 40  $\mu$ M für die Behandlung der MCF-7 Zellen festgelegt. Diese Konzentration zeigte die größte Wirkung auf die MCF-7 Zellen [181].

### 3.10.2 Membranpotential-Messung an Zellen

Die Messung des Membranpotentials unter Variationen der extrazellulären pH-Werte an humanen Mammakarzinomzellen (MCF-7 Zellen) wurde, wie bereits beschrieben, mit dem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3) durchgeführt.

Der zeitliche Ablauf der Membranpotential-Messung wird in Abbildung 3-37 gezeigt.

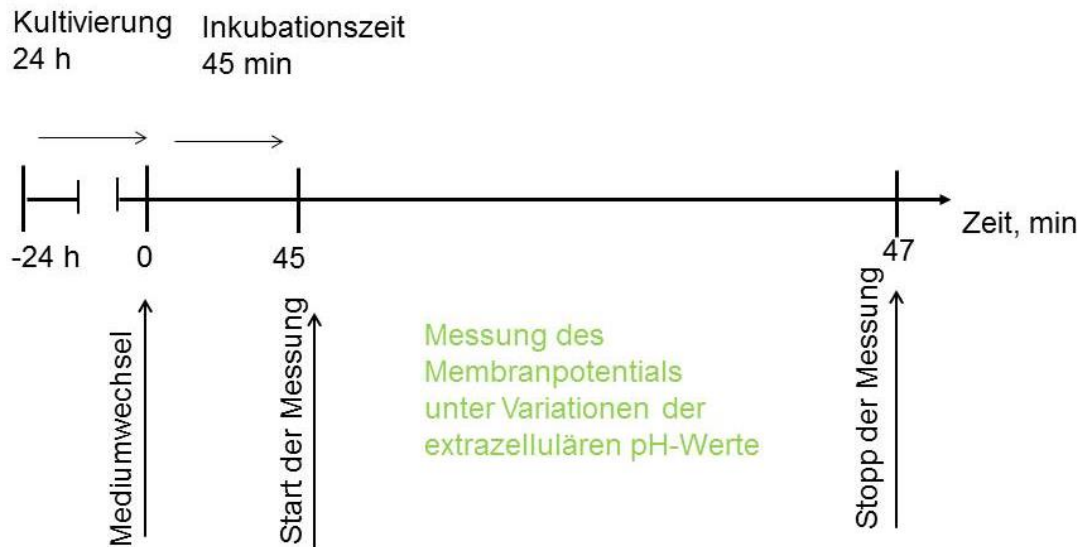


Abbildung 3-37: Schematischer zeitlichen Ablauf für die Messung des Membranpotentials an MCF-7 Zellen unter Variation der extrazellulären pH-Werte. Die Fluoreszenzintensität wurde mit dem Fluoreszenz Microplate Reader (FLUOstar Galaxy) gemessen.

24h vor dem geplanten Messbeginn wurden  $2,6 \times 10^4$  Zellen pro Well in 150µl Kulturmedium ausgesät und für 24h bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Vor Beginn der Messung wurde unter sterilen Bedingungen das Kulturmedium gegen HEPES (MES) gepufferte physiologische Lösung mit den verschiedenen pH-Werten (7,4; 7,0 und 6,5) unter Zugabe von 2µM DiBAC<sub>4</sub>(3) und 40µM Amilorid ausgetauscht. Die Zellen wurden mit den entsprechenden Lösungen 45 min im Inkubator ohne CO<sub>2</sub>-Begasung markiert. Im Anschluss wurde die Fluoreszenzintensität in einem Multiplaterereader detektiert. Die Proben wurden mit einer Wellenlänge von 485nm angeregt und das Emissionslicht bei 520nm gemessen. Die Fluoreszenzintensitätswerte wurden der Kalibrierungskurve entsprechend umgerechnet. Für die Messungen wurden immer zwei 96-Well-Platten mit Zellen angeimpft und gleichzeitig zwei weitere 96-Well-Platten mit Messmedien aufgefüllt. Bei der Auswertung wurde jeweils die an Medium ohne Zellen gemessene Signalstärke von der Signalstärke, die an Zellen gemessen war, subtrahiert. Dadurch wird das Hintergrundrauschen minimiert. Die Messungen erfolgten an nicht synchronisierten Zellen.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Eigenschaften der Elektroden

#### 4.1.1 Impedanzspektroskopie

Für die durch Impedanzspektroskopie gemessenen biologischen Effekte stehen nicht die elektrochemischen Prozesse, sondern die Effekte im Elektrolytmedium im Vordergrund. Wenn die Parameter für die Elemente des CPEs ermittelt werden können, lässt sich der Spannungsabfall an der Doppelschicht berechnen. Zur Ermittlung dieser Parameter führte man das Fitting an ein physikalisch begründbares Ersatzschaltbild (siehe Abbildung 3-8, Abbildung 4-1) durch.

Die elektrische Stimulation der Zellen sollte einerseits zu den gewünschten stimulierenden Effekten führen, aber andererseits keine zytotoxischen oder korrosiven Effekte erzeugen [47, 152]. Ziel der Messung war die Ermittlung des Ladungstrfers und der Stromdichten, die beim Anlegen einer Stimulationsspannung an den Elektroden entstehen.

Bei der Zweipunktmessung der Glas-Sensorchips zeigt sich der durch die steigende Frequenz abnehmende Impedanzwert.

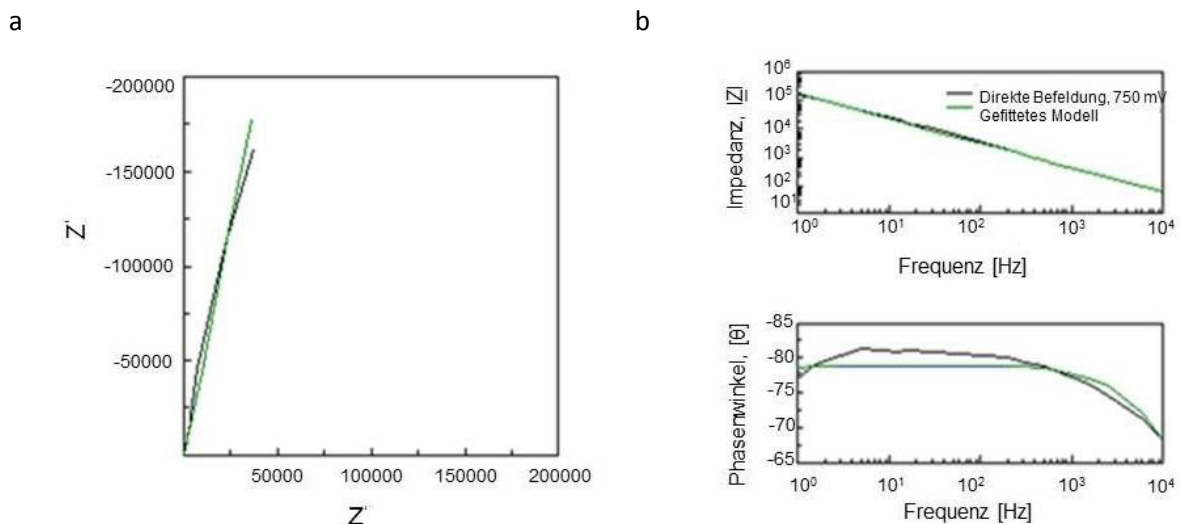


Abbildung 4-1: Nyquistplot der Impedanzwerte der untersuchten Mikroelektroden (Platin-Elektroden) in einer PBS Lösung (a); Phasenwinkel und Betrag der Impedanz von Mikroelektroden gemessen mit einer Spannung von 750mV (b).

Das Impedanzspektrum der verwendeten Platin-Mikroelektroden in PBS zeigen Abbildung 4-1. Im niederfrequenten Bereich geht die Impedanz in eine Gerade über, welche die Impedanz der Elektroden repräsentiert. Diese ist deutlich diffusionsabhängig. Das erhaltene Spektrum wurde über einen nichtlinearen komplexen Fit auf den gezeigten Äquivalentschaltkreis (Abbildung 3-8 und Abbildung 4-1) angepasst. Der Elektrolytwiderstand wird über den Widerstand  $R_E$  beschrieben. Um die Eigenschaften des Elektrode/Elektrolyt Überganges zu beschreiben, ist die Einführung von weiteren Kapazitäten und Widerständen erforderlich (Randle's ESB). Die Ergebnisse des Fittings (Abbildung 4-1, grüne Kurve) zeigt, dass der Elektrolytwiderstand bei  $12\Omega$  liegt.

Weiterhin wurde die Elektrodenimpedanz an passivierten und nicht passivierten Glas-Sensorchips gemessen. Die angelegte Spannung hat dabei bei niedriger Frequenz (<100Hz) einen großen Einfluss auf den Impedanzwert. Zu bemerken ist, dass sich bei beiden Stimulationsarten die Impedanzwerte mit steigender Frequenz sehr stark annähern und schließlich zusammenlaufen.

Bei der elektrischen Stimulation betrachtet man die Impedanz der Elektroden-Elektrolyt-Grenzfläche im Zusammenhang mit einer „safe stimulation charge“ (SSC). Die Höhe der SSC hängt zum einen von einer Doppelschichtkapazität (große Elektrodenfläche) und zum anderen von einer Pseudokapazität (elektrochemisch reversible charge-transfer Reaktionen an der Oberfläche) ab. Beide Faktoren verringern die Gesamtimpedanz der Elektroden.

Bei einer angelegten Spannung von 750mV und einer Frequenz von 1 Hz beträgt die Impedanz  $10^5\Omega$ . Für die weiteren Messungen sind die bei 100Hz, beziehungsweise bei 150kHz gemessenen Impedanzwerte, von Interesse. Für 100Hz ergeben sich bei direkter Stimulation Werte von bis zu 4k $\Omega$  bei einer Höhe der angelegten Spannung von 750mV, die ab 150kHz bei 60 $\Omega$  konvergieren.

Mit diesen Daten kann die an den Elektroden fließende Stromstärke bestimmt werden. Die Elektrodenfläche (IDES) am Glas-Sensorchip beträgt 0,08cm<sup>2</sup>. Daraus ergibt sich bei einer Frequenz von 100Hz und der Anregungsspannung von 750mV eine Stromdichte von 2,3mA/cm<sup>2</sup> und bei einer Frequenz von 150kHz eine Stromdichte von 156mA/cm<sup>2</sup>.

Damit lässt sich der Ladungstransfer von Platin-Elektroden in das Medium berechnen. Bei einer Anregungsspannung von 750mV und einer Signaldauer von 10ms (100Hz) beträgt der Ladungstransfer 23 $\mu$ Q/cm<sup>2</sup> (Elektrodenfläche 0,08cm<sup>2</sup>), bei einer Signaldauer von 6,7 $\mu$ s (150kHz) beträgt der Ladungstransfer 1 $\mu$ Q/cm<sup>2</sup>.

Die typischen Stimulationsparameter bei Platin-Elektroden, die für die Neurostimulation benutzt werden, liegen im Bereich von 1 bis 4mA Strom (bei einer Elektrodenfläche von 0,005 bis 0,01cm<sup>2</sup>), Pulsdauern von 500-1000 $\mu$ s und Wiederholungsraten von 10 bis 100Hz [39, 40]. In unserem Fall liegt der Strom im Bereich von 0,2mA (Elektrodenfläche 0,08cm<sup>2</sup> und Pulsdauer 10ms) bis 12,5mA (Elektrodenfläche 0,08cm<sup>2</sup> und Pulsdauer 6,7 $\mu$ s). Bei kapazitiver Feldeinspeisung und gepulster biphasischer Anregungsspannung zwischen -600mV und 900mV (Signaldauer 0,2ms) treten laut Literatur erst ab einem Ladungstransfer von 50-150 $\mu$ Q/cm<sup>2</sup> irreversible Elektrodenreaktionen an Platin-Elektroden auf [184, 187]. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass der Ladungstransfer unter den Werten liegt, ab denen irreversible Elektrodenreaktionen auftreten. Dadurch können nicht-reversible Faraday-Reaktionen vermieden werden.

Die Impulse für die Stimulation wurden spannungsgesteuert abgesetzt. Die optimalste Signalform für die Minimierung der elektrochemischen Effekte ist ein biphasisches sinusförmiges Signal. Bei einem monophasischen gepulsten Signal muss die Wiederholungsrate niedrig sein, um irreversible elektrochemische Effekte zu minimieren. Während kurze Impulse (10–100 $\mu$ s) vorteilhaft zur Vermeidung irreversibler Faraday-Reaktionen sind, verlangen biologische Systeme längere Impulse (Zeitkonstanten vieler Ionenkanäle) [152].

Weiterhin wurde das Impedanzverhalten der Elektroden des Glas-Sensorchips bei verschiedenen Anregungsspannungen (von 200mV bis 750mV) und steigender Frequenz untersucht. Dabei wurde zudem der Einfluss der Passivierung auf das Elektrodenverhalten charakterisiert. Das Bode-Diagramm der untersuchten Mikroelektroden (Platin-Elektroden) in einer PBS Lösung zeigt Abbildung 4-2. Dabei wurden der Phasenwinkel und der Betrag der Impedanz der Mikroelektroden mit einer Spannung von 200mV, 500mV und 750mV im Frequenzbereich von 1Hz bis 10<sup>6</sup>Hz gemessen. Das elektrische Feld wurde direkt und kapazitiv eingekoppelt.



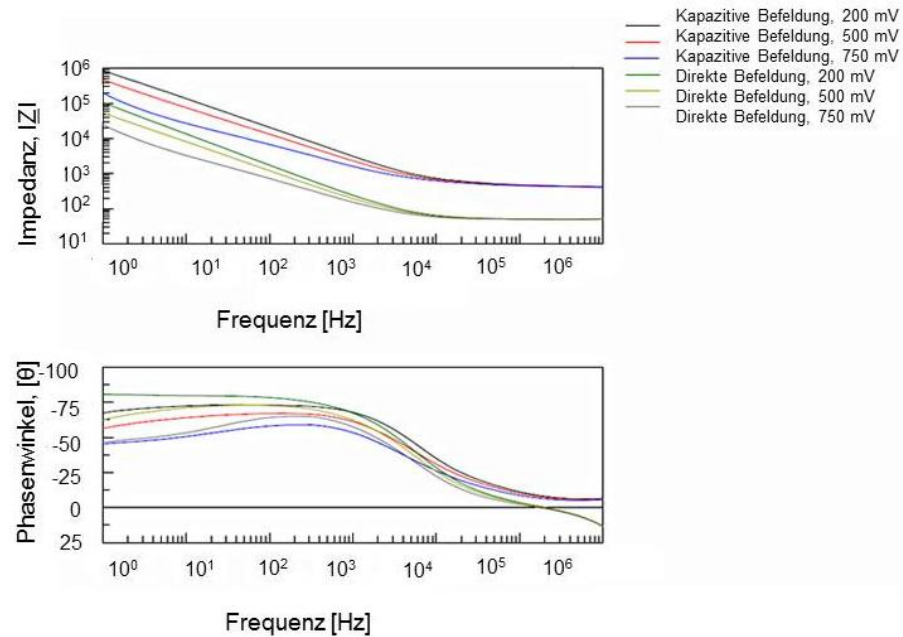


Abbildung 4-2: Impedanzmessung ohne Zellen: Direkte und kapazitive Feldeinspeisung. Bode-Diagramm der untersuchten Mikroelektroden (Platin-Elektroden) in einer PBS Lösung. Phasenwinkel und Betrag der Impedanz von Mikroelektroden, gemessen mit einer Spannung von 200mV, 500mV und 750mV im Frequenzbereich von 1Hz bis  $10^6$ Hz.

Diese Messergebnisse zeigen, wie stark eine Passivierung die Stromdichten reduziert und welchen Einfluss sie auf die Impedanzwerte nimmt.

Bei einer angelegten Spannung von 750mV beträgt die Impedanz der passivierten Elektroden des Glas-Sensorchips ca.  $4 \times 10^5 \Omega$ . Für 100Hz ergeben sich bei kapazitiver Stimulation Impedanzwerte von bis zu 10k $\Omega$  bei der Höhe der angelegten Spannung von 750mV, die ab 150kHz bei 600 $\Omega$  konvergieren.

#### 4.1.2 Ermittlung des Faraday'schen Stromanteils

Trotz der Analogie zwischen einem elektrischen und einem elektrochemischen System bestehen einige Unterschiede. Elektrochemische Systeme sind nicht-linear und das Stromverhalten zu Spannungsverhalten ist eher exponentiell (Butler-Volmer-Gleichung). In elektrischen Systemen ist dieses Verhalten linear (Ohmsches Gesetz). Weiterhin unterscheidet sich das Verhalten von solchen Systemen mit der Zeit. Zudem enthalten elektrochemische Systeme oft aktive Elemente. Elektrische Systeme bestehen dagegen meist aus passiven Elementen [89, 144].

Um das nicht-lineare Verhalten der elektrochemischen Reaktionen an den Elektroden zu charakterisieren, wurden chronoamperometrische Messungen durchgeführt. Anhand der gemessenen Ströme wurde dabei abgeschätzt, welchen Anteil der Faraday'sche Strom am Gesamtstrom, der an den Elektroden abfließt, leistet.

Die Graphen zeigen den Stromdichtenverlauf gegen die Zeit mit Intervallen von positiver (anodischer) Spannung von 750mV (10 ms) und Open Circuit-Bedingungen.

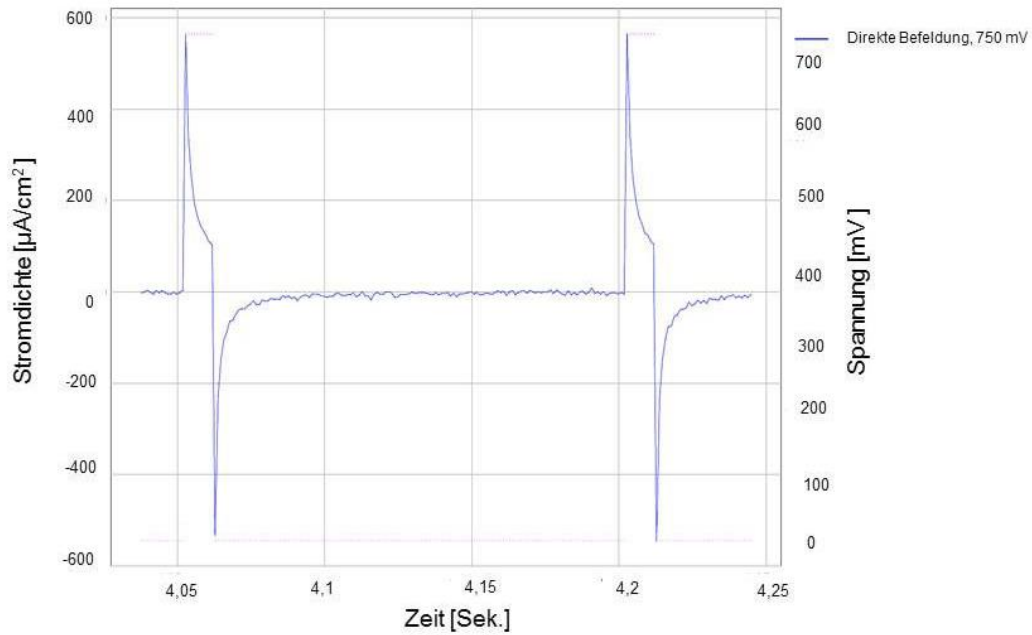


Abbildung 4-3: Chronoamperometrie: Stromdichteverlauf gemessen an den IDEs des Glas-Sensorchips. Direkte elektrische Stimulation mit 750mV.

Der Spannungsabfall über das Messsystem ist gleich [91]

$$U = IR_E + \frac{Q}{C_D}, \text{ wobei } C_D = \frac{Q}{U_D} \quad (4-1)$$

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{-Q}{R_E C_D} + \frac{U}{R_E} \quad (4-2)$$

Über eine Integration lassen sich daraus die Ladung  $Q$  und der Stromverlauf  $I$  bestimmen:

$$Q = UC_D(1 - e^{-\frac{t}{R_E C_D}}) \quad (4-3)$$

$$I = \frac{dQ}{dt} = \frac{U}{R_E} e^{-\frac{t}{R_E C_D}} \quad (4-4)$$

Die Zeitkonstante des Abklingvorgangs weist einen Wert von  $\tau_{\text{direkt } 750\text{mV}} = 0,004 \text{ s}$  auf (siehe Abbildung 4-3). Der Elektrolytwiderstand beträgt  $12\Omega$  (Kapitel 4.1.1). Damit berechnet sich die Pseudokapazität zu  $C_{ps} = 4 \times 10^{-4} \text{ F}$  ( $\tau = R_E C_{ps}$ ).

Unter der Annahme, dass die spezifische Doppelschichtkapazität der Platin-Elektroden im Bereich von  $10\mu\text{F}/\text{cm}^2$  bis  $30\mu\text{F}/\text{cm}^2$  liegt und die Elektrodenfläche ca.  $13\text{mm}^2$  beträgt, ist die Doppelschichtkapazität  $C_D = 2,5 \times 10^{-6} \text{ F}$  groß [79]. Die Doppelschichtkapazität ist von Faktoren wie der angelegten Spannung, der Elektrolytleitfähigkeit und dem Elektrodenmaterial abhängig [79].

Die unten stehende Abbildung 4-4 zeigt schematisch den kapazitiven und den Faraday'schen Stromverlauf.

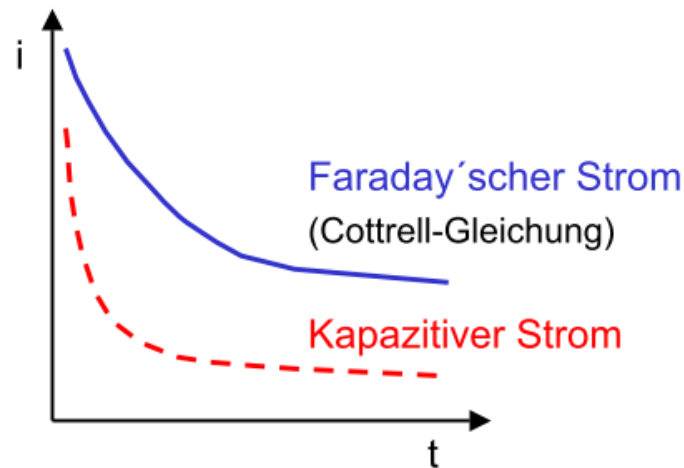


Abbildung 4-4: Theoretischer Stromverlauf an Elektroden: Kapazitiver Strom (rote Kurve); Faraday'scher Strom (blaue Kurve). Entnommen aus [2].

Die Fläche  $A_{\text{ges}}$  unter der gemessenen Kurve repräsentiert die Gesamtladung durch das System (gemessener Stromverlauf während der Signaldauer 10msec):

$$A_{\text{ges}}=Q_{\text{ges}}=UC_{ps}\left(1-e^{-\frac{t}{R_E C_{ps}}}\right) \quad (4-5)$$

wobei  $t_1=0$ ;  $t_2=10\text{msec}$  (Signaldauer)

$$A_{\text{ges}}=750 \times 10^{-3} \left(1 - e^{-\frac{10^{-2}}{12 \times 4 \times 10^{-4}}}\right) \text{As}$$

$$A_{\text{ges}}= 2,56 \times 10^{-4} \text{As}$$

Zunächst ermitteln wir die Fläche  $A_{\text{kap}}$  unter dem kapazitiven Strom:

$$A_{\text{kap}}=Q_D=UC_D\left(1-e^{-\frac{t}{R_E C_D}}\right) \quad (4-6)$$

wobei  $t_1=0$ ;  $t_2=10\text{msec}$  (Signaldauer)

$$A_{\text{kap}}=750 \times 10^{-3} \left(1 - e^{-\frac{10^{-2}}{12 \times 2,5 \times 10^{-6}}}\right) \text{As}$$

$$A_{\text{kap}}= 0,02 \times 10^{-4} \text{As}$$

Daraus ergibt sich, dass die Ladungen des Faraday'sche Stroms ca. 99% von der Gesamtladung betragen. Der kapazitive Ladungsanteil liegt bei ca. 1%. Das hat zur Folge, dass der größte Teil der Ströme, die in diesem System abfließen, Faraday'sche Ströme sind. Diese Daten wurden für die Pulsspannung mit einer Amplitude von 750mV und Signaldauer von 10msec bestimmt.

### 4.1.3 Messungen mit MCF-7 Zellen

Weiterhin führt der Bewuchs der Glas-Sensorchips mit Zellen zu einem veränderten Impedanzwert an den IDEs. Für die Befeldungsversuche ist es wichtig, die veränderten Impedanzwerte zu kennen, da dies Rückschlüsse auf die an den Zellen fließenden Ströme ermöglicht.

Das Impedanzverhalten von mit MCF-7 Zellen bewachsenen Glas-Sensorchips wurde bei verschiedenen Anregungsspannungen (von 200mV bis 750mV) und in Abhängigkeit von der Frequenz untersucht. Das Bode-Diagramm der untersuchten Mikroelektroden (Platin-Elektroden) in einer PBS Lösung zeigt Abbildung 4-5. Die Glas-Sensorchips sind mit den Zellen bewachsen. Dabei wurden der Phasenwinkel und der Betrag der Impedanz von Mikroelektroden mit einer Spannung von 200mV, 500mV und 750mV im Frequenzbereich von 1Hz bis  $10^6$ Hz gemessen (siehe Kapitel 3.6.3). Das elektrische Feld wurde direkt und kapazitiv eingekoppelt.

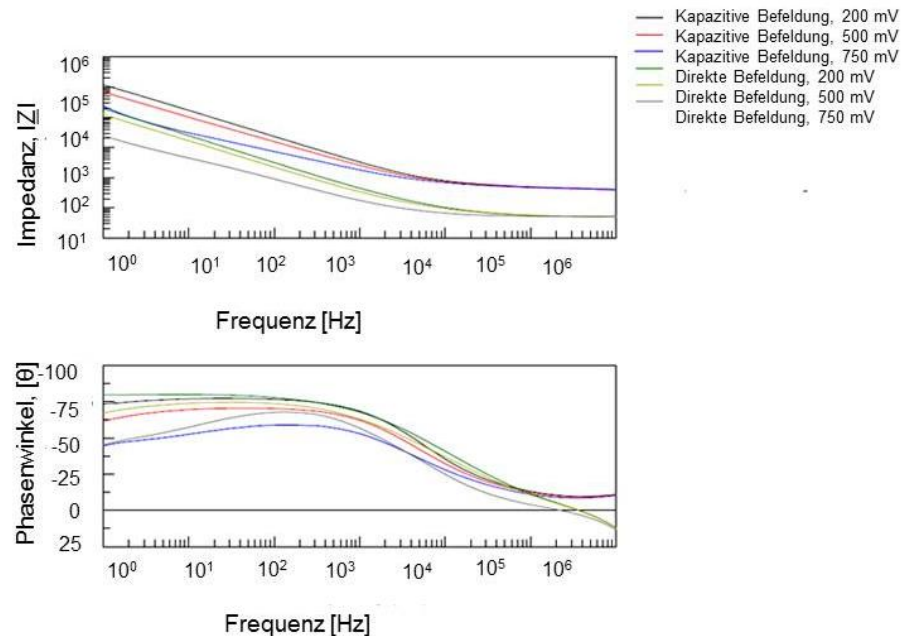


Abbildung 4-5: Impedanzmessung mit MCF-7 Zellen: Direkte und kapazitive Feldeinspeisung. Bode-Diagramm: Phasenwinkel und Betrag der Impedanz von Mikroelektroden gemessen mit einer Spannung von 200mV, 500mV und 750mV im Frequenzbereich von 1Hz bis  $10^6$ Hz.

Bei Spannungsamplituden unter 750mV bewirkt der Bewuchs mit MCF-7 Zellen eine Erhöhung des Impedanzwertes. Ebenso ist der Kurvenverlauf zu dem zellfreien Glas-Sensorchip unterschiedlich. Die einzelnen Kurven konvergieren später und nicht so gleichmäßig wie bei Abbildung 4-2. Für die weiteren Messungen sind die bei 100Hz, beziehungsweise bei 150kHz gemessenen Impedanzwerte von Interesse. Für 100Hz ergeben sich bei direkter Stimulation Werte zwischen  $1\text{k}\Omega$ - $4\text{k}\Omega$ , abhängig von der Höhe der angelegten Spannung, die ab 150kHz bei  $60\Omega$  konvergieren. Die Messung mit dem Glas-Sensorchip mit kapazitiver Stimulation führt hier zu Werten zwischen  $10\text{k}\Omega$ - $30\text{k}\Omega$  und einem minimalen Impedanzwert bei 150kHz von  $1000\Omega$ .

Weiterhin wurden die Stromdichten an mit Zellen bewachsenen Glas-Sensorchips bestimmt (siehe Abbildung 4-6). Im Vergleich zur Referenzmessung sind die Zeitkonstanten von direk-

ter und kapazitiver Stimulation größer. Sie betragen  $\tau_{\text{direkt } 750 \text{ mV}} = 0,007 \text{ s}$  und  $\tau_{\text{kapazitiv } 750 \text{ mV}} = 0,012 \text{ s}$ .

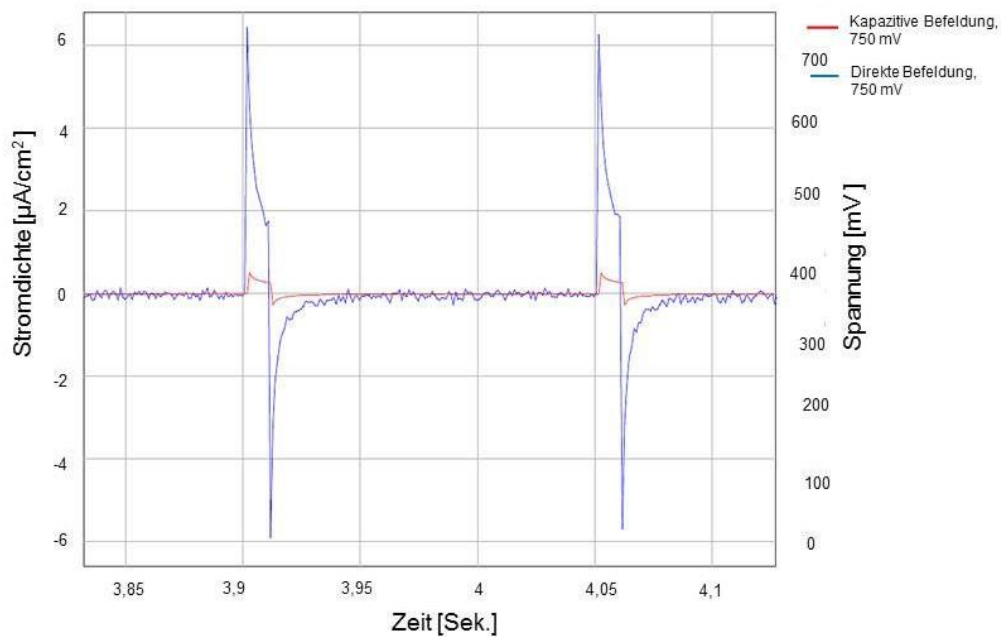


Abbildung 4-6: Stromdichteverlauf gemessen an den IDEs der Glas-Sensorchips; Messung mit MCF-7 Zellen – Direkte elektrische Stimulation mit 750mV (blau); Kapazitive elektrische Stimulation mit 750mV (rot).

Diese Messungen zeigen eine 10-fache Stromdichtenerhöhung bei nicht passivierten Elektroden des Glas-Sensorchips im Vergleich zu passivierten Glas-Sensorchips.

## 4.2 Numerische Modellierung des Spannungs- und Feldverlaufs

### 4.2.1 Direkte elektrische Stimulation: Sinusförmige elektrische Felder, 100 Hz und 150 kHz

Mit dem in Kapitel 3.7.1 (siehe Abbildung 3-11) vorgestellten Simulationsmodell ergibt sich der in Abbildung 4-7 dargestellte Potentialverlauf in und an einer Zelle, die sich zwischen zwei Stimulationselektroden in einem Messmedium befindet, bei einer Frequenz von 100Hz (Abbildung 4-7, a) und von 150kHz (Abbildung 4-7, b). Die an der rechten Elektrode angelegte Spannung beträgt 750mV.

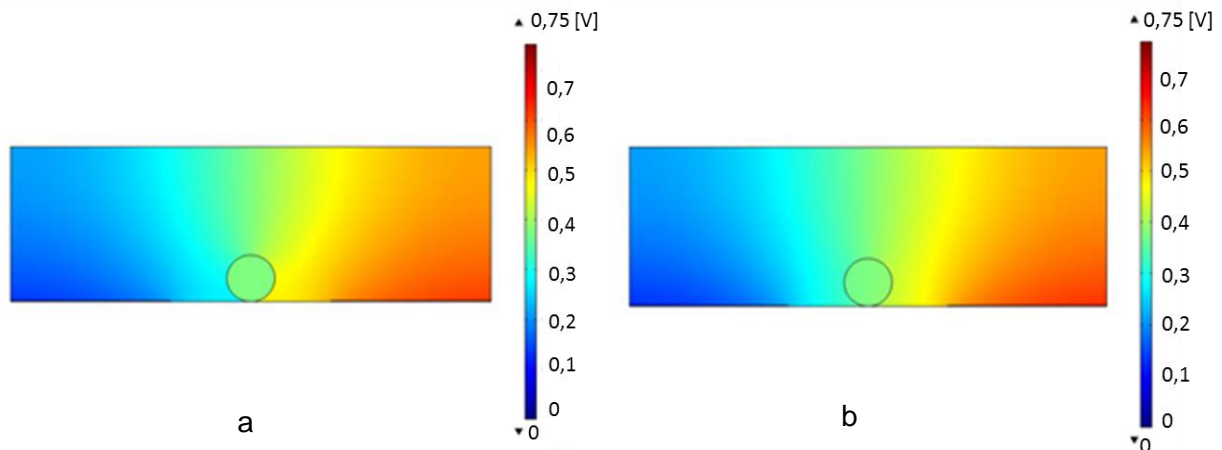


Abbildung 4-7: Spannungsverlauf in der Simulation in und an einer Zelle, die sich zwischen zwei Stimulationselektroden in einem Messmedium befindet, mit einer Stimulationsspannung von 750mV und einer Frequenz von 100Hz (a) und 150kHz (b). Unten links und rechts von der Zelle sind zwei Stimulationselektroden angebracht.

Um die sprunghafte Abnahme des Potentials an den Grenzschichten gut zu verdeutlichen, zeigt Abbildung 4-9 den Spannungsabfall durch den Messaufbau. Man erstellt eine Gerade, die sogenannte Cut Linie 2D, die für jeden Punkt der X-Achse die Spannung misst (blaue Linie in der Abbildung 4-8).

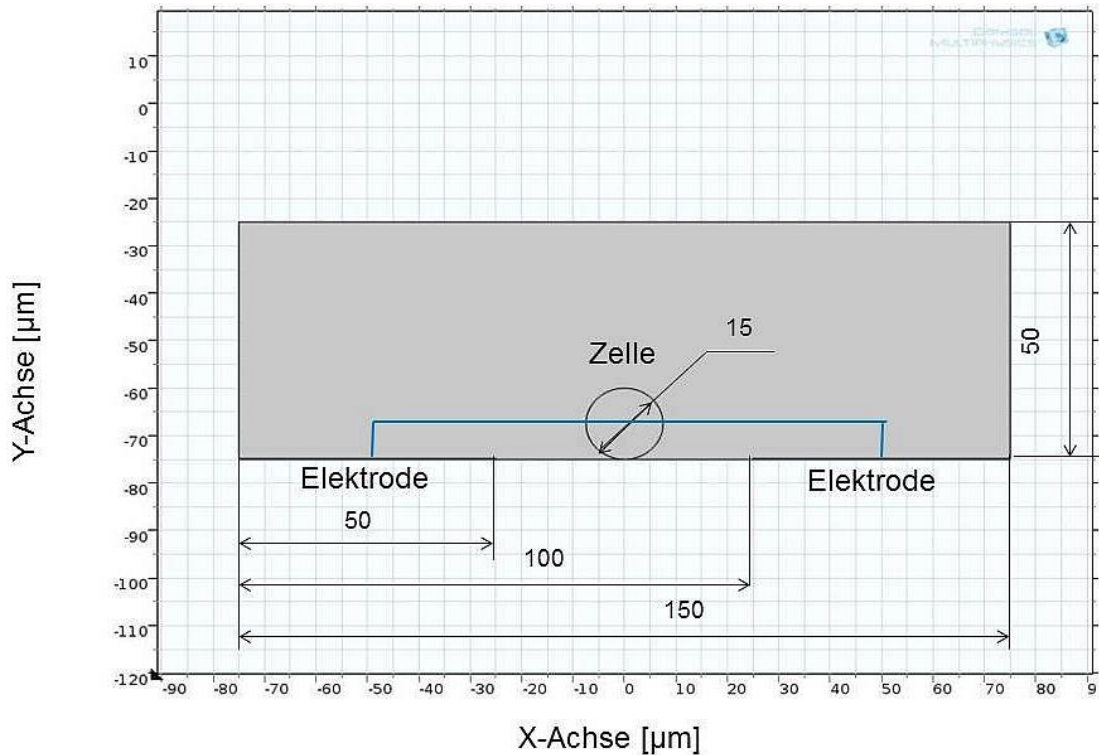


Abbildung 4-8: Simulationsmodell einer Zelle zwischen zwei Elektroden in  $[\mu\text{m}]$ , Seitenansicht. In Blau ist die Linie markiert, deren entlang des Spannungsabfalls gemessen wurde. Unten links und rechts von der Zelle sind zwei Stimulationselektroden angebracht.

Daraus resultiert folgender Graph:

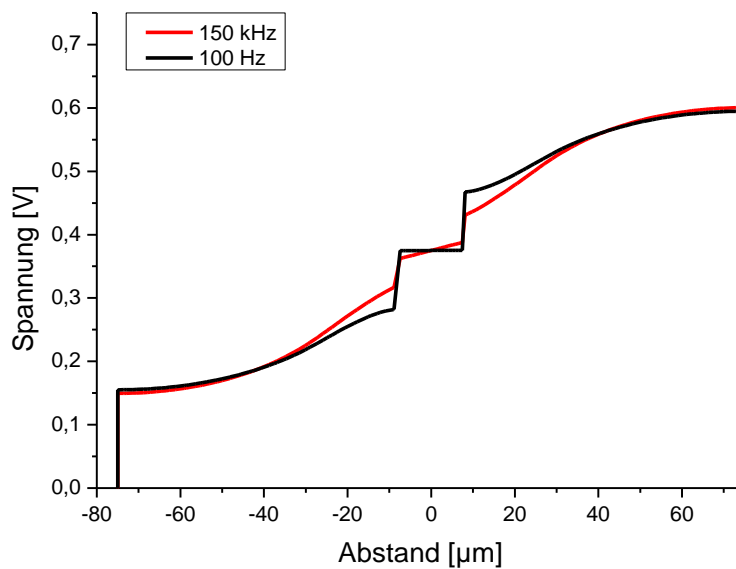


Abbildung 4-9: Spannungsabfall  $[\text{V}]$  durch den Messaufbau (schwarze Linie in Abbildung 4-8) am Grenzübergang Elektrode/Elektrolyt entlang der X-Achse  $[\mu\text{m}]$  und der Zellebene für die Frequenzen  $f=100\text{Hz}$  (schwarze Kurve) und  $f=150\text{kHz}$  (rote Kurve).

Der Spannungsabfall ist abhängig von der Frequenz. Mit steigender Frequenz wird der Abfall an den Grenzen (Übergang Elektrode/Elektrolyt, Elektrolyt/Zellmembran) kleiner. Die Simulation zeigt einen Spannungsabfall an den Elektroden von 0,16V und 0,15V bei den Frequenzen 100Hz und 150kHz. Weiterhin zeigt diese Simulation dem Aufbau eines Spannungsgradienten in der Zelle bei einer Stimulationsfrequenz von 150kHz. Bei einer Frequenz von 100Hz ist der Spannungsgradient in der Zelle dagegen deutlich schwächer ausgeprägt. Die Spannungsversorgung erfolgt an der rechten Elektrode, die andere Elektrode ist auf Masse gelegt. Erkennbar ist, dass die Zellmembran das Innere der Zelle von dem elektrischen Feld, das durch die Elektroden erzeugt wurde, abschirmt. Die räumliche Verteilung der elektrischen Feldstärken um und in einer Zelle zwischen zwei Elektroden, die sich bei Anlegen einer Stimulationsspannung von 750mV ergibt, zeigt die Abbildung 4-10.

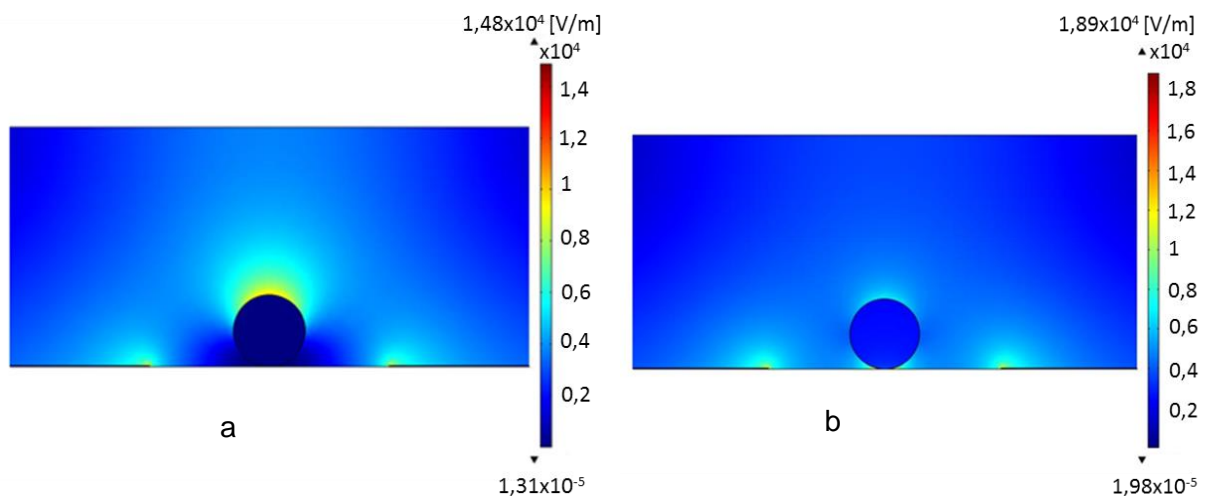


Abbildung 4-10: Berechneter Feldverlauf in und an einer Zelle, die sich zwischen zwei Stimulationselektroden in einem Messmedium befindet, mit einer Stimulationsspannung von 750mV und einer Frequenz von 100Hz (a) und 150kHz (b).

Die in Comsol berechneten Feldstärken im Zellinneren belaufen sich bei der Frequenz von 100Hz auf maximal 3,21V/m. Im extrazellulären Medium treten gleichzeitig Feldstärken im Bereich von 2-4kV/m auf. Um die Zelle herrschen relativ gleichmäßige Feldstärken. Eine Ausnahme bilden die Bereiche an den Elektrodenecken und die Feldstärke am höchsten Punkt der Zelle bei der Frequenz von 100Hz.

Bei der direkten Stimulation durch ein elektrisches Feld, das mit 150kHz Frequenz erzeugt wird, verliert die Membran ihre isolierende Eigenschaft. Dies ermöglicht es dem elektrischen Feld, auf das Zellinnere einzuwirken. Die durch Comsol ermittelten Feldstärken im Zellinneren belaufen sich dabei maximal auf 2,3kV/m. In der extrazellulären Umgebung treten gleichzeitig Feldstärken von bis zu 4-6kV/m auf.



#### 4.2.2 Kapazitive elektrische Stimulation: Sinusförmige elektrische Felder, 100Hz und 150 kHz

Mit dem in Kapitel 3.7.2 (siehe Abbildung 3-12) vorgestellten Simulationsmodell ergibt sich der in Abbildung 4-11 dargestellte Potentialverlauf an einer Tumorzelle, die sich zwischen zwei Elektroden auf den Boden eines Wells befindet, bei einer Frequenz von 100Hz (Abbildung 4-11, a) und 150kHz (Abbildung 4-11, b). Die an der rechten Elektrode angelegte Spannung beträgt 15V.

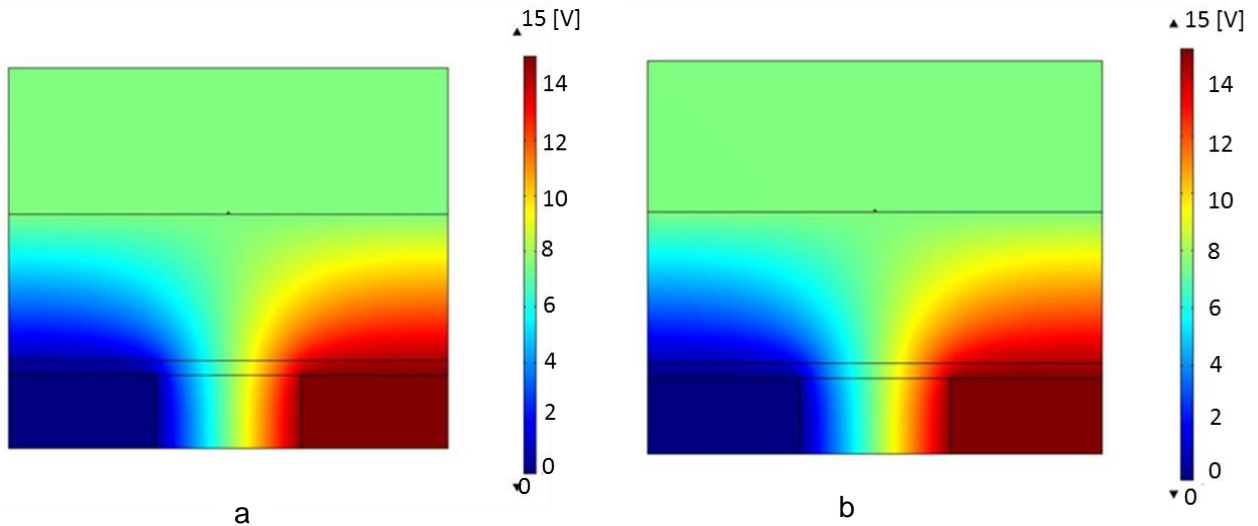


Abbildung 4-11: Berechneter Spannungsverlauf am Boden eines Wells der 6-Well-Platte in und an einer Zelle, die sich am Boden eines Wells der 6-Well-Platte befindet. Die 6-Well-Platte ist auf eine Befeldungsplatte gestellt. Die Zellen wurden mit einer Spannung von 15V und einer Frequenz von 100Hz (a) und 150kHz (b) stimuliert. Der Elektrodenabstand beträgt 1 mm.

Eine räumliche Verteilung der elektrischen Feldstärke am Boden des Wells einer 6-Well-Platte zwischen zwei Fingern der IDEs Elektroden, die sich bei Anlegen einer Stimulationsspannung von 15V ergibt, zeigt die Abbildung 4-12.

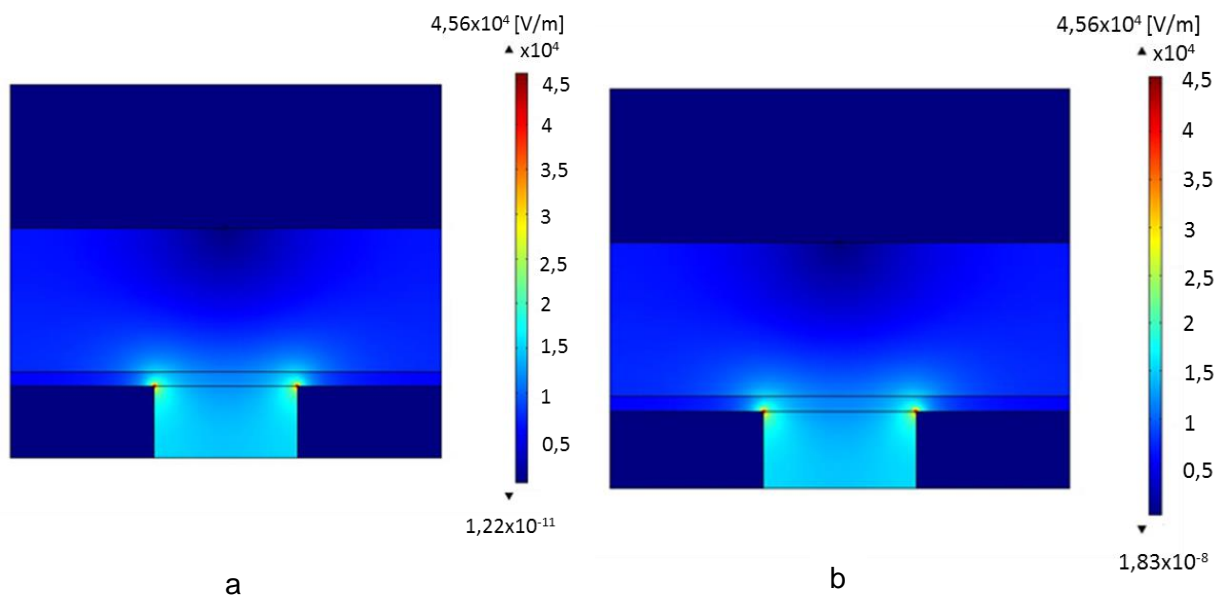


Abbildung 4-12: Berechneter Feldverlauf am Boden eines Wells der 6-Well-Platte in und an einer Zelle, die sich am Boden eines Wells der 6-Well-Platte befindet. Die 6-Well-Platte ist auf eine Befeldungsplatte gestellt. Die Zellen wurden mit einer Spannung von 15V und einer Frequenz von 100Hz (a) und 150kHz (b) stimuliert. Der Elektrodenabstand beträgt 1mm.

Ebenso wie bei der direkten Stimulation durchdringt das elektrische Feld die Zellmembran. Durch die kapazitive Stimulation ist die Feldstärke sowohl am Boden des Wells als auch in der Zelle durch die isolierende Lötstopplackschicht und den Kunststoffboden der 6-Well-Platte wesentlich abgeschwächt. Aus diesem Grund müssen die Zellen mit einer viel höheren Spannung stimuliert werden, um die gleiche Feldstärke in und an der Zelle wie bei der direkten Stimulation zu erzielen. Laut Simulation soll die Anregungsspannung bei 10kV (Frequenz 150kHz, Elektrodenabstand 1mm, Zellen am Boden eines Wells der 6-Well-Platte) liegen. So eine hohe Spannung ist bei diesem Versuchsaufbau schwer zu gewährleisten, da sie zu Überschlügen führen kann. Die abgeschätzten Spannungswerte, bei denen es zu keinem Durchschlag kommen kann, liegen unter 5,7kV. Die Durchschlagsspannung errechnet sich aus der Durchschlagsspannung der Lötstopplack-Schicht (Durchschlagfestigkeit  $150\text{V}/\mu\text{m}$ , Schichtdicke  $8\mu\text{m}$  [219]) und der Durchschlagsspannung der Luft (Durchschlagfestigkeit  $3,3\text{kV}/\text{mm}$  [216], Abstand 1mm), (siehe Abbildung 4-13).

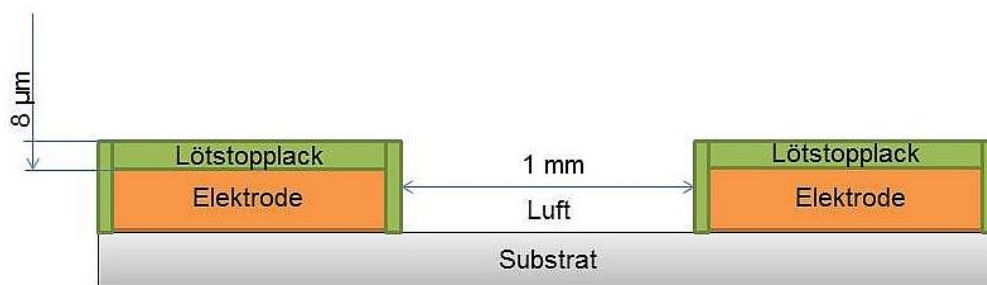


Abbildung 4-13: Seitenansicht eines Teils der Befeldungsplatine mit IDEs-Abstand 1 mm. Auf einem Glas-Substrat (grau) sind Elektroden-Strukturen (gelb) aufgetragen. Diese sind mit einem Lötstopplack (grün) mit einer Schichtdicke von  $8\mu\text{m}$  überzogen. Die Elektroden-Strukturen haben einen Abstand von 1mm (3mm). Die Elektrodenquerschnittslänge beträgt ebenso jeweils 1mm (3mm).

Aus diesem Grund wurden die Zellen mit der maximalen Spannung, die mit dem verwendeten Signalgenerator erzeugt werden kann (15V), stimuliert. Hier sollte geklärt werden, ob viel kleinere Feldstärken einen Einfluss auf die Zellproliferation und den Zellmetabolismus nehmen.

Für den Elektrodenabstand von 1mm (Elektrodenfläche  $34\text{mm}^2$ ) ergeben sich im Inneren des Wells Feldstärken von maximal  $2,6 \times 10^{-3}\text{V}/\text{m}$  (bei einer Frequenz von 100Hz) und  $4\text{V}/\text{m}$  (bei einer Frequenz von 150kHz) und im Inneren der Zelle von maximal  $1,7 \times 10^{-6}\text{V}/\text{m}$  (100 Hz) und  $2,4\text{V}/\text{m}$  (150kHz) (siehe Abbildung 4-12).

Für den Elektrodenabstand von 3mm (Elektrodenfläche  $102\text{mm}^2$ ) betragen die mittels Comsol aufgezeichneten Werte im Inneren der Zelle maximal  $6,5 \times 10^{-7}\text{V}/\text{m}$  (bei einer Frequenz von 100Hz) und  $0,85\text{V}/\text{m}$  (bei einer Frequenz von 150kHz), außerhalb  $7,2 \times 10^{-4}\text{V}/\text{m}$  (100Hz) und  $1,4\text{V}/\text{m}$  (150kHz) (siehe Anhang C, Kapitel 6.3.1).

Bei direkter Stimulation beträgt die Feldstärke, die bei 750mV Spannung und 150kHz erzeugt wird, im Zellinneren maximal  $2,3\text{kV}/\text{m}$ . In der extrazellulären Umgebung treten gleichzeitig Feldstärken bis zu  $4\text{-}6\text{kV}/\text{m}$  auf (Kapitel 4.2.1).

### 4.3 Elektrische Stimulation: Direkte Feldeinspeisung, niederfrequente gepulste elektrische Felder, 100 Hz

Das Proliferationsverhalten der Zellpopulation wurde mit Hilfe der Messung des Zellmetabolismus und einer Zellzahlbestimmung im Falle der direkten elektrischen Stimulation und fluorimetrischer Resazurin-Messungen der Proben im Falle der kapazitiven elektrischen Stimulation bestimmt. Alle Einzelwerte wurden mit parallel geführten Kontrollversuchen verglichen.

#### 4.3.1 Teilungsverhalten: Zellzahlbestimmung bei stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (MDA-MB-231 Zellen)

Um eine Aussage über die langfristigen Auswirkungen eines extern applizierten niederfrequenten elektrischen Feldes auf das Teilungsverhalten von Tumorzellen treffen zu können, wurden humane Mammakarzinomzellen (MDA-MB-231 Zellen) auf einem am HNLME entwickelten, multiparametrischen Glas-Sensorchip stimuliert (siehe Abbildung 3-4). Die Zellen wurden elektrisch für 21h mit einem Rechteck-Puls von 750mV, monopolar, Periodendauer 10ms und einem Tastverhältnis von 1:15 befördert. Nach der Stimulation wurden diese Zellen vom Glassubstrat abgelöst und gezählt (siehe Abbildung 4-14).

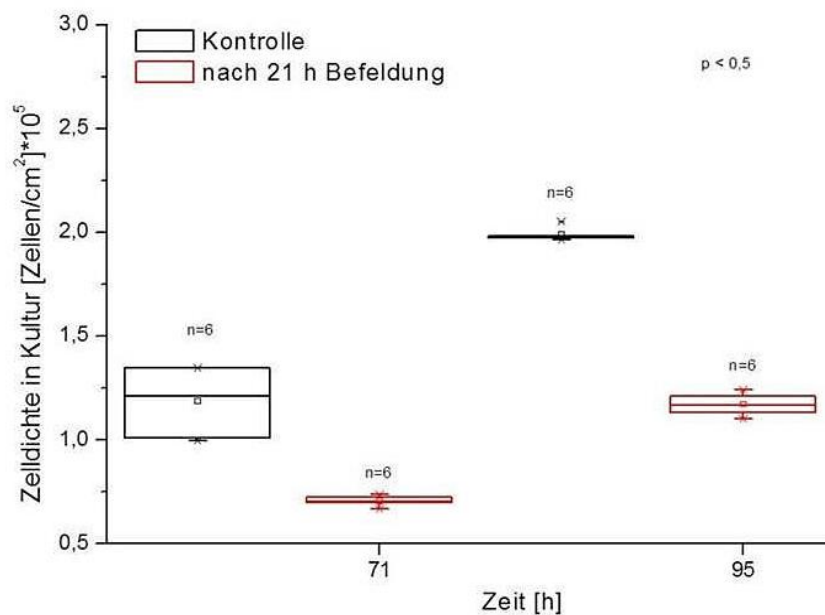


Abbildung 4-14: Einfluss der elektrischen Felder, auf das Teilungsverhalten von MDA-MB-231 Zellen nach 71h/95h in Kultur auf Glas-Sensorchips. Die Zellen wurden mit einem direkt eingekoppelten elektrischen Feld stimuliert. Daraufhin wurden die Wachstumsänderung und damit der Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Zellen bestimmt. Nach 50h der Kultivierung wurden zwei Glas-Sensorchips zum Versuch aufgebaut und für 21h stimuliert. Nach der Befeldung, 71h nach Aussaat, wurde der erste Versuch abgebaut und die Zellzahl auf den befeldeten Glas-Sensorchips und dem Kontrollchip bestimmt. 74h nach Aussaat wurde die nächsten Versuche mit 2 weiteren Glas-Sensorchips gestartet. Diese wurden ebenfalls 21h lang befördert und im Anschluss die Zellzahl ermittelt. Nach 21h Befeldung fiel die Zellzahl um ca. 40%.

Die Untersuchung des Teilungsverhaltens der MDA-MB<sub>231</sub> Zellen, die einem niederfrequenten elektrischen Feld ausgesetzt waren, zeigte eine um ca. 40% reduzierte Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Unterschiede zwischen zwei Gruppen zur 71. und 95. Stunde wurden mit Hilfe eines t-Tests auf Signifikanz überprüft. Sie zeigen signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) (siehe Anhang D).

#### 4.3.2 Teilungsverhalten: Zellzahlbestimmung bei stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen (MCF-7 Zellen)

Weiterhin wurden Messungen mit dem IMR-System durchgeführt, welche die Aussagekraft erhöhen sollen. Dieses System ermöglicht Parallelmessungen zum oxidativen und nicht-oxidativen Zellmetabolismus während einer elektrischen Stimulation in Echtzeit.

Da die Mammakarzinomzellen (MCF-7 Zellen) stärkere Signaländerungen als MDA-MB-231 Zellen liefern, wurden die weiteren Messungen mit MCF-7 Zellen durchgeführt.

Das Teilungsverhalten von elektrisch stimulierten Zellen gegenüber nicht stimulierten Zellen zeigt Abbildung 4-15. Die Zellen wurden vorher in einer Multiwellplatte im IMR-System kultiviert (12h Vormesszeit und 30h elektrische Stimulation). Die Messung wurde zweimal durchgeführt.

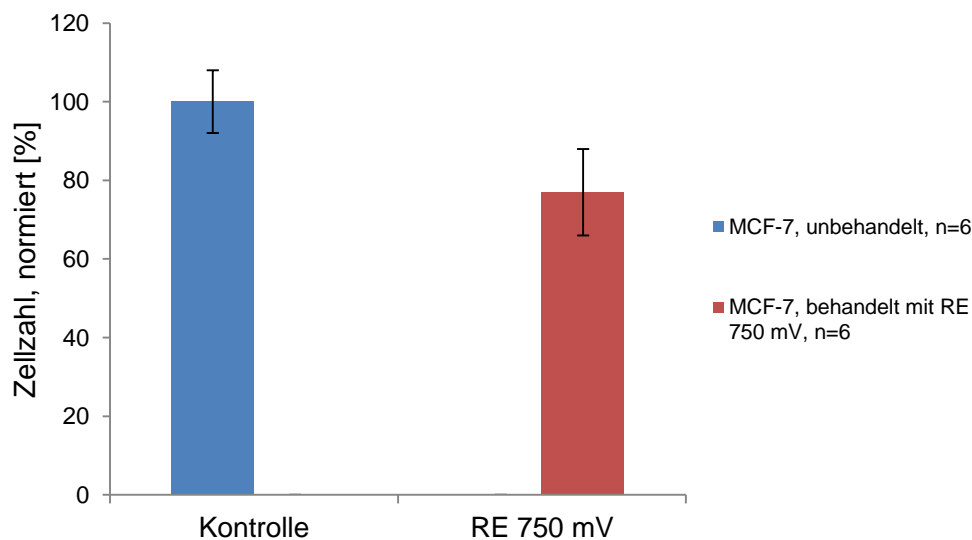


Abbildung 4-15: Zellzahlbestimmung von elektrisch stimulierten MCF-7 Zellen gegenüber nicht stimulierten Zellen. Die Untersuchung des Teilungsverhaltens der MCF-7 Zellen, die einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld ausgesetzt waren, zeigte eine um ca. 20% reduzierte Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

Es ergab sich eine Reduktion der Zellzahl um 20% bei den stimulierten Zellen in Vergleich zu nicht stimulierten Zellen. Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mit Hilfe eines t-Tests auf Signifikanz überprüft. Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den stimulierten Gruppe sind signifikant ( $p < 0,05$ ) (siehe Anhang D).

Um zu klären, ob durch die elektrische Stimulation das Teilungsverhalten beeinflusst wurde, wurde der Kulturüberstand der Zellen nach Zugabe des Farbstoffes Resazurin untersucht. Dazu führte man eine fluorimetrische Resazurin-Messung durch (siehe Abbildung 4-16).

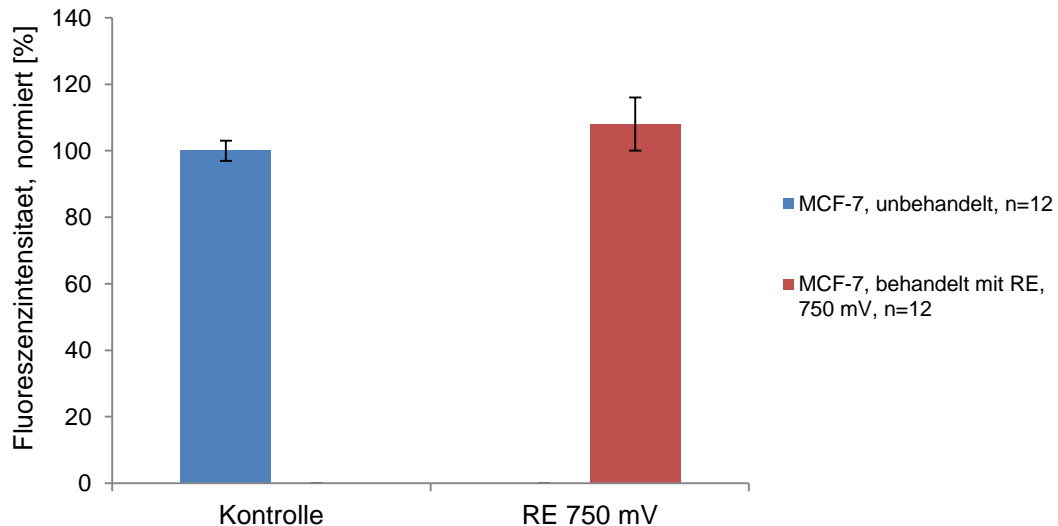


Abbildung 4-16: Resazurinmessung der metabolischen Aktivität an MCF-7 Zellen im Überstand. Im Zellüberstand wurde kein signifikanter Unterschied gemessen.

### 4.3.3 Temperaturkontrolle auf dem Glas-Sensorchip während der Stimulation

Es kann während der Stimulation zu Hitzeentwicklung kommen. Deswegen wurde im Versuch der Temperaturverlauf auf den verwendeten Glas-Sensorchips direkt mit Hilfe eines Temperatursensors PT1000 aufgezeichnet. Die Temperaturmessung wurde dann bei beiden Glas-Sensorchips während der elektrischen Stimulation über 30h durchgeführt. Der Versuchsaufbau erfolgte bei 37°C in einer temperierten Kammer. Abbildung 4-17 zeigt die Änderung der Temperatur, gemessen am Temperatursensor PT1000 im Laufe von 30h an beiden Glas-Sensorchips während der Stimulation.

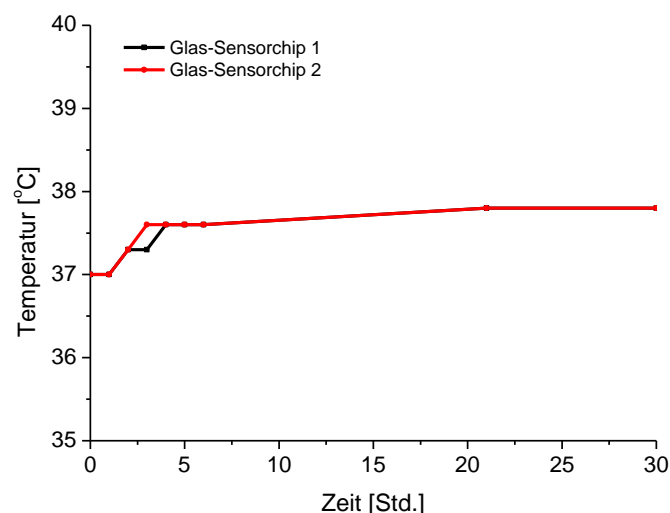


Abbildung 4-17: Temperaturverlauf auf den verwendeten Glas-Sensorchips mit Hilfe eines Temperatursensors PT1000 aufgezeichnet. Die Temperaturmessung wurde dann bei beiden Glas-Sensorchips während der elektrischen Stimulation d.h., Stimulation mit 750mV – 10ms, entsprechend dem Befeldungsprotokoll (siehe Kapitel 3.8.1, Abbildung 3-13) über 30h durchgeführt.

Aus diesen Messungen ergab sich, dass sich die Temperatur während der Stimulation auf den Glas-Sensorchips um  $0,8^{\circ}\text{C}$  änderte (siehe Anhang C, Kapitel 6.4.4). Diese langsame, geringfügige Temperaturänderung kann als Ursache für einen Rückgang der Wachstumsgeschwindigkeit ausgeschlossen werden [242].

#### 4.3.4 Nachweis membrangeschädigter Zellen mit Trypanblaufärbung

Die Wachstumshemmung könnte durch den Zelltod oder eine Zellmembranschädigung zustande kommen. Um einschätzen zu können, worauf die Wachstumshemmung beruht, wurde in einem exemplarischen Versuch der Anteil geschädigter Zellen mittels Trypanblaufärbung bestimmt [131]. Die Messung zeigte keinen signifikanten Unterschied im relativen Anteil an toten Zellen in der gesamten Kultur zwischen den unbehandelten Zellen (Kontrolle) und den elektrisch stimulierten Zellen. Aus diesem Grund kann man sagen, dass die Zellen bei den verwendeten Stimulationsparametern nicht in die Apoptose übergehen.

#### 4.3.5 Metabolische Messung und Morphologie von MCF-7 Zellen

Eine Messung mit dem IMR-System ist in Abbildung 4-18 dargestellt, bei der MCF-7 Zellen mit einem niederfrequenten elektrischen Feld beaufschlagt wurden.

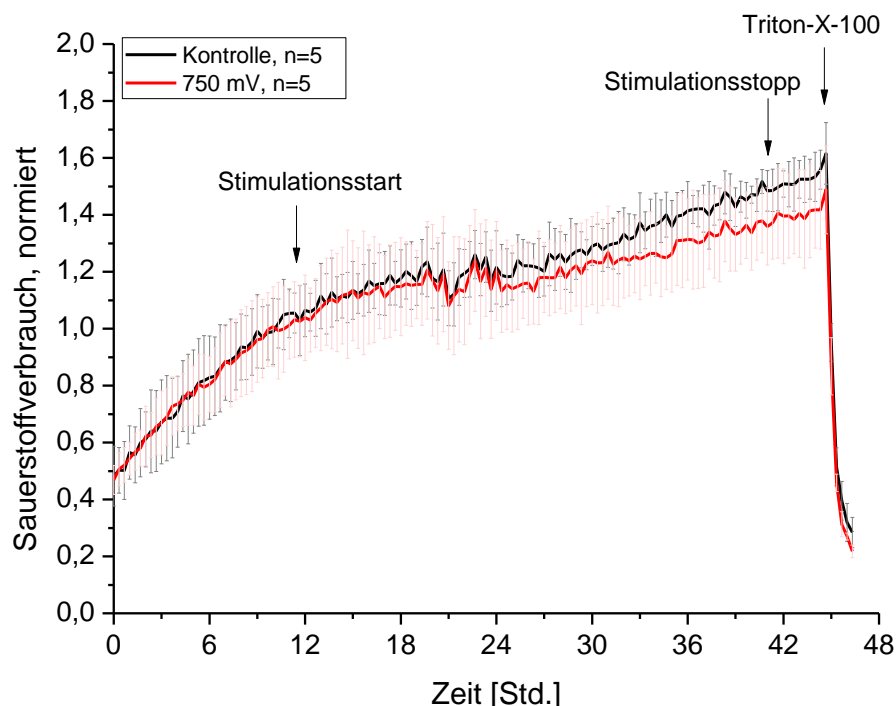


Abbildung 4-18: Metabolische Messung zur Bestimmung des Einflusses von einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld auf MCF-7 Zellen: Statistische Auswertung des Sauerstoffverbrauchs von mit einem elektrischen Feld behandelten und unbehandelten MCF-7 Zellen (normiert auf den Anfangswert der Stimulation). Die Messung des Sauerstoffverbrauchs der stimulierten Zellen weist keine signifikante Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Gesamtzellzahl  $5 \times 10^4$  Zellen/Well. Nach 12h Monitoring im IMR ohne E-Feld wurden die Zellen für 30h elektrisch stimuliert.

Eine statistische Auswertung wurde vorgenommen. In Abbildung 4-18 sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung zu sehen ( $n=7$ ). Die Sauerstoffverbrauchsrate sind auf den Anfangswert der Stimulation (12h) normiert.

Der Sauerstoffverbrauch der stimulierten MCF-7 Zellen zeigt keinen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen. Es ist eine leicht hemmende Tendenz eines elektrischen Feldes auf die Zellen zu erkennen, die aber keine Signifikanz zeigt.

Die im extrazellulären Raum gemessenen Ansäuerungsrate an elektrisch stimulierten und nicht behandelten Zellen wird in Abbildung 4-19 gezeigt.

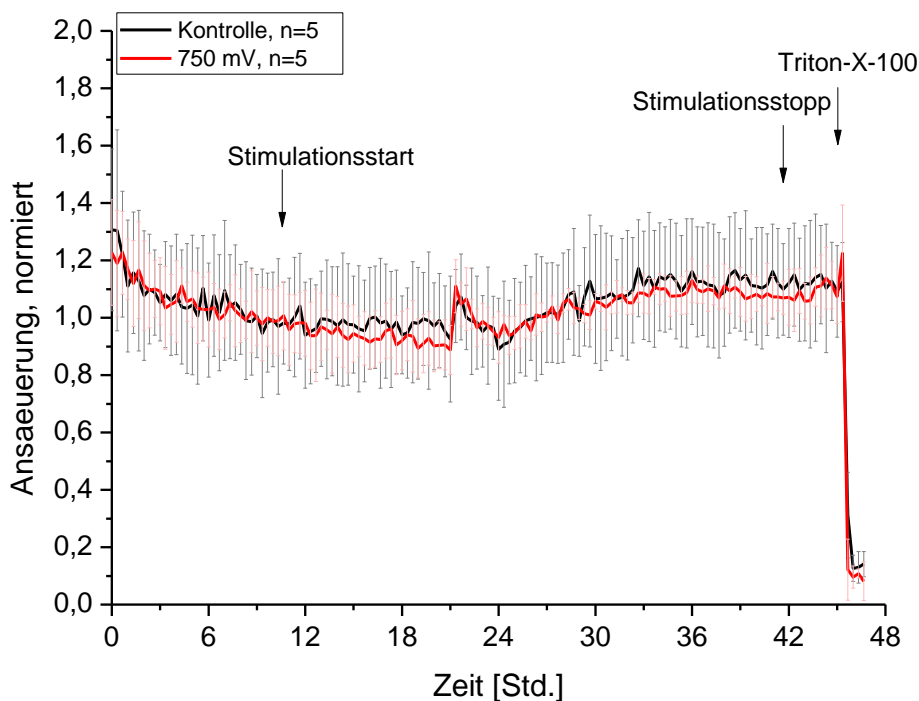


Abbildung 4-19: Metabolische Messung zur Bestimmung des Einflusses von einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld auf MCF-7 Zellen: Statistische Auswertung der Ansäuerung von mit einem elektrischen Feld behandelten und unbehandelten MCF-7 Zellen (normiert auf den Anfangswert der Stimulation). Die Messung der Ansäuerung der stimulierten Zellen weist keine signifikante Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Gesamtzellzahl  $5 \times 10^4$  Zellen/Well. Nach 12h Monitoring im IMR ohne E-Feld wurden die Zellen 30h elektrisch stimuliert.

Es wurde wie bei dem Sauerstoffverbrauch eine statistische Auswertung vorgenommen. In Abbildung 4-19 sind die Mittelwerte mit der jeweiligen Standardabweichung zu sehen ( $n=7$ ). Die Ansäuerungsrate der stimulierten MCF-7 Zellen zeigen - analog zu den Sauerstoffverbrauchsrate - keinen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen. Es ist eine leicht hemmende Tendenz, wie im Falle des Sauerstoffverbrauches zu erkennen, die aber keine Signifikanz zeigt.



#### 4.3.6 Morphologie von MCF-7 Zellen

Im Folgenden werden Bilder der Kontrollgruppe und der stimulierten Gruppe gezeigt (Abbildung 4-20). Die Bilder sind kurz vor Start der Stimulation (1.Tag) und vor Zugabe des Tritons (2.Tag) aufgenommen worden. Die morphologische Untersuchung zeigte, dass die elektrische Stimulation die Zellmorphologie nicht unmittelbar erkennbar beeinflusst (siehe Abbildung 4-20). Jedoch tritt eine Reduktion der Zellzahl bei den stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppe auf (siehe Kapitel 4.3.2).

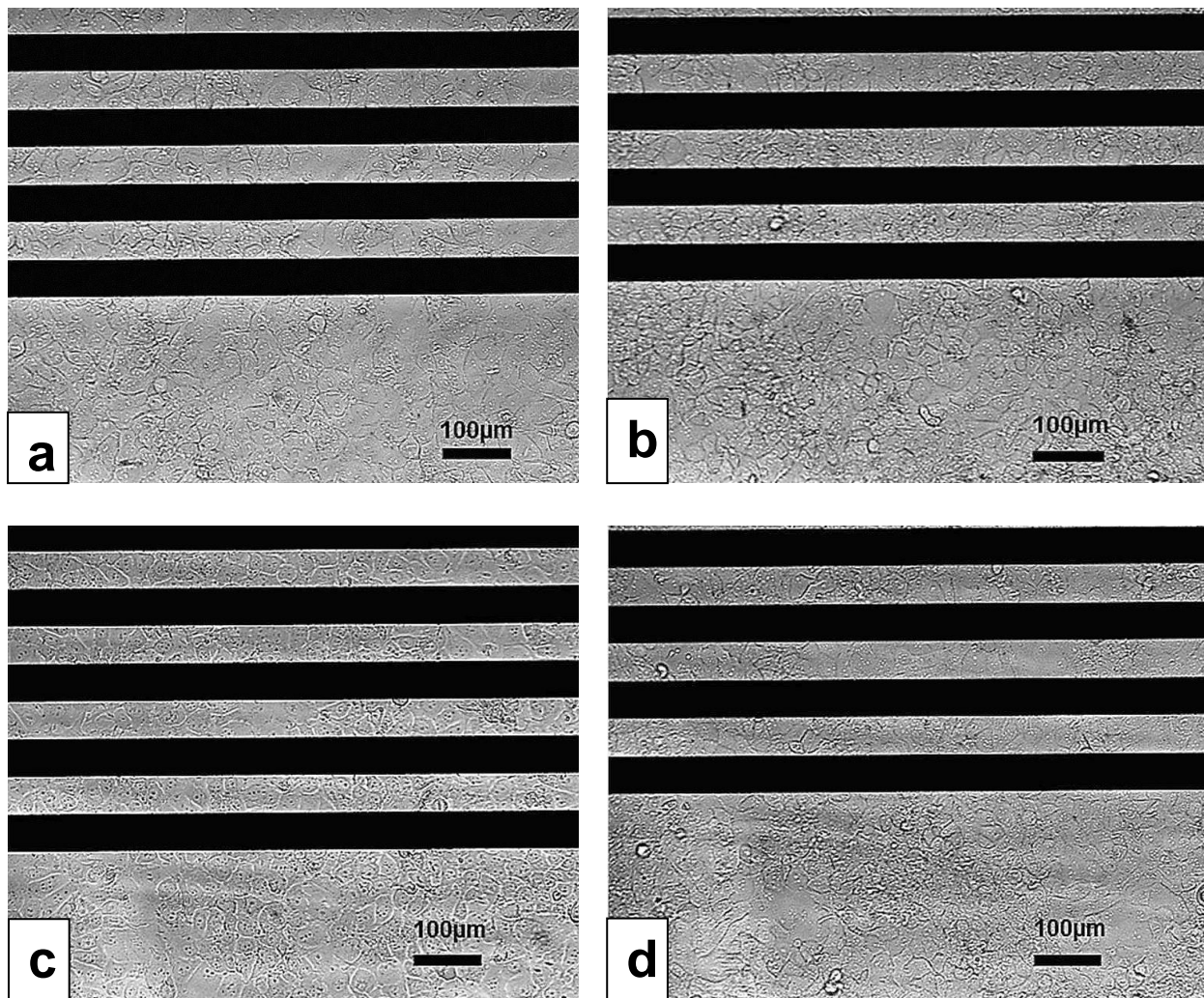


Abbildung 4-20: Morphologie von MCF-7 Zellen nach Anlegen eines elektrischen Feldes (Pulsfelder 750mV, 100Hz) a) Kontrolle, 1.Tag; b) Kontrolle, 2.Tag; c) Behandelnde Zellen vor elektrischer Stimulation, 1.Tag; d) Behandelnde Zellen nach 30h elektrischer Stimulation, 2.Tag. Die morphologische Untersuchung zeigte, dass die elektrische Stimulation die Zellmorphologie nicht unmittelbar erkennbar beeinflusst. In anderen Wells sind die Ergebnisse vergleichbar.



## 4.4 Elektrische Stimulation: Direkte Feldeinspeisung, sinusförmige elektrische Felder, 100Hz

### 4.4.1 Metabolische Messung von MCF-7 Zellen

Den normierten Sauerstoffverbrauch über der Versuchslaufzeit in Abhängigkeit von der elektrischen Stimulation zeigt Abbildung 4-21. Diese wurde zum Zeitpunkt  $t=12\text{h}$  gestartet und zum Zeitpunkt  $t=120\text{h}$  beendet.

Bei allen Gruppen ist zunächst ein Anstieg der Raten zu erkennen, der nach ca. 40h in eine Sättigungs-Phase übergeht. Die Gruppe ohne angelegte Spannung (Kontrollgruppe) erreicht ihre Sättigungs-Phase ab ca. 50h.

Die Gruppen mit niedriger angelegter Spannung (50mV; 200mV) zeigen nach 40h einen beinahe konstanten Sauerstoffverbrauch, der zwischen 2 und 2,5 schwankt.

Bei der Gruppe mit der höchsten Spannungsamplitude (715mV) zeigt sich nach 50h ein Rückgang des Sauerstoffverbrauchs. Liegen die Verbrauchswerte bei  $t=40\text{h}$  noch zwischen 2–2,5, geht er bis zum Ende der Messung auf 0,8–1,5 zurück.

Nach der Stimulation (Zeitpunkt  $t=120\text{h}$ ) wurde der Versuch mit einem Tritonabschluss (0,1% Triton X-100) als Positivkontrolle beendet. Durch dieses Detergens wird die Zellmembran der Zellen aufgelöst und der Sauerstoffverbrauch der Zellen läuft gegen Null.

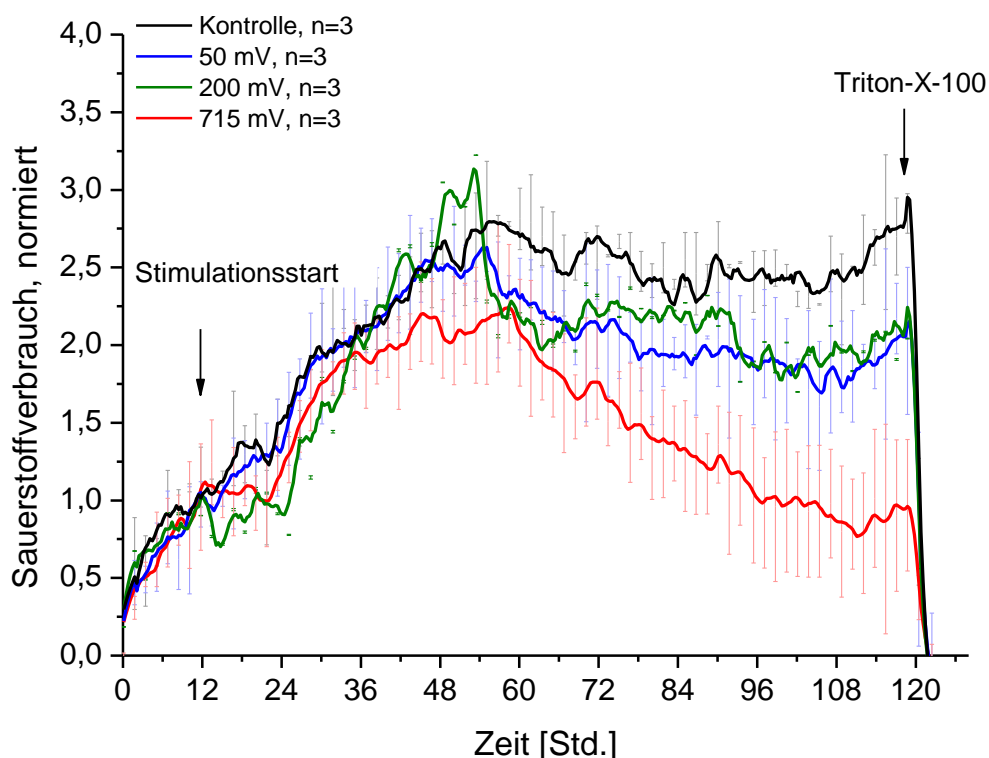


Abbildung 4-21: Metabolische Messung zur Bestimmung des Einflusses von einem sinusförmigen elektrischen Feld (Frequenz 100Hz) auf MCF-7 Zellen: Sauerstoffverbrauch von mit einem elektrischen Feld behandelten und nicht behandelten MCF-7 Zellen (auf Start der Stimulation normierte Mittelwerte). Wechselspannungen: 50mV, 200mV und 715mV. Die Gruppen mit niedriger angelegter Spannung (50mV; 200mV) zeigen nach 40h einen beinahe konstanten Sauerstoffverbrauch, der zwischen 2 und 2,5 schwankt. Bei der Gruppe mit der höchsten Spannungsamplitude (715mV) zeigt sich nach 50h ein starker Rückgang des Sauerstoffverbrauchs. Liegen die Verbrauchswerte bei  $t=40\text{h}$  bei

der Gruppe noch zwischen 2–2,5, geht er bis zum Ende der Messung auf 0,8–1,5 zurück. Der Sauerstoffverbrauch der stimulierten MCF-7 Zellen zeigt ab ca. 70h einen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen bei einer Spannungsamplitude von 715mV. Nach der Stimulation (Zeitpunkt  $t=120h$ ) wurde der Versuch mit einem Tritonabschluss (0,1% Triton X-100) als Positivkontrolle beendet. Gesamtzellzahl  $5 \times 10^4$  Zellen/Well. Nach 12h Monitoring im IMR ohne E-Feld wurden die Zellen 108h elektrisch stimuliert. n: Anzahl auswertbarer Wells einer Gruppe.

Der Sauerstoffverbrauch der stimulierten MCF-7 Zellen zeigt ab ca. 70h einen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen bei einer Spannungsamplitude von 715mV (t-Test,  $p < 0,05$ ; siehe Anhang D, Tabelle 6-16).

Die extrazellulären Ansäuerungsraten sind in Abbildung 4-22 dargestellt. Sie sind bei fast allen Gruppen sehr konstant und schwanken in den ersten 50h zwischen 0,8 und 1,2. Nach 50h zeigen die meisten Gruppen Ansäuerungsraten zwischen 0,6 und 1.

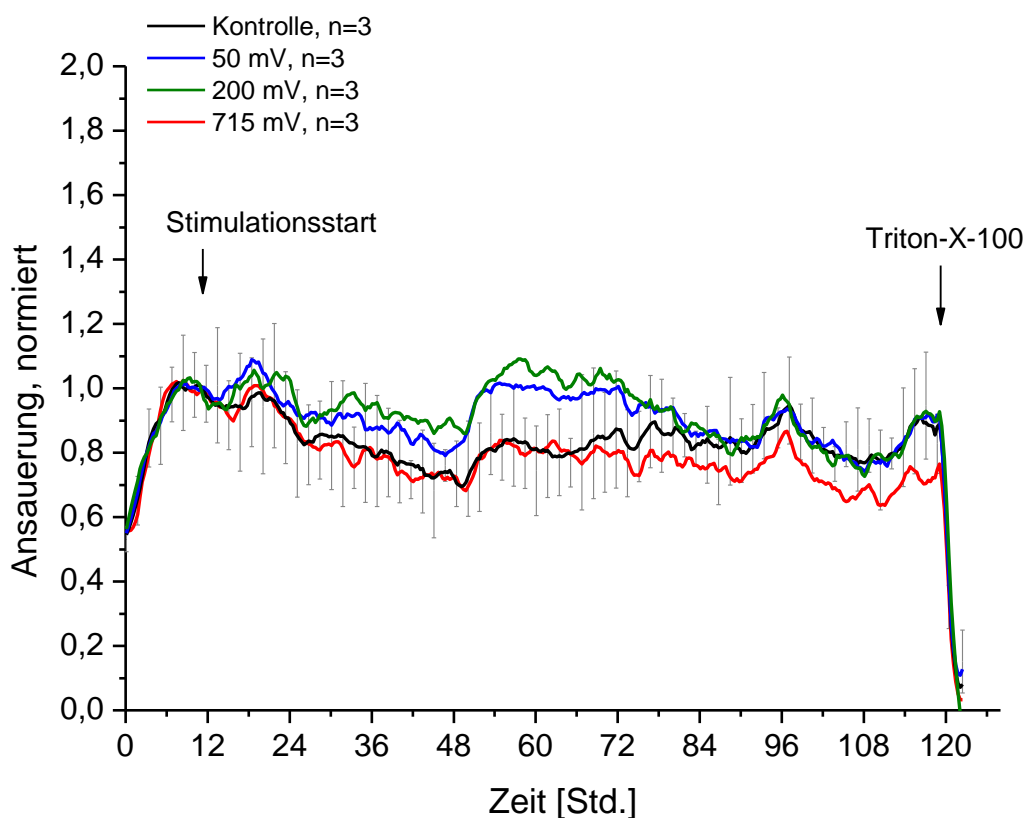


Abbildung 4-22: Metabolische Messung zur Bestimmung des Einflusses von einem sinusförmigen elektrischen Feld (Frequenz 100Hz) auf MCF-7 Zellen: Ansäuerung an den mit einem elektrischen Feld behandelten und unbehandelten MCF-7 Zellen (auf Start der Stimulation normierte Mittelwerte). Wellenspannungen: 715mV, 200mV, 50mV. Die Ansäuerungsraten an den stimulierten MCF-7 Zellen zeigen keinen deutlichen Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen. Sie sind bei fast allen Gruppen sehr konstant und schwanken in den ersten 50h zwischen 0,8 und 1,2. Nach 50h zeigen die meisten Gruppen Ansäuerungsraten zwischen 0,6 und 1. n: Anzahl auswertbarer Wells einer Gruppe.

Die Ansäuerungsraten an den stimulierten MCF-7 Zellen zeigen keinen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen (t-Test, siehe Anhang D, Tabelle 6-16).

#### 4.4.2 Morphologie von MCF-7 Zellen

Im Folgenden werden Bilder der Kontrollgruppe und der stimulierten Gruppe gezeigt (Abbildung 4-23). Die Bilder sind kurz vor Start der Stimulation (1.Tag) und vor Zugabe des Tritons (5.Tag) aufgenommen worden. Die morphologische Untersuchung zeigte, dass die elektrische Stimulation die Zellmorphologie nicht unmittelbar erkennbar beeinflusst.

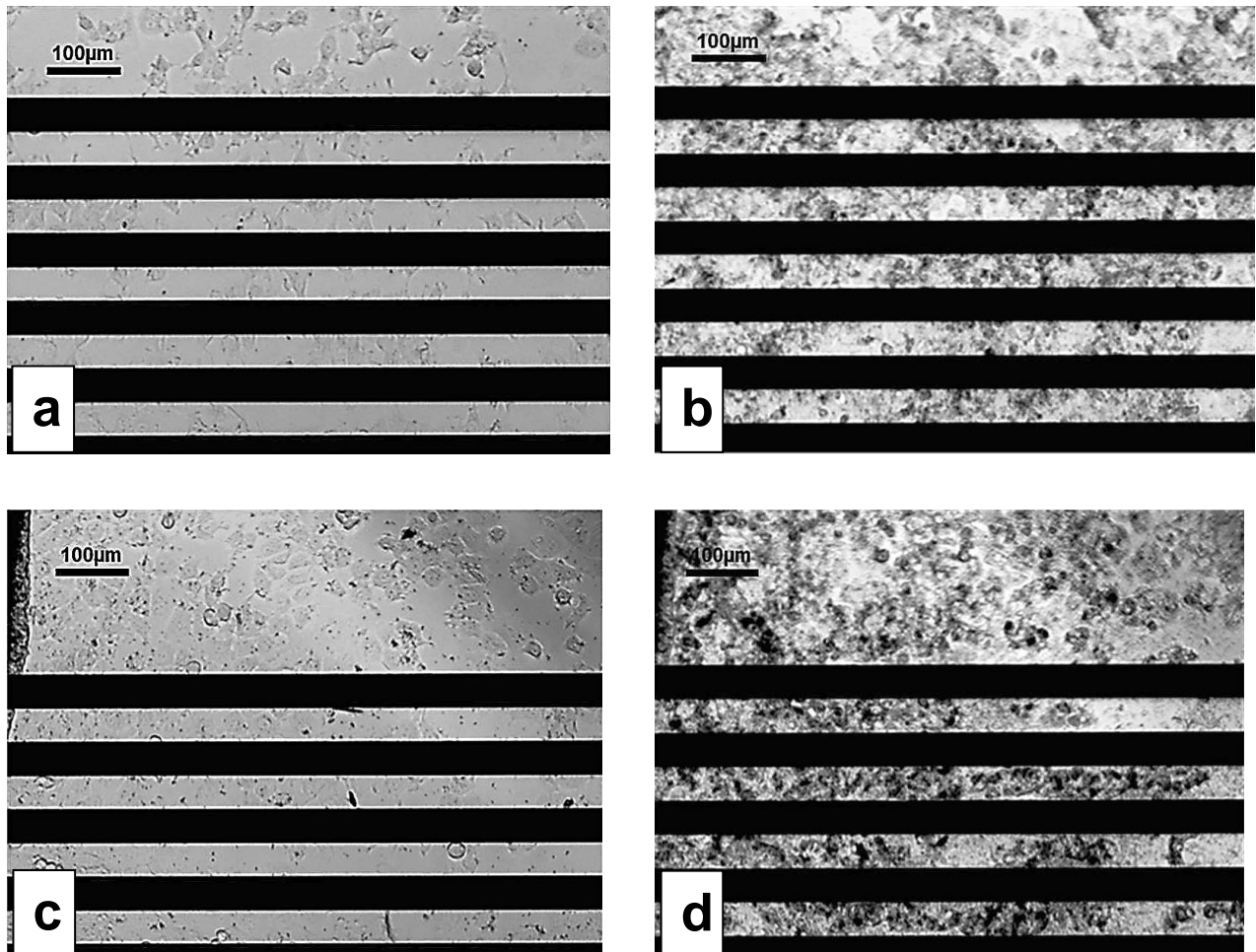


Abbildung 4-23: Morphologie von MCF-7 Zellen nach Anlegen des elektrischen Feldes (Wechselspannung 715mV, 100Hz). a) Kontrolle, 1.Tag; b) Kontrolle, 5.Tag; c) Behandelnde Zellen vor elektrischer Stimulation, 1.Tag; d) Behandelnde Zellen nach 108h elektrischer Stimulation, 5.Tag. Die morphologische Untersuchung zeigte, dass die elektrische Stimulation die Zellmorphologie nicht unmittelbar erkennbar beeinflusst. In anderen Wells zeigte sich ein vergleichbares Verhalten.

Die Aufnahmen wurden über die Elektroden-Strukturen gemacht, damit man die Zellen aus den stimulierten Bereichen ansehen kann. Die Mikroskop-Aufnahmen zeigen bei allen Wells Verunreinigungen, die als schwarze Punkte zu erkennen sind. Diese kommen durch Anhaftungsprobleme mit auf diese Platte angebrachten Sensorspots zu Stande. Diese lösten sich zum Teil während der Messung von Substrat ab.

## **4.5 Elektrische Stimulation: Direkte Feldeinspeisung, sinusförmige elektrische Felder, 150kHz**

### **4.5.1 Metabolische Messung von MCF-7 Zellen**

Den normierten Sauerstoffverbrauch über der Versuchslaufzeit in Abhängigkeit von der elektrischen Stimulation zeigt Abbildung 4-24. Die Stimulation wurde zum Zeitpunkt  $t=12h$  gestartet und zum Zeitpunkt  $t=120h$  beendet.

Bei der Stimulation mit 150kHz tritt zunächst bei allen Gruppen nach ca. 15h ein plötzlicher Abfall im Sauerstoffverbrauch ein, der bei der Gruppe mit der höchsten angelegten Spannungsamplitude (715mV) am stärksten ist.

Der Sauerstoffverbrauch geht dabei um die Hälfte zurück. Zwischen 20h und 60h zeigen alle Kurven einen Anstieg, der ab 75h langsam in eine Sättigung übergeht.

Die Gruppe ohne angelegte Spannung (Kontrollgruppe) zeigt den größten Sauerstoffverbrauch.

Die Gruppen mit niedriger angelegter Spannung (50mV; 200mV) zeigen nach 80h einen beinahe konstanten Sauerstoffverbrauch, der zwischen 1,5 und 1,7 schwankt.

Bei der Gruppe mit der höchsten Spannungsamplitude (715mV) zeigt sich nach  $t=80h$  ein beinahe konstanter Sauerstoffverbrauch, der zwischen 1 und 1,2 schwankt.

Nach der Stimulation (Zeitpunkt  $t=120h$ ) wurde der Versuch mit einem Tritonabschluss (0,1% Triton X-100) als Positivkontrolle beendet.

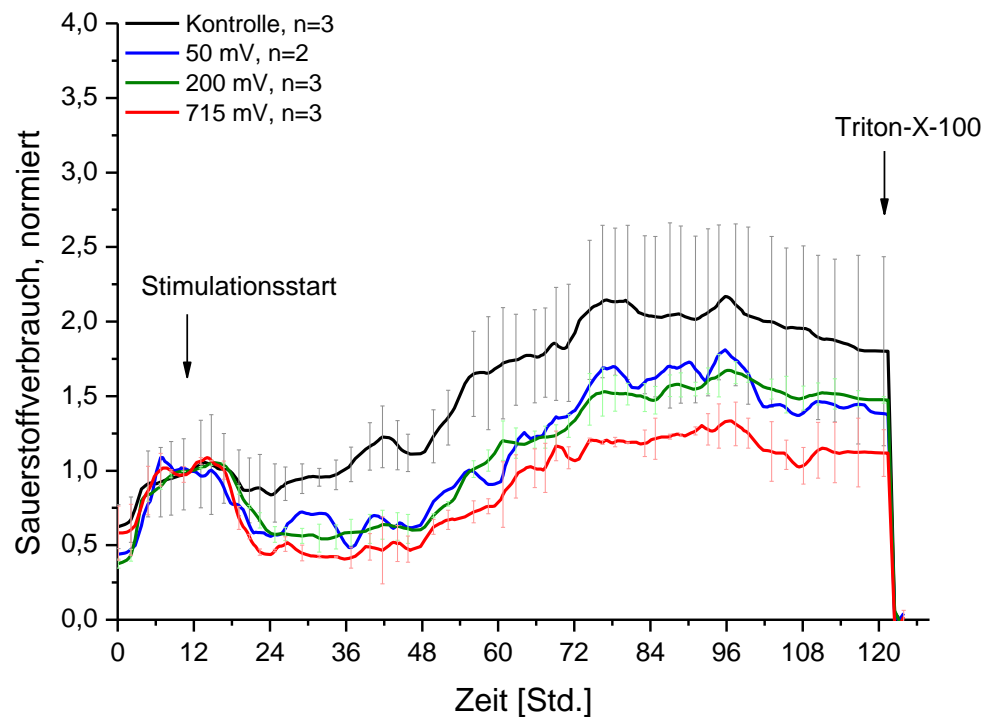


Abbildung 4-24: Metabolische Messung zur Bestimmung des Einflusses von einem sinusförmigen elektrischen Feld (Frequenz 150kHz) auf MCF-7 Zellen: Sauerstoffverbrauch von mit einem elektrischen Feld behandelten und nicht behandelten MCF-7 Zellen (auf Start der Stimulation normierte Mittelwerte). Wechselspannungen: 50mV, 200mV und 715mV. Bei der Stimulation mit 150kHz tritt zunächst bei allen Gruppen nach ca. 15h ein plötzlicher Abfall im Sauerstoffverbrauch ein, der bei der Gruppe mit der höchsten angelegten Spannungsamplitude (715mV) am stärksten ist. Der Sauerstoffverbrauch geht dabei um die Hälfte zurück. Zwischen 20h und 60h zeigen alle Kurven einen Anstieg, der ab 75h langsam in eine Sättigung übergeht. Die Gruppe ohne angelegte Spannung (Kontrollgruppe) zeigt den größten Sauerstoffverbrauch. Die Gruppen mit niedriger angelegter Spannung (50mV; 200mV) zeigen nach 80 h einen beinahe konstanten Sauerstoffverbrauch, der zwischen 1,5 und 1,7 schwankt. Bei der Gruppe mit der höchsten Spannungsamplitude (715mV) zeigt sich nach dem Erreichen 80h ein beinahe konstanter Sauerstoffverbrauch, der zwischen 1 und 1,2 schwankt. Nach der Stimulation (Zeitpunkt  $t=120h$ ) wurde der Versuch mit einem Tritonabschluss (0,1% Triton X-100) als Positivkontrolle beendet. Gesamtzellzahl  $5 \times 10^4$  Zellen/Well. Nach 12h Monitoring im IMR ohne E-Feld wurden die Zellen 108h elektrisch stimuliert. n: Anzahl auswertbarer Wells einer Gruppe.

Der Sauerstoffverbrauch der stimulierten MCF-7 Zellen zeigt ab ca. 70h einen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen bei einer Spannungsamplitude von 715mV (t-Test,  $p < 0,05$ ; siehe Anhang D, Tabelle 6-19).

Die extrazellulären Ansäuerungsraten zeigen ein sehr starkes Rauschen und ebenso wie die Sauerstoffverbrauchsraten einen starken Abbau nach 10h. Hierbei fallen die Raten von 1 auf zwischen 0,4 und 0,8 (siehe Abbildung 4-25). Nach 50h nähern sich sämtliche Kurven einander an und pendeln bis Ende der Messung zwischen 0,4 und 0,8.

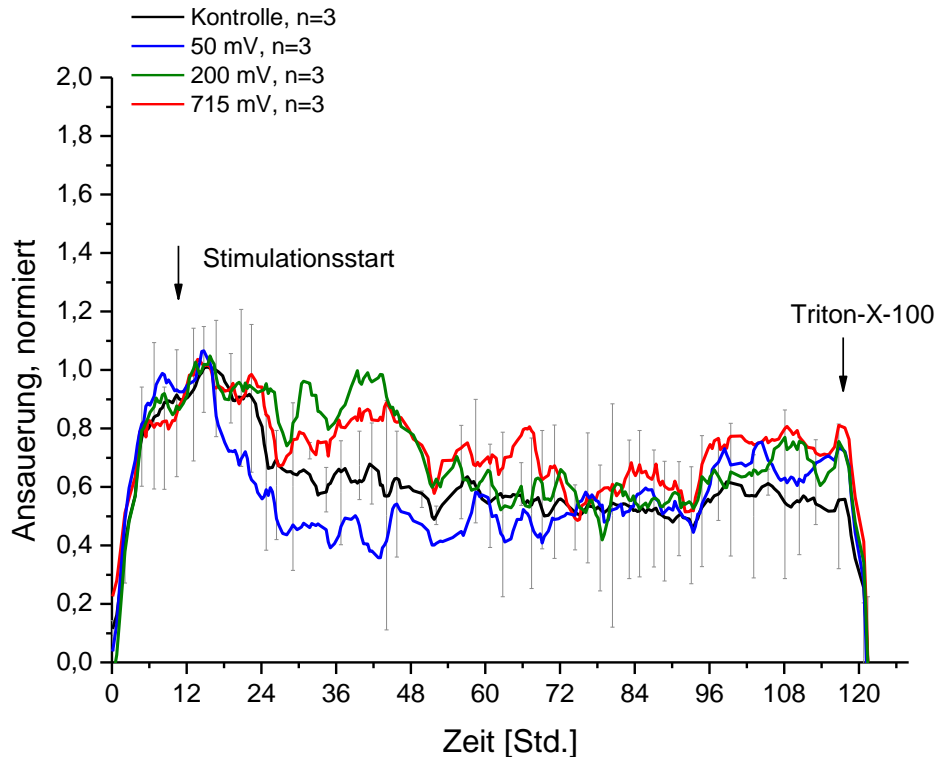


Abbildung 4-25: Metabolische Messung zur Bestimmung des Einflusses von einem sinusförmigen elektrischen Feld (Frequenz 150kHz) auf MCF-7 Zellen: Ansäuerung an den mit einem elektrischen Feld behandelten und unbehandelten MCF-7 Zellen (auf Start der Stimulation normierte Mittelwerte). Wellspannungen: 715mV, 200mV, 50mV. Die Ansäuerungsraten an den stimulierten MCF-7 Zellen zeigen keinen deutlichen Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen. Die extrazellulären Ansäuerungsraten zeigen ein sehr starkes Rauschen und ebenso einen starken Abbau nach 10h. Hierbei fallen die Raten von 1 auf zwischen 0,4 und 0,8. Nach 50h nähern sich sämtliche Kurven einander an und schwankt bis Ende der Messung zwischen 0,4 und 0,8. n: Anzahl auswertbarer Wells einer Gruppe.

Die Ansäuerungsraten an den stimulierten MCF-7 Zellen zeigen wiederum keinen deutlichen Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen (t-Test, siehe Anhang D, Tabelle 6-19).

#### 4.5.2 Morphologie von MCF-7 Zellen

Die Bilder sind im selben Zyklus wie bei der Messung mit 100Hz gemacht worden und zeigen dieselben Zeitpunkte (siehe Abbildung 4-26). Während der Messung sieht man keine unmittelbar erkennbaren Unterschiede in der Morphologie der beiden Gruppen.

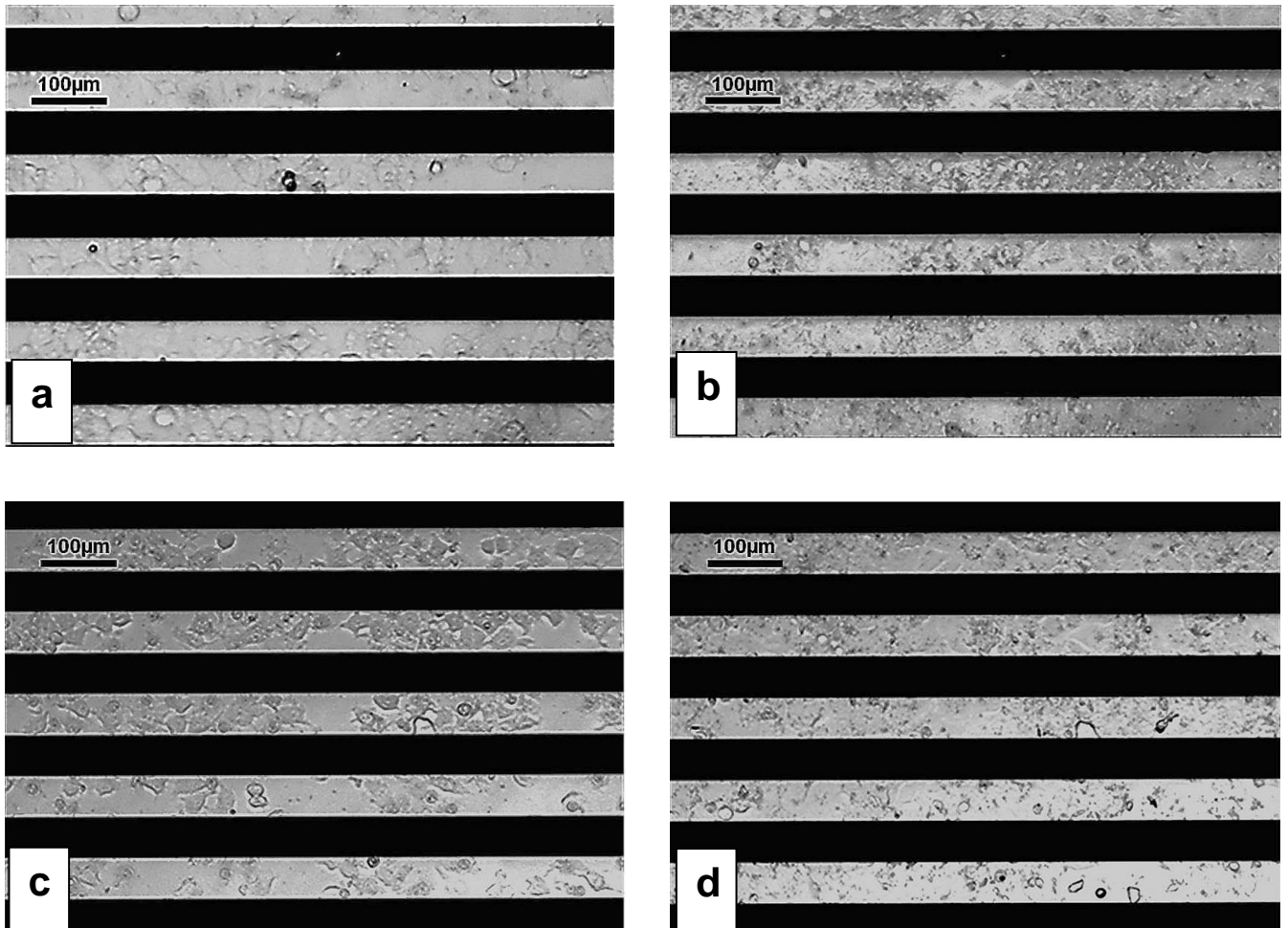


Abbildung 4-26: Morphologie von MCF-7 Zellen nach Anlegen des elektrischen Feldes (Wechselspannung 715mV, 150kHz). a) Kontrolle, 1.Tag; b) Kontrolle, 5.Tag; c) Behandelnde Zellen vor elektrischer Stimulation, 1.Tag; d) Behandelnde Zellen nach 108h elektrischer Stimulation, 5.Tag. Während der Messung sieht man keine unmittelbar erkennbaren Unterschiede in der Morphologie der beiden Gruppen. In anderen Wells zeigte sich ein vergleichbares Verhalten.

## 4.6 Elektrische Stimulation: Kapazitive Feldeinspeisung, sinusförmige elektrische Felder, 100 Hz und 150 kHz

### 4.6.1 Untersuchung des Proliferationsverhaltens mittels fluorimetrischen Resazurin-Messungen und Zellzahlbestimmung von MCF-7 Zellen

Um auszuschließen, dass die durch den IMR Versuch gewonnenen Ergebnisse auf Stromeffekte an den Zellen zurück zu führen sind, wurde die kapazitive Feldeinspeisung der MCF-7 Zellen wie in Kapitel 3.8.2 beschrieben durchgeführt.

Die Bestimmung der Zellzahl von behandelten (mit einem kapazitiv eingespeisten elektrischen Feld von 15V) und nicht behandelten Zellen erfolgte über den TC10™ Automated Cell Counter.

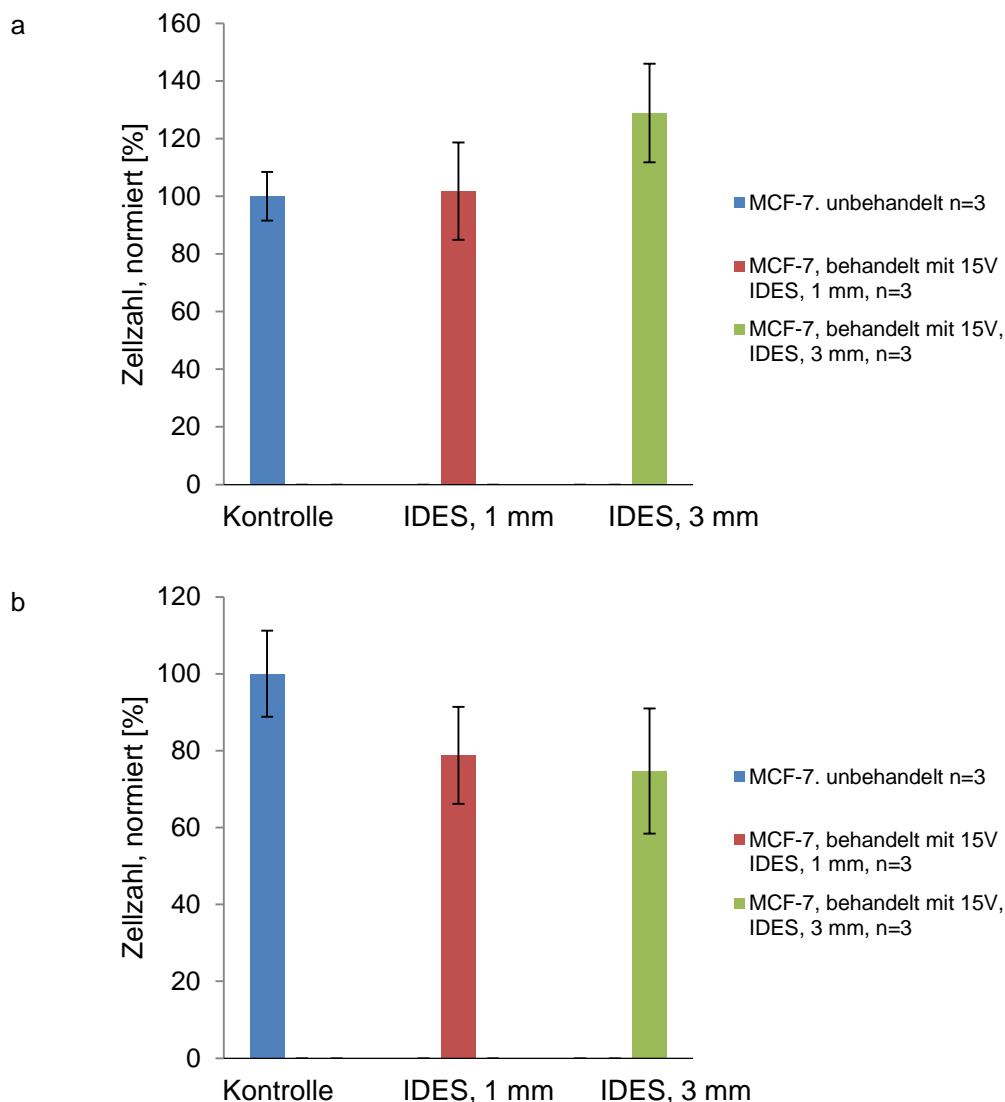


Abbildung 4-27: Elektrische Stimulation von MCF-7 Zellen, kapazitive Befeldung, 15V; Mittelwerte der gemessenen Zellzahlen ( $n=3$ ) mit dazugehörigen Standardabweichungen bei (a) 100Hz und (b) 150kHz. Bei der Stimulation mit 100Hz ist der Mittelwert der Gruppe mit 1mm Elektrodenabstand leicht geringer als in der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Gruppe mit 3mm Elektrodenabstand ist hingegen sogar höher als in der Kontrollgruppe. Die Standardabweichungen der Tests überschneiden sich jeweils mit der Kontrolle. Die mit 150kHz stimulierten Gruppen weisen bei beiden Elektrodenabständen niedrigere Mittelwerte als die nicht stimulierte Kontrollgruppe auf. Dabei unterscheiden sich die Standardabweichungen der stimulierten Wells mit der Kontrolle nicht.



Die Mittelwerte der gemessenen Zellzahlen mit den dazugehörigen Standardabweichungen werden in Tabelle 6-23, Tabelle 6-24 und Tabelle 6-25 gezeigt. Bei der Stimulation mit 100Hz ist der Mittelwert der Gruppe mit 1mm Elektrodenabstand genau so groß wie die Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Gruppe mit 3mm Elektrodenabstand ist sogar höher als in der Kontrollgruppe. Die Standardabweichungen der Tests überschneiden sich nicht mit der Kontrolle. Die mit 150kHz stimulierten Gruppen weisen bei beiden Elektrodenabständen niedrigere Mittelwerte als die nicht stimulierte Kontrollgruppe auf. Dabei unterscheiden sich die Standardabweichungen der stimulierten Wells mit der Kontrolle nicht. Die Überprüfung mittels t-Test ergab bei keiner Messung eine Signifikanz ( $p < 0,05$ ; t-Test, Anhang D, Tabelle 6-29, Tabelle 6-30, Tabelle 6-31 und Tabelle 6-32).

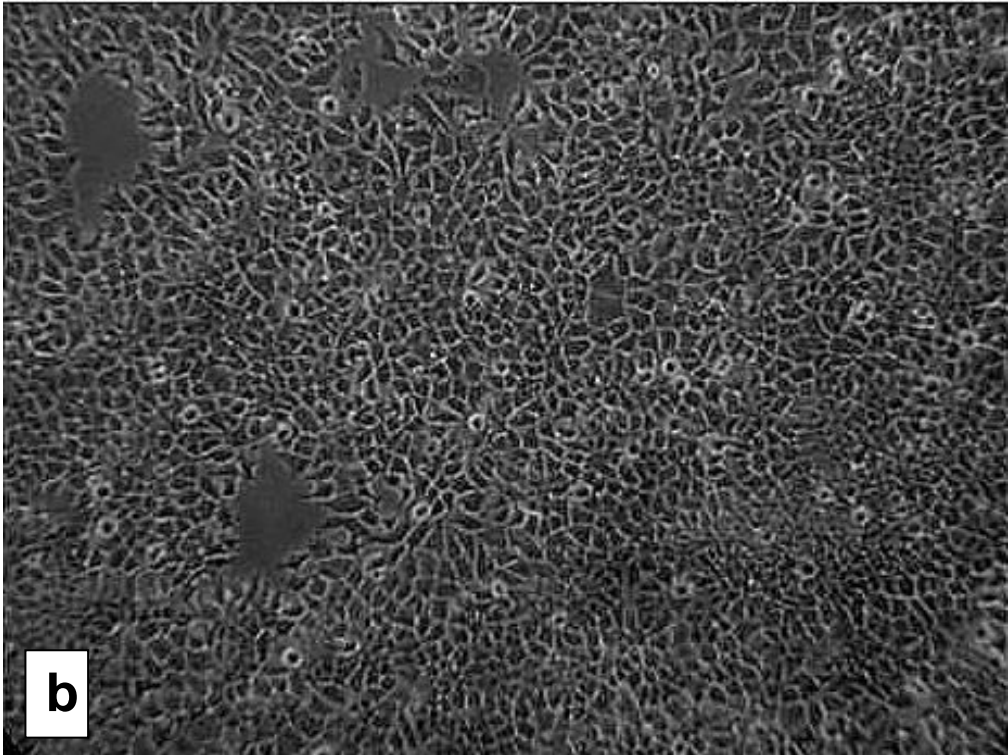
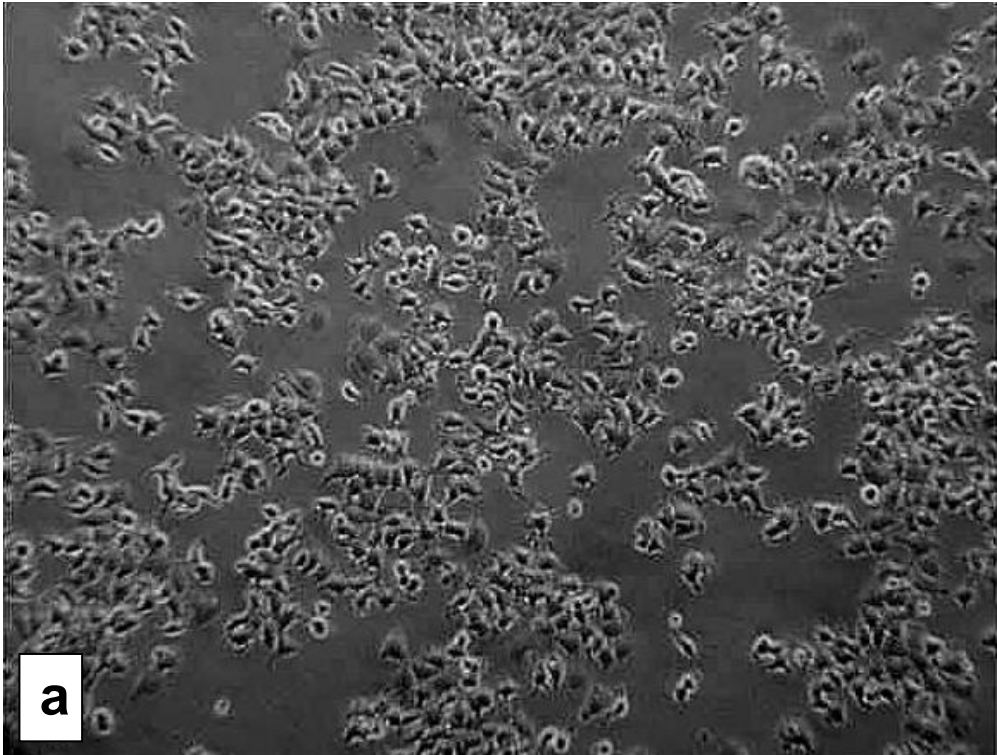
Die Bestimmung der Zellviabilität von behandelten (mit einem kapazitiv eingespeisten elektrischen Feld von 15V) und nicht behandelten Zellen erfolgte über einen Resazurin-Assay. Bei der Bestimmung des Metabolismus durch die Fluoreszenzanalyse zeigten sich bei allen Messungen - unabhängig von der Frequenz - keine klaren Unterschiede zur nicht stimulierten Kontrollgruppe (siehe Anhang D, Tabelle 6-26, Tabelle 6-27, Tabelle 6-28).

#### **4.6.2 Morphologie von MCF-7 Zellen**

Damit Veränderungen in der Struktur und Aussehen der Tumorzellen kontrolliert werden konnten, sind Fotos von einer Gruppe mit 3mm Elektrodenabstand durch ein Durchlichtmikroskop gemacht worden.

##### ***Kapazitive elektrische Stimulation, 100Hz***

Die Bilder sind kurz vor Start der Stimulation (1.Tag) und kurz vor Abschalten der elektrischen Stimulation (4.Tag) aufgenommen worden. Beide Gruppen zeigen größtenteils intakte Zellen, jedoch zeigte sich kein unmittelbar erkennbarer Unterschied in der Morphologie der beiden Gruppen. Die Zellen der behandelten Wells weisen eine höhere Zelldichte auf (siehe Abbildung 4-28). Die Ergebnisse sind aber nicht signifikant (siehe Abbildung 4-27, a).



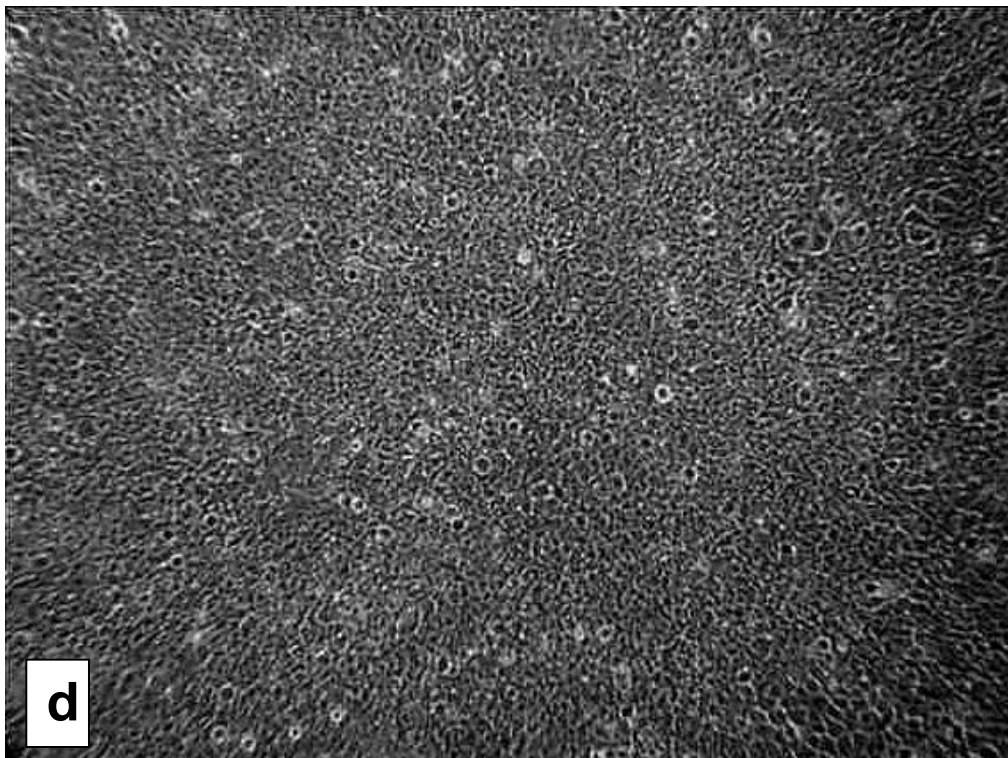
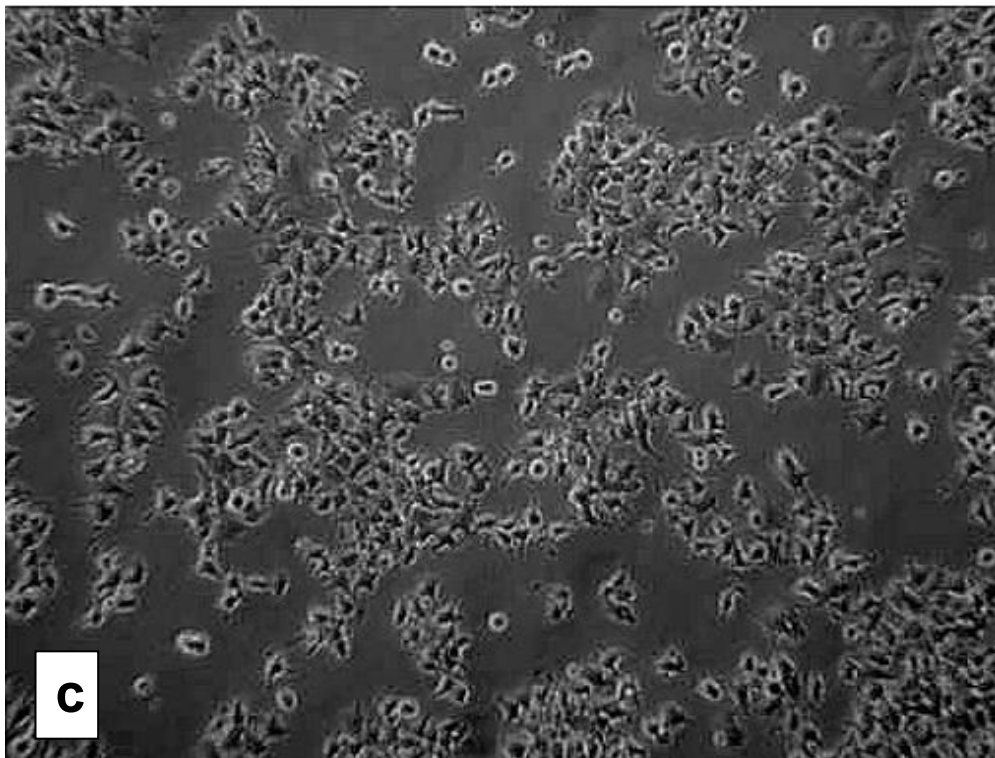
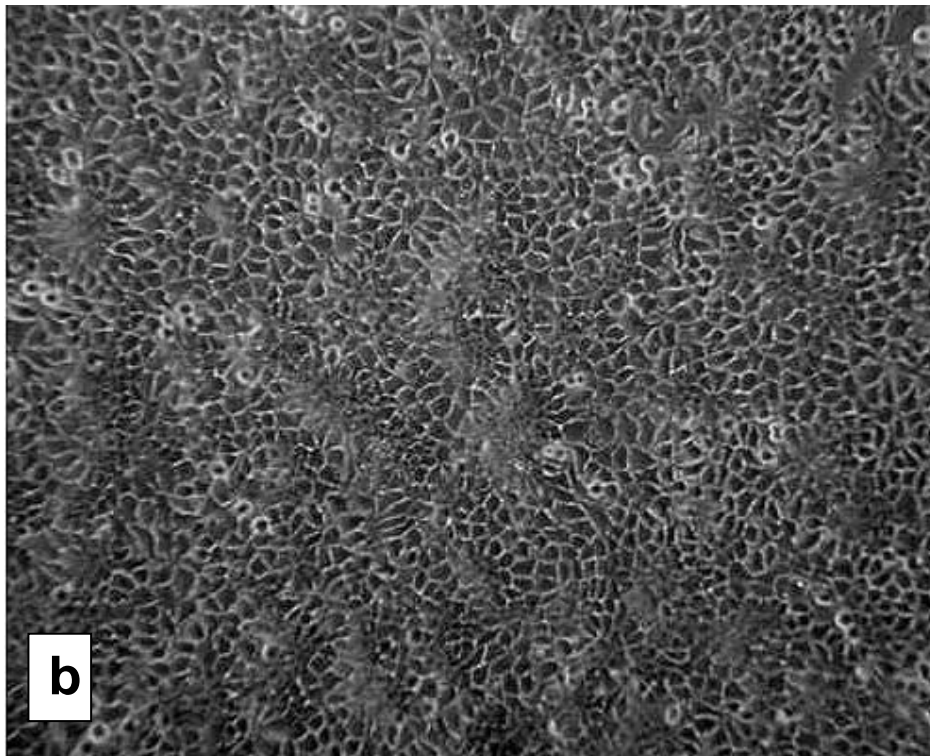
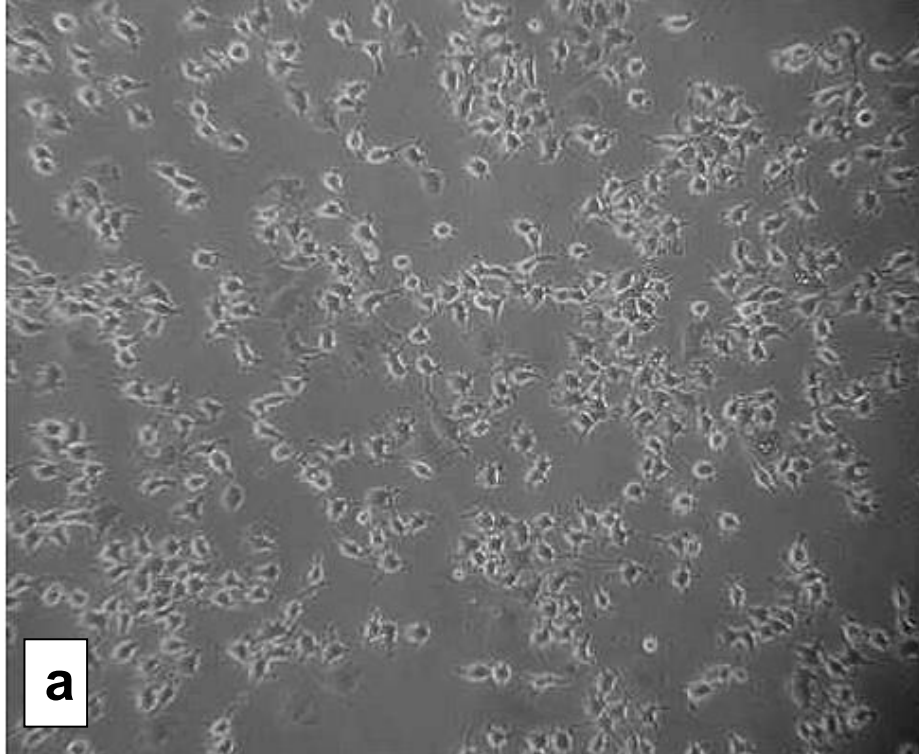


Abbildung 4-28: Morphologie von MCF-7 Zellen nach Anlegen des kapazitiv eingespeisten elektrischen Feldes (Wechselspannung 15V, 100Hz). a) Kontrolle, 1.Tag; b) Kontrolle, 4.Tag; c) Behandelnde Zellen vor der elektrischen Stimulation, 1.Tag; d) Behandelnde Zellen nach 96h elektrischer Stimulation, 4.Tag. Beide Gruppen zeigen größtenteils intakte Zellen, jedoch zeigte sich kein unmittelbar erkennbarer Unterschied in der Morphologie der beiden Gruppen. Elektrodenabstand 3mm. In anderen Wells zeigte sich ein vergleichbares Verhalten.

***Kapazitive elektrische Stimulation, 150kHz***

Morphologisch weisen die stimulierten Zellen keinen Unterschied zur Kontrollgruppe auf. In beiden Gruppen sind die meisten Zellen intakt, jedoch zeigte sich kein unmittelbar erkennbarer Unterschied in der Morphologie der beiden Gruppen (siehe Abbildung 4-29).



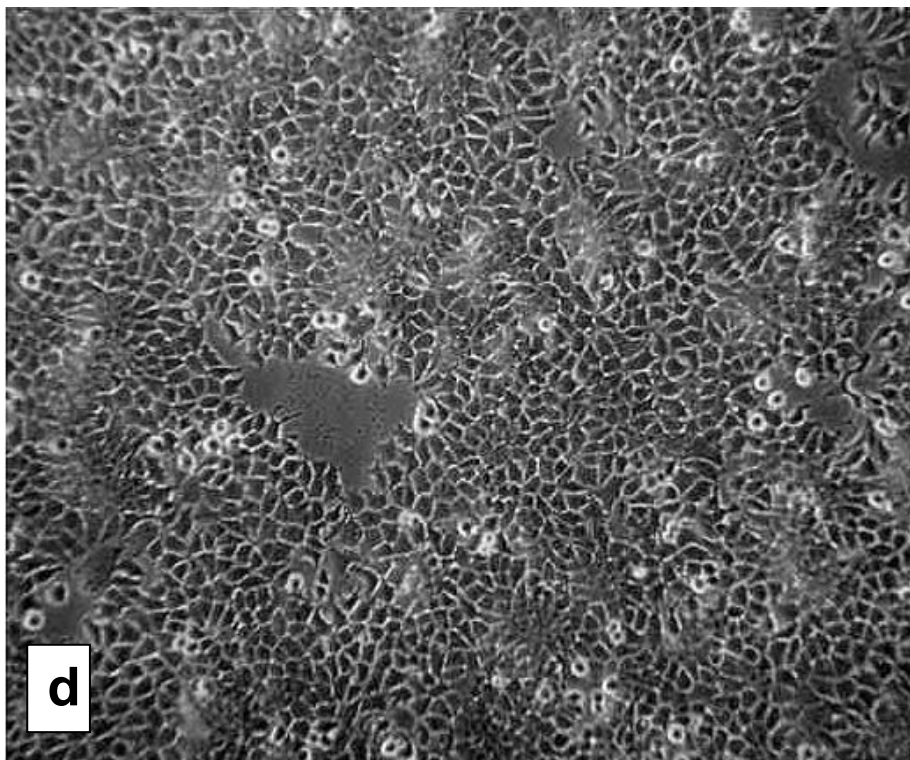
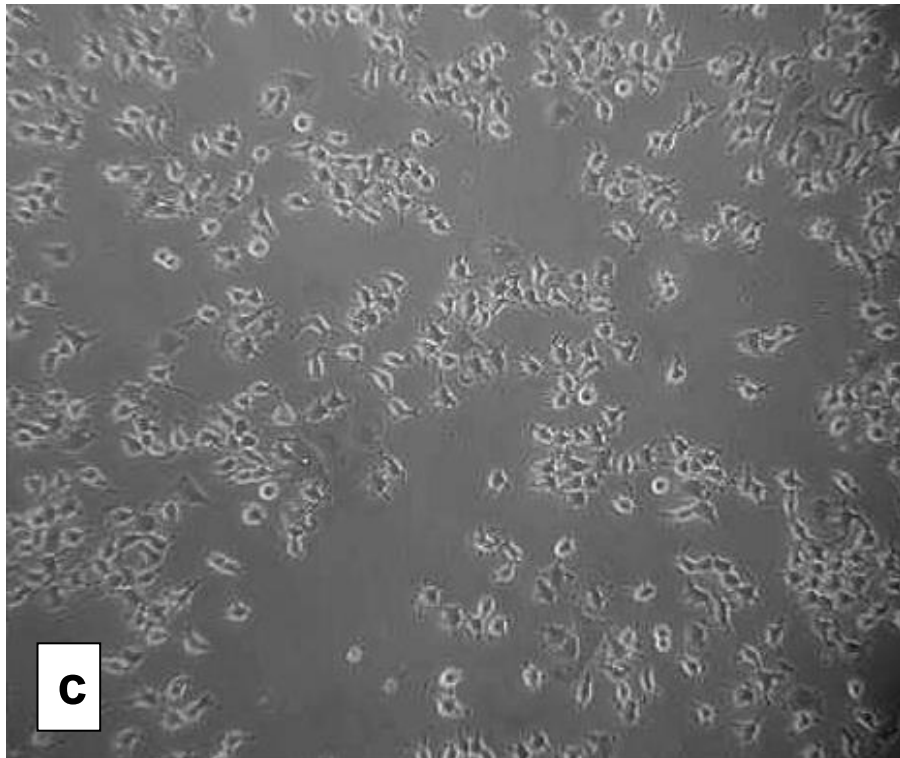


Abbildung 4-29: Morphologie von MCF-7 Zellen nach Anlegen des kapazitiv eingespeisten elektrischen Feldes (Wechselspannung 15V, 150kHz). a) Kontrolle, 1.Tag; b) Kontrolle, 4.Tag; c) Behandelnde Zellen vor der elektrischen Stimulation, 1.Tag; d) Behandelnde Zellen nach 96h elektrischer Stimulation, 4.Tag. In beiden Gruppen sind die meisten Zellen intakt, jedoch zeigte sich kein unmittelbar erkennbarer Unterschied in der Morphologie der beiden Gruppen. Elektrodenabstand 3mm. In anderen Wells zeigte sich vergleichbares Verhalten.



## 4.7 Membranpotential-Messung

Wie in Kapitel 4.3.2 behandelt, zeigte die Untersuchung des Teilungsverhaltens an MCF-7 Zellen, die einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld ausgesetzt waren, im Vergleich zur Kontrolle eine Reduktion von 20%. In diesem Zusammenhang untersuchte man mit weiteren Versuchen den Membranpotentialverlauf an diesen Zellen und wie stark dieser sich von elektrischen Feldern beeinflussen ließ.

### 4.7.1 Zelle in einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld von $-2,3 \text{ kV/m}$

Der Versuch wurde nach dem Protokoll aus Kapitel 3.9.4 durchgeführt. Betrachten wir die Auswertungsschritte am Beispiel einer Zelle 1 (siehe Abbildung 4-30), an die ein elektrisches Feld zuerst in Richtung von unten nach oben und dann in Gegenrichtung (Feldrichtung von oben nach unten) angelegt wurde. Zusätzlich wird der Membranpotentialverlauf am Beispiel einer Zelle 2, die einem gegengepolten Feld ausgesetzt war (siehe Abbildung 4-30), untersucht.

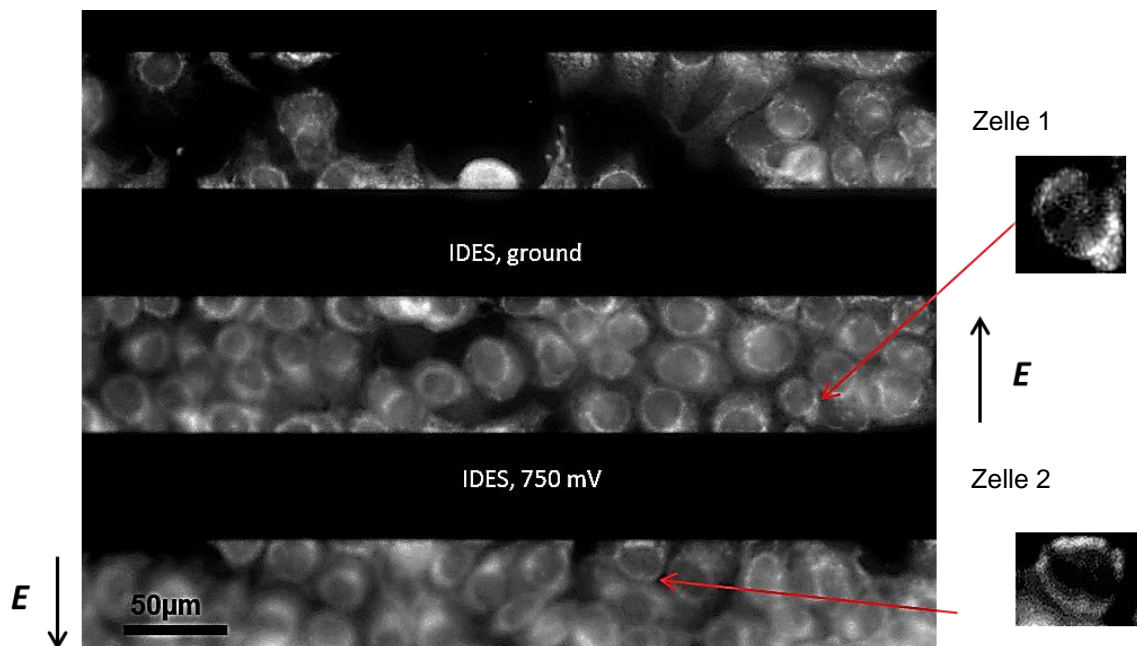


Abbildung 4-30: Mammakarzinomzellen (MCF-7) auf einem Glas-Sensorchip in HEPES-PS unter Zugabe von  $2 \mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3). Die Zellen sind einem elektrischen Feld von  $-2,3 \text{ kV/m}$  (rechnerische Werte) über den IDES ausgesetzt. Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten.

Bei der Auswertung des Membranpotentials wurden immer Einzelzellen ausgewertet. Bei jedem einminütigen Videoausschnitt (9., 19., 29. und 39. Minute) ermittelte man ein Intensitätsmittelwert. Folgende Abbildung 4-31 zeigte Fluoreszenzaufnahmen einer Zelle, die einem elektrischen Feld ausgesetzt war.

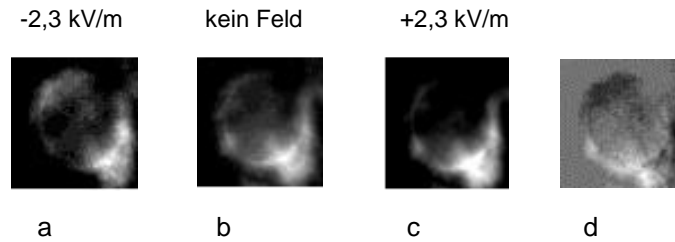


Abbildung 4-31: MCF-7 Zellen in HEPES-gepufferter Salzlösung, beladen mit  $2\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3), pH=7,4: a) Fluoreszenzantwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von  $-2,3\text{kV/m}$  ausgesetzt ist (Feldrichtung von unten nach oben); b) Zelle ohne appliziertes elektrisches Feld; c) Fluoreszenzantwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von  $+2,3\text{kV/m}$  in Gegenrichtung ausgesetzt ist (Feldrichtung von oben nach unten) d) Differenz der Bilder c) und a). Der graue Hintergrund wurde als Null-Wert angenommen.

Zelle 1 befindet sich zwischen zwei Elektroden und ist einem elektrischen Feld von  $-2,3\text{kV/m}$  (Feldrichtung von unten nach oben) ausgesetzt. Betrachten wir die Fluoreszenzantwort dieser Zelle auf das elektrische Feld.

Abbildung 4-32 zeigt die Membranpotentialänderung an dieser Zelle (Zelle aus der Abbildung 4-31, Differenz von Bilder aus der Abbildung 4-31, b und Abbildung 4-31, a) bei Wechsel des elektrischen Feldes.

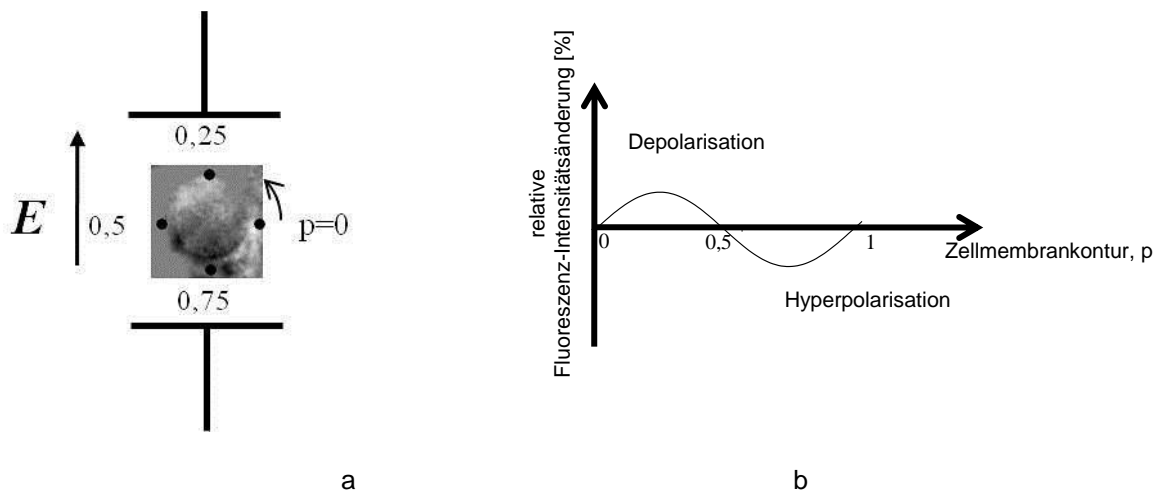


Abbildung 4-32: Membranpotentialänderung an einer MCF-7 Zelle induziert durch ein extern appliziertes elektrisches Feld von  $-2,3\text{kV/m}$ : a) DiBAC<sub>4</sub>(3) Fluoreszenzänderung an einer Zelle; b) theoretischer Kurvenverlauf eines Membranpotentials entlang der Zellmembran.

Der Kurvenverlauf des Zellmembranpotentials wird in Abbildung 4-33 gezeigt. Dieses ist entlang einer Zellmembran aufgezeichnet. Aus diesen beiden Kurven (Abbildung 4-33) berechnet man die relative Fluoreszenzänderung mittels  $(F_b - F_k)/F_k$ . Wobei  $F_b$ : Fluoreszenzintensität, gemessen an einer Zellmembran bei 19 min, die einem elektrischen Feld von  $-2,3\text{kV/m}$  ausgesetzt war,  $F_k$ : Fluoreszenzintensität, gemessen an einer Zellmembran bei 9 min, die keinem elektrischen Feld ausgesetzt war (Kontrolle). Bei der Ermittlung der  $F_b$ - und  $F_k$ -Werte wurde jeweils von diesen Werten der Betrag für den Fluoreszenz-Grundintensität abgezogen. Dadurch minimierte man den Einfluss des Hintergrundrauschens auf das Gesamtsignal.

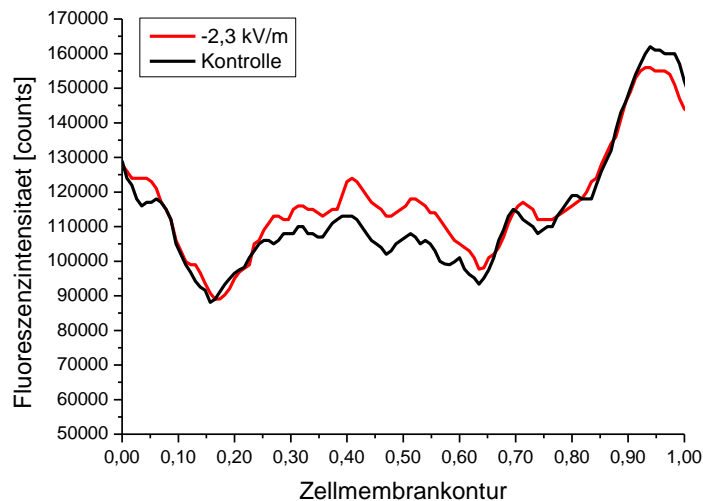


Abbildung 4-33: Fluoreszenzintensität, gemessen an der Zellmembran einer MCF-7 Zelle: Zelle einem elektrischen Feld von  $-2,3\text{ kV/m}$  ausgesetzt (rote Kurve); Zelle keinem elektrischen Feld ausgesetzt (schwarze Kurve, Kontrolle).

Abbildung 4-34 zeigt, wie sich das Membranpotential einer Zelle, die einem elektrischen Feld in Höhe von  $-2,3\text{ kV/m}$  ausgesetzt war, ändert. Das Membranpotential berechnete man über die relative Fluoreszenzänderung entsprechend der Farbstoffempfindlichkeit.

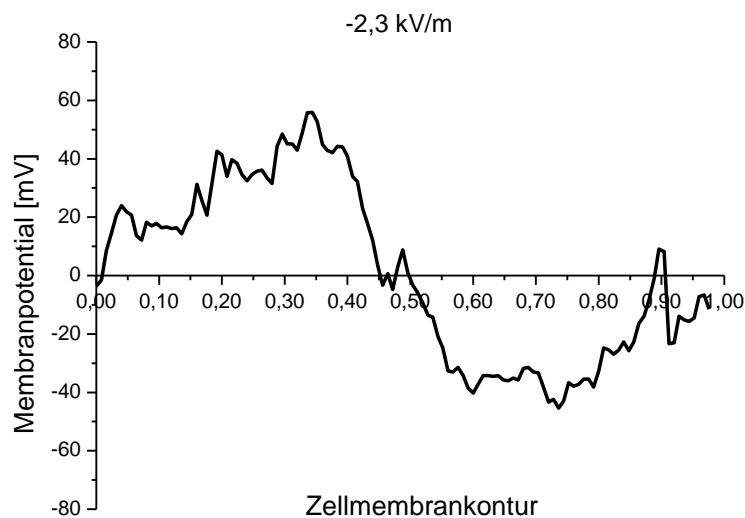


Abbildung 4-34: Membranpotentialverlauf an einer Mammakarzinomzelle (MCF-7) in HEPES-gepufferter Salzlösung mit  $2\mu\text{M DiBAC}_4(3)$ ,  $\text{pH}=7,4$ , die einem elektrischen Feld von  $-2,3\text{ kV/m}$  ausgesetzt war.

Die Messung zeigt uns die Depolarisation der einen und die gleichzeitige Hyperpolarisation der anderen Zellhälfte. Die Fluoreszenzintensitätsänderung beträgt  $12,5\%$ . Anhand der Kalibrationskurve (siehe Abbildung 4-34) umgerechnet wies eine Zelle in einem elektrischen Feld von  $-2,3\text{ kV/m}$  eine Änderung des Membranpotentials im Intervall von  $+35\text{ mV}$  bis  $-35\text{ mV}$  auf.



Weiterhin betrachten wir die Fluoreszenzantwort von Zelle 1, die einem gegengepolten elektrischen Feld von  $+2,3\text{kV/m}$  ausgesetzt war (Feldrichtung von oben nach unten).

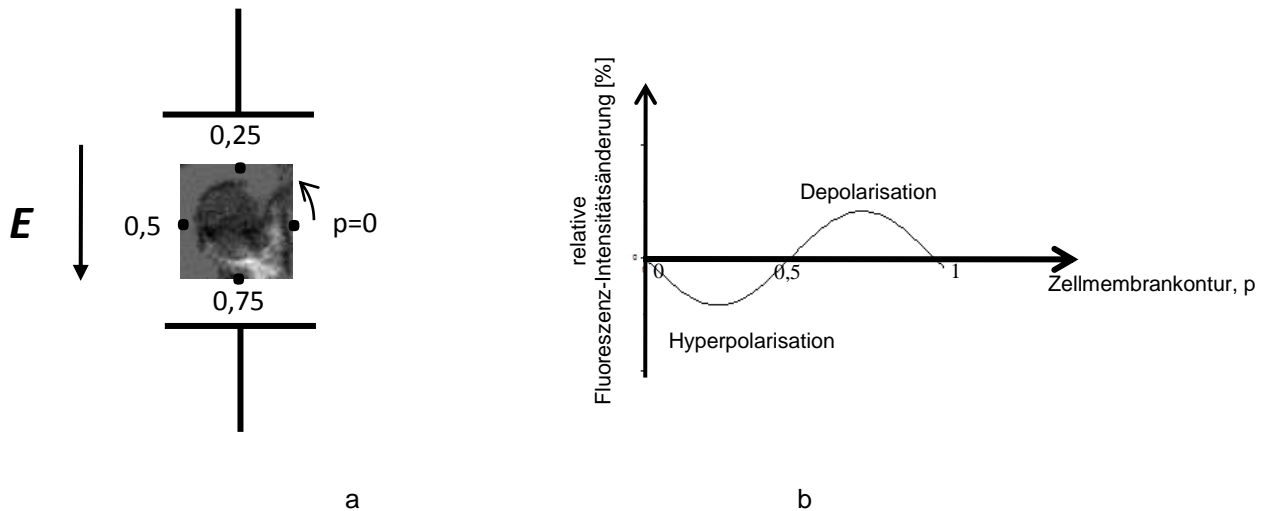


Abbildung 4-35: Membranpotentialänderung an einer MCF-7 Zelle induziert durch ein in Gegenrichtung extern appliziertes elektrischen Feld von  $2,3\text{kV/m}$ : a) DiBAC<sub>4</sub>(3) Fluoreszenzänderung an der Zelle; b) theoretischer Kurvenverlauf des Membranpotentials entlang der Zellmembran.

Um den Effekt des Umschaltens besser zu veranschaulichen, wurde die Zelle zuerst einem elektrischen Feld in einer Richtung und dann in Gegenrichtung ausgesetzt. Bei der Auswertung subtrahierte man eine Kurve des Membranpotentialverlaufs von der anderen. Abbildung 4-36 zeigt den Kurvenverlauf des Zellmembranpotentials. Dieses ist entlang einer Zellmembran aufgezeichnet. Aus diesen beiden Kurven (siehe Abbildung 4-36) berechnete man eine relative Fluoreszenzänderung über  $(F_{b2}-F_{b1})/F_{b1}$ . Wobei  $F_{b1}$ : Fluoreszenzintensität, gemessen an einer Zellmembran bei 19 min, die einem elektrischen Feld von  $-2,3\text{kV/m}$  ausgesetzt war,  $F_{b2}$ : Fluoreszenzintensität, gemessen an einer Zellmembran bei 39 min, die einem elektrischen Feld von  $2,3\text{kV/m}$  (in Gegenrichtung geschaltet) ausgesetzt war.

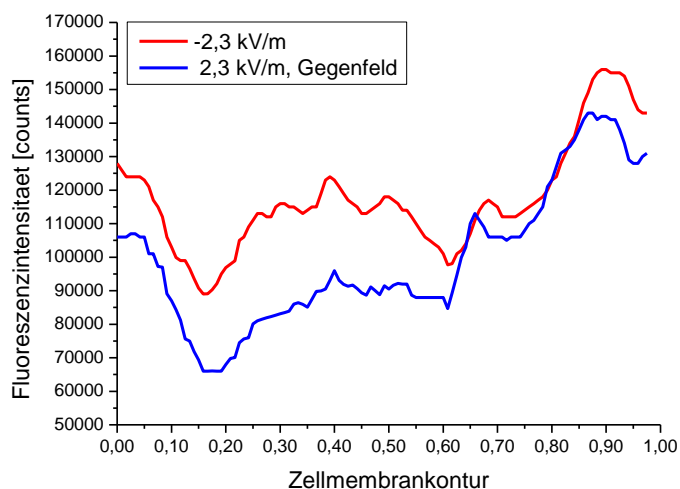


Abbildung 4-36: Fluoreszenzintensität, gemessen an der Zellmembran einer MCF-7 Zelle: Zelle einem elektrischen Feld von  $-2,3\text{kV/m}$  ausgesetzt (rote Kurve), Zelle einem in Gegenrichtung geschalteten elektrischen Feld von  $+2,3\text{kV/m}$  ausgesetzt (blaue Kurve).

Abbildung 4-37 zeigt wie der Membranpotentialverlauf einer solchen Zelle verläuft.

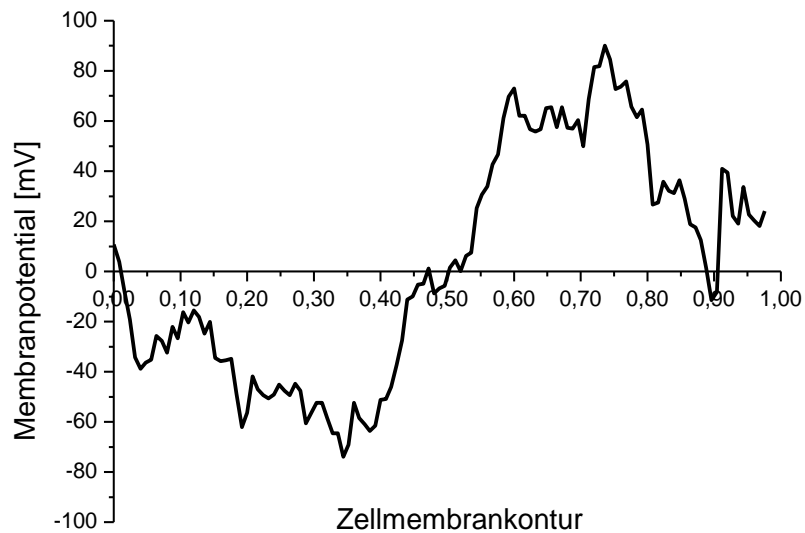


Abbildung 4-37: Membranpotentialverlauf an einer Mammakarzinomzelle (MCF-7) in HEPES-gepufferter Salzlösung mit  $2\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3), pH=7,4, die zuerst einem elektrischen Feld von  $-2,3\text{kV/m}$  und dann einem Gegenfeld von  $+2,3\text{kV/m}$  über die IDEs ausgesetzt war.

Aus der Abbildung 4-37 geht hervor, dass die Zelle mit einem elektrischen Feld (Rechteck,  $750\text{mV}$ ,  $10\text{ msec}$ , Tastverhältnis 1:15) umgepolt werden kann. Dabei wird eine Zellhälfte hyperpolarisiert und die andere depolarisiert. Die Fluoreszenzintensitätsänderung beträgt 25%, was dem Betrag von  $70\text{mV}$  entspricht (mittels der Kalibrierungskurve (siehe Abbildung 4-32) umgerechnet).

Die durchgeführten Messungen zeigten uns, dass jede Zellhälfte jeweils in Abhängigkeit von der Feldrichtung entweder depolarisiert oder hyperpolarisiert wird. Beim Wechsel der Feldrichtung kann die Zellmembran umgepolt werden.

#### 4.7.2 Zelle in einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Gegenfeld von 2,3kV/m

Desweiteren betrachten wir die Fluoreszenzantwort einer weiteren Zelle (Zelle 2, siehe Abbildung 4-30), die sich in einem gegengeschalteten elektrischen Feld von +2,3kV/m befand (Feldrichtung von oben nach unten, siehe Abbildung 4-38, Abbildung 4-39):

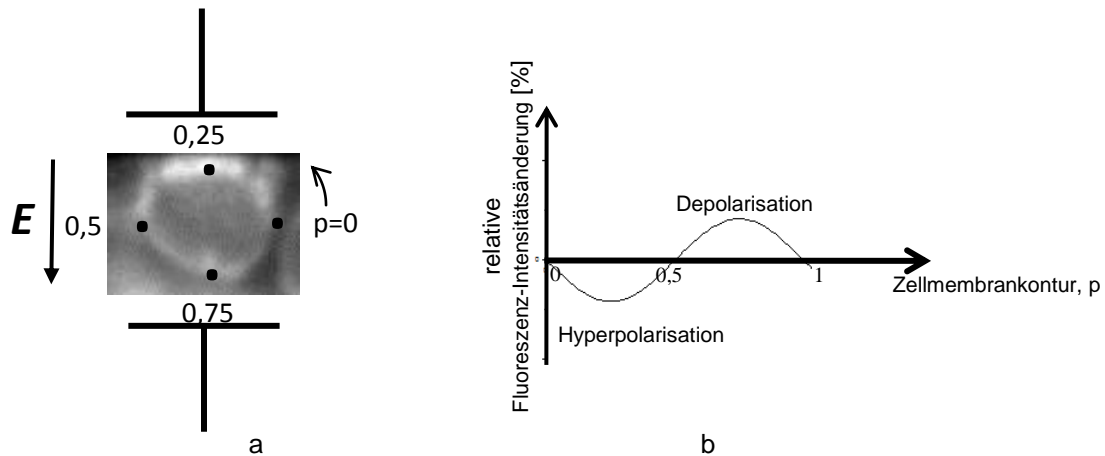


Abbildung 4-38: Membranpotentialänderung induziert durch ein in Gegenrichtung extern appliziertes elektrisches Feld von +2,3kV/m an einer MCF-7 Zelle: a) DiBAC<sub>4</sub>(3) Fluoreszenzänderung an einer Zelle; b) theoretischer Kurvenverlauf eines Membranpotentials entlang der Zellmembran.

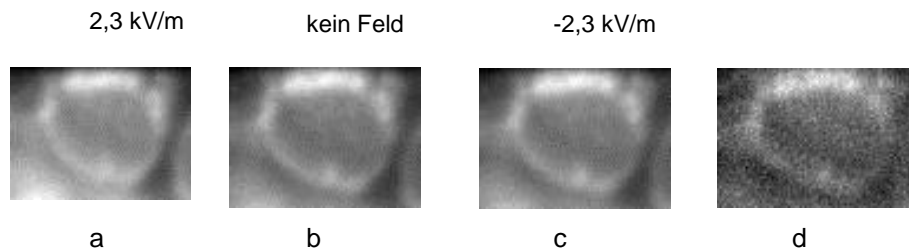


Abbildung 4-39: MCF-7 Zellen in HEPES-gepufferter Salzlösung, beladen mit 2µM DiBAC<sub>4</sub>(3), pH=7,4: a) Fluoreszenzantwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von +2,3kV/m ausgesetzt ist (Feldrichtung von oben nach unten); b) Zelle ohne appliziertes elektrisches Feld; c) Fluoreszenzantwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von -2,3kV/m in Gegenrichtung ausgesetzt ist (Feldrichtung von unten nach oben) d) Differenz der Bilder c) und a). Der graue Hintergrund wurde als Null-Wert angenommen.

Der Kurvenverlauf des Zellmembranpotentials wird in Abbildung 4-40 gezeigt. Dieses ist entlang der Zellmembran aufgezeichnet. Aus diesen beiden Kurven (Abbildung 4-40) berechnete man eine relative Fluoreszenzänderung über  $(F_b - F_k)/F_k$ . Wobei  $F_b$  die Fluoreszenzintensität an der Zellmembran einer Zelle in einem elektrischen Feld von 2,3kV/m zum Zeitpunkt 19 min ist und  $F_k$  die Fluoreszenzintensität an der Zellmembran einer Zelle in keinem elektrischen Feld zum Zeitpunkt 29 min (Kontrolle). Bei der Ermittlung der  $F_b$ - und  $F_k$ -Werte wurde von den jeweiligen Werten der Wert für die Fluoreszenzhintergrund abgezogen. Dadurch minimierte man den Einfluss des Hintergrundrauschens auf das Gesamtsignal.

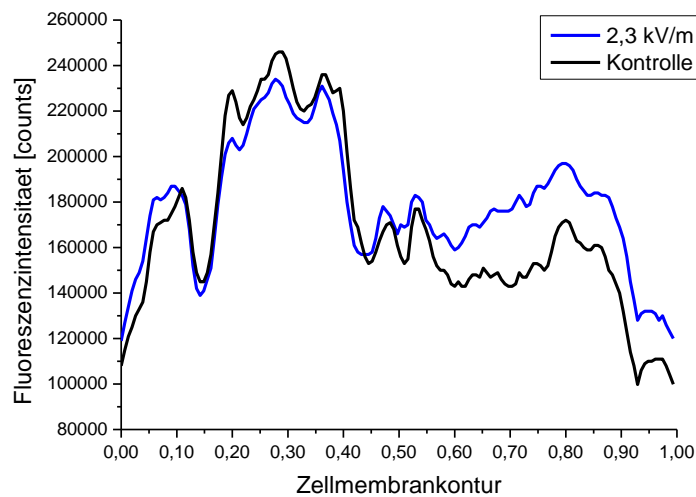


Abbildung 4-40: Fluoreszenzintensität, gemessen an der Zellmembran einer MCF-7 Zelle: Zelle einem elektrischen Feld von +2,3kV/m ausgesetzt (blaue Kurve); Zelle keinem elektrischen Feld ausgesetzt, Kontrolle (schwarze Kurve).

Abbildung 4-41 zeigt, wie sich der Membranpotentialverlauf einer Zelle, die einem elektrischen Gegenfeld (Änderung der Richtung auf 180°) ausgesetzt ist, ändert.

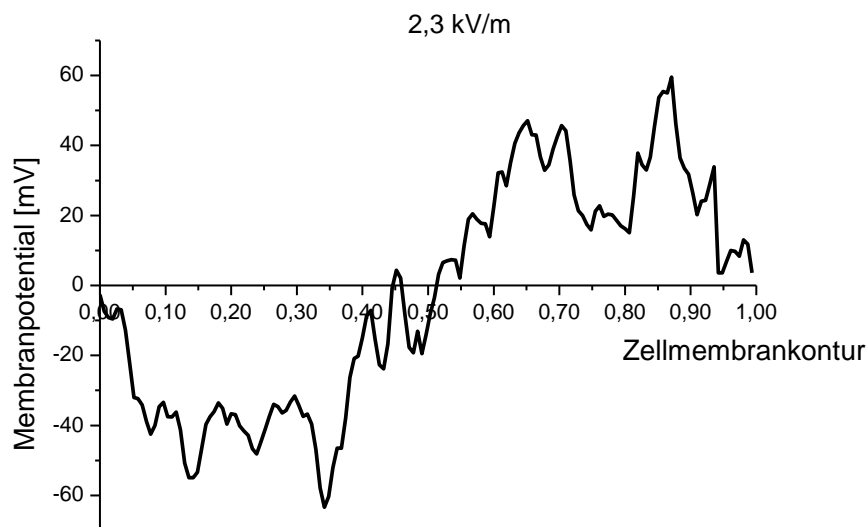


Abbildung 4-41: Membranpotentialverlauf an einer Mammakarzinomzelle (MCF-7) in HEPES-gepufferter Salzlösung mit  $2\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3), pH=7,4, die einem elektrischen Feld von +2,3kV/m ausgesetzt war.

Die Messung zeigte uns die Hyperpolarisation der einen und die gleichzeitige Depolarisation der anderen Zellhälfte. Die Fluoreszenzintensitätsänderung beträgt 12,5%. Anhand einer Kalibrationskurve umgerechnet wies eine Zelle in einem elektrischen Feld von 2,3kV/m eine Änderung des Membranpotentials im Intervall von -35mV bis +35mV auf.

Ein Transmembranpotential an einer einem elektrischen Feld ausgesetzter Zelle variierte von positiv auf der zur Kathode zugewandten Seite (Depolarisation) zu negativ auf der zur

Anode zugewandten Seite (Hyperpolarisation). Daraus resultiert die Depolarisation der einen Zellhälfte und die gleichzeitige Hyperpolarisation der anderen Zellhälfte. Mit der Änderung der Feldrichtung auf  $180^\circ$  wurde die Zelle einem Gegenfeld ausgesetzt. Die Zelle in einem elektrischen Feld von  $2,3\text{kV/m}$  wies eine Änderung des Membranpotentials im Intervall von  $-35\text{mV}$  bis  $+35\text{mV}$  auf. Das Rauschen des Signals resultiert aus den Limitierungen der Objektivvergrößerung (20x).

Nachfolgend betrachten wir die Fluoreszenzantwort einer Zelle in einem 10-fach kleineren elektrischen Feld ( $230\text{V/m}$ ) in der Richtung von unten nach oben und in der Gegenrichtung (von oben nach unten).

#### 4.7.3 Zelle in einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld von $-230\text{ V/m}$

Betrachten wir die Auswertungsschritte am Beispiel einer Zelle 3 (siehe Abbildung 4-42), bei der ein elektrisches Feld zuerst in Richtung von unten nach oben und dann in Gegenrichtung über die Längenelektroden angelegt wurde. Die angelegte Spannung betrug ebenso  $750\text{mV}$ . Der Versuch wurde nach dem Protokoll aus Kapitel 3.9.4 durchgeführt.

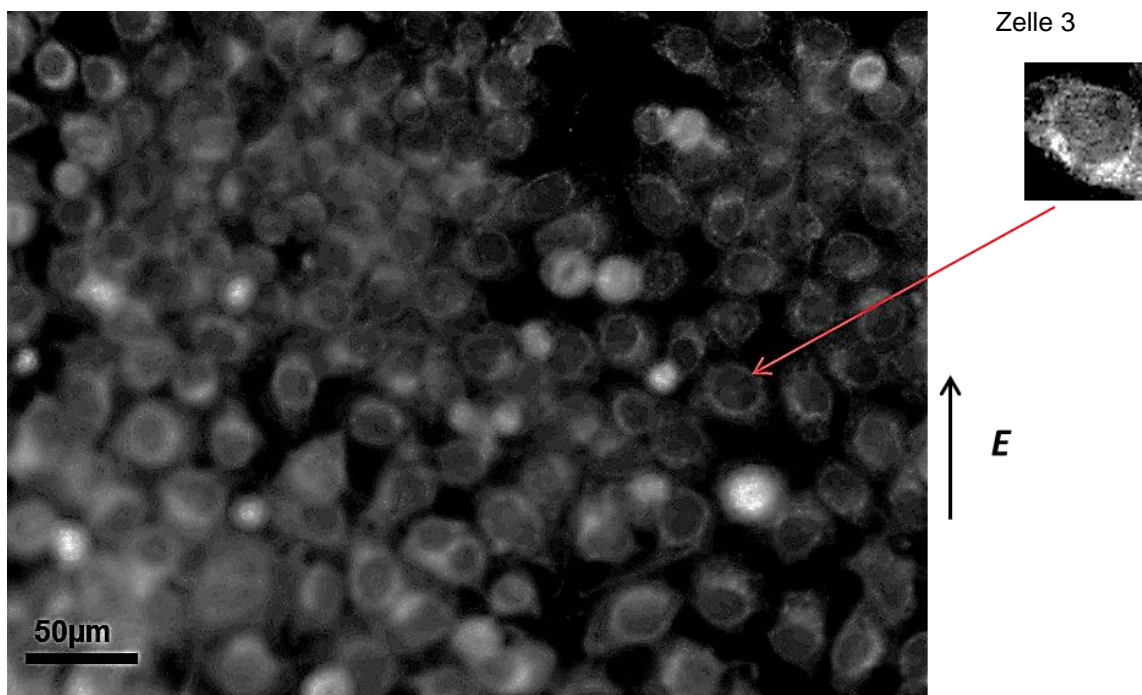


Abbildung 4-42: Mammakarzinomzellen (MCF-7) auf einem Glas-Sensorchip in HEPES-PS unter Zugabe von  $2\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3). Die Zellen sind einem elektrischen Feld von  $-230\text{V/m}$  über die Längenelektroden ausgesetzt. Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten.

Die Auswertungsschritte entsprechen denen in Kapitel 4.7.1. Bei jedem einminütigen Videoausschnitt (9., 19. und 39. Minute) ermittelte man einen Intensitätsmittelwert (siehe Abbildung 4-43).

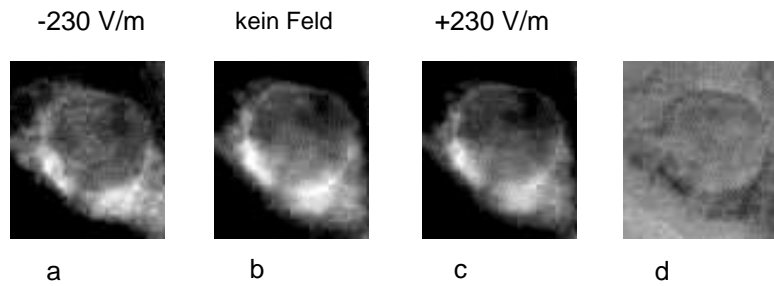


Abbildung 4-43: MCF-7 Zellen in HEPES-gepufferter Salzlösung, beladen mit  $2\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3), pH=7,4: a) Fluoreszenzantwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von -230V/m ausgesetzt ist (Feldrichtung von unten nach oben); b) Zelle ohne appliziertes elektrisches Feld; c) Fluoreszenzantwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von +230V/m in Gegenrichtung ausgesetzt ist (Feldrichtung von oben nach unten) d) Differenz der Bilder c) und a). Der graue Hintergrund wird als Null-Wert angenommen.

Der Kurvenverlauf des Zellmembranpotentials wird in Abbildung 4-44 gezeigt. Dieses ist entlang der Zellmembran aufgezeichnet. Aus diesen beiden Kurven berechnete man die relative Fluoreszenzänderung (siehe Kapitel 4.7.1).

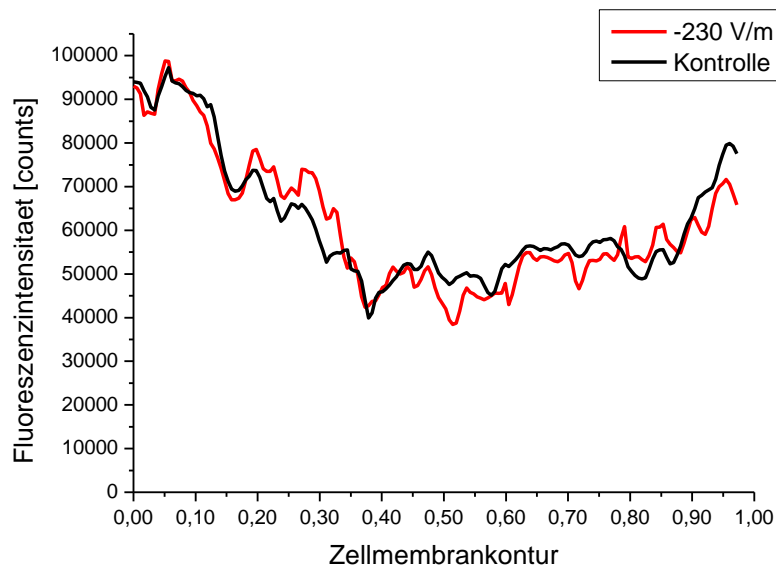


Abbildung 4-44: Fluoreszenzintensität, gemessen an der Zellmembran einer MCF-7 Zelle: Zelle einem elektrischen Feld von -230V/m ausgesetzt (rote Kurve); Zelle keinem elektrischen Feld ausgesetzt, Kontrolle (schwarze Kurve).

Abbildung 4-45 zeigt, wie der Membranpotentialverlauf einer solchen Zelle verläuft.

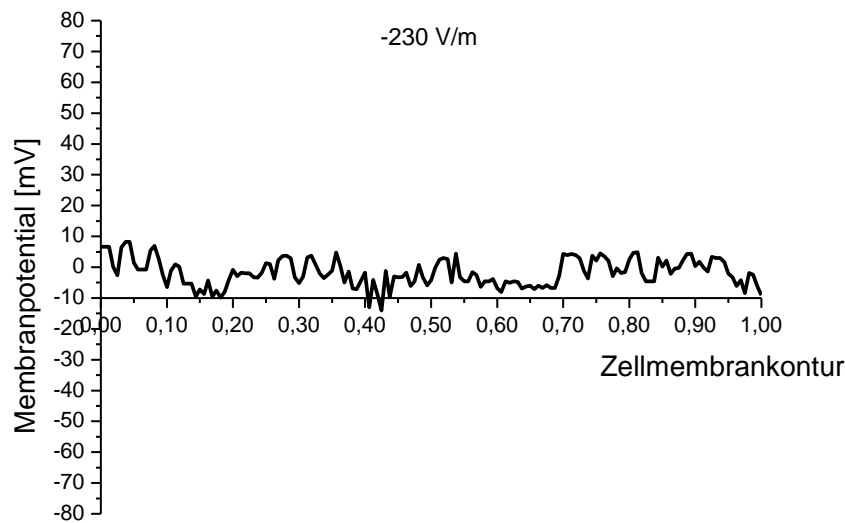


Abbildung 4-45: Membranpotentialverlauf an einer Mammakarzinomzelle (MCF-7) in HEPES-gepufferter Salzlösung mit  $2\mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3), pH=7,4, die einem elektrischen Feld von  $-230\text{V/m}$  ausgesetzt war.

Abbildung 4-45 zeigt, dass die Feldstärke von  $-230\text{V/m}$  kein nachweisbares Umschalten der Zellmembran verursachen konnte.

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Membranpotential einer Zelle von dem Betrag der elektrischen Feldstärke abhängt und mit der Feldrichtung geändert werden kann. Wenn eine Zelle einem elektrischen Feld von  $2,3\text{kV/m}$  ausgesetzt wurde, betrug die Membranpotentialänderung  $35\text{mV}$ , bei  $230\text{V/m}$  wurde keine Änderung gemessen.

Das gemessene Signal ist etwas verrauscht, was durch die Objektivvergrößerung (20x) verursacht wird. Durch die gegebene optische Anordnung hat man pro Bildausschnitt mehrere Zellen. Eine einzelne Zelle ist vergleichsweise klein in dieser Abbildung. Auf Grund dessen hat man relativ wenig Bildinformation von der Zellmembran und dadurch nur eine begrenzte Auflösung. Eine zusätzliche Limitierung war der Kamera-Chip, der mit 8-bit Graustufen aufnimmt.

Der Zellmembran-Kontur folgend, zeigte die Akkumulation des Farbstoffs die nach den elektrischen Umladungseffekten zu erwartenden Tendenzen.



#### 4.8 Untersuchung der Proliferation und des Membranpotentials unter Verwendung des $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Karrierblockers Amilorid und Variation der extrazellulären pH-Werte

Der extrazelluläre und intrazelluläre pH-Wert spielt eine wichtige Rolle für das zelluläre Wachstum. Extra- und intrazelluläre pH-Werte sind eng miteinander verbunden und eine extrazelluläre Azidose führt zur Azidose im intrazellulären Raum. Eine Abnahme des pH-Werts im cytosolischen Bereich führt zur Abnahme der metabolischen Aktivität und kann Apoptose verursachen [130]. Andererseits besagt die Hypothese von Binggeli und Weinstein, dass teilungsfähige Zellen, wie Tumorzellen oder embryonale Zellen, ein weniger negatives Transmembranpotential als nicht-teilungsfähige Zellen, wie Muskel- und Nervenzellen, aufweisen [32]. Basierend auf diesen Beobachtungen könnte man vermuten, dass eine Abnahme des extrazellulären pH-Wertes zu einer Abnahme des Membranpotentials (Hyperpolarisation) führen könnte.

Es wurden am Beispiel der MCF-7 Zellen Effekte von verschiedenen extrazellulären pH-Werten (7,4; 7,0; 6,5 und 6,0) unter Verwendung von Kanalblockern wie Amilorid ( $40\mu\text{M}$ ) auf den Metabolismus und Membranpotential untersucht.

Amilorid wurde 24h nach dem Start der Messung über die gesamte Messdauer zugegeben. 6 h nach Start der Messung erfolgte ein pH-Wert-Wechsel des Mediums. Es wurde ein Messprotokoll ausgewählt, bei dem der Pipettierroboter bereits 6h nach Start der Messung auf ein neues Medien-Vorratsgefäß wechselt. In diesem befand sich gepuffertes Messmedium (DMEM D5030, 25mM D-Glucose,  $50\mu\text{g/ml}$  Gentamycin, 4mM L-Glutamin, 5% FCS und 10mM HEPES (pH 7,4 u. 7,0) oder MES (pH 6,5 und 6,0) mit den entsprechenden pH-Werten [181].

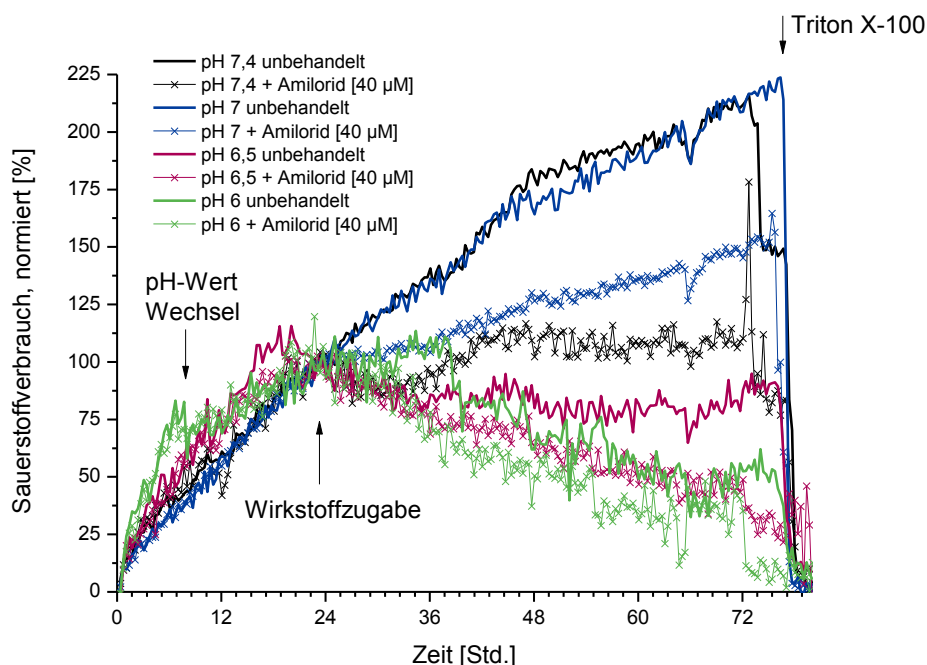


Abbildung 4-46: Sauerstoffverbrauchsmessung von MCF-7 Zellen in einer 24-Well iMPW unter Verwendung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  Antiporters Amilorid ( $40\mu\text{M}$ ) und Variation der extrazellulären pH-Werte. Die Werte sind auf den Wert der Wirkstoffzugabe 24h normiert. Gesamtzellzahl  $5 \times 10^4$  Zellen/Well. Entnommen aus [181].

Wie Abbildung 4-46 zeigt, führt ein Absinken des pH-Werts im extrazellulären Raum zur Abnahme der metabolischen Aktivität. Der Sauerstoffverbrauch der Zellen sinkt proportional zum pH-Wert im extrazellulären Raum. Aus diesen Messungen geht hervor, dass mit einem alkalischen pH-Wert die metabolische Aktivität stärker beeinträchtigt wird. Das könnte auf eine Hemmung der mitochondrialen Aktivität und der Proliferation hindeuten. Alle Werte sind auf den Zeitpunkt der Wirkstoffzugabe (24h) normiert. [181]

Variationen der extrazellulären pH-Werte führen auch zu unterschiedlich starken Reaktionen auf die Amilorid-Behandlungen. Die Behandlung der MCF-7 Zellen mit dem Kanalblocker führt zu einer signifikanten Sauerstoffverbrauchsabnahme proportional zur extrazellulären pH-Wert-Abnahme. Unter sehr sauren extrazellulären Bedingungen ( $\text{pH}_{\text{ex}}=6,0$ ) zeigen die Zellen eine geringe Reaktion auf die Amiloridzugabe. Die mitochondriale Aktivität ändert sich in diesem Fall kaum. [181]

Weiterhin wurde untersucht, ob Variationen der extrazellulären pH-Werte zu einer Änderung des Membranpotentials führen.

Die Messung des Membranpotentials wurde nach dem Protokoll aus Kapitel 3.10.2 durchgeführt.

Die Abhängigkeit des Membranpotentials vom pH-Wert im extrazellulären Raum wird in Abbildung 4-47 gezeigt.

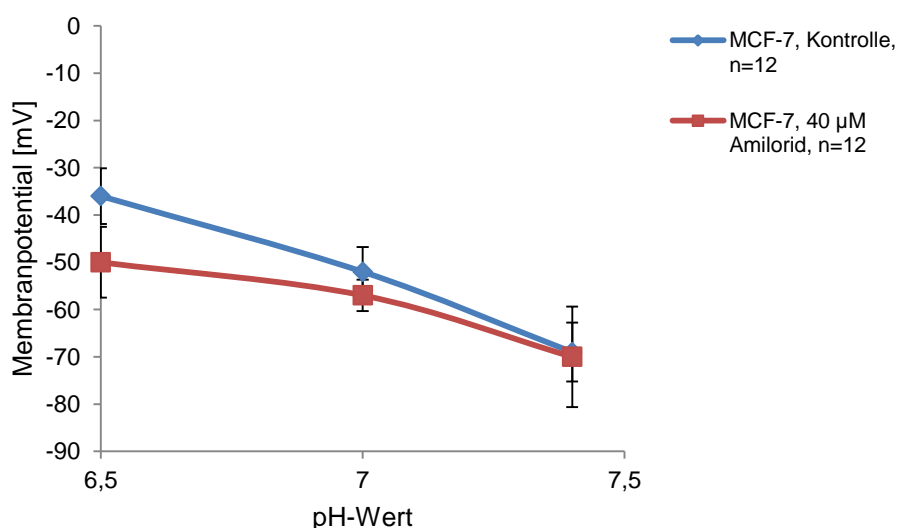


Abbildung 4-47: Membranpotential gemessen an MCF-7 Zellen in HEPES-PS bei  $\text{pH}=7,4$ ;  $\text{pH}=7,0$  und MES-PS bei  $\text{pH}=6,5$ . Die Inkubationszeit betrug 45 min.

Die extrazelluläre Azidose zeigt eine Verschiebung des Membranpotentials in Richtung positiver Werte. In unserem Fall führt eine Änderung des extrazellulären pH-Werts von 7,4 auf 6,5 zu einer Änderung des Membranpotentials von -70mV (MW,  $n=12$ ) auf -37mV (MW,  $n=12$ ). Die statistischen Auswertungen zeigen eine Signifikanz (siehe Anhang H, Tabelle 6-37, Tabelle 6-38 und Tabelle 6-39). Unter sehr sauren extrazellulären Bedingungen ( $\text{pH}_{\text{ex}}=6,0$ , Daten sind nicht gezeigt) konnte man keinen Unterschied zwischen Kontroll- und behandelter Gruppe messen.

Die Amilorid-Behandlung zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Membranpotentialänderung im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Anhang H, Tabelle 6-37, Tabelle 6-38 und Tabelle 6-40). Aus den Messungen kann man aber erkennen, dass die Zellmembran mit steigender Azidose im extrazellulären Raum ( $\text{pH}_{\text{ex}}=6,5$ ) im Vergleich zur Kontrolle weniger depolarisiert ist. Das könnte auf die Blockade der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Carrier hindeuten und zu einer indirekten Hyperpolarisation der Zellmembran führen.

#### 4.8.1 Morphologie von MCF-7 Zellen

Um die morphologischen Auswirkung des extrazellulären pH-Werts und des Kanalblockers Amilorid sichtbar zu machen, sind Aufnahmen mittels eines Durchlichtmikroskops erfasst worden. Im Folgenden sind Bilder der unbehandelten Zellen (unterschiedliche pH-Werte; pH=7,4; 7,0 und 6,5) und der mit dem Kanalblocker Amilorid behandelten Zellen (unterschiedliche pH-Werte unter Zugabe von 40µM Amilorid) gezeigt (siehe Abbildung 4-48 - Abbildung 4-50).

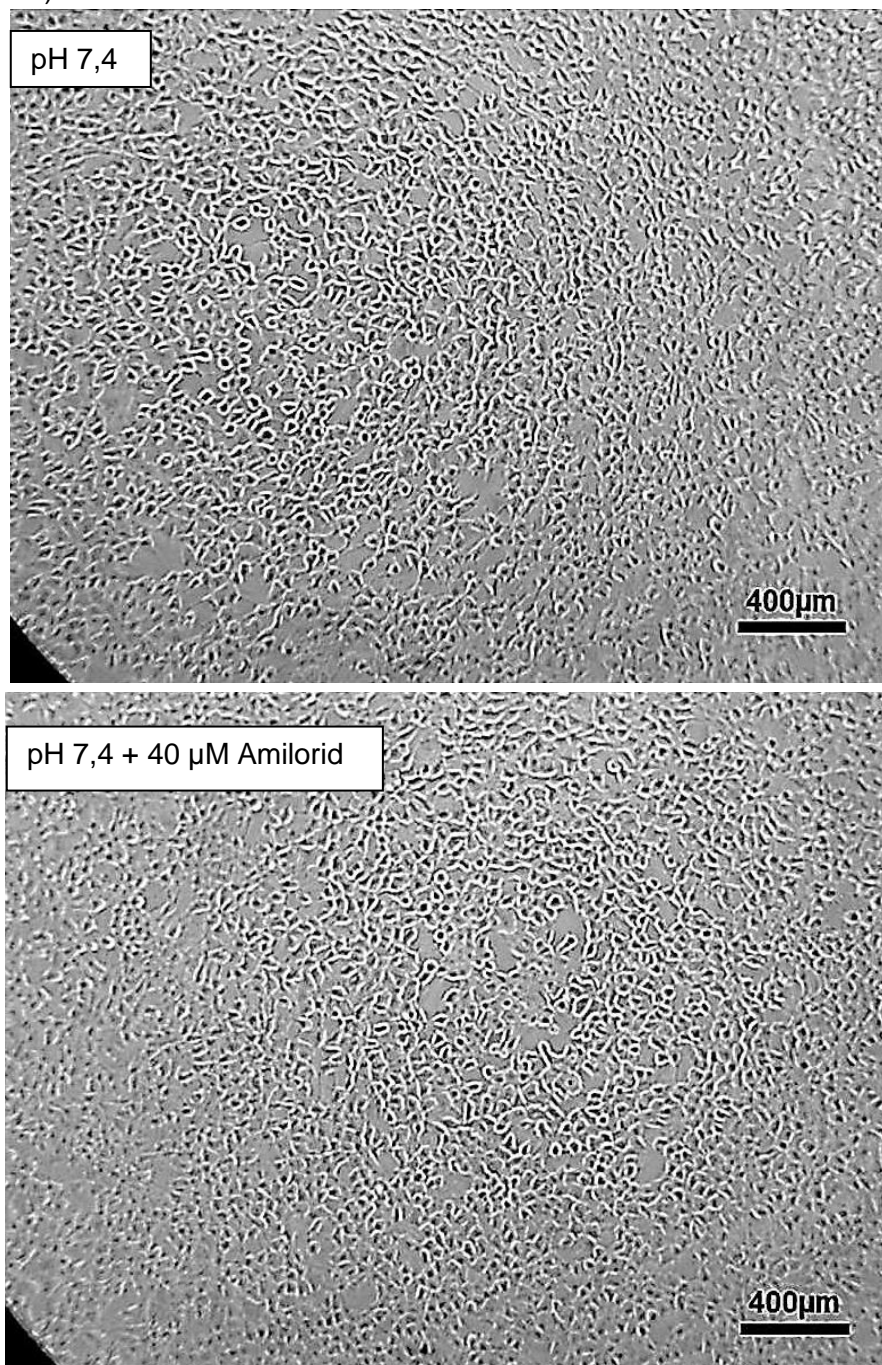


Abbildung 4-48: Morphologie der MCF-7 Zellen nach Variation des extrazellulären pH-Werts (pH=7,4) unter Verwendung des Kanalblockers Amilorid (40µM). Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten. Die morphologische Untersuchung zeigte, dass die Zellmorphologie nicht unmittelbar erkennbar beeinflusst wurde. In anderen Wells zeigte sich ein vergleichbares Verhalten.

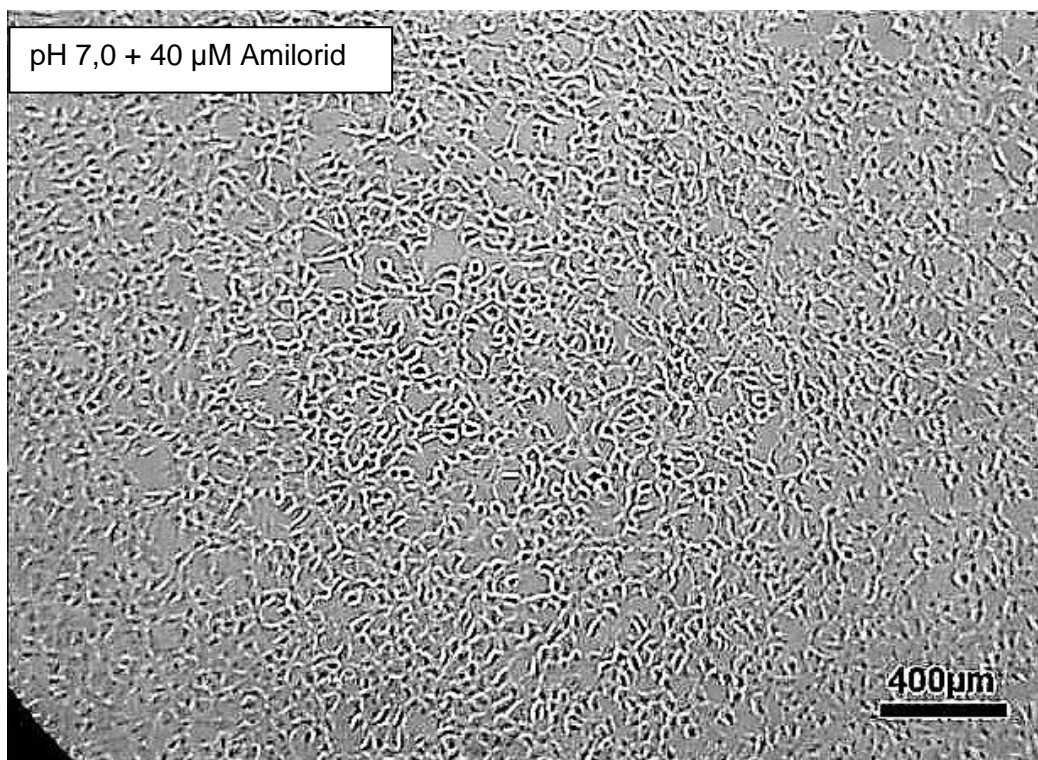
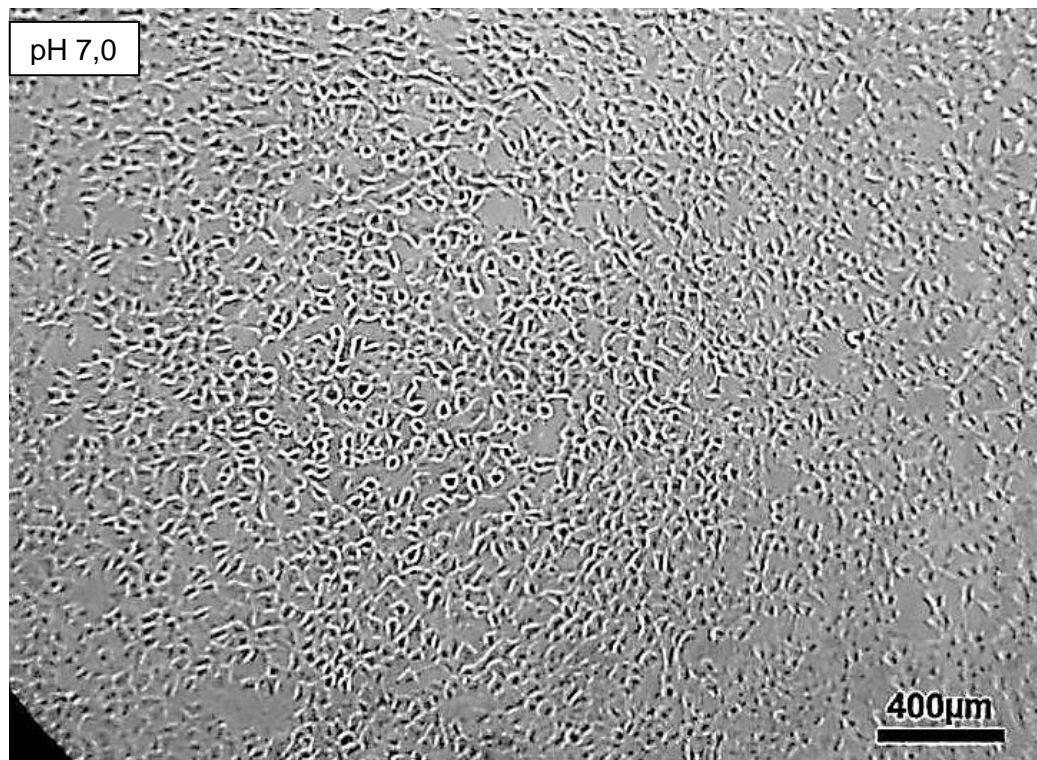


Abbildung 4-49: Morphologie der MCF-7 Zellen nach Variation des extrazellulären pH-Werts (pH=7,0) unter Verwendung des Kanalblockers Amilorid (40µM). Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten. Die morphologische Untersuchung zeigte, dass die Zellmorphologie nicht unmittelbar erkennbar beeinflusst wurde. In anderen Wells zeigte sich ein vergleichbares Verhalten.



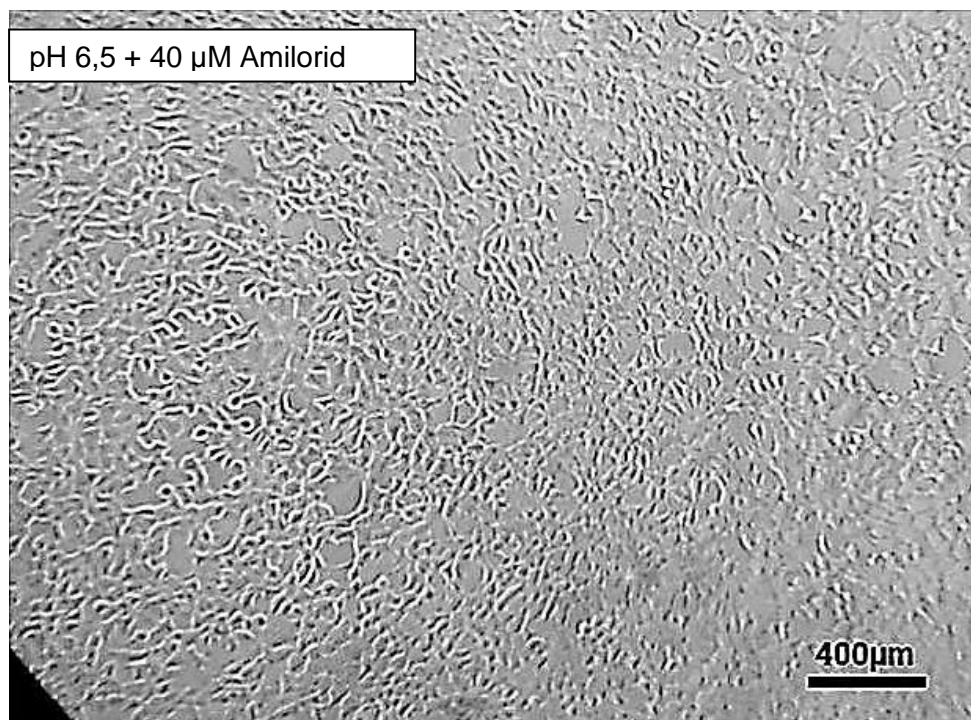
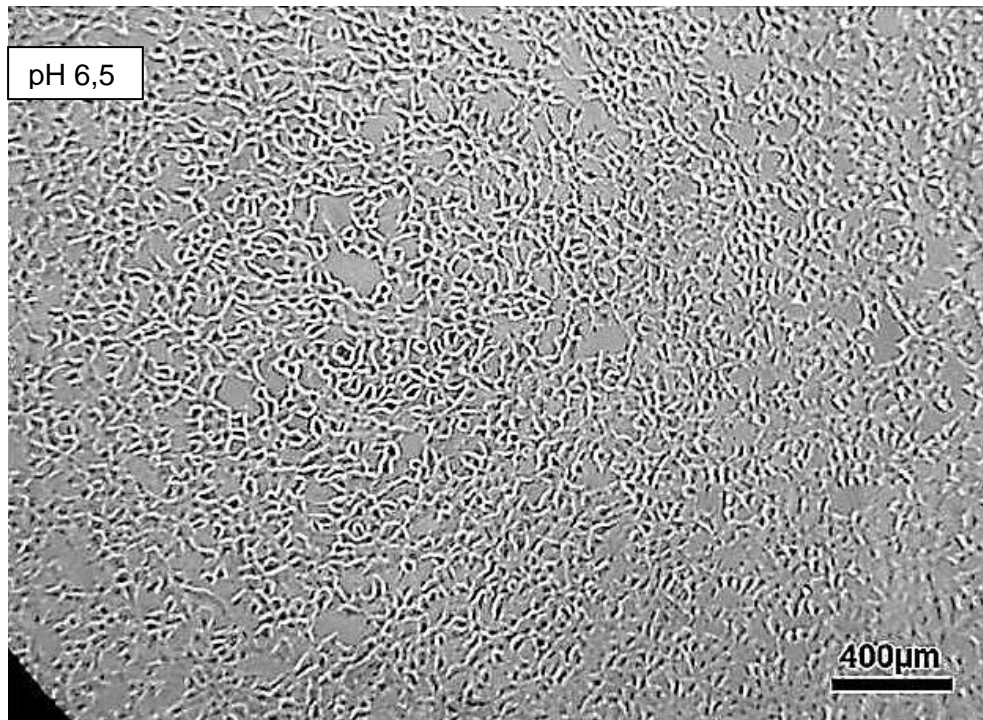


Abbildung 4-50: Morphologie der MCF-7 Zellen nach Variation des extrazellulären pH-Werts (pH=6,5) unter Verwendung des Kanalblockers Amilorid (40µM). Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten. Die morphologische Untersuchung zeigte, dass die Zellmorphologie nicht unmittelbar erkennbar beeinflusst wurde. In anderen Wells zeigte sich ein vergleichbares Verhalten.

Die Morphologie der MCF-7 Zellen nach Variation der extrazellulären pH-Werte (pH-Wert 7,4; 7,0 und 6,5) zeigte größtenteils intakte Zellen: Es gibt keinen unmittelbar erkennbaren Unterschied in der Morphologie der unterschiedlichen pH-Wert-Gruppen. Die Zugabe des Kanalblockers Amilorid (40µM) wies ebenso keinen unmittelbar erkennbaren Einfluss auf die Morphologie auf.

## 5 DISKUSSION

Die elektrische Stimulation von Tumorzellen durch elektrische Felder fand als alternative Behandlungsmethode zu etablierten Tumortherapien in den letzten Jahren eine immer stärkere Beachtung. Dadurch können in erster Linie das Membranpotential, die mitochondrielle Aktivität, das Zellvolumen, die Enzymaktivität, die DNA-Synthese, das Zellwachstum und die Proliferation, die Aktivierung der Wachstumsfaktoren, die Differenzierung, die Onkogenese und die maligne Transformation beeinflusst werden. In deren Folge kommt es auch zu mannigfaltigen Auswirkungen auf die Signaltransduktion und den Metabolismus [93, 94]. Unter bestimmten Bedingungen sind diese Prozesse irreversibel und können damit in verschiedenen Gebieten der Medizin eingesetzt werden. Deren Einsatz, vorrangig in der Onkologie, ist denkbar.

So zeigten einige Forschungsarbeiten eine inhibitorische Wirkung von elektrischen Feldern auf die Proliferation von Tumorzellen. Bekannt ist, dass elektrische Felder mit Frequenzen von 100kHz bis 300kHz die Teilung von Tumorzellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* verzögern können [55, 61, 64, 114]. So beschrieb die Arbeitsgruppe von Wang einen proliferationshemmenden Effekt auf Endothelzellen und Linsenepithelzellen bei einem elektrischen Feld (2V/cm, Gleichspannung), wobei die Zellen in eine G1/S Phase übergangen und eine Abnahme der E Zyklin Expression aufwiesen [221]. Die elektrische Stimulation von Mausfibroblasten (L929) mit harmonischen Feldern (ab 1V/cm,  $f$  unter 1kHz) zeigte ebenso eine Wachstumshemmung [89]. Niedrige Frequenzen ( $f \leq 1$ kHz) können Teile der Membran depolarisieren und somit zu einer Schädigung der Zelle führen [119]. Speziell die Ionenkanäle reagierten hierbei empfindlich auf das E-Feld [54]. Es wurde auch die Proliferationshemmung bei Tumorzellen unter elektrischer Stimulation (2V/cm, 100-300kHz) beschrieben [120]. Innerhalb der spannungsgesteuerten Ionenkanäle reagierten bestimmte Moleküle auf Veränderungen im elektrischen Feld in der Zelle [30]. Ein veränderter Ionenfluss kann wiederum Auswirkungen auf das Membranpotential haben und damit das Teilungsverhalten der Zellen beeinflussen [32]. In diesen Arbeiten sind unterschiedliche Befeldungsprotokolle zur Anwendung gekommen, wodurch eine Vergleichbarkeit des Wirkungsgrades elektrischer Felder erschwert wird.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde zum einen der Zusammenhang zwischen der Depolarisation/Hyperpolarisation der Zellmembran und der Proliferationshemmung an Zellen, die einem elektrischen Feld ausgesetzt wurden, gezeigt. Zum anderen wurden parallel der Zellmetabolismus und die Zellmorphologie untersucht. Dabei konnte anhand der Simulation gezeigt werden, dass durch die unterschiedlichen Frequenzen (100Hz bzw. 150kHz) unterschiedliche Signalwege aktiviert werden können.

Basierend auf verschiedenen Studien zeigten Binggeli und Weinstein, dass sich das Transmembranpotential verschiedener Zellen in Abhängigkeit von ihrer Proliferation verändert. Die teilungsfähigen Zellen, wie Tumorzellen oder embryonale Zellen, weisen weniger negative Transmembranpotentiale auf als Zellen, die keinen neoplastischen Ursprung haben [32]. Auf Grund dieser Hypothese kann man eine Korrelation zwischen der mitotischen Aktivität einer Zelle und dem Transmembranpotential vermuten.

In dieser Hinsicht gewinnt die Frage, wie biologische Systeme bzw. die Zellen von elektrischen Feldern zu beeinflussen sind, immer mehr an Gewicht. Bei diesen Therapien spielen sowohl der Ionentransport als auch der intrazelluläre pH-Wert eine entscheidende Rolle.

Die Beeinflussung der Proliferation und des Metabolismus von Tumorzellen als auch des Membranpotentials durch extern applizierte elektrische Felder oder extrazelluläre Azidose stand im Vordergrund dieser Arbeit.

Dabei wurde untersucht, ob sich die Teilungsaktivität, der Metabolismus, die Morphologie und das Transmembranpotential von Tumorzellen durch das Anlegen elektrischer Felder beeinflussen bzw. inhibieren lassen. Zudem wurden die elektrischen Felder um eine Tumorzelle bei verschiedenen Befeldungsarten (direkt, kapazitiv) simuliert. Für die Erklärung einer möglichen Feldwirkung wurden verschiedene Herangehensweisen (Befeldungsmuster, Befeldungsart) bei der Experimentplanung verwendet. Die Mammakarzinomzellen (MCF-7 Zellen) stimulierte man dabei mit niederfrequenten gepulsten elektrischen Feldern und sinusförmigen elektrischen Feldern, wobei zelluläre Prozesse beeinflusst werden.

Weiterhin wurden am Beispiel von MCF-7 Zellen die Effekte von extrazellulärer Azidose (unterschiedliche extrazelluläre pH-Werte) unter Verwendung von  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Karrierblockern wie Amilorid auf den Metabolismus und das Membranpotential untersucht.

## 5.1 Eigenschaften der Stimulationselektroden

Um die Informationen über die Charakterisierung der Elektroden-Eigenschaften der für die elektrische Stimulation eingesetzten Elektroden in physiologischen Lösungen zu gewinnen, sind die Kenntnisse über Parameter wie die Elektrodenimpedanz und die an den Elektroden entstandenen Stromdichten erforderlich.

### 5.1.1 Elektrodenverhalten

Es wurde eine Charakterisierung der Elektroden im Frequenzbereich durchgeführt. Dafür kamen elektrochemische Methoden zum Einsatz. Diese erlauben es, sowohl die Eigenschaften als auch Änderungen der Grenzfläche Elektrode-Elektrolyt zu untersuchen.

Folgende Reaktionen können auf der Pt-Elektrode auftreten, die als Anode betrachtet wird (siehe Tabelle 5-1).

Elektrolyse des Wassers, Oxidation	$2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 \uparrow + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$	(5-1)
Oxidation der Salze	$\text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ClO}^- + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	(5-2)
Oxidation der Metalle	$\text{Pt} + 4\text{Cl}^- \rightarrow \text{PtCl}_4^{2-} + 2\text{e}^-$	(5-3)
Oxidation der organischen Stoffe	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 6\text{CO}_2 + 24\text{H}^+ + 24\text{e}^-$	(5-4)

Tabelle 5-1: Elektrochemische Reaktionen auf den Platin-Elektroden. Die Elektrode wird als Anode betrachtet (entnommen aus [39]).

Auf der Pt-Elektrode, die als Kathode betrachtet wird, kann folgende Reaktion auftreten:  $2\text{H}_2\text{O} + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2 \uparrow + 2\text{OH}^-$  (Elektrolyse des Wassers, Reduktion). Durch Wasserelektrolyse könnte es zur Gasentwicklung kommen, was für die Zellen schädlich ist. Weiterhin kann die Elektrolyse von Wasser eine lokale Änderung des pH-Werts in Elektrodennähe hervorrufen. Diese Reaktion kann durch die Wahl der Signalform und der induzierten Ladungsmenge (<SSC, siehe Kapitel 4.1.1) minimiert werden (ladebilanziertes biphasisches Signal statt einem monopolaren Signal). Reaktion (5-2) beschreibt die Oxidation der Salze und ist hier als wahrscheinlichste Reaktion präsentiert. Diese Reaktion ist vermutlich harmlos. Obwohl  $\text{ClO}^-$  ein hoch wirksames Oxidationsmittel ist, welches kinetisch aktiv ist. Weitere mögliche Oxidationsprodukte wie z. B.  $\text{ClO}_4^-$  sind auch starke Oxidationsmittel. Diese sind aber weniger kinetisch aktiv. Reaktion (5-3) beschreibt die Oxidation der Metalle der Elektrodenoberfläche. Dies kann zum Auflösen der Elektrodenoberfläche führen. Platin ist in einigen Fällen ein



starkes Oxidationsmittel und kann durch organische Spezies (z. B. durch Glukose), die in Zellkulturmedium vorhanden sind, reduziert werden. So ist die Platinauflösung (falls die Pt-Elektrode als Anode betrachtet wird) in Cl-haltigen Medien gut bekannt. Die Metallauflösung lässt sich nicht vermeiden und kann nicht komplett durch eine niedrigere Ladungsdichte unterdrückt werden. Reaktion (5-4) beschreibt die Oxidation der organischen Stoffe wie z. B. Glukose. Diese kann entweder zum Teil oder komplett zu  $\text{CO}_2$  oxidiert werden. Diese Prozesse stellen kein spezielles Problem dar, weil die Oxidationsprodukte nicht toxisch für die Zellen sind. Die Reaktionen (5-2)-(5-4) können auch durch eine geänderte Signalform (z.B. ladebilanziertes biphasisches Signal) nicht vermieden werden. [39, 40]

In Tabelle 5-2 sind drei mögliche Reaktionen aufgelistet, die den Ladungstransfer zwischen den Platin-Elektroden und dem Medium bzw. Zellen beschreiben:

Doppelschicht-Aufladung	$Pt (-) \text{stößt } Cl^- \text{ ab} \leftrightarrow Pt (+) \text{zieht } Cl^- \text{ an}$	(5-5)
Flächen-Oxidation	$Pt + H_2O \leftrightarrow Pt + 2H^+ + 2e^-$	(5-6)
Wasserstoff-Atom Plattierung	$Pt - H \leftrightarrow Pt + H^+ + e^-$	(5-7)

Tabelle 5-2: Mögliche Reaktionen, die den Ladungstransfer zwischen den Platin-Elektroden und dem Medium bzw. Zellen beschreiben (entnommen aus [39]).

Reaktion (5-5) beschreibt die Doppelschicht, die sich am Übergang Elektrode-Elektrolyt bildet. Dieser Prozess ist reversibel. Reaktion (5-6) beschreibt die chemisch reversible Oxidation oder Reduktion von Platin an der Elektrode. Reaktion (5-7) tritt schon bei niedrigeren Potentialen auf und führt zur Minimierung der Metallauflösung. Diese Reaktion ist kinetisch reversibel und verbraucht sehr wenig Energie. [39, 40]

Die optimalste Signalform für die Minimierung der elektrochemischen Effekte ist ein biphasisches harmonisches Signal. Bei einem monopolaren Signal muss dagegen die Wiederholungsrate niedrig sein.

Elektrochemische Systeme sind nicht-linear und das Stromverhalten zu Spannungsverhalten ist annähernd exponentiell (Butler-Volmer-Gleichung). In elektrischen Systemen ist dieses Verhalten linear (Ohmsches Gesetz). Weiterhin ist das Verhalten von solchen Systemen zeitabhängig. Zudem enthalten elektrochemische Systeme oft aktive Elemente. Während elektrische Systeme meist aus passiven Elementen bestehen [89, 144].

Um das nicht-lineare Verhalten des Systems zu analysieren, wurden chronoamperometrische Messungen der auf dem Glas-Sensorchip entstandenen Ströme durchgeführt. Anhand der gemessenen Stromdichten wurde abgeschätzt, welchen Anteil der Faraday'sche Strom an dem Gesamtstrom, der an den Elektroden abfließt, leistet. Bei einer Pulsspannung mit einer Amplitude von 750mV und einer Signaldauer von 10ms ergibt sich, dass der Faraday'sche Stromanteil am Gesamtstrom 99% ausmacht (siehe Kapitel 4.1.2). Das weist darauf hin, dass der Großteil der in diesem System abfließenden Ströme einen elektrochemischen Ursprung hat.

Brummer et al. zeigten in einer Arbeit, dass Wasserelektrolyse und Oxidation der Salze bei ladebilanzierten biphasischen Signalen (zero net DC), einem bis zu  $300 \pm 20 \mu\text{Q}/\text{cm}^2$  limitierten Ladungstransfer (Elektrode als Anode) bzw. bis zu  $350 \pm 50 \mu\text{Q}/\text{cm}^2$  (Elektrode als Kathode) und Stromdichten von  $\pm 50$  bis  $\pm 450 \text{mA}/\text{cm}^2$  vermieden werden kann [40].

Aus den durchgeführten Messungen hat sich ergeben: Bei 100Hz direkter Stimulation (Höhe der angelegten Spannung von 750mV) liegen die Impedanzwerte bei 4k $\Omega$ , die ab 150kHz bei 60 $\Omega$  konvergieren (siehe Kapitel 4.1.2, Abbildung 4-2).

Aus diesen Messungen kann die an den Elektroden fließende Stromstärke bestimmt werden. Die Elektrodenfläche des Glas-Sensorchips beträgt  $0,08\text{cm}^2$ . Daraus ergibt sich bei einer Frequenz von  $100\text{Hz}$  und einer Anregungsspannung von  $750\text{mV}$  eine Stromstärke von  $2,3\text{mA/cm}^2$  und bei einer Frequenz von  $150\text{kHz}$  eine Stromstärke von  $156\text{mA/cm}^2$ .

Auf Grund dieser Daten kann der Ladungstransfer von Platin-Elektroden an das Medium ausgerechnet werden. Bei der Anregungsspannung von  $750\text{mV}$  und Signaldauer von  $10\text{ms}$  ( $100\text{Hz}$ ) beträgt der Ladungstransfer  $23\mu\text{Q/cm}^2$  (Elektrodenfläche  $0,08\text{cm}^2$ ), bei Signaldauer von  $6,7\mu\text{s}$  ( $150\text{kHz}$ ) beträgt der Ladungstransfer  $1\mu\text{Q/cm}^2$  (siehe Kapitel 4.1.2, Abbildung 4-3). Diese Werte liegen in einem Bereich, in dem die Wasserelektrolyse und die Oxidation der Salze vermieden werden.

Scheiner et al. zeigten, dass z.B. Muskelgewebe erst bei einem Ladungstransfer von  $40\mu\text{Q/cm}^2$  (monopolares Signal) und einem Ladungstransfer von  $120\mu\text{Q/cm}^2$  (biphasisches Signal, kathodische Pulswelle) und  $50\mu\text{Q/cm}^2$  (biphasisches Signal, anodische Pulswelle) signifikant beschädigt wird. Unter diesen Werten wurde keine Elektrodenkorrosion beobachtet [243]. Daraus lässt sich vermuten, dass der Ladungstransfer in dem von uns untersuchten System unter den Werten liegt, bei denen irreversible Elektrodenreaktionen auftreten könnten.

Typische Stimulationsparameter bei Platin-Elektroden, die für die Neurostimulation benutzt werden, liegen im Bereich von  $1$  bis  $4\text{mA}$  Strom (Elektrodenfläche von  $0,005$  bis  $0,01\text{cm}^2$ ), Pulsdauern von  $500$ - $1000\mu\text{s}$  und Wiederholungsraten von  $10$  bis  $100\text{Hz}$  [40]. In unserem Fall liegt der Strom im Bereich von  $0,2\text{mA}$  (Elektrodenfläche  $0,08\text{cm}^2$  und Pulsdauer von  $10\text{ms}$ ) und  $12,5\text{mA}$  (Elektrodenfläche  $0,08\text{cm}^2$  und Pulsdauer von  $6,7\mu\text{s}$ ).

Die dazu durchgeführte Simulation zeigte, dass an der Grenzfläche Elektrode-Elektrolyt bei einer Anregungsspannung von  $750\text{mV}$  die angelegte Spannung um jeweils  $150\text{mV}$  abfällt (siehe Kapitel 4.2.1, Abbildung 4-9).

Bei der Stimulation der Zellen mit monopolarer gepulster Spannungssignalförm können irreversible elektrochemische Reaktionen auf Grund der induzierten Ladungsmenge und der entstandenen Ströme ziemlich sicher ausgeschlossen werden [243,40]. Um das Risiko irreversibler elektrochemischer Reaktionen weiter zu minimieren, wurden zwischen den Impulsen von  $10\text{ms}$  Dauer Pausen von  $140\text{ms}$  eingeführt. Bei der Stimulation der Zellen mit biphasischen harmonischen Signalen (Anregungsspannung bis zu  $750\text{mV}$ , Frequenz  $100\text{Hz}$  und  $150\text{kHz}$ ) sind irreversible elektrochemische Reaktionen, die Zellschädigungen nach sich ziehen können, auch eher ausgeschlossen. [243, 40]

### 5.1.2 Einfluss der Passivierung

Weiterhin wurde der Impedanzunterschied (Amplitude, Phasenwinkel) zwischen den Glas-Sensorchips mit freien Platin-Elektroden und mit den passivierten Elektroden untersucht (siehe Kapitel 4.1.1, Abbildung 4-2). Bei einer angelegten Spannung von  $750\text{mV}$  und einer Frequenz von  $1\text{Hz}$  beträgt die Impedanz der passivierten Elektroden ca.  $4 \times 10^5 \Omega$ . Für  $100\text{Hz}$  ergeben sich bei kapazitiver Stimulation Werte von bis  $10\text{k}\Omega$  bei einer angelegten Spannung von  $750\text{mV}$ , die ab  $150\text{kHz}$  zu  $600\Omega$  konvergieren.

Aus diesen Messungen kann die an den Elektroden fließende Stromstärke definiert werden. Daraus ergibt sich bei einer Frequenz von  $100\text{Hz}$  und der Anregungsspannung von  $750\text{mV}$  eine Stromdichte von  $0,9\text{mA/cm}^2$  und bei einer Frequenz von  $150\text{kHz}$  eine Stromdichte von  $1,25\text{mA/cm}^2$ .

Der Wechselstromwiderstand des beschichteten Glas-Sensorchips ist im Mittel um das 10-fache höher als der des direkten Glas-Sensorchips. Um einen ähnlichen Effekt bei

direkter und kapazitiver Feldeinspeisung zu erzielen, braucht man deshalb bei der kapazitiven Stimulation eine viel höhere Spannung.

### 5.1.3 Einfluss des Zellbewuchses

Um das Impedanzverhalten der mit Zellen bewachsenen Glas-Sensorchips bei steigender Frequenz zu untersuchen, wurde eine Zwei-Punkt-Impedanzmessung durchgeführt.

Bei Spannungsamplituden unter 750mV bewirkt der Bewuchs mit MCF-7 Zellen eine Erhöhung des Impedanzwerts. Ebenso ist der Kurvenverlauf des Impedanzspektrums im Vergleich zu dem zellfreien Glas-Sensorchip unterschiedlich, die einzelnen Kurven konvergieren später und nicht so gleichmäßig wie bei Abbildung 4-5 (siehe Kapitel 4.1.3). Das zeigt zusätzlich, dass die Zellen im Medium kein ohmsches Verhalten im Frequenzbereich aufweisen und erst ab 100kHz zu einem ohmschen Verhalten übergehen. Das bestätigt, dass die Zellen im höheren Frequenzbereich einen kapazitiven Kurzschluss der Membranen zeigen.

Weiterhin wurde der Strom an mit Zellen bewachsenen Glas-Sensorchips gemessen. Aus dieser Strommessung ergibt sich, dass Stromwerte der elektrisch isolierten Elektroden des beschichteten Glas-Sensorchips im Mittel um das ca. 6-fache niedriger sind als die der nicht-isolierten Elektroden des direkten Glas-Sensorchips (siehe Kapitel 4.1.3, Abbildung 4-6).

Die angelegte Spannung hat bei niedriger Frequenz (<100Hz) einen großen Einfluss auf den Impedanzwert. Im Frequenzbereich ab ca. 100kHz kann das untersuchte System als ohmscher Widerstand betrachtet werden. Das sagt aus, dass sich das durch die Spannungsapplikation erzeugte Feld in den Zellen im Frequenzbereich ab ca. 100kHz nicht frequenzabhängig verhält. Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Spannungs-Signal (Einheit V) kann man nicht so direkt mit einem Feld-Verlauf (Einheit V/m) vergleichen.

Weiterhin zeigte die Messung der Impedanz die Abhängigkeit der Elektrodenimpedanz von der Stromdichte. Mit steigender Stromdichte nahmen sowohl Betrag als auch Phasenwinkel der Impedanz ab. Das bedeutet, dass die in die Zellen übertragene Signalform von der Amplitude der eingespeisten Spannung abhängt. Außerdem werden die Zellen, die sich zwischen den Elektroden befinden, räumlich nicht gleichmäßig stimuliert.

## 5.2 Einfluss der elektrischen Stimulation auf Tumorzellen

### 5.2.1 Niederfrequente gepulste elektrische Felder: Direkte Feldeinkopplung

Um die Hypothese von Binggeli und Weinstein zu überprüfen, wurde die Beeinflussung der Teilungsaktivität, des Metabolismus, der Morphologie und der induzierten Membranpotentialänderung von Tumorzellen durch das Anlegen elektrischer niederfrequenter gepulster Felder untersucht.

#### ***Einfluss auf Zellmetabolismus, Teilungsverhalten und Zellmorphologie***

Durch die Messung des extrazellulären Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerung wird der Stoffwechsel charakterisiert.

Um eine Aussage über die langfristigen Auswirkungen eines extern applizierten niederfrequenten elektrischen Feldes auf das Teilungsverhalten von Tumorzellen treffen zu können, wurden humane Mammakarzinomzellen (MCF-7 Zellen) in einem 24-fach IMR-Messsystem stimuliert.

Die Untersuchung des Teilungsverhaltens der MCF-7 Zellen, die einem niederfrequenten elektrischen Feld ausgesetzt waren, zeigte eine um 20% reduzierte Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen (siehe Kapitel 4.3.2). Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen wurden mit Hilfe eines t-Tests auf Signifikanz überprüft. Die Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den stimulierten Gruppe sind signifikant ( $p < 0,05$ ) (siehe Anhang D, Tabelle 6-12).

Die Messung des Metabolismus (Sauerstoffverbrauch, Ansäuerung) der stimulierten Zellen weist eine leichte Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (siehe Anhang D, Tabelle 6-13).

Weiterhin wurde die Empfindlichkeit der durchgeführten Mess-Methode analysiert. Die Diffusionslänge, die die Sauerstoffionen in Zellkulturmedium während der Ruhephase zwischen den Pipettierzyklen (20 min) zurücklegen, beträgt  $x = 2,6\text{mm}$  [88]. Das bedeutet, dass der Sauerstoffverbrauch der Zellen aus dem umgebenden Kulturmedium innerhalb von 20 min im Kreisbereich von 2,6mm um den  $pO_2$ -Sensor ermittelt wird. Das Layout der Wells ist so konzipiert, dass die IDEs ca. 80% der Wellfläche bedecken. Stimuliert werden nur die Zellen, die über der IDE-Struktur wachsen. Der Prozentsatz der stimulierten Zellen, die im durch die Diffusionslänge limitierten Bereich liegen, und von denen der Sauerstoffverbrauch der Zellen erfasst wird, beträgt 83% (siehe Anhang F, Abbildung 6-6).

Die Ansäuerungsaktivität der stimulierten MCF-7 Zellen zeigte ebenso keinen deutlichen Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Anhang D, Tabelle 6-13). Auch hier wurde die Empfindlichkeit der durchgeführten Mess-Methode analysiert. Die Diffusionslänge, die Protonen in 20 min zurücklegen, beträgt  $x = 1,2\text{mm}$  [88]. Das bedeutet, dass die pH-Wert-Änderung innerhalb von 20 min im Kreisbereich von 1,2mm von dem pH-Sensor ermittelt wird. Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass der Prozentsatz von stimulierten Zellen, die im durch die Diffusionslänge limitierten Bereich liegen, und von denen die pH-Wert-Änderung erfasst wird, 77% beträgt (siehe Anhang F, Abbildung 6-7). Die Messergebnisse werden (Layout bedingt) durch die unbehandelten Zellen, die sich nicht direkt über den Elektroden befinden, beeinflusst.

Ein möglicher Effekt, der neben der elektrischen Stimulation zur Zellzahlreduktion führen könnte, ist die Entstehung von irreversiblen elektrochemischen Reaktionen am Übergang zwischen Elektrode/Elektrolyt.

Wie in Kapitel 5.1.1 beschrieben, entwickeln sich eher keine irreversiblen Reaktionen.

Um einschätzen zu können, ob die Zellen durch die elektrische Stimulation in den Zelltod übergehen und die Zellmembran dabei beschädigt wird, wurden stimulierte und nicht-stimulierte Zellen einem Test zum Nachweis membrangeschädigter Zellen mit Hilfe der Trypanblaufärbung unterzogen. Aus diesen Messungen ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen behandelten und unbehandelten Zellen. [131]

Um auszuschließen, dass die Reduktion der Zellzahl durch einen thermischen Effekt verursacht wurde, wurde während des Experiments die Temperatur mit Hilfe eines Pt 1000 Temperatursensors auf dem Glas-Sensorchip gemessen (siehe Kapitel 4.3.3). Während der 30h Befeldung nahm die Zelltemperatur nur um 0,8°C zu. Ein negativer Einfluss der Temperatur auf die Zellzahl kann dadurch nicht bestätigt werden. Zudem sind keine Unterschiede in der Zellmorphologie von stimulierten und nicht-stimulierten Zellen zu erkennen. Im Temperaturbereich zwischen 39°C und 41°C werden immunologische Prozesse (z.B. Hitzeschock-Protein (HSP)) aktiviert. Der Bereich zwischen 40°C und 42°C verlangt eine Induktion von Proteinsystemen und Gen-Expressionen. Bei Temperaturen zwischen 42,5°C und 43°C kann ein zytotoxischer Effekt eintreten. [242]

Daraus lässt sich schließen, dass durch die Stimulation thermische Effekte vernachlässigt werden können.

Während der kompletten Messung wurden die Zellen in einem Medium mit dem Zusatz von 5% FCS kultiviert. Wie bekannt, enthält FCS verschiedene Wachstumsfaktoren, die das Zellwachstum stimulieren. Die stimulierten Zellen wurden nicht synchronisiert, da nicht bekannt ist, in welchem Zellstadium das elektrische Feld den größten Einfluss auf die Zellen hat. Damit die Zellen unter elektrischer Stimulation alle Stadien eines Zellzyklus durchlaufen konnten, wurden die Zellen einem elektrischen Feld 30h lang ausgesetzt, was der Verdopplungszeit der MCF-7 Zellen entspricht. Diese Wachstumsfaktoren können die Ergebnisse beeinflussen bzw. vermindern.

Es wurde gezeigt, dass durch die Stimulation der Zellen mit niederfrequenten elektrischen Feldern eine Zellzahlreduktion um 20% auftritt. Diese wurde nicht durch parasitäre Effekte, wie z.B. eine Erhöhung der Temperatur oder durch die irreversiblen elektrochemischen Ströme induzierter Zelltod, verursacht.

## 5.2.2 Sinusförmige elektrische Felder: Direkte und Kapazitive Feldeinkopplung

Weiterhin stimulierte man die Zellen mit einem bipolaren harmonischen Signal und einer Frequenz von 100Hz bzw. 150kHz.

Für die Untersuchung des Zellmetabolismus von mit harmonischen Feldpulsen stimulierten Tumorzellen sind neben den zwei unterschiedlichen Frequenzen (100Hz und 150kHz) auch zwei verschiedene Arten der elektrischen Stimulation verwendet worden: Direkte- und kapazitive Stimulation. Die Stimulationsparameter für die elektrische Stimulation basieren auf Literaturangaben [119, 120, 120, 221].

Zunächst wurden die Zellen mit einem direkt eingekoppelten elektrischen Feld stimuliert. Um eine Aussage über die langfristigen Auswirkungen eines direkt applizierten elektrischen Feldes harmonischer Form auf das Teilungsverhalten und den Zellmetabolismus der Tumorzellen treffen zu können, wurden die Zellen im 24-fach IMR-Messsystem während der Stimulation untersucht (siehe Kapitel 2.4.5).

Durch den Kontakt zwischen Zellen und Elektroden können bei der direkten Stimulation neben dem elektrischen Feld auch Stromeffekte auf die Zellen wirken. Wie schon oben beschrieben, sind irreversible Faraday'sche Ströme nicht zu erwarten. Die kapazitive Stimula-

tion schafft eine Trennung zwischen Elektroden und den Zellen, wodurch die elektrochemischen Effekte auf die Zellen entfallen. Um eine Aussage über die langfristigen Auswirkungen eines kapazitiv applizierten elektrischen Feldes auf das Teilungsverhalten und Zellmetabolismus der Tumorzellen treffen zu können, wurden die Zellen in einem speziellen 6-Well-Platten-System stimuliert (siehe Kapitel 3.8.2). Dabei wurden das Teilungsverhalten ermittelt und die Zellviabilität mittels des Resazurin-Tests bestimmt.

### ***Sinusförmige elektrische Felder, 100 Hz: Einfluss auf Zellmetabolismus, Teilungsverhalten und Zellmorphologie***

#### *Direkte Feldeinkopplung*

Die direkte elektrische Stimulation mit 100Hz über mehrere Stunden (120h) im IMR zeigte einen inhibitorischen Effekt auf den Zellmetabolismus (Sauerstoffverbrauch) der stimulierten Gruppen. Die angelegte Spannungsamplitude lag im Bereich von 50mV bis 715mV (siehe Kapitel 4.4.1). Die Gruppen, an denen die höchste Spannung angelegt wurde, zeigten hierbei auch den stärksten Rückgang im Sauerstoffverbrauch der Zellen. Schon während der Exponentialphase (1.Stunde-49.Stunde) ist der Sauerstoffverbrauch der stimulierten Zellen im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrolle verringert (siehe Abbildung 4-21).

Der Sauerstoffverbrauch der stimulierten MCF-7 Zellen zeigt ab ca. 70h einen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen bei einer Spannungsamplitude von 715mV (t-Test,  $p < 0,05$ ; siehe Anhang D, Tabelle 6-16).

Aus Kapitel 4.1.1 ergibt sich, dass keine irreversiblen elektrochemischen Reaktionen an den Platin-Elektroden bei einer Spannungsamplitude von 750 mV auftreten können.

Es sind keine Unterschiede in der Zellmorphologie von stimulierten und nicht-stimulierten Zellen zu erkennen (siehe Abbildung 4-23). Es ist daher anzunehmen, dass die Zellmorphologie durch die Stimulation nicht beeinflusst wird.

Bei 100Hz ist der Impedanzwert der Zellmembran sehr hoch. Die gemessenen Impedanzwerte an MCF-7 Zellen liegen bei ca. 10k $\Omega$ . Dadurch wird das Innere der Zelle von der Spannung und dem E-Feld isoliert. Die Simulation in Comsol zeigte, dass auch bei 100Hz ein elektrisches Feld im Inneren der Zelle auftritt (3,21V/m). Dieses ist jedoch im Vergleich zu den Feldstärken im extrazellulären Medium (ca. 2-4kV/m) um den Faktor  $10^3$  niedriger (siehe Kapitel 4.2.1, Abbildung 4-7, a). Laut Literaturangaben können so kleine Feldstärken (bis ca. 60V/m) keinen Einfluss auf den Metabolismus haben. Einige Forschungsarbeiten zeigen aber eine inhibitorische Wirkung von elektrischen Feldern bei niedriger Feldstärke und Frequenz. Die dabei verwendeten Feldstärken im extrazellulären Raum betragen mindestens 100-200V/m und waren damit um den Faktor von ca. 10 geringer, als die hier simulierten Feldstärken. [119, 221]

Niedrige Frequenzen ( $f \leq 1\text{kHz}$ ) können Teile der Membran depolarisieren und somit zu einer Schädigung der Zelle führen [119]. Speziell die Ionenkanäle reagieren hierbei empfindlich auf das E-Feld [54]. Innerhalb der spannungsgesteuerten Ionenkanäle reagieren bestimmte Moleküle auf Veränderungen im elektrischen Feld in der Zelle [30]. Ein veränderter Ionenfluss könnte wiederum das Membranpotential und damit das Teilungsverhalten der Zellen beeinflussen [32]. Dies wäre eine mögliche Erklärung für den gemessenen hemmenden Effekt auf den Metabolismus.

### Kapazitive Feldeinkopplung

Damit bis auf das elektrische Feld alle anderen Effekte als Ursache ausgeschlossen werden können, wurde mittels einer Befeldungsplatte das Feld kapazitiv eingespeist.

Um die Zellzahl zu quantifizieren, wurden die Zellen direkt nach der Stimulation trypsiniert und gezählt. Dabei wurde die Zellzahl der stimulierten und nicht-stimulierten Zellen verglichen. Es zeigt sich nach Versuchsende in den mit 100Hz stimulierten Gruppen sogar eine leicht höhere Zellzahl, im Vergleich zur Kontrollgruppe (bei Elektroden mit 1mm bzw. 3mm Abstand, siehe Kapitel 4.6.1, Abbildung 4-27, a). Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant (siehe Anhang D, Tabelle 6-29).

Bei der Bestimmung der Zellviabilität mittels des Resazurin-Tests ergab sich kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen (t-Test,  $p < 0,05$ , siehe Anhang D, Tabelle 6-30). Die stimulierten Zellen zeigten keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zur nicht-stimulierten Kontrollgruppe (siehe Abbildung 4-28). Eine mögliche Ursache für den ausbleibenden Effekt kann eine zu niedrige Feldstärke sein (siehe Kapitel 4.2.2, Abbildung 4-12, a). Bei den Elektroden mit 1mm Abstand betrug die mit COMSOL stimulierte Feldstärke an der Zelle bei einer angelegten Spannung von 15V und Frequenz von 100Hz ca.  $7,2 \times 10^{-4} \text{V/m}$  und war damit deutlich niedriger, als an der IDEs einer iMWP. Desweiteren ist nicht auszuschließen, dass der Bodens der 6-Well-Platte die Zellen zu wirksam vor dem elektrischen Feld abschirmt. Ein weiterer Grund kann ein zu großer Abstand zwischen Elektroden und Zellen und eine damit einhergehende Schwächung des E-Feldes sein.

### ***Sinusförmige elektrische Felder, 150 kHz: Einfluss auf Zellmetabolismus, Teilungsverhalten und Zellmorphologie***

#### Direkte Feldeinkopplung

Die direkte elektrische Stimulation mit einer Frequenz von 150kHz zeigte einen ähnlichen Effekt wie bei 100Hz. Die Kontrollgruppen wiesen hierbei stärkere Sauerstoffverbrauchsraten als die stimulierten Gruppen auf (siehe Kapitel 4.5.1, Abbildung 4-24). Der Sauerstoffverbrauch der stimulierten MCF-7 Zellen zeigt ab  $t=70\text{h}$  einen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen bei einer Spannungsamplitude von 715mV (t-Test,  $p < 0,05$ ; siehe Anhang D, Tabelle 6-19).

Die extrazelluläre Ansäuerung zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen (siehe Anhang D, Tabelle 6-19).

Die Simulation mittels Comsol zeigte, dass durch die hohe Frequenz das elektrische Feld die Zellmembran durchdringen kann (siehe Kapitel 4.2.1, Abbildung 4-10, b). Dadurch entstehen im Zellinneren Feldstärken von bis zu 2,3kV/m. Die Feldstärken im umgebenden Milieu besitzen mit 4-6kV/m die gleichen Größenordnungen. Diese Feldstärke könnte stark genug sein, um sich hemmend auf den Metabolismus und die Zellteilung auszuwirken. Während der Zellteilung besitzt die Zelle mehr polare Zellbestandteile, auf die durch das elektrische Feld eine Kraft ausgeübt werden könnten. Dabei sind speziell während des Teilungsvorganges die Mikrotubuli, die den Spindelapparat bilden und für die Chromosomenverteilung zuständig sind, stark polar und könnten damit in Mitleidenschaft gezogen werden [119]. Dies ist eine mögliche Erklärung für den gemessenen hemmenden Effekt auf den Metabolismus.



### Kapazitive Feldeinkopplung

Bei der kapazitiven elektrischen Stimulation mit 150kHz zeigten die stimulierten Gruppen eine im Vergleich zur Kontrolle niedrigere Zellzahl (siehe Kapitel 4.6.1, Abbildung 4-27, b). Dieser Unterschied war jedoch bei beiden Messungen nicht signifikant (siehe Anhang D, Tabelle 6-31). Die simulierte Feldstärke bei einer angelegten Spannung von 15V und Frequenz von 150kHz lag im Bereich von 0,85V/m innerhalb der Zelle und 1,4V/m außerhalb der Zelle (siehe Kapitel 4.2.2, Abbildung 4-12, b). Metabolisch und morphologisch gab es zwischen den Gruppen keine sichtbaren Unterschiede (siehe Abbildung 4-29). Ebenso ergab der Resazurin-Test keine Unterschiede zwischen nicht-stimulierten Zellen (Kontrolle) und den beiden befeldeten Gruppen (siehe Anhang D, Tabelle 6-27, Tabelle 6-28 und Tabelle 6-32). Der scheinbar hemmende Effekt kann ebenso auf die oben genannten Auswirkungen des elektrischen Feldes zurückgehen. Um signifikante Ergebnisse zu erhalten, müssen weitere Versuchsreihen mit vergleichbarer Feldstärke wie im Falle der direkten elektrischen Stimulation durchgeführt werden.

Der Betrag der elektrischen Feldstärke kann durch eine Reduzierung der Bodendicke oder durch eine Minimierung des Elektrodenabstandes erhöht werden. Zudem wurde untersucht, welche elektrische Feldstärke an der Zelle auf einem Foliensubstrat entsteht. Um die gleiche Feldstärke, wie bei der direkten elektrischen Stimulation im Well einer 6-Well-Platte zu erreichen, sollte man laut Simulation eine Spannung in Höhe von über 10kV bei der Anregungsfrequenz von 150kHz und einem Elektrodenabstand von 1 mm auf die Zellen auf einem Foliensubstrat mit einer Dicke von 175µm einzuspeisen (siehe Anhang C, Abbildung 6-3, b). Diese Anregungsspannung liegt über die Durchschlagsspannung.

Eine weitere Möglichkeit ist das Aufbringen einer Photolackschicht (SU-8) auf die Glas-Sensorchips. Unter der Annahme, dass die Parameter der SU-8 Schicht eine Höhe von ca. 2µm, einen Elektrodenabstand von 50µm und eine Frequenz von 150kHz beinhalten, muss laut Simulation die Anregungsspannung bei ca. 50V liegen (siehe Anhang C, Abbildung 6-4, b). Die mittels Comsol aufgezeichneten Werte betragen in diesem Fall im Inneren der Zelle maximal 2kV/m und außerhalb 3kV/m. Um die Zelle herrschen relativ gleichmäßige Feldstärken (siehe Anhang C, Kapitel 6.3.3). Bei direkter Stimulation beträgt die Feldstärke, die bei 750mV Spannung und 150kHz erzeugt wird, im Zellinneren maximal 2,3kV/m. In der extrazellulären Umgebung treten gleichzeitig Feldstärken von bis zu 4-6kV/m auf (Kapitel 4.2.1).

Zusammenfassend wurde bei der direkten elektrischen Stimulation ein hemmender Effekt auf den Zellmetabolismus gemessen. Die kapazitive Stimulation mittels Befeldungsplatte wies, sowohl beim Metabolismus als auch bei der Zellteilung, keine signifikanten Ergebnisse auf. Deswegen ist es nicht möglich, die Ursache für die inhibitorische Wirkung einzuschränken. Dabei legt die Simulation jedoch nahe, dass sich das E-Feld in Abhängigkeit der Frequenz unterschiedlich auf die Zelle auswirkt. Die isolierende Wirkung der Membran geht dabei mit steigender Frequenz zurück. Zur weiteren Bearbeitung dieses Themas ist es wichtig, signifikante Ergebnisse zur kapazitiven Stimulation zu erhalten. Deswegen sollten hier noch weitere Versuchsreihen folgen. Für diese Versuche sollte der Messaufbau durch die Verwendung von dünneren Passivierungsschichten, wie z.B. mit Ta<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-Isolierung, deren schichtdicke 170 nm beträgt, optimiert werden. Damit können dieselben Feldstärken wie an den nicht passivierten IDEs erreicht werden.

### 5.3 Induktion möglicher biologischer Effekte durch ein elektrisches Feld: Beeinflussung des Membranpotentials

Die Mitose einer entarteten Zelle ist von mehreren zellulären Prozessen abhängig. Sie wird auf verschiedenen Ebenen und von Organellen wie Zellkern, Zytoplasma und Zellmembran reguliert. Zusätzlich spielen die Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle in den zellregulierenden Prozessen. Sie binden an spezifische Rezeptoren der Zellmembran und ermöglichen dadurch die zelluläre Signaltransduktion. So ist z.B. der Second Messenger cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) für die molekulare Wachstumskontrolle der normalen und neoplastischen Zellen verantwortlich. Die Synthese dieser Proteine ist von mehreren Faktoren, wie z.B. der Ionenzusammensetzung im extra- und intrazellulären Raum, abhängig [220].

Bei biologischen Prozessen, wie z.B. Mitose, wo eine exakte räumliche und zeitliche Auflösung von Bedeutung ist, können elektrische Felder mit dem Ziel, diese Mitose zu beeinflussen, eingesetzt werden [55]. Ein elektrisches Feld wirkt sowohl auf die Ionen als auch auf die biologischen Moleküle, die als Dipole betrachtet werden können.

Bei niedrigeren Frequenzen (unter 1kHz, very low frequencies) werden erregbare Zellen und Gewebe durch die Membrandepolarisation stimuliert [59, 190]. Zellen wie Nerven-, Muskel- und Herzmuskelzellen wurden mit elektrischen Wechselfeldern im Frequenzbereich bis zu 1kHz stimuliert [166]. Der Stimulationseffekt lässt aber bei Frequenzen höher als 1kHz nach [55]. Bei diesen Frequenzen durchdringt das elektrische Feld die Zellmembran frequenz- und amplitudenabhängig und dadurch werden intrazelluläre Prozesse beeinflusst. Wenn eine Zelle einem elektrischen Feld im MHz-Bereich (very high frequencies) ausgesetzt ist, kann das zu thermischen Effekten führen, die durch die „molekulare Reibung“ zwischen den schnell oszillierenden Molekülen zustande kommen [203, 237].

Präklinische Studien zeigten den antimitotischen Effekt von TT-Feldern (low intensity, 1-3V/cm; intermediate-frequency, 100-300kHz, Wechselfelder), die Intensitäts- und Frequenz-abhängig sind und einen zusätzlichen oder synergetischen Effekt in der Kombination mit einer Chemotherapie aufweisen [61, 119, 191]. Solche TT-Felder zeigen auch eine inhibitorische Wirkung auf die Metastasen im Tiermodell [61]. Diese wirken unterschiedlich auf sich teilende und nicht-teilende Zellen [55]. Durch die elektrische Stimulation wird der Teilungsvorgang beeinträchtigt. Zum einen bestehen die Mikrotubuli zum größten Teil aus polaren Molekülen, die durch ein extern appliziertes elektrisches Feld beeinflusst werden, so dass dadurch die Bildung des Spindelapparates beeinträchtigt werden kann. Diese Dezentrierung der Mikrotubulie verhindert die Polymerisation, die für die Bildung des Spindelapparates notwendig ist. Zum anderen weisen sich teilende Zellen im Vergleich zu nicht-teilenden Zellen einen ungleichmäßigeren Feldverlauf auf. Dieses Feld übt eine elektrische Kraft auf die polaren Moleküle und Organellen aus und führt zur Dielektrophorese. Dabei werden polare Moleküle und Organelle in Richtung des höheren elektrischen Feldes gezogen. [55]

Abbildung 5-1 zeigt mögliche Mechanismen, die das Membranpotential bzw. den intrazellulären pH-Wert und die Kaliumkonzentration durch den Einfluss extern applizierter elektrischer Felder zu Transkriptionsantworten umwandeln können [135]. Unter den möglichen Mechanismen sind folgende Signalwege wie:

*Einfluss der Signalmoleküle durch die spannungsabhängigen Gap Junctions;*  
*Spannungsabhängige Konformationsänderungen der integrin-assoziierten Proteine;*  
*Kalziumeinstrom durch spannungssensitive Kalziumkanäle;*  
*Einstrom von Signalmolekülen wie Serotonin (Neurotransmitter);*  
*Aktivierung von spannungssensitiver Phosphatase (VSP);*

Änderung der intrazellulären Ionenzusammensetzung von  $H^+$ -,  $K^+$ - und  $Ca^{2+}$ - Ionen;  
Beeinflussung des Spindelapparates.

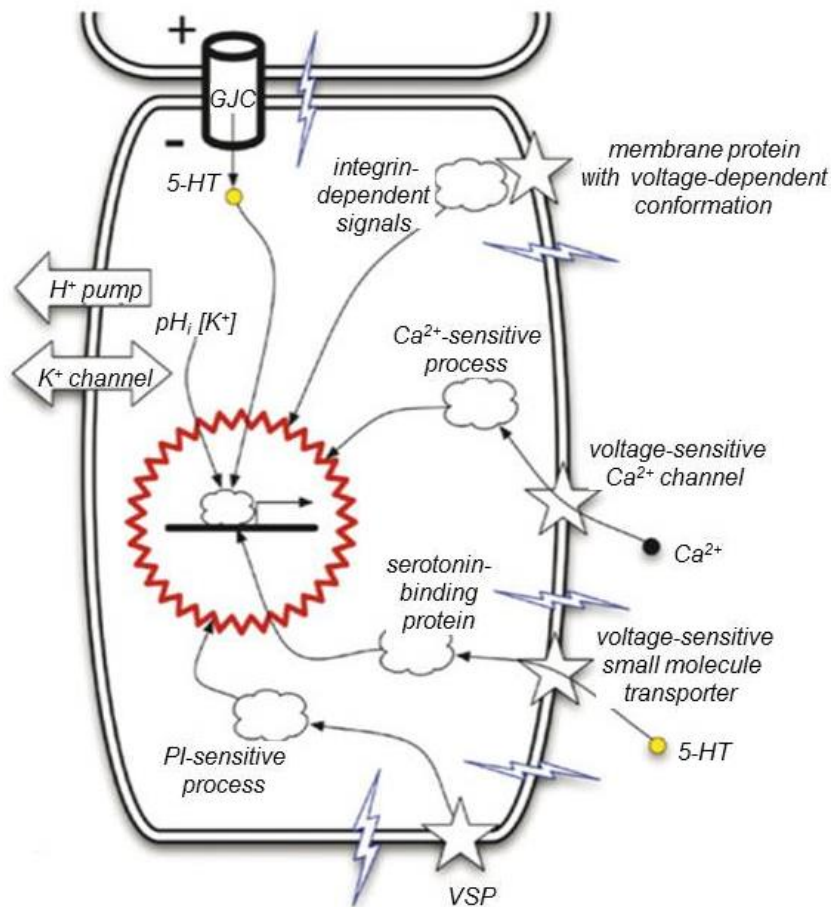


Abbildung 5-1: Schema der Signaltransduktion, die durch die Wirkung externer elektrischer Felder hervorgerufen wird. Dadurch können das Membranpotential, der intrazelluläre pH-Wert, die Bildung des Spindelapparates und die Kaliumionenkonzentration beeinflusst werden (entnommen aus [135]).

Alle diese Signalwege scheinen Einfluss auf genetische Änderungen und unter Anderem auch auf die Proliferation zu nehmen [135].

Das Transmembranpotential spielt eine wichtige funktionale Rolle für die nicht-erregbaren Zellen. Wenn eine Zelle einem elektrischen Feld ausgesetzt ist, führt das zu einer Membranpotentialänderung an der Zellmembran. Die Amplitude dieses Membranpotentials ist proportional zur Amplitude des applizierten Feldes. Dies kann zu einer Änderung der Membranpermeabilität und der Ionenzusammensetzung führen. Diverse Ionenbewegungen können dabei mannigfaltige metabolische Prozesse hervorrufen [80, 89, 135].

Die Untersuchung des Teilungsverhaltens von MCF-7 Zellen, die einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld (direkte Feldeinkopplung) ausgesetzt waren, zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine Reduktion der Zellzahl um 20%. In diesem Zusammenhang steht der Einfluss des Transmembranpotentials und des Ionenstromes durch die Membran auf zelluläre Prozesse bzw. Proliferation im Vordergrund. Man untersuchte den Membranpotentialverlauf an diesen Zellen und wie stark sich dieser von den angelegten elektrischen Feldern beeinflussen ließ.

Die Standard Messmethode für die Untersuchung des Membranpotentials bzw. der Ionenkanäle ist die Patch-Clamp-Technik. Diese Technik erlaubt eine präzise Untersuchung der Ionen-

nenkanäle, wird aber durch z.B. lokale Zerstörungen der Plasmamembran (keine in vivo Untersuchungsmöglichkeit) limitiert. Weiterhin gehört auch eine aufwändige Versuchsvorbereitung zu den Nachteilen dieser Methode. Aus diesen Gründen wurde in dieser Arbeit das Membranpotential mittels der fluorimetrischen Methode untersucht.

Die Messung des Membranpotentials von MCF-7 Zellen erfolgte mit dem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff DiBAC<sub>4</sub>(3).

Zu den Nachteilen der Farbstoffe aus der Bis-Oxonol-Gruppe gehört die Toxizität. Um die unmittelbare toxische Wirkung des Farbstoffes auf die Zellen während des Experimentes auszuschließen, wurde ein Toxizitätstest durchgeführt, wobei die optimale Farbstoffkonzentration ermittelt wurde (siehe Kapitel 3.9.1). Die Messungen zeigten keine unmittelbare toxische Wirkung des Farbstoffes auf die MCF-7 Zellen in DiBAC<sub>4</sub>(3) Konzentrationen bis zu 5µM (siehe Abbildung 3-24, Abbildung 3-25 und Abbildung 3-26). Durch einen weiteren photodynamischen Test stellte sich eine optimale DiBAC<sub>4</sub>(3) Farbstoffkonzentration für die durchgeführten Experimente von 2µM heraus (siehe Kapitel 3.9.1, Abbildung 3-27).

Um die Membranpotentialänderung quantifizieren zu können, erstellte man eine Kalibrierungskurve mit Hilfe des Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> Ionophors Gramicidin. So bestimmte man die Farbstoffempfindlichkeit (siehe Kapitel 3.9.2, Abbildung 3-31). Die durchgeführten Messungen wiesen auf, dass der Farbstoff im Bereich von 5mM bis 60mM [K<sup>+</sup>]<sub>ex</sub> linearen Charakter zeigt und die Empfindlichkeit des Farbstoffes DiBAC<sub>4</sub>(3) 0,36±0,0039%*mV*<sup>-1</sup> betrug.

Die Messung des Membranpotentials an MCF-7 Zellen wurde nach dem im Kapitel 3.9.3 und Kapitel 3.9.4 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Diese Messungen erfolgten an den auf Glas-Sensorchips kultivierten Zellen. Die Messergebnisse wiesen folgenden Membranpotentialverlauf auf: Erwartungsgemäß variierte das Transmembranpotential einer einem elektrischen Feld ausgesetzten Zelle vom Positiven auf der zur Kathode zugewandten Seite (Depolarisation) zum Negativen auf der zur Anode zugewandten Seite (Hyperpolarisation) (siehe Kapitel 4.7.1, Abbildung 4-34). In einem elektrischen Feld von 2,3kV/m wies die Zelle Änderungen des Membranpotentials im Intervall von -35mV bis +35mV auf. Eine Zelle, die einem elektrischen Feld von ca. 230V/m ausgesetzt war, zeigte keine Änderung des Membranpotentials (siehe Kapitel 4.7.3, Abbildung 4-45).

Die durchgeführten Messungen haben gezeigt, dass eine Transmembranpotentialänderung, die durch eine Änderung der elektrischen Gradienten vorgenommen wird, auch Zellfunktionen wie die Proliferation beeinflussen kann. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Arbeiten [32, 138, 197, 213]. Die Membranpotentialfluktuation (Hyperpolarisation/Depolarisation) scheint einen wichtigen Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen zu haben. In weiteren Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen der Aktivität der Ionenkanäle, dem Transmembranpotential, dem intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Signaling und der Proliferation gezeigt werden [236].

Ein extern appliziertes elektrisches Feld kann sowohl den Ionendurchfluss durch die Membran als auch das Transmembranpotential beeinflussen. Dadurch wird auch die Ionenverteilung im intra- und extrazellulären Raum verändert. Das kann Änderungen auf zellulärer Ebene (z.B. Zellproliferation) nach sich ziehen. Ionenkanäle und Ionentransporter gelangen immer mehr in den Fokus der Tumorforschung [71, 130, 168, 177]. Viele Studien zeigen einen Einfluss verschiedener Ionenkanäle wie Kalzium-, Natrium- und in erster Linie Kaliumionenkanäle auf die Proliferation und das Membranpotential (siehe Kapitel 2.2.5). Das Membranpotential wird auch als wichtige Größe im Zusammenhang mit der Karzinogenese diskutiert. Diese wird an den nicht erregbaren Zellen vorwiegend durch den Fluss von Kaliumionen definiert und kontrolliert, da die Durchlässigkeit für diese am größten ist [130]. Die Membranpotentialänderung während des Zellzyklus und deren Kontrolle durch die Kaliumkanäle hat eine große Bedeutung für die Tumorthherapie [130].

Die Membranpotentialänderung wird in erster Linie durch spannungssensitive Ionenkanäle initiiert. Deren Aktivität ist auch notwendig für die weitere Signaltransduktion, die Änderungen in der Genexpression und im Proliferationsverhalten verursachen könnte [135]. Zusammenfassend kann man sagen, dass die Vielfalt der Ionenkanäle (überwiegend Kaliumkanäle) und Signalwege, die die aktivieren können, einen Einfluss auf die Transmembranpotential-Regulation (Depolarisation/Hyperpolarisation) in Tumorzellen nehmen. Andererseits kann man die Änderung des Transmembranpotentials als Aktivierungs-Trigger für intrazelluläre Signalmessenger wie z.B. Kalzium, der die Proliferation begünstigt, betrachten [236]. Eine durch Kaliumkanäle induzierte Membranpotentialverschiebung in negativer Richtung (also Hyperpolarisation) nimmt einen hemmenden Einfluss auf die Proliferation [32, 130, 222]. Weiterhin können Kaliumkanäle apoptosehemmende Proteine Mcl-1 aktivieren, die zur Membranhyperpolarisation führen können. Die Membranhyperpolarisation kann zudem zu einem Substrattransport führen. Die Nährstoffe werden in diesem Fall entlang eines elektrochemischen Natriumgradienten transportiert [130, 232].

So kann man vermuten, dass verschiedene Ionenkanäle und vorwiegend Kaliumionenkanäle eine wichtige Rolle in der Tumorstromungsregulation spielen. Eine erhöhte Aktivität der Kaliumionenkanäle wird mit einer erhöhten Proliferationsrate assoziiert. Die in Kapitel 2.2.5 beschriebenen Signalwege, die durch verschiedene Ionenkanäle aktiviert werden können, zeigen synergetische komplexe Effekte auf die Proliferation. Die Regulationsmechanismen zwischen den Kaliumkanälen und der Tumorzellproliferation sind noch nicht komplett verstanden.

Im Prinzip können Ionenkanäle die Proliferation auf zwei verschiedene Arten beeinflussen. Einerseits sind sie für das Unterstützen von homöostatischen Parametern wie intrazellulärem  $[Ca^{2+}]_{in}$ , pH-Wert und Zellvolumen erforderlich. Dabei erfolgen die Aufnahme von Substratprodukten und der Abtransport von Metabolismusprodukten. Andererseits führt die Expression der Kaliumkanäle in Tumorzellen zur Zellmembranhyperpolarisation (statt Depolarisation). Dies kann proliferationshemmend wirken [224]. Dieser Gegensatz zeigt das nicht ausreichende Verständnis der Wirkungsmechanismen zwischen den Kaliumkanälen und anderen Ionenkanälen, der Membrandepolarisation/Membranhyperpolarisation und der Proliferation und verlangt weiteren Forschungsbedarf [130].

Ein weiterer möglicher Wirkungsmechanismus ist eine Aktivitätsregulation von spannungssensitiven Transportmolekülen wie Serotonin. Dadurch wird das Membranpotential beeinflusst und spezifische chemische Signalwege werden aktiviert [135]. Weiterhin könnten Membranrezeptoren umverteilt werden oder  $\beta 1$  Integrine aktiviert werden und Änderungen in Membranproteinen initiiert werden, was auch zu Proliferationsänderungen führen könnte [135, 136].

Die erzielten Ergebnisse erlauben uns das Transmembranpotential als ein grundlegendes biophysikalisches Signal in nicht-erregbaren Zellen zu betrachten. Die Untersuchung des Teilungsverhaltens von MCF-7 Zellen, die einem niederfrequenten elektrischen Feld ausgesetzt waren, zeigte eine um 20% reduzierte Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Messung des Metabolismus weist eine leichte Abnahme relativ zu nicht-stimulierten Zellen auf. Die durchgeführten Messungen zeigten die Depolarisation einer Zellhälfte und die gleichzeitige Hyperpolarisation der anderen Zellhälfte. Die Experimente können als Hinweis dafür gewertet werden, dass extern applizierte elektrische Felder an Tumorzellen lokal das Membranpotential und damit auch die Permeabilität von Ionenkanälen ändern. Ob diese Veränderung kausal mit der beobachteten Änderung der Zellproliferation zusammenhängen, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

## 5.4 Proliferationshemmung unter Verwendung des $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Karrierblockers Amilorid und Variation der extrazellulären pH-Werte

Der extrazelluläre pH-Wert ist bei den meisten Tumorzellen niedriger als bei normalen Zellen, da der Tumorzellmetabolismus im sauerstoffarmen Milieu zur Umwandlung von Glukose und anderen Substraten in Milchsäure führt [227, 231]. Diese Erkenntnis ist therapeutisch relevant. Eine Abnahme des pH-Werts im cytosolischen Bereich kann eine Abnahme der metabolischen Aktivität bedeuten und Apoptose hervorrufen [130]. Andererseits besagt die Hypothese von Binggeli und Weinstein, dass teilungsfähige Zellen, wie Tumorzellen oder embryonale Zellen, ein weniger negatives Transmembranpotential als die nicht-teilungsfähige Zellen, wie Muskel- und Nervenzellen, aufweisen [32]. Auf Grund dieser Hypothese könnte man eine Korrelation zwischen der mitotischen Aktivität einer Zelle und dem Transmembranpotential (Membrandepolarisation) vermuten. Basierend auf diesen Beobachtungen könnte man vermuten, dass eine Abnahme des extrazellulären pH-Werts zu einer Abnahme des Membranpotentials (Hyperpolarisation) führen könnte.

In dieser Arbeit wurden am Beispiel der MCF-7 Zelllinie Effekte von unterschiedlichen extrazellulären pH-Werten unter Verwendung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Karrierblockers Amilorid auf den Metabolismus und das Membranpotential untersucht (siehe Kapitel 4.8).

Wie die durchgeführten Messungen zeigten, führte ein Absenken des pH-Werts im extrazellulären Raum zu Abnahme der metabolischen Aktivität (siehe Abbildung 4-46) [181]. Der Sauerstoffverbrauch der Zellen sinkt proportional zur pH-Wert-Abnahme im extrazellulären Raum. Das könnte auf die Hemmung der mitochondrialen Aktivität und Proliferation hindeuten. Bei einer Variation des extrazellulären pH-Werts bis zu  $\text{pH}_{\text{ex}}=7,0$  kann der intrazelluläre pH-Wert durch zelluläre Regulationsmechanismen bis zu  $\text{pH}_{\text{in}}=7,3$  aufrechterhalten werden [169]. Ab einem extrazellulären pH-Wert von  $\text{pH}_{\text{ex}}=6,6$  erreicht der intrazelluläre pH-Wert  $\text{pH}_{\text{in}}=7,1$  und verursacht einen Zellzyklusarrest [169]. Das ist aus der Messung des Zellmetabolismus ersichtlich. Ab einem extrazellulären pH-Wert von  $\text{pH}_{\text{ex}}=6,5$  erkennt man keine weitere Steigung der metabolischen Aktivität.

Weiterhin führt Variation der extrazellulären pH-Werte zu einer Änderung des Membranpotentials (siehe Abbildung 4-47). Extrazelluläre Azidose führt zu einer Verschiebung des Membranpotentials in Richtung positiver Werte (Depolarisation). In unserem Fall führt die Reduktion des extrazellulären pH-Werts von 7,4 auf 6,5 zu einem Anstieg des Membranpotentials von -70mV (MW, n=12) auf -37mV (MW, n=12). Unter sehr sauren extrazellulären Bedingungen ( $\text{pH}_{\text{ex}}=6,0$ , Daten sind nicht gezeigt) konnte kein Unterschied zwischen Kontroll- und behandelter Gruppe gemessen werden. Der Grund dafür könnte eine starke Abrundung der Zellen sein, die die Messergebnisse verfälschte.

Wie oben beschrieben, führt eine extrazelluläre Azidose auch zur Hemmung des Metabolismus und zu passivem Protonenausstrom. Aus diesen Messungen können wir einen Zusammenhang zwischen der Membrandepolarisation der MCF-7 Zellen, die wir bei der extrazellulären Azidose gemessen haben, und der Proliferationshemmung vermuten. Dieses Ergebnis widerspricht aber der oben genannten Arbeitshypothese. Dieser Gegensatz zeigt, dass die Wirkungsmechanismen zwischen Proliferations- und Membranbeeinflussung (Depolarisation/Hyperpolarisation) durch die Variationen der intra- und extrazellulären pH-Werte noch nicht ausreichend geklärt sind. Zur Erkenntnis dieses Gegensatzes besteht ein weiterer Forschungsbedarf. Es ist zu vermuten, dass es in vivo Mechanismen gibt, welche durch Untersuchungen an den Zellen nicht erfasst werden können.

Weiterhin führen Variationen des extrazellulären pH-Werts auch zu unterschiedlich starken Reaktionen auf Amilorid-Behandlungen. Die Zugabe des Kanalblockers zu MCF-7 Zellen (Inaktivierung der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Carrier) führte zu einer signifikanten Sauerstoffverbrauchsabnahme proportional zur Abnahme des extrazellulären pH-Werts (siehe Abbildung 4-46) [181]. Unter sehr sauren extrazellulären Bedingungen ( $\text{pH}_{\text{ex}}=6,0$ ) reagieren Zellen sehr schwach auf die Amiloridzugabe. Die mitochondriale Aktivität ändert sich in diesem Fall kaum. Laut Literatur gehen Zellen unter Amilorid-Behandlung in Abhängigkeit vom intrazellulären pH-Wert (bis zu  $\text{pH}_{\text{in}}=5,5$ ) in die Apoptose über [169, 182]. So zeigten Zellen von tumortragenden Mäusen (HRAS transformierte Fibroblasten, Mutation der NHE1 Kanälen) eine 80%ige metabolische Reduktion im Vergleich zu unbehandelten Mäusen [169].

Die Amilorid-Behandlung zeigte in den durchgeführten Versuchen keinen signifikanten Einfluss auf die Membranpotentialänderung im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe Abbildung 4-47). Generell sind  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Carrier elektroneutral. Aus den Messungen kann man aber erkennen, dass die Membran mit steigender Azidose im extrazellulären Raum ( $\text{pH}_{\text{ex}}=6,5$ ) im Vergleich zu Kontrolle weniger depolarisiert ist. Die Aktivierung der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Carrier kann zu einer Abnahme der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschrates führen. Das könnte ein Grund für die Zunahme an intrazellulärem Kalzium sein und zu einer Änderung der Membrandepolarisation führen [99]. Umgekehrt könnte die Blockade des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Carriers zur indirekten Hyperpolarisation der Zellmembran führen.

All diese Signalwege können die Membran sowohl depolarisieren als auch hyperpolarisieren. Man könnte vermuten, dass durch die Amilorid-Behandlung einer dieser Transportwege blockiert wurde und eine leichte Hyperpolarisation im Vergleich zur Kontrollgruppe bei dem  $\text{pH}_{\text{ex}}$ -Wert von 6,5 gemessen wurde. Dadurch könnte auch die ziemlich hohe Streuung der gemessenen Membranpotentialwerte (hohe Standardabweichung) erklärt werden. Über welchen Weg genau dieser Effekt hervorgerufen wurde und wie das genaue Zusammenspiel der Signalwege ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der extrazellulären Azidose und der Proliferationshemmung besteht. Daraus kann man schließen, dass variierende extrazelluläre pH-Werte und dadurch geänderte intrazelluläre pH-Werte einen Einfluss auf das Membranpotential (also Depolarisation) nehmen. Die Verwendung des Amilorid-Kanalblockers führt zu einer signifikanten Sauerstoffverbrauchsabnahme und wies keinen signifikanten Einfluss auf die Membranpotentialänderung auf.



## 5.5 Fazit

Basierend auf der Beobachtung von Binggeli und Weinstein [32], dass das Transmembranpotential verschiedener Zellen sich in Abhängigkeit ihrer Proliferation verändert, wurde im Rahmen dieser Arbeit der umgekehrte Effekt - die Proliferation von Zellen unter dem Einfluss von elektrischen Feldern - untersucht. Damit sollte geklärt werden, ob auf diese Weise langfristige Effekte an humanen Tumorzellen erzielt werden können und ob sich daraus therapeutische Möglichkeiten ergeben.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob und wie elektrische Felder den Metabolismus, das Teilungsverhalten und die Zellmorphologie von Tumorzellen beeinflussen. Dafür wurden humane Mammakarzinomzellen mit niederfrequenten Rechteckpulsen mit einer Frequenz von 100Hz und sinusförmigen Feldpulsen mit einer Frequenz von 100Hz bzw. 150kHz beaufschlagt.

Die Untersuchung des Teilungsverhaltens der MCF-7 Zellen, welche einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld ausgesetzt waren, zeigte eine um 20% reduzierte Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Messung des Zellmetabolismus von mit sinusförmigen Feldpulsen stimulierten Tumorzellen zeigte auch einen inhibitorischen Effekt auf den Zellmetabolismus (Sauerstoffverbrauch) der behandelten Gruppen.

Um elektrochemisch bedingte Nebeneffekte bei der direkten Stimulation zu vermeiden, wurde zudem analysiert, wie sich die Zellen bei einer direkten elektrischen Stimulation im Vergleich zu einer Stimulation mit einem kapazitiv eingekoppelten elektrischen Feld verhalten. Mit Hilfe einer Finiten Elemente Simulation konnte abgeschätzt werden, welche Feldstärken auf der Zellebene entstehen können. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Zellzahlreduktion bei der direkten Stimulation nicht durch zytotoxische Effekte oder korrosive Effekte verursacht wurde.

Weiterhin konnte, anhand der durchgeführten Zellmembranpotential-Messungen, die Hyperpolarisation der einen und die gleichzeitige Depolarisation der anderen Zellhälfte nachgewiesen werden. Die Membranpotential-Fluktuation (Hyperpolarisation/Depolarisation) scheint einen wichtigen Einfluss auf die Proliferation von Tumorzellen zu haben. Dies lässt vermuten, dass ein Zusammenhang zwischen einer – durch ein extern appliziertes elektrisches Feld verursachten – Membranpotentialänderung und der zellulären Teilungsaktivität besteht. Der Zusammenhang zwischen den Ionenkanälen und der dadurch induzierten Membranpotentialänderung und Tumorstillstandshemmung ist bei weitem noch nicht eindeutig geklärt und verlangt einen weiteren Forschungsbedarf.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine Azidose im extrazellulären Bereich einerseits zu einer Proliferationshemmung und andererseits zu einer Membrandepolarisation führt. Dies wird vermutlich durch die intrazellulären pH-Regulationsmechanismen verursacht. Weiterhin verursacht die Verwendung eines  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Karrierblockers (Amilorid) eine leichte Membranhyperpolarisation bei steigender extrazellulärer Azidose. Die Proliferationshemmung ist stärker ausgeprägt als bei unbehandelten Zellen. Das lässt einen Zusammenhang zwischen extrazellulärer Azidose, Membrandepolarisation und Proliferationshemmung vermuten. Die Hypothese von Binggeli und Weinstein besagt jedoch eine Korrelation zwischen Membranhyperpolarisation und Proliferationshemmung [32]. Dieser Gegensatz zeigt unser nicht ausreichendes Verständnis der Wirkungsmechanismen zwischen der Membrandepolarisation/Membranhyperpolarisation und der Proliferation unter extrazellulärer Azidose. Es ist zu vermuten, dass es in vivo Mechanismen gibt, welche durch Untersuchungen an isolierten Zellen nicht ausreichend erfasst werden können.

Durch die Variation der extrazellulären pH-Werte können weitere Membranproteine aktiviert werden, die einen Einfluss auf die Zellproliferation aufweisen. So zeigten Wissenschaftler

des New Yorker Konsortiums für Membranprotein-Strukturen (NYCOMPS) eine neuartige Struktur eines Membranproteins der „Trans Box Inhibitor Motiv“ (TMBIM)-Familie, die aus Röntgendaten errechnet wurde. Dieses Protein kann den Kalzium-Spiegel in der Zelle steuern. Abhängig vom pH-Wert kann dieser Kanal einen offenen oder geschlossenen Konformationszustand annehmen. Bei den physiologischen pH-Werten liegen etwa gleich viele Proteine im offenen oder geschlossenen Zustand vor. Das kann zu einem permanenten Kalziumverlust durch die Membran führen. Chang et al. zeigten die Möglichkeit, pH-Werte durch diesen Kanal zu modulieren. Es wurden Änderungen an der pH-Werten durch das Steuern von einem Membranprotein (TMBIM) gezeigt. Der pH-Wert kann den Kalziumspiegel in einer Zelle regulieren. Als nächsten Schritt sehen Wissenschaftler die Möglichkeit, die Kristallstrukturen der menschlichen TMBIM-Proteine zu erforschen, um möglichst spezifische Inhibitor-Wirkstoffe zu entwickeln [45].

## 5.6 Ausblick: Therapeutischer Ansatz

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen, dass elektrische Felder geeignet sind, das Proliferationsverhalten von Tumorzellen zu beeinflussen.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Beeinflussung der Funktionalität von Ionenkanälen durch extern applizierte elektrische Felder an Tumorzellen zu einer Proliferationsbeeinträchtigung führen kann. Jedoch sind die Kenntnisse über die Rolle der Kalium- und der anderer Ionenkanäle in der Tumorzellenproliferation noch nicht ausreichend. Man weiß nicht genau wie groß der funktionale Einfluss spezifischer Ionenkanäle auf die Tumoren ist und welche Rolle diese in verschiedenen Tumorentwicklungsstadien spielen. Weiterhin existieren nur wenige Studien, die die Eigenschaften der Ionenkanäle an normalen und Tumorzellen vergleichen [130]. Um die Bedeutung des Membranpotentials von Ionenkanälen und von externen elektrischen Feldern für das Verhalten von Tumorzellen bzw. Tumoren zu klären, müssen in weiteren Versuchen in erster Linie die Kaliumionenkanäle (Verhalten und Einfluss auf die metabolischen Signalwege während der elektrischen Stimulation) untersucht werden.

Während der Messungen wurden die Zellen in einem Medium mit dem Zusatz von 5% FCS kultiviert, das verschiedene Wachstumsfaktoren beinhaltet. Deswegen müsste man in weiteren Versuchen einen Weg finden, den FCS-Anteil in Medium zu reduzieren. Damit soll eine Überstimulation der Zellen verhindert werden.

Dank der Proliferationshemmung der Endothelzellen wird auch die Angiogenese beeinträchtigt [120]. Der Einfluss der elektrischen Felder ist dabei richtungsabhängig. Am effektivsten ist die Ausrichtung des elektrischen Feldes entlang der Teilungsachse der sich teilenden Zellen. Mit dem Ziel, den Einfluss des elektrischen Feldes zu erhöhen, kann man die Felder mit einem sequenziellen Feldrichtungswechsel von  $90^\circ$  applizieren [119]. Präklinische Studien zeigten, dass die Intensität und die Frequenz elektrischer Felder, die einen Einfluss auf Tumore nehmen, sich umgekehrt proportional zur Tumorzell-Größe verhalten müssen. Das bedeutet, dass die das Feld generierenden Geräte für jede Tumorart in Intensität und Frequenz programmierbar sein müssen. [55]

Zur weiteren Bearbeitung dieses Themas ist es auch wichtig, signifikante Ergebnisse zur kapazitiven Stimulation zu erhalten. Deswegen sollten hierzu noch weitere Versuchsreihen folgen. Für diese Versuche sollte der Messaufbau durch die Verwendung von dünneren Passivierungsschichten auf den Glas-Sensorchips, wie z.B. mit  $Ta_2O_5$ -Isolierung, deren Schichtdicke 170 nm beträgt, optimiert werden. Damit können dieselben Feldstärken wie an den IDEs erreicht werden.



## 6 ANHANG

### 6.1 Anhang A

#### 6.1.1 Chemikalien und Lösungen

Die in der Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 6-1 zusammengefasst.

Bezeichnung	Hersteller
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich (H 4043), Deutschland
2-( <i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	Sigma-Aldrich (M 0164), Deutschland
Accutase	PAA laboratories (L 11-007), Österreich
Amiloridehydrochloridehydrate (Amilorid)	Sigma-Aldrich (A 7410), Deutschland
Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid) Trimethine Oxonol, (DiBAC <sub>4</sub> (3))	Molecular Probes (B 438), USA
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	MERCK KGaA (102382), Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	MERCK (317275), Deutschland
Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM D 5030)	Sigma-Aldrich (D5030), Deutschland
Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM D5648)	Sigma-Aldrich (D5648), Deutschland
Ethanol 70%	VWR Prolab, Deutschland
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma-Aldrich (F7524), Deutschland
Gentamycin (50 mg/ml)	Sigma-Aldrich (G1397), Deutschland
Glucose wasserfrei	MERCK KGaA (108337), Deutschland
Gramicidin D from Bacillus aneurinolyticus	Sigma-Aldrich (G 5002), Deutschland
L-Glutamin 200 mM	Sigma-Aldrich (G 7513), Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	MERCK KGaA (6404), Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	MERCK KGaA (106329), Deutschland
Natriumhydrogenphosphat (di-) Dihydrat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	MERCK KGaA (6580), Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	MERCK KGaA (106498), Deutschland
N-Methyl-D-glucamine (NMDG)	Fluka (66930), Deutschland
Phenol Rot	MERCK KGaA (7241), Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS), pH 7.4	Sigma-Aldrich (P-5368), Deutschland
Resazurinsodiumsalt (Resazurin)	Sigma-Aldrich (R 7017), Deutschland
Salzsäure (HCl)	MERCK KGaA (1.00321), Deutschland
TC10™ Trypan Blue Dye	BIO-RAD (145-0021), Deutschland
Triton-X-100 (100%)	Sigma-Aldrich (T 9284), Deutschland
Trypan Blue	Sigma-Aldrich (T 6146), Deutschland
Trypsin	GIBCO (840-7075IH), Deutschland

Tabelle 6-1: Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien und Lösungen.

### 6.1.2 Zusammensetzung der angewendeten Medien

Im Folgenden sind die verwendeten Medien zusammengefasst.

#### Lösung für Zellkultur:

Kulturmedium: DMEM D5646 (Sigma-Aldrich)+3,9g/l  $\text{NaHCO}_3$ +5% FCS (vorgewärmt auf 37°C)

#### Lösungen für die Messung des Zellmetabolismus während der elektrischen Stimulation:

Messmedium: DMEM D5030 (Sigma-Aldrich, ohne Phenolrot und  $\text{NaHCO}_3$ )+4,5g/l D-Glucose+4mM L-Glutamin+50µg/ml Gentamycin+5% FCS

#### Lösungen für die Messung des Zellmetabolismus unter Amilorid-Behandlung:

Gepuffertes Messmedium: DMEM D5030 (Sigma-Aldrich) + 4,5g/l D-Glucose+4mM L-Glutamin+50µg/ml Gentamycin+5% FCS+ 10mM HEPES (pH 7,4 u. 7,0) oder MES (pH 6,5 u. 6,0)

#### Lösungen für die Fluoreszenzmessungen:

HEPES gepufferte physiologische Lösung (HEPES-PS): NaCl 140mM, KCl 2,8mM,  $\text{MgSO}_4$  1mM,  $\text{CaCl}_2$  1mM, D-Glucose 11mM, HEPES 10mM. Die Substanzen wurden in A. bidest (bidestilliertes Wasser) angesetzt, das pH mit NaOH bzw. KCl auf 7,4 oder 7,0 eingestellt wurde.

MES gepufferte physiologische Lösung (MES-PS): NaCl 140mM, KCl 2,8mM,  $\text{MgSO}_4$  1mM,  $\text{CaCl}_2$  1mM, D-Glucose 11mM, MES 10mM. Die Substanzen wurden in A. bidest. angesetzt, das pH mit NaOH bzw. KCl auf 6,5 oder 6,0 eingestellt.

#### Lösungen für den Toxizitätstest:

Messmedium + 1µM, 5µM, 10µM oder 20µM DiBAC<sub>4</sub>(3). 1mM DiBAC<sub>4</sub>(3)-Stammlösung (DMSO/EtOH)

#### DiBAC<sub>4</sub>(3) Eichlösungen:

	2,8 mM KCl	10 mM KCl	25 mM KCl	30 mM KCl	40 mM KCl	60 mM KCl
DiBAC <sub>4</sub> (3)	2 µM	2 µM	2 µM	2 µM	2 µM	2 µM
Gramicidin	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM	1 µM
NMDG	140 mM	138,2 mM	117,8 mM	112,8 mM	102,8 mM	82,8 mM
KCl	2,8 mM	10 mM	25 mM	30 mM	40 mM	60 mM

Tabelle 6-2: Zusammensetzung der DiBAC<sub>4</sub> (3) Eichlösungen.

Die Konzentrationen der anderen Salze entsprachen den bei HEPES (MES)-PS angegebenen Konzentrationen. Die Substanzen wurden in A. bidest. angesetzt. Der pH mit NaOH (KCl) auf 7,4, 7,0, 6,5 und 6,0 eingestellt.

#### Lösungen für die Membranpotential-Messung während elektrischer Stimulation:

HEPES-PS+2µM DiBAC<sub>4</sub>(3)

Lösungen für die Membranpotential-Messung an den Zellen unter Amilorid-Behandlung:

HEPES-PS+2 $\mu$ M DiBAC<sub>4</sub>(3) (pH 7,4 u. 7,0) und : MES-PS+2 $\mu$ M DiBAC<sub>4</sub>(3) (pH 6,5 u. 6,0).

### 6.1.3 Geräte

Die in der Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 6-3 aufgelistet.

Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage (Kern 440-35N)	KERN & SOHN GmbH, Deutschland
Digitalkamera NIKON 5400	Nikon Corporation, Japan
FLUOstar Galaxy	BMG LABTECH GmbH, Deutschland
Frequenzgenerator, SG801	HEB Digitaltechnik, Deutschland
Frequenzgenerator, 8202	Voltcraft, Deutschland
Impedance/Gain-phase Analyzer 1260A	Solartron Analytical, Ametek Inc.
Inkubator (37 °C, 10% CO <sub>2</sub> )	Binder, Deutschland
Intelligent Microplate Reader (IMR)	Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik, HP Medizintechnik GmbH, Deutschland
Inversmikroskop CK2	OL Olympus Optical Co., Japan
Inverses Digital Microscope iMIC	Till Photonics, Deutschland
Magnetrührer mit Heizplatte (RCT classic IKAMAG safety control)	VWR International GmbH, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Carl Roth GmbH, Deutschland
pH-Meter inoLab 720	WTW GmbH, Deutschland
Pipetten (10, 100, 200, 1000 $\mu$ l)	Eppendorf, Deutschland
Pipettenspitzen Premium Tips	Biozym, Deutschland
Pipettierkopf für IMR-System	Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik; HP Medizintechnik, Deutschland
Potentiostat, Voltalab 40	Radiometer Analytical, VoltaLab Instruments
Semimikrowaage Genius Sar	Sartorius AG, Deutschland
Sterilbank Hera Safe	Thermo Scientific, Deutschland
TC10™ Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories, Deutschland
Varioklav Dampfsterilisator	Thermo Scientific, Deutschland
Verdunstungsschutz für Deepwell-Platte (24 Well)	Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik
Wasserbad (Isotemp 200)	Fisher Scientific, Deutschland
Zellkultur-Inkubator	BINDER, Deutschland
Zentrifuge (Multifuge 3 S-R)	Heraeus, Deutschland

Tabelle 6-3: Zusammenfassung der verwendeten Geräte.

#### 6.1.4 Software

In folgender Tabelle 6-4 ist die verwendete Software zusammengefasst.

Software	Hersteller
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, USA
Origin 8.0 G	OriginLab Corporation, USA
IMR Steuersoftware 1.0	HP Medizintechnik GmbH, Deutschland
iMWP Data Viewer 1.3	HP Medizintechnik GmbH, Deutschland
Microscope System 24 1.0	HP Medizintechnik GmbH, Deutschland
IMROS (IMR Operating System)	SHZ Softwarehaus Zuleger GmbH, Deutschland
ImageJ, 1.48v	Open Source

Tabelle 6-4: Zusammenfassung der verwendeten Software.

## 6.2 Anhang B

### *Impedanzmessung*

In den Kapiteln 4.1.1. und 4.1.3. sind die Bode-Diagrammen der untersuchten Elektroden in einer PBS Lösung gezeigt. In unten stehender Tabelle 6-5 bis Tabelle 6-8 sind die maximalen und minimalen Werte des Betrages bei verschiedenen Anregungsspannungen (200mV, 500mV und 750mV) zusammengefasst. Die Messungen wurden an den Glas-Sensorchips mit und ohne Zellen durchgeführt.

*Vergleichsmessung (ohne Zellen): Frequenzbereich [ $10^0\text{Hz}$ – $10^6\text{Hz}$ ], direkte Befeldung:*

Amplitude [mV]	Max. Impedanzwert [ $\Omega$ ]	Min. Impedanzwert [ $\Omega$ ]
200	$2 \times 10^5$	40
500	$5 \times 10^4$	40
750	$2,5 \times 10^4$	40

Tabelle 6-5: Impedanzmessung: Betrag der Impedanz von Mikroelektroden, gemessen mit einer Spannung von 200mV, 500mV und 750mV im Frequenzbereich von  $10^0\text{Hz}$  bis  $10^6\text{Hz}$ . Chip ohne Zellen. Direkte Feldeinspeisung, Kontrolle.

*Vergleichsmessung (ohne Zellen): Frequenzbereich [ $10^0\text{Hz}$ – $10^6\text{Hz}$ ], kapazitive Befeldung:*

Amplitude [mV]	Max. Impedanzwert [ $\Omega$ ]	Min. Impedanzwert [ $\Omega$ ]
200	$8 \times 10^5$	800
500	$5 \times 10^5$	800
750	$2,5 \times 10^5$	800

Tabelle 6-6: Impedanzmessung: Betrag der Impedanz von Mikroelektroden, gemessen mit einer Spannung von 200mV, 500mV und 750mV im Frequenzbereich von  $10^0\text{Hz}$  bis  $10^6\text{Hz}$ . Chip ohne Zellen. Kapazitive Feldeinspeisung, Kontrolle.

*Vergleichsmessung mit MCF-7 Zellen: Frequenzbereich [ $10^0\text{Hz}$ – $10^6\text{Hz}$ ], direkte Befeldung:*

Amplitude [mV]	Max. Impedanzwert [ $\Omega$ ]	Min. Impedanzwert [ $\Omega$ ]
200	$2 \times 10^5$	60
500	$1,2 \times 10^5$	60
750	$2 \times 10^4$	60

Tabelle 6-7: Impedanzmessung: Betrag der Impedanz von Mikroelektroden, gemessen mit einer Spannung von 200mV, 500mV und 750mV im Frequenzbereich von  $10^0\text{Hz}$  bis  $10^6\text{Hz}$ . Messung mit MCF-7 Zellen. Direkte Feldeinspeisung.



Vergleichsmessung mit MCF-7 Zellen: Frequenzbereich [ $10^0\text{Hz}$ – $10^6\text{Hz}$ ], kapazitive Befeldung:

Amplitude [mV]	Max. Impedanzwert [ $\Omega$ ]	Min. Impedanzwert [ $\Omega$ ]
200	$1,3 \times 10^6$	1000
500	$7 \times 10^5$	1000
750	$2,5 \times 10^5$	1000

Tabelle 6-8: Impedanzmessung: Betrag der Impedanz von Mikroelektroden, gemessen mit einer Spannung von 200mV, 500mV und 750mV im Frequenzbereich von  $10^0\text{Hz}$  bis  $10^6\text{Hz}$ . Messung mit MCF-7 Zellen. Kapazitive Feldeinspeisung.

## 6.3 Anhang C

### Numerische Modellierung des Spannungs- und Feldverlaufs

#### 6.3.1 Kapazitive elektrische Stimulation: Sinusförmige elektrische Felder, 100Hz und 150 kHz, Elektrodenabstand 3 mm, Anregungsspannung 15 V

Mit dem in Kapitel 3.7.2 vorgestellten Simulationsmodell ergibt sich der in Abbildung 6-1 und Abbildung 6-2 dargestellte Potentialverlauf der räumlichen Verteilung der elektrischen Feldstärke an einer Zelle, die sich auf den Boden eines Wells einer 6-Well-Platte zwischen zwei Fingern der IDEs Elektroden befindet. Die Frequenz beträgt 100Hz bzw. 150kHz. Die an der rechten Elektrode angelegte Spannung beträgt 15V. Der Elektrodenabstand beträgt 3mm.

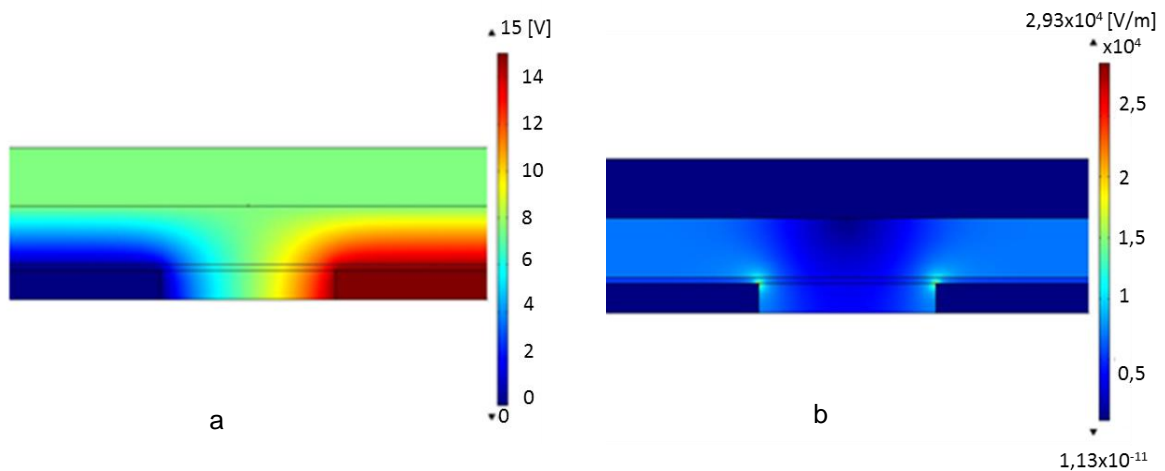


Abbildung 6-1: Berechneter Spannungsverlauf (a) und Feldverlauf (b) am Boden eines Wells der 6-Well-Platte in und an einer Zelle, die sich am Boden eines Wells der 6-Well-Platte befindet. Die 6-Well-Platte ist auf eine Befeldungsplatine gestellt. Die Zellen wurden mit einer Spannung von 15V und einer Frequenz von 100Hz stimuliert. Der Elektrodenabstand beträgt 3mm.

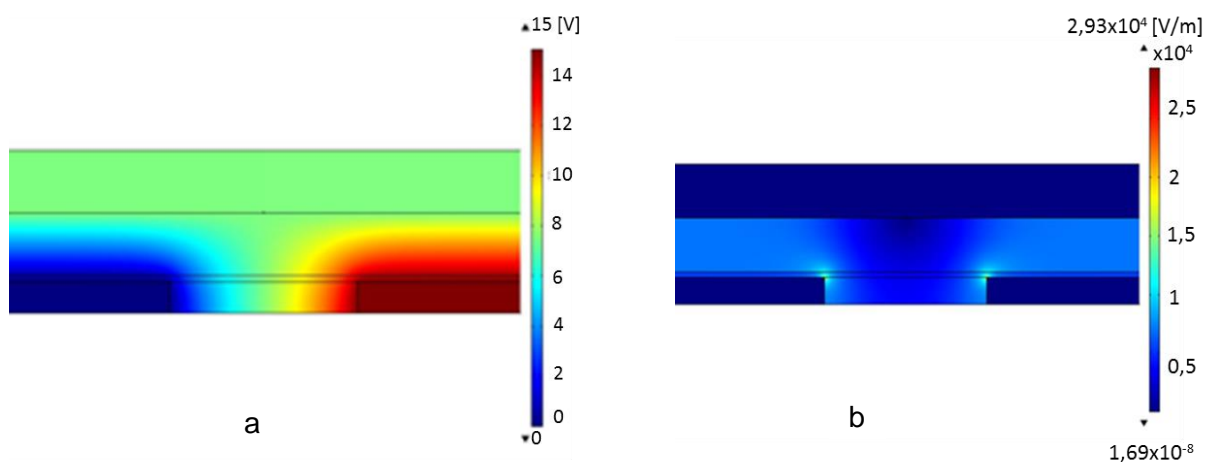


Abbildung 6-2: Berechneter Spannungsverlauf (a) und Feldverlauf (b) am Boden eines Wells der 6-Well-Platte in und an einer Zelle, die sich am Boden eines Wells der 6-Well-Platte befindet. Die 6-Well-Platte ist auf eine Befeldungsplatine gestellt. Die Zellen wurden mit einer Spannung von 15V und einer Frequenz von 150kHz stimuliert. Der Elektrodenabstand beträgt 3mm.

Für den Elektrodenabstand von 3mm ergeben sich im Inneren des Wells Feldstärken von maximal  $7,2 \times 10^{-4} \text{V/m}$  und  $1,4 \text{V/m}$  und im Inneren der Zelle von maximal  $6,5 \times 10^{-7} \text{V/m}$  und  $0,85 \text{V/m}$  bei Frequenzen von 100Hz und 150kHz entsprechend.

### 6.3.2 Kapazitive elektrische Stimulation: Sinusförmige elektrische Felder 150kHz, Elektrodenabstand 1 mm, Anregungsspannung 10 kV, Zellen auf einem Foliensubstrat

Mit dieser Simulation wurde untersucht, welche elektrische Feldstärke an der Zelle auf einem Foliensubstrat entsteht. Die Foliendicke beträgt  $175 \mu\text{m}$ . Verwendet wurde das Modell aus Kapitel 3.7.1 mit einer Anregungsspannung von 10kV, einem IDEs Abstand von 1mm und einer Folie mit einer Dicke von  $175 \mu\text{m}$ . Der Spannungsverlauf ist in Abbildung 6-3 dargestellt.

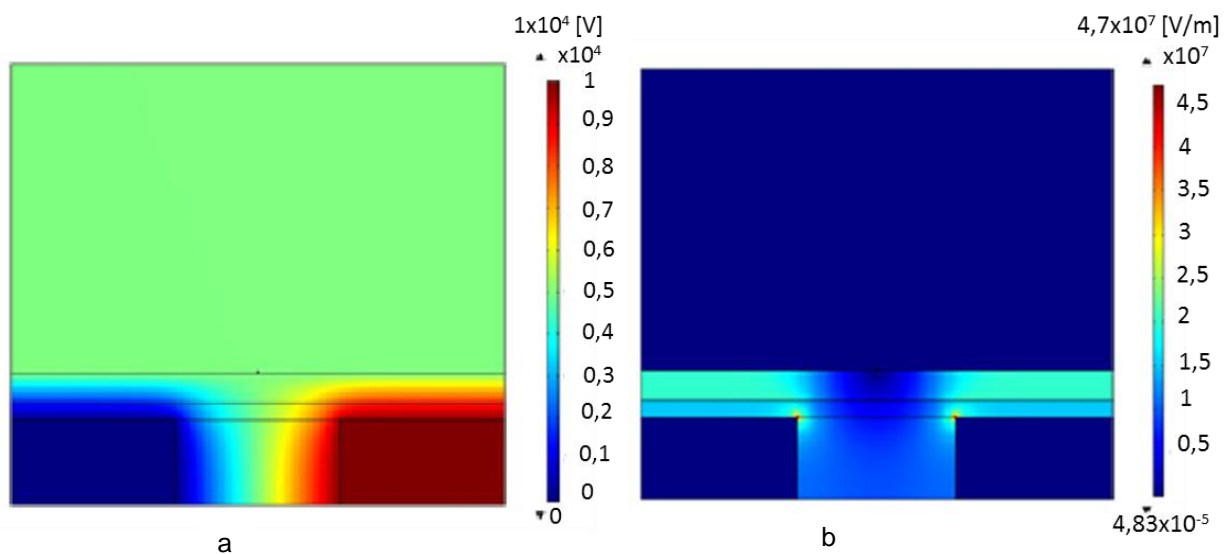


Abbildung 6-3: Berechneter Spannungsverlauf (a) und Feldverlauf (b) am Boden eines Wells der 6-Well-Platte in und an einer Zelle, die sich am Boden eines Foliensubstrates befindet. Die 6-Well-Platte ist auf eine Befeldungsplatine gestellt. Die Zellen wurden mit einer Spannung von 10kV und einer Frequenz von 150kHz stimuliert. Der Elektrodenabstand beträgt 1mm.

Für den Elektrodenabstand von 1mm betragen die mittels Comsol aufgezeichneten Werte im Inneren der Zelle maximal  $2,3 \text{kV/m}$  und außerhalb  $4 \text{kV/m}$ .

### 6.3.3 Kapazitive elektrische Stimulation: Sinusförmige elektrische Felder, 150kHz, Elektrodenabstand 50 $\mu\text{m}$ , Anregungsspannung 50 V, Zellen auf einem mit SU-8 Lack passivierten Glas-Sensorchip

Weiterhin wurde berechnet, welcher Spannungs- und Feldverlauf auf einem mit SU-8 Lack passivierten Glas-Sensorchip entsteht.

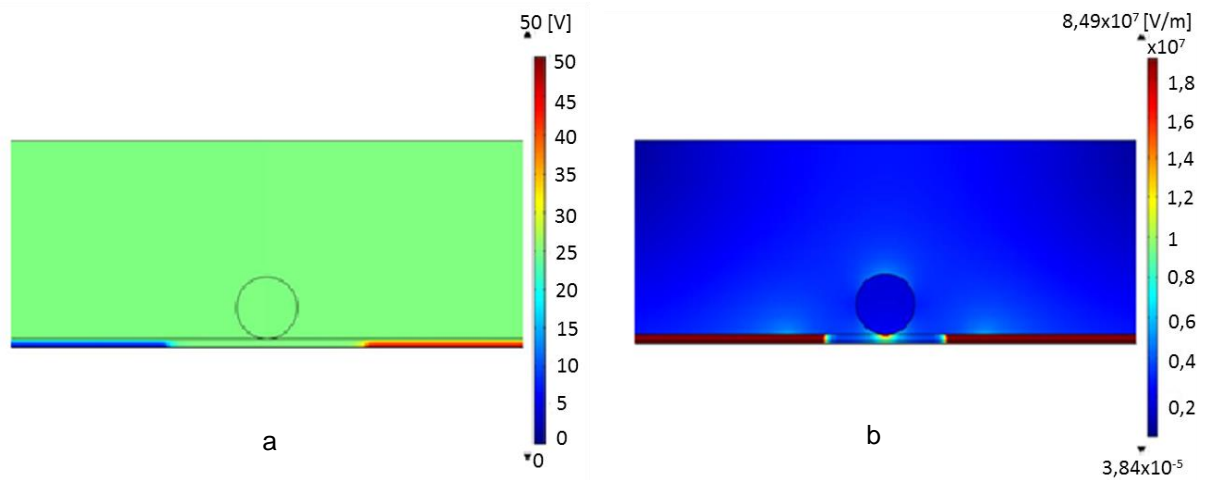


Abbildung 6-4: Berechneter Spannungsverlauf (a) und Feldverlauf (b) in und an einer Zelle, die sich am Boden eines mit SU-8 Lack passivierten Glas-Sensorchips befindet. Die Zellen wurden mit einer Spannung von 50V und einer Frequenz von 150kHz stimuliert. Der Elektrodenabstand beträgt 50 $\mu\text{m}$ .

Die in Comsol gemessenen Feldstärken im Zellinneren belaufen sich bei der Frequenz von 150kHz, der Anregungsspannung von 50V und dem Elektrodenabstand von 50 $\mu\text{m}$  auf maximal 2kV/m. Im extrazellulären Medium treten gleichzeitig Feldstärken im Bereich von 3kV/m auf. Um die Zelle herrschen relativ gleichmäßige Feldstärken.

### 6.3.4 Direkte elektrische Stimulation über Längselektroden: Sinusförmige elektrische Felder, 100 Hz

Mit dem in Kapitel 3.7.1 vorgestellten Simulationsmodell ergibt sich die in Abbildung 6-5 dargestellte räumliche Verteilung der elektrischen Feldstärken in und an einer Tumorzelle. Diese befinden sich zwischen zwei Stimulationselektroden in einem Messmedium (bei einem Elektrodenabstand von 3mm und bei einer Frequenz von 100Hz). Die an der rechten Elektrode angelegte Spannung beträgt 750mV.

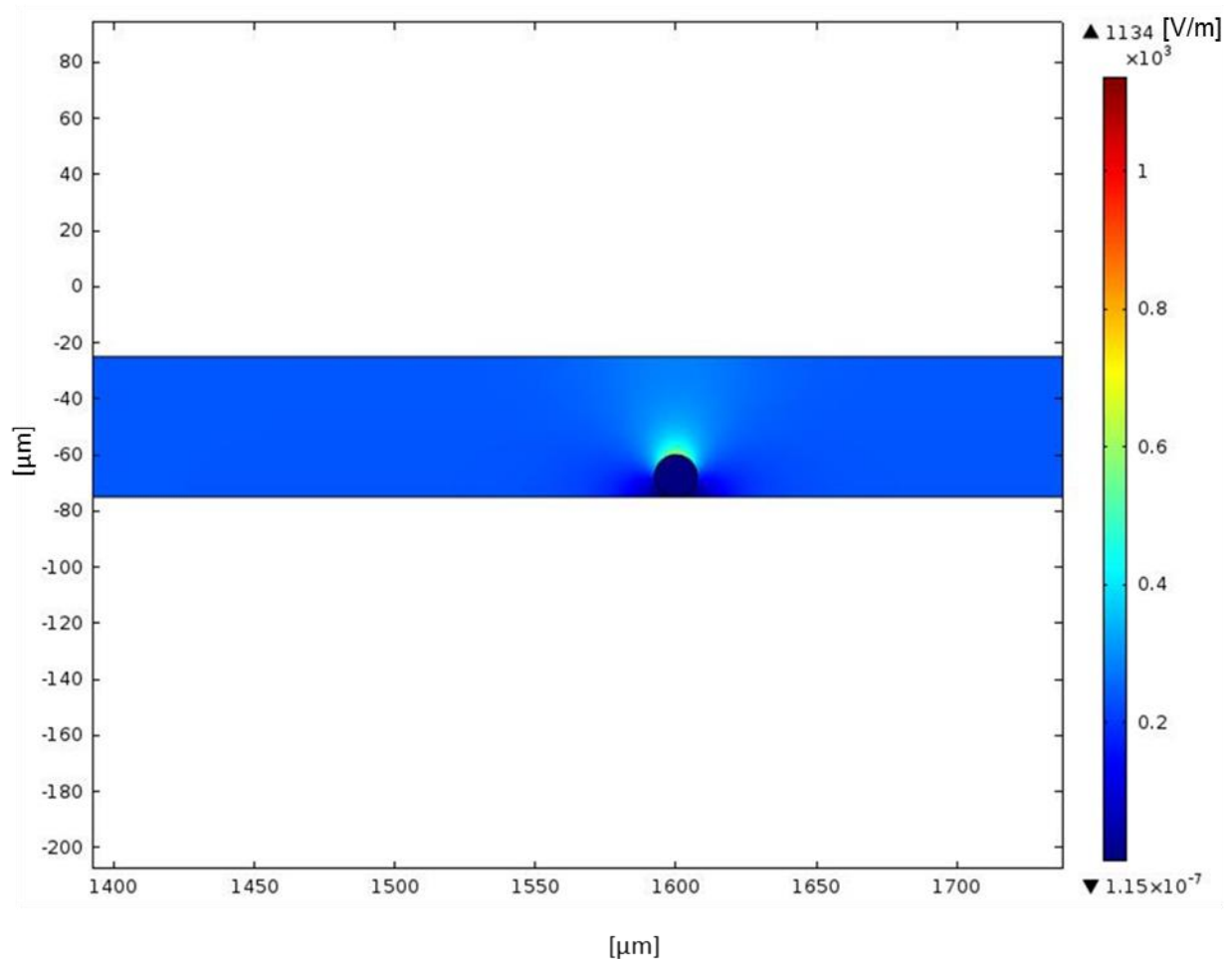


Abbildung 6-5: Berechneter Feldverlauf in und an einer Zelle, die sich zwischen zwei Stimulationselektroden in einem Messmedium befindet, mit einer Stimulationsspannung von 750mV und einer Frequenz von 100Hz. Elektrodenabstand beträgt 3mm. Vergrößerte Abbildung.

Die in Comsol gemessenen Feldstärken im Zellinneren belaufen sich bei der Frequenz von 100Hz auf maximal  $1,9 \times 10^{-3} \text{ V/cm}$ . Im extrazellulären Medium liegen die Feldstärken bei 230V/m.

## 6.4 Anhang D

### *Elektrische Stimulation*

#### 6.4.1 Statistische Auswertung

Aus den gewonnen Testergebnissen der Zellzahlen, der metabolischen Messungen und der Resazurin-Umsetzungen soll über einen statistischen Hypothesentest, die Gleichheit, bzw. die Unterschiedlichkeit ermittelt werden.

#### Verwendete statistische Methode

Um die Hypothesen zu bestätigen oder abzulehnen, wurde der Student'sche t-Test verwandt. Dieser Test setzt eine Normalverteilung der Grundgesamtheit voraus, verwendet aber die t-Verteilung, die bei kleiner Stichprobenanzahl zur Anwendung kommt.

Das Verfahren vergleicht die Mittelwerte unter Berücksichtigung der Standardabweichung der Stichproben für zwei Gruppen. Mittels eines vorgegebenen Signifikanzkriteriums wird der Hypothesentest bestätigt, bzw. abgelehnt.

Der Student t-Test ist in diesem Fall mathematisch identisch mit dem einfaktoriellen Anova Test.

Dabei wurden folgende Hypothesen definiert:

Nullhypothese: Die Mittelwerte aller Niveaus sind gleich.

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$                       Stichproben unterscheiden sich nicht signifikant

Alternativhypothese: Die Mittelwerte eines oder mehrerer Niveaus sind verschieden.

$H_1: \mu_1 - \mu_2 \neq 0$                       Unterschied der Stichproben ist signifikant

Beim Niveau 0,05 unterscheiden sich die Mittelwerte der Grundgesamtheiten signifikant.

$p_s < 0,05$                                   Signifikanzkriterium. p: errechnetes Signifikanzniveau  
(zwischen verglichenen Stichproben)

## 6.4.2 Elektrische Stimulation: direkte Feldeinkopplung, Zellzahlbestimmung, Resazurinumsetzung

### **Niederfrequente elektrische Felder, 100Hz, Anregungsspannung 750mV**

#### MDA-MB-231 Zellen auf den Glas-Sensorchip

Zu entsprechenden Zeitpunkten nach dem Stimulationsstart (jeweils 21h) wurde die Zellzahl den mit einem elektrischen Feld stimulierten und nicht stimulierten Zellen verglichen. Die Stimulationsdauer beträgt jeweils 21h (siehe Kapitel 4.3.1).

#### *Zellzahlbestimmung:*

Zelldichte in Kultur in (Zellen/cm <sup>2</sup> )x10 <sup>5</sup>						
Zeit nach der Aussaat	48 h		71 h		95 h	
	Kontrolle	Kontrolle	Befeldung 1	Kontrolle	Befeldung 2	
Versuch 1	0,74	1,35	0,74	2,05	1,10	
	0,71	1,35	0,73	1,98	1,15	
Versuch 2	0,71	1,00	0,70	1,98	1,24	
	0,68	1,01	0,67	1,98	1,19	
Versuch 3	0,71	1,16	0,71	1,96	1,21	
	0,72	1,26	0,70	1,98	1,13	

Tabelle 6-9: Zelldichte der auf dem Glas-Sensorchip kultivierten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten bei unbehandelten MDA-MB-231 Zellen (Kontrolle) und mit elektrischem Feld stimulierten Zellen.

#### *Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse:*

Ein Test wurde immer mit 2x6 gleichen Ausgangsproben durchgeführt. Die Referenzprobe (Kontrolle) blieb unbehandelt, die andere wurde mit einer Spannung von 750mV stimuliert:

6 Proben blieben unbehandelt

6 Proben wurden mit einer Spannung von 750mV stimuliert

Dauer der Stimulation	p-Wert			
	Zellzahl		Zellzahl	
	Kontrolle vs stimulierten Zellen, 71 h		Kontrolle vs stimulierten Zellen, 95 h	
21 h	2,51E-5	signifikant	1,64E-11	signifikant

Tabelle 6-10: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test bei zwei Stichproben, p<0,05). Elektrische Stimulation der MDA-MB<sub>231</sub> Zellen auf den Glas-Sensorchip, n=6.

MCF-7 Zellen in einer iMWP im IMR Messsystem

Zu den entsprechenden Zeitpunkten nach dem Stimulationsstart (jeweils 30h) wurde die Zellzahl der mit einem elektrischen Feld stimulierten und nicht stimulierten Zellen verglichen. Die Stimulationsdauer betrug 30h (siehe Kapitel 4.3.2).

Zellzahlbestimmung:

Zelldichte in Kultur in (Zellen/cm <sup>2</sup> )x10 <sup>5</sup>			
Versuch 1		Versuch 2	
Kontrolle	Elektrische Stimulation	Kontrolle	Elektrische Stimulation
1,51	1,16	2,57	1,81
1,91	1,56	2,55	1,96
1,71	1,41	2,90	1,72
1,61	1,33	2,42	2,20
1,86	1,30	2,43	2,17
1,77	1,25	2,57	1,81

Tabelle 6-11: Zellzahl von elektrisch stimulierten MCF-7 Zellen gegenüber nicht stimulierten Zellen.

Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse:

Ein Test wurde immer mit 2x6 gleichen Ausgangsproben durchgeführt. Die Referenzprobe (Kontrolle) blieb unbehandelt, die andere wurde mit einer Spannung von 750mV stimuliert:

6 Proben blieben unbehandelt

6 Proben wurden mit einer Spannung von 750mV stimuliert

Dauer der Stimulation	p-Wert	
	Zellzahl	
	Kontrolle vs stimulierten Zellen, Test 1	Kontrolle vs stimulierten Zellen, Test 2
30h	0,16E-2      signifikant	8,44E-4      signifikant

Tabelle 6-12: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test bei zwei Stichproben, p<0,05). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP, n=6.



### 6.4.3 Elektrische Stimulation: direkte Feldeinkopplung, Metabolische Messungen

#### Niederfrequente elektrische Felder: 100 Hz

Ein Test wurde immer mit 2x5 gleichen Ausgangsproben durchgeführt. Die Referenzprobe (Kontrolle) blieb unbehandelt, die andere werde mit einer Feldstärke von 20-40V/cm stimuliert:

5 Proben blieben unbehandelt

5 Proben wurden mit einer Spannung von 750mV (bzw. einer Feldstärke von 2,3 kV/m) stimuliert

Zu entsprechenden Zeitpunkten nach dem Stimulationsstart (0h, 10h, 20h und 30h) wurden die metabolischen Parameter Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsrate von mit einem elektrischen Feld stimulierten und nicht stimulierten Zellen verglichen. Die Stimulationsdauer betrug 30h (siehe Kapitel 4.3.5).

Zeit nach dem Stimulationsstart	p-Wert			
	Sauerstoffverbrauch		Ansäuerung	
	Kontrolle vs stimulierten Zellen		Kontrolle vs stimulierten Zellen	
0 h	0,87	Keine Signifikanz	0,86	Keine Signifikanz
10 h	0,95	Keine Signifikanz	0,60	Keine Signifikanz
20 h	0,51	Keine Signifikanz	0,29	Keine Signifikanz
30h	0,06	Keine Signifikanz	0,65	Keine Signifikanz

Tabelle 6-13: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test,  $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Niederfrequente Feldpulse, 100Hz.

#### Sinusförmige elektrische Felder: 100 Hz

Ein Test wurde immer mit 4x3 gleichen Ausgangsproben durchgeführt. Die Referenzprobe (Kontrolle) blieb unbehandelt, die anderen Gruppen wurden mit verschiedenen Feldstärken stimuliert:

3 Proben blieben unbehandelt

3 Proben wurden mit einer Spannung von 50mV stimuliert

3 Proben wurden mit einer Spannung von 200mV stimuliert

3 Proben wurden mit einer Spannung von 715mV stimuliert

Zu entsprechenden Zeitpunkten nach dem Stimulationsstart (0h, 30h, 70h, 90h und 110h) wurden die metabolischen Parameter Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsrate von mit einem elektrischen Feld stimulierten und nicht stimulierten Zellen verglichen. Die Stimulationsdauer betrug 108h (siehe Kapitel 4.4.1).

*Elektrische Stimulation der Zellen mit einer Spannung von 50mV:*

Zeit nach dem Stimulationsstart	p-Wert			
	Sauerstoffverbrauch		Ansäuerung	
	Kontrolle vs stimulierten Zellen		Kontrolle vs stimulierten Zellen	
30h	0,99	Keine Signifikanz	0,71	Keine Signifikanz
70 h	0,05	Keine Signifikanz	0,56	Keine Signifikanz
90 h	0,84	Keine Signifikanz	0,52	Keine Signifikanz
110 h	0,71	Keine Signifikanz	0,11	Keine Signifikanz

Tabelle 6-14: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test,  $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 100Hz. Anregungsspannung 50mV.

*Elektrische Stimulation der Zellen mit einer Spannung von 200mV:*

Zeit nach dem Stimulationsstart	p-Wert			
	Sauerstoffverbrauch		Ansäuerung	
	Kontrolle vs stimulierten Zellen		Kontrolle vs stimulierten Zellen	
30h	0,01	signifikant	0,32	Keine Signifikanz
70 h	0,48	Keine Signifikanz	0,52	Keine Signifikanz
90 h	0,27	Keine Signifikanz	0,89	Keine Signifikanz
110 h	0,49	Keine Signifikanz	0,94	Keine Signifikanz

Tabelle 6-15: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test,  $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 100Hz. Anregungsspannung 200mV.

*Elektrische Stimulation der Zellen mit einer Spannung von 715mV:*

Zeit nach dem Stimulationsstart	p-Wert			
	Sauerstoffverbrauch		Ansäuerung	
	Kontrolle vs stimulierten Zellen		Kontrolle vs stimulierten Zellen	
30h	0,44	Keine Signifikanz	0,97	Keine Signifikanz
70 h	0,01	signifikant	0,50	Keine Signifikanz
90 h	0,03	signifikant	0,39	Keine Signifikanz
110 h	0,03	signifikant	0,29	Keine Signifikanz

Tabelle 6-16: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test,  $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 100Hz. Anregungsspannung 715mV.

Sinusförmige elektrische Felder: 150kHz

Ein Test wurde immer mit 4x3 gleichen Ausgangsproben durchgeführt. Die Referenzprobe (Kontrolle) blieb unbehandelt, die anderen Gruppen wurden mit verschiedenen Feldstärken stimuliert:

3 Proben blieben unbehandelt

3 Proben wurden mit einer Spannung von 50mV stimuliert

3 Proben wurden mit einer Spannung von 200mV stimuliert

3 Proben wurden mit einer Spannung von 715mV stimuliert

Zu entsprechenden Zeitpunkten nach dem Stimulationsstart (0h, 30h, 70h, 90h und 110h) wurden die metabolischen Parameter Sauerstoffverbrauch und Ansäuerungsrate von mit einem elektrischen Feld stimulierten und nicht stimulierten Zellen verglichen. Die Stimulationsdauer betrug 108h (siehe Kapitel 4.5.1).

Elektrische Stimulation der Zellen mit einer Spannung von 50mV:

Zeit nach dem Stimulationsstart	p-Wert			
	Sauerstoffverbrauch		Ansäuerung	
	Kontrolle vs stimulierten Zellen		Kontrolle vs stimulierten Zellen	
30h	0,39	Keine Signifikanz	0,68	Keine Signifikanz
70 h	0,56	Keine Signifikanz	0,10	Keine Signifikanz
90 h	0,94	Keine Signifikanz	0,90	Keine Signifikanz
110 h	0,81	Keine Signifikanz	0,78	Keine Signifikanz

Tabelle 6-17: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test,  $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 150kHz. Anregungsspannung 50mV.

Elektrische Stimulation der Zellen mit einer Spannung von 200mV:

Zeit nach dem Stimulationsstart	p-Wert			
	Sauerstoffverbrauch		Ansäuerung	
	Kontrolle vs stimulierten Zellen		Kontrolle vs stimulierten Zellen	
30h	0,01	signifikant	0,22	Keine Signifikanz
70 h	0,08	Keine Signifikanz	0,80	Keine Signifikanz
90 h	0,04	Signifikant	0,59	Keine Signifikanz
110 h	0,07	Keine Signifikanz	0,64	Keine Signifikanz

Tabelle 6-18: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test,  $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 150kHz. Anregungsspannung 200mV

*Elektrische Stimulation der Zellen mit einer Spannung von 715mV:*

Zeit nach dem Stimulationsstart	p-Wert			
	Sauerstoffverbrauch		Ansäuerung	
	Kontrolle vs stimulierten Zellen		Kontrolle vs stimulierten Zellen	
30h	0,06	Keine Signifikanz	0,98	Keine Signifikanz
70 h	0,03	signifikant	0,86	Keine Signifikanz
90 h	0,01	signifikant	0,45	Keine Signifikanz
110 h	0,02	signifikant	0,45	Keine Signifikanz

Tabelle 6-19: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test,  $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 150kHz. Anregungsspannung 715mV.

#### 6.4.4 Temperaturkontrolle auf dem Glas-Sensorchip während der elektrischen Stimulation mittels einen Temperatursensors PT1000

Es kann während der elektrischen Stimulation zu Hitzeentwicklung kommen. Aus diesem Grund wurde der Temperaturverlauf auf den verwendeten Glas-Sensorchips während der elektrischen Stimulation mit Hilfe eines Temperatursensors PT1000 aufgezeichnet (siehe Kapitel 4.3.3).

Der Stimulationsversuch wurde im Inkubator aufgebaut. Diesen heizte man zunächst auf 37°C auf und maß dann den Widerstand bei dieser Temperatur. Danach wurde der gleiche Ablauf bei der Temperatur von 40°C wiederholt. Nach der Messung ergaben sich folgende Widerstandswerte:

Temperatur, (°C)	37 °C	40 °C
Glas-Sensorchip 1, Widerstand (Ω)	1162	1173
Glas-Sensorchip 2, Widerstand (Ω)	968	979

Tabelle 6-20: Widerstandswerte, gemessen an Temperatursensor Pt1000 an beiden Glas-Sensorchips bei 37°C und 40°C.

Daraus berechnete man die Kurvensteigung, die die Änderung der Temperatur widerspiegelt:

$$\text{Glas-Sensorchip 1: } \frac{(1173 - 1162) \Omega}{(40 - 37) ^\circ C} = 3,7 \frac{\Omega}{^\circ C}$$

$$\text{Glas-Sensorchip 2: } \frac{(979 - 968) \Omega}{(40 - 37) ^\circ C} = 3,7 \frac{\Omega}{^\circ C}$$

Anschließend führte man die Temperaturmessung an beiden Glas-Sensorchips während der elektrischen Stimulation über 30h durch. Die gemessenen Widerstandswerte sind in Tabelle 6-21 zusammengefasst.

Zeit (h)	0	1	2	3	4	5	6	21	30
Glas-Sensorchip 1, Widerstandswerte (Ω)	968	968	969	969	970	970	970	971	971
Glas-Sensorchip 2, Widerstandswerte (Ω)	1162	1162	1163	1164	1164	1164	1164	1165	1165

Tabelle 6-21: Widerstandswerte, gemessen an Temperatursensor Pt1000, während der elektrischen Stimulation (30h) an beiden Glas-Sensorchips.

Aus diesen Messungen berechnete man die Änderung der Temperatur auf den Glas-Sensorchips während der elektrischen Stimulation (30h)

$$\text{Glas-Sensorchip 1: } \frac{\Delta t}{(971 - 968)\Omega} = \frac{1^\circ C}{3,7\Omega}$$

Die Änderung der Temperatur betrug:  $\Delta t = 0,8^\circ C$

$$\text{Glas-Sensorchip 2: } \frac{\Delta t}{(1165 - 1162)\Omega} = \frac{1^\circ \text{C}}{3,7\Omega}$$

Die Änderung der Temperatur betrug:  $\Delta t = 0,8^\circ \text{C}$

Zeit (h)	0	1	2	3	4	5	6	21	30
Glas-Sensorchip 1, Temperatur, ( $^\circ\text{C}$ )	37	37	37,3	37,3	37,6	37,6	37,6	37,8	37,8
Glas-Sensorchip 2, Temperatur, ( $^\circ\text{C}$ )	37	37	37,3	37,6	37,6	37,6	37,6	37,8	37,8

Tabelle 6-22: Temperaturwerte, gemessen an Temperatursensor Pt1000, während der elektrischen Stimulation (30h) an beiden Glas-Sensorchips.

Aus diesen Messungen ergab sich, dass sich die Temperatur während der Stimulation auf den Glas-Sensorchips um  $0,8^\circ \text{C}$  ändert.

Diese langsame, geringfügige Temperaturänderung kann man als Ursache für einen Rückgang der Wachstumsgeschwindigkeit ausschließen.

#### 6.4.5 Elektrische Stimulation: kapazitive Feldeinkopplung,

##### **Sinusförmige elektrische Felder: 100Hz, 150kHz, MCF-7 Zellen, Anregungsspannung 15 V**

Wie in Kapitel 4.6.1 beschrieben, wurden die Zellzahl und die Resazurin-Umsetzung der Zellen nach elektrischer Stimulation mit kapazitiver Feldeinkopplung bestimmt und statistisch ausgewertet.

*Zellzahlenbestimmung:*

Stimulation mit 100 Hz: Zellzahl	Well 1	Well 2	Well 3
Kontrollgruppe	$2,55 \times 10^6$	$2,78 \times 10^6$	$2,35 \times 10^6$
Stimulierte Gruppe (1 mm Elektrodenabstand)	$3,09 \times 10^6$	$2,22 \times 10^6$	$2,51 \times 10^6$
Stimulierte Gruppe (3 mm Elektrodenabstand)	$3,2 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$2,85 \times 10^6$

Tabelle 6-23: Elektrische Stimulation: Kapazitive Befeldung 100Hz; Zellzahl.

1. Stimulation 150kHz: Zellzahl	Well 1	Well 2	Well 3
Kontrollgruppe	$3,18 \times 10^6$	$3,3 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6$
Stimulierte Gruppe (1 mm Elektrodenabstand)	$2,95 \times 10^6$	$2,9 \times 10^6$	$2,33 \times 10^6$
Stimulierte Gruppe (3 mm Elektrodenabstand)	$2,96 \times 10^6$	$2,13 \times 10^6$	$2,66 \times 10^6$

Tabelle 6-24: Elektrische Stimulation: Kapazitive Befeldung 150kHz; Zellzahl

Reproduzierte Stimulation: 150kHz: Zellzahl	Well 1	Well 2	Well 3
Kontrollgruppe	2,1x10 <sup>6</sup>	1,43x10 <sup>6</sup>	2,1x10 <sup>6</sup>
Stimulierte Gruppe (1 mm Elektrodenabstand)	1,94x10 <sup>6</sup>	1,88x10 <sup>6</sup>	1,25x10 <sup>6</sup>
Stimulierte Gruppe (3 mm Elektrodenabstand)	1,67x10 <sup>6</sup>	1,9x10 <sup>6</sup>	1,2x10 <sup>6</sup>

Tabelle 6-25: Elektrische Stimulation: Kapazitive Befeldung 150kHz; Zellzahl.

*Resazurin-Umsetzung:*

Stimulation mit 100 Hz Fluoreszenzanalyse–Resazurin Test	Well 1	Well 2	Well 3
Ohne Zellen	388	395	413
Kontrollgruppe	9458	10456	10483
Stimulierte Gruppe (1 mm Elektrodenabstand)	9495	9436	10513
Stimulierte Gruppe (3 mm Elektrodenabstand)	10271	10576	-

Tabelle 6-26: Elektrische Stimulation: Kapazitive Befeldung 100Hz; Fluoreszenzanalyse.

1. Stimulation mit 150 kHz Fluoreszenzanalyse–Resazurin Test	Well 1	Well 2	Well 3
Ohne Zellen	386	377	395
Kontrollgruppe	12133	12037	11886
Stimulierte Gruppe (1 mm Elektrodenabstand)	12688	13320	13160
Stimulierte Gruppe (3 mm Elektrodenabstand)	12155	12393	12325

Tabelle 6-27: Elektrische Stimulation: Kapazitive Befeldung 150kHz; Fluoreszenzanalyse.

2. Stimulation mit 150 kHz Fluoreszenzanalyse–Resazurin Test	Well 1	Well 2	Well 3
Ohne Zellen	343	344	355
Kontrollgruppe	12652	12252	12244
Stimulierte Gruppe (1 mm Elektrodenabstand)	12191	12068	12157
Stimulierte Gruppe (3 mm Elektrodenabstand)	12066	12421	12197

Tabelle 6-28: Elektrische Stimulation: Kapazitive Befeldung 150kHz; Fluoreszenzanalyse.

### **Statistische Auswertung**

Ein Test wurde immer mit 3x3 gleichen Ausgangsproben durchgeführt. Die Referenzprobe (Kontrolle) blieb unbehandelt, die anderen wurden mit verschiedenen Feldstärken stimuliert:

3 Proben blieben unbehandelt

3 Proben wurden mit einer Spannung von 15V und einem Elektrodenabstand von 1mm stimuliert

3 Proben wurden mit einer Spannung von 15V und einem Elektrodenabstand von 3mm stimuliert

Nach dem Versuchsende (96h Stimulation) wurden die Zellzahl und die Ergebnisse des Resazurin-Umsetzungstests verglichen. Die Messungen wurden bei zwei verschiedenen Frequenzen von 100Hz und 150kHz durchgeführt.

#### Sinusförmige elektrische Felder: 100 Hz

*Elektrische Stimulation der Zellen mit einer Spannung von 15V:*

##### *Zellzahlbestimmung:*

Zeit nach dem Stimulationsstart	p-Wert	
	Zellzahl	
	Kontrolle vs stimulierten Zellen, 1mm	Kontrolle vs stimulierten Zellen, 3 mm
96 h	0,88 Keine Signifikanz	0,09 Keine Signifikanz

Tabelle 6-29: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test,  $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 100Hz. Anregungsspannung 15V. Kapazitive Feldeinspeisung.

##### *Resazurin-Umsetzung:*

Zeit nach dem Stimulationsstart	p-Wert	
	Fluoreszenzintensität	
	Kontrolle vs stimulierten Zellen, 1mm	Kontrolle vs stimulierten Zellen, 3 mm
96 h	0,54 Keine Signifikanz	0,58 Keine Signifikanz

Tabelle 6-30: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test,  $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 100Hz. Anregungsspannung 15V. Kapazitive Feldeinspeisung.



Sinusförmige elektrische Felder: 150 kHz*Zellzahlbestimmung:*

Zeit nach dem Stimulationsstart	p-Wert		Zellzahl	
	Kontrolle vs stimulierten Zellen, 1mm	Kontrolle vs stimulierten Zellen, 3 mm	Kontrolle vs stimulierten Zellen, 1mm	Kontrolle vs stimulierten Zellen, 3 mm
96 h, Test 1	0,07	Keine Signifikanz	0,06	Keine Signifikanz
96 h, Test 2	0,58	Keine Signifikanz	0,38	Keine Signifikanz

Tabelle 6-31: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test,  $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 150kHz. Anregungsspannung 15V. Kapazitive Feldeinspeisung.

*Resazurin-Umsetzung:*

Zeit nach dem Stimulationsstart	p-Wert		Fluoreszenzintensität	
	Kontrolle vs stimulierten Zellen, 1mm	Kontrolle vs stimulierten Zellen, 3 mm	Kontrolle vs stimulierten Zellen, 1mm	Kontrolle vs stimulierten Zellen, 3 mm
96 h, Test 1	0,01	Signifikant	0,06	Keine Signifikanz
96 h, Test 2	0,16	Keine Signifikanz	0,42	Keine Signifikanz

Tabelle 6-32: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test,  $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 150kHz. Anregungsspannung 15V. Kapazitive Feldeinspeisung.

## 6.5 Anhang E

### **Kalibrierungskurve zum Quantifizieren einer Änderung des Membranpotentials**

Um eine statistisch signifikante Datenlage zu erzielen, wurden die Messungen im Fluoreszenz-Mikroplatten-Reader FLUOStar durchgeführt. Die Zellen wurden in einer 96 Well-Platte mit gleicher Zelldichte wie auf dem Glas-Sensorchip kultiviert. Es wurden Kalibrationsmessungen durchgeführt und die bei den verschiedenen  $[K^+]_{ex}$  Konzentrationen und verschiedenen Zeitabständen gemessenen Fluoreszenzintensitäten in Prozent ermittelt (Inkubationszeit liegt im Bereich von 20 min bis 80 min).

Tabelle 6-33 bis Tabelle 6-36 zeigen die Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in  $2 \mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) beladenen MCF-7 Zellen bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen und Inkubationszeiten (siehe Kapitel 3.9.2.)

#### *Inkubationszeit 20 min:*

Kalium extrazellulär, $[K^+]_{ex}$ , [mM]	5	20	40	60	90
Nernst-Potential [mV]	-87	-50	-32	-21	-10
Fluoreszenz [%], Mittelwert	100 (n=12)	112 (n=12)	118 (n=12)	123 (n=12)	108 (n=12)
SEM, [%]	3,7	7,4	4,9	5,4	8,9

Tabelle 6-33: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in  $2 \mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) beladenen MCF-7 Zellen bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Inkubationszeit betrug 20 min.

#### *Inkubationszeit 45 min:*

Kalium extrazellulär, $[K^+]_{ex}$ , [mM]	5	20	40	60	90
Nernst-Potential [mV]	-87	-50	-32	-21	-10
Fluoreszenz [%], Mittelwert	100 (n=12)	114 (n=12)	119 (n=12)	126 (n=12)	109 (n=12)
SEM, [%]	3,8	7,2	4,6	5,1	9,9

Tabelle 6-34: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in  $2 \mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) beladenen MCF-7 Zellen bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Inkubationszeit betrug 45 min.

#### *Inkubationszeit 65 min:*

Kalium extrazellulär, $[K^+]_{ex}$ , [mM]	5	20	40	60	90
Nernst-Potential [mV]	-87	-50	-32	-21	-10
Fluoreszenz [%], Mittelwert	100 (n=12)	118 (n=12)	123 (n=12)	125 (n=12)	112 (n=12)
SEM, [%]	3,7	7,1	4,5	5,8	10,6

Tabelle 6-35: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in  $2 \mu\text{M}$  DiBAC<sub>4</sub>(3) beladenen MCF-7 Zellen bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Inkubationszeit betrug 65 min.

*Inkubationszeit 80 min:*

Kalium extrazellulär, [K <sup>+</sup> ] <sub>ex</sub> , [mM]	5	20	40	60	90
Nernst-Potential [mV]	-87	-50	-32	-21	-10
Fluoreszenz [%], Mittelwert	100 (n=12)	110 (n=12)	117 (n=12)	124 (n=12)	116 (n=12)
SEM, [%]	3,4	4,6	6,3	6,4	10,7

Tabelle 6-36: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in 2µM DiBAC<sub>4</sub>(3) beladenen MCF-7 Zellen bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Inkubationszeit betrug 80 min.

Die optimalste Inkubationszeit lag bei 45 min, wo die Fluoreszenzintensität ihr Maximum erreicht.

Es wurde eine lineare Regression mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate mit folgender Gleichung:  $y=kx+b$ , wobei  $k=0,36\pm 0,039$ ,  $b=128\pm 0,13$ ,  $r=0,96$  vorgenommen. Bei den Konzentrationen  $[K^+]_{in}=130$  mM,  $[K^+]_{ex}=5, 20, 40$  und  $60$  mM betragen die berechneten Membranpotentiale  $-87$  mV,  $-50$  mV,  $-32$  mV und  $-21$  mV. Die durchgeführten Messungen zeigten, dass der Farbstoff im Bereich von  $5$  mM bis  $60$  mM  $[K^+]_{ex}$  einen linearen Verlauf hat und dass die Empfindlichkeit des Farbstoffs DiBAC<sub>4</sub>(3)  $0,36\pm 0,0039\%$ mV<sup>-1</sup> betrug.

## 6.6 Anhang F

### *Layout eines Wells der Multiwellplatte: Flächenberechnung*

Das Layout eines Wells der Multiwellplatte hat einen großen Einfluss auf die Diskrepanz zwischen der signifikanten Proliferationshemmung und der nur geringen metabolischen Änderung.

#### Sauerstoffverbrauchssensor

Die Diffusionslänge, die die Sauerstoffionen in Zellkulturmedium während der Ruhephase zwischen den Pipettierzyklen (20 min) zurücklegen, beträgt  $x=2,6\text{mm}$  [88]. Das bedeutet, dass der Sauerstoffverbrauch der Zellen aus dem umgebenden Kulturmedium innerhalb von 20 min im Kreisbereich von 2,6mm von dem  $\text{pO}_2$ -Sensor ermittelt wird. Das Layout der Wells ist so konzipiert, dass die IDES ca. 80% der Wellfläche bedecken. Stimuliert werden nur die Zellen, die über der IDES-Struktur wachsen.

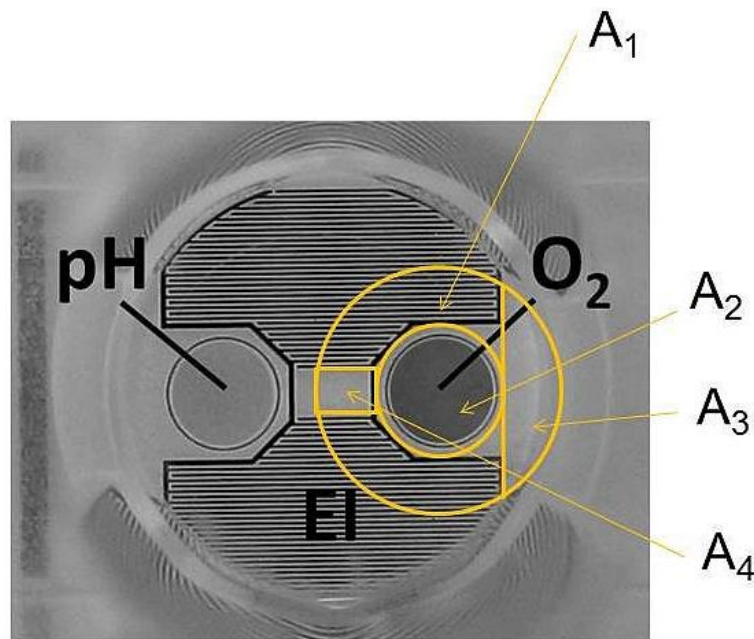


Abbildung 6-6: Layout eines Wells der Multiwellplatte. Die Sauerstoffverbrauchs- und Ansäuerungsrate sind Indikatoren für den Stoffwechsel. A1: Fläche, die durch die Diffusionslänge, die Sauerstoffionen in Zellkulturmedium während der Ruhephase zwischen Pipettierzyklen zurücklegen, bestimmt wird; A2: Fläche des Sauerstoffsensors; A3 und A4: Flächen, die keine stimulierten Zellen bewachsen.

Bestimmung der Fläche  $A_1$ , die durch die Diffusionslänge, die Sauerstoffionen in Zellkulturmedium während der Ruhephase zwischen Pipettierzyklen zurücklegen, können definiert werden:

$$A_1 = \pi r_1^2 = \pi \times (2,6 + 1)^2 = 40,7 \text{ mm}^2 \quad (6-1)$$

Dabei ist  $r_1$ : die Diffusionslänge, welche die Sauerstoffionen in Zellkulturmedium während der Ruhephase zwischen Pipettierzyklen zurücklegen, plus den Radius des Sauerstoffsensors ist.

$$A_2 = \pi r_2^2 = \pi \times 1^2 = 3,14 \text{ mm}^2 \quad (6-2)$$

Dabei ist  $r_2$  der Radius des Sauerstoffsensors ist, auf dem keine Zellen wachsen.

$$A_3 = 2 \times \left(\frac{1}{2} a \times b\right) = 2 \times \left(\frac{1}{2} \times 1 \times 2,1\right) = 2,1 \text{ mm}^2 \quad (6-3)$$

$$A_4 = c \times d = 1 \times 1,7 = 1,7 \text{ mm}^2 \quad (6-4)$$

Der Prozentsatz der stimulierten Zellen, die im durch die Diffusionslänge limitierten Bereich liegen, und von denen der Sauerstoffverbrauch der Zellen erfasst wird, beträgt ca. 83%. Der berechnet sich aus der Flächendifferenz  $\Delta A_{O_2} = A_1 - (A_2 + A_3 + A_4)$ .

### pH-Wert-Sensor

Die Diffusionslänge, die Protonen in 20 min zurücklegen, beträgt  $x=1,2\text{mm}$  [88]. Das bedeutet, dass die pH-Wert-Änderung innerhalb von 20 min im Kreisbereich von 1,2mm um den pH-Sensor ermittelt wird.

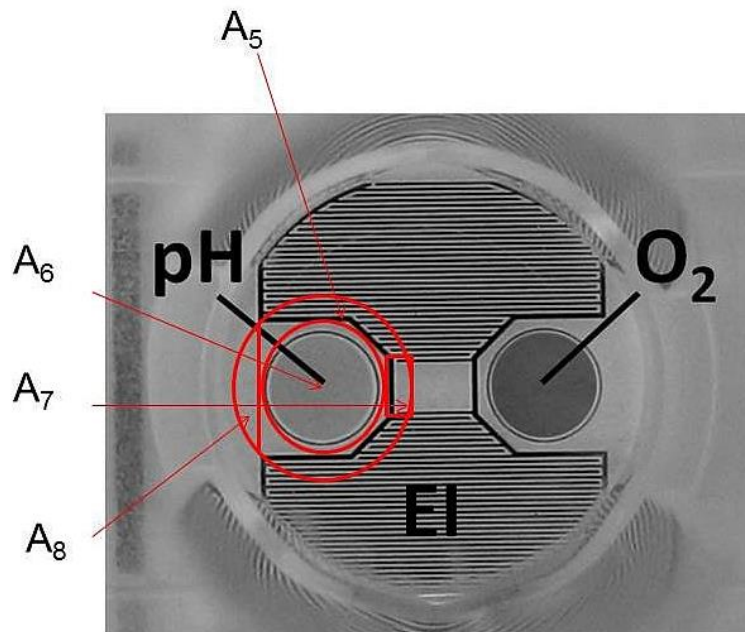


Abbildung 6-7: Layout eines Wells der Multiwellplatte. Die Sauerstoffverbrauchs- und Ansäuerungsrate sind Indikatoren für den Stoffwechsel.  $A_5$ : Fläche, die durch die Diffusionslänge, die Protonen in Zellkulturmedium während der Ruhephase zwischen Pipettierzyklen zurücklegen, bestimmt wird;  $A_6$ : Fläche des pH-Wert-Änderungs-Sensors;  $A_7$  und  $A_8$ : Flächen, die keine stimulierten Zellen bewachsen.

Bestimmen wir die Fläche  $A_5$ , die durch die Diffusionslänge, die Protonen in Zellkulturmedium während der Ruhephase zwischen Pipettierzyklen zurücklegen, bestimmt werden kann:

$$A_5 = \pi r_3^2 = \pi \times (1,2 + 1)^2 = 15,2 \text{ mm}^2 \quad (6-5)$$

Dabei ist  $r_3$  die Diffusionslänge, die Protonen in Zellkulturmedium während der Ruhephase zwischen Pipettierzyklen zurücklegen, plus den Radius des pH-Wert Sensors ist.

$$A_6 = \pi r_4^2 = \pi \times 1^2 = 3,14 \text{ mm}^2 \quad (6-6)$$

Dabei ist  $r_4$  der Radius des pH-Wert Sensors ist, auf dem keine Zellen wachsen.

$$A_7 = c \times d = 1 \times 0,2 = 0,2 \text{ mm}^2 \quad (6-7)$$

$$A_8 = 2 \times \left(\frac{1}{2} a \times b\right) = 2 \times \left(\frac{1}{2} \times 0,2 \times 0,66\right) = 0,13 \text{ mm}^2 \quad (6-8)$$

Aus diesen Daten lässt sich schließen, dass der Prozentsatz von stimulierten Zellen, die im durch die Diffusionslänge limitierten Bereich liegen, und von denen die pH-Wert-Änderung erfasst wird, um die 77% beträgt. Der berechnet sich aus der Flächendifferenz  $\Delta A_{\text{pH}} = A_5 - (A_6 + A_7 + A_8)$ .

## 6.7 Anhang G

### *Ringplatine für die elektrische Kontaktierung*

Die Ringplatine wurde für das 6-fach-Messsystem entworfen. Der Schaltplan zeigt, wie die einzelnen Pads der Glas-Sensorchips mit den Sub-D Steckern kontaktiert sind. Die Adapterplatine dient dazu, die Signale von Signalgenerator zu den Glas-Sensorchips ab zu leiten. Die Belegung der Kontakte für die Koaxialkabel ist so gestaltet, dass sie mit der Belegung der Kontakte der Sub-D Stecker Ringplatine übereinstimmen (siehe Kapitel 3.8.1, 6-fach-Messkammer).

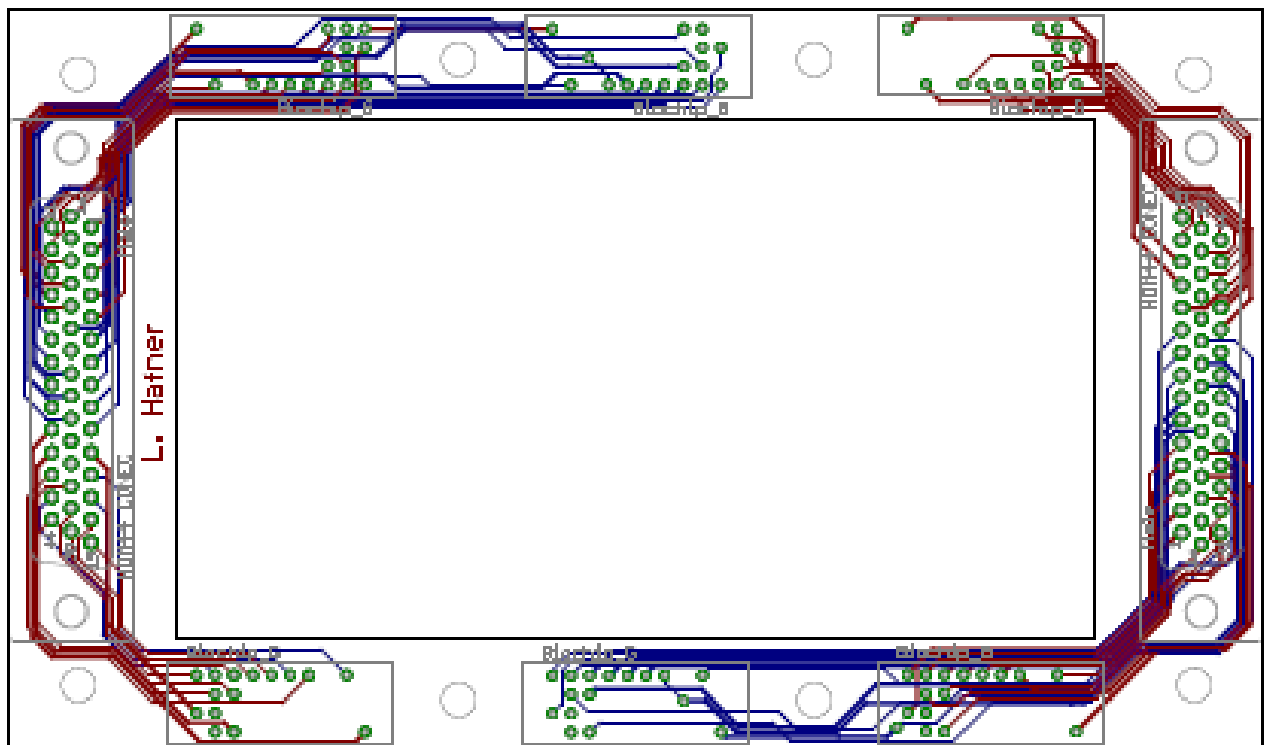


Abbildung 6-8: Ringplatine: Layout. Rot: oberer Layer, blau: unterer Layer, schwarz: oberer mittlerer Layer, grün: unterer mittlerer Layer.

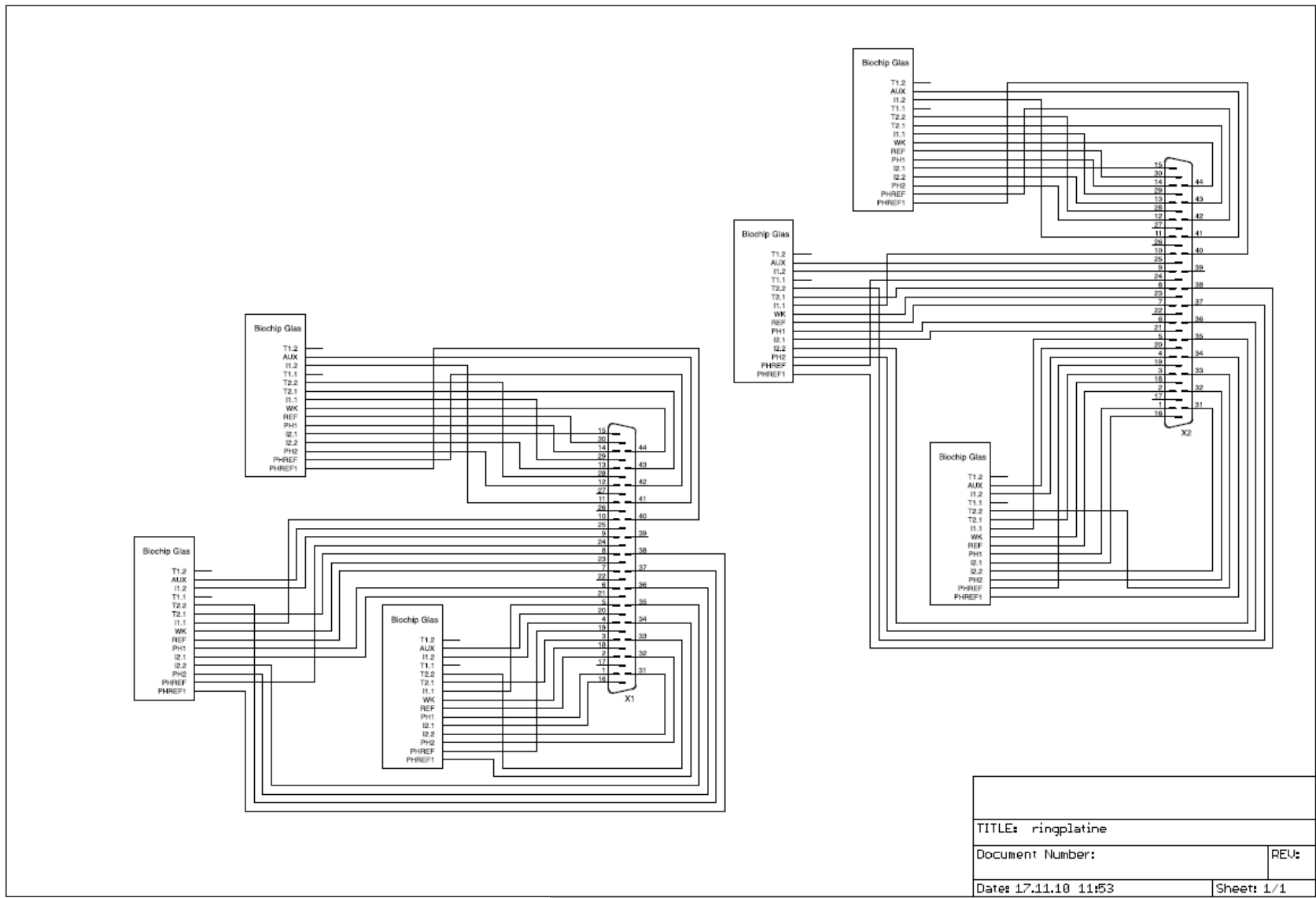


Abbildung 6-9: Ringplatine: Schaltplan.

TITLE: ringplatine	
Document Number:	REV:
Date: 17.11.10 11:53	Sheet: 1/1



## 6.8 Anhang H

### ***Untersuchung des Membranpotentials unter Verwendung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austausch-Karrierblockers Amilorid unter Variation der extrazellulären pH-Werte***

Die Messung des Membranpotentials und dessen Abhängigkeit von unterschiedlichen pH-Werten im extrazellulären Raum wird in Tabelle 6-37 gezeigt (siehe Kapitel 4.8).

pH-Wert	6,5	7,0	7,4
Fluoreszenzintensität, Kontrolle, n=12	7598	7164	6714
StdAbw, Kontrolle	403	416	470
Mit 40 µM Amilorid behandelnde Zellen, n=12	7230	7030	6687
StdAbw, behan. Zellen	419	408	489

Tabelle 6-37: Messung des Membranpotentials unter Verwendung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austausch-Karrierblockers Amilorid und Variationen der extrazellulären pH-Werte. Fluoreszenzanalyse.

Tabelle 6-38 zeigt Membranpotentialwerte, die nach einer Kalibrierungskurve (siehe Kapitel 3.10.1, Abbildung 3-37, Formel 3-2) in mV umgerechnet wurden:

pH-Wert	6,5	7,0	7,4
Membranpotential, mV, Kontrolle	-36	-52	-69
StdAbw, Kontrolle	5,9	5,2	6,23
Membranpotential, mV, behandelnde Zellen	-50	-57	-70
StdAbw, behan. Zellen	7,5	3,3	10,6

Tabelle 6-38: Messung des Membranpotentials unter Verwendung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austausch-Karrierblockers Amilorid und Variationen der extrazellulären pH-Werte nach einer Kalibrierungskurve in mV umgerechnet.

Die statistische Auswertung des Membranpotentials von unterschiedlichen pH-Werten im extrazellulären Raum wird in Tabelle 6-39 gezeigt:

Verglichene Gruppen n=12	p-Wert	
	Zellmembranpotential	
pH=7,4 vs pH=7,0	2,03E-4	Signifikant
pH=7,4 vs pH=6,5	2,97E-8	Signifikant
pH=7,0 vs pH=6,5	0,01	Signifikant

Tabelle 6-39: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, p<0,05). Messung des Membranpotentials unter Variationen der extrazellulären pH-Werte.

Die statistische Auswertung des Membranpotentials von unterschiedlichen pH-Werten im extrazellulären Raum und von gleichen pH-Werten unter Verwendung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austausch-Karrierblockers Amilorid ist in Tabelle 6-40 zusammengefasst.

Verglichene Gruppen n=12	p-Wert	
	Zellmembranpotential	
pH=7,4 vs pH=7,4 + 40 $\mu$ M Amilorid	0,90	Keine Signifikanz
pH=7,0 vs pH=7,0 + 40 $\mu$ M Amilorid	0,58	Keine Signifikanz
pH=6,5 vs pH=6,5 + 40 $\mu$ M Amilorid	0,35	Keine Signifikanz
pH=7,0 vs pH=6,5 + 40 $\mu$ M Amilorid	0,49	Keine Signifikanz
pH=7,0 + 40 $\mu$ M Amilorid vs pH=6,5 + 40 $\mu$ M Amilorid	0,49	Keine Signifikanz
pH=7,4 + 40 $\mu$ M Amilorid vs pH=7,0 + 40 $\mu$ M Amilorid	0,001	Signifikant
pH=7,4 + 40 $\mu$ M Amilorid vs pH=6,5 + 40 $\mu$ M Amilorid	0,01	Signifikant

Tabelle 6-40: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test,  $p < 0,05$ ). Messung des Membranpotentials unter Verwendung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austausch-Karrierblockers Amilorid und Variation der extrazellulären pH-Werte.

**LITERATURVERZEICHNIS**

- [1] Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen. <https://www.dsmz.de/>.
- [2] Elektrochemische Messmethoden. [http://kwi.dechema.de/kwi\\_media/7+Messmethoden.pdf](http://kwi.dechema.de/kwi_media/7+Messmethoden.pdf).
- [3] TILL Photonics GmbH. iMIC Digital Mikroskope Manual, 2012. Version 1.06.
- [4] Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik (TU München). <http://www.lme.ei.tum.de/>.
- [5] ImageJ. <http://imagej.nih.gov/ij/>.
- [6] Presens GmbH. <http://www.presens.de/>.
- [7] Solartron Analytical. <http://www.solartronanalytical.com/material-test-systems/Model-1260a-impedance-gain-phase-analyzer-fra.aspx>.
- [8] SU-8 3000 Permanent Epoxy Negative Photoresist. Data Sheet. <http://microchem.com/pdf/SU-8%203000%20Data%20Sheet.pdf>.
- [9] VoltaLab 80 (PGZ402 & VoltaMaster 4). [http://www.radiometer-analytical.com/en\\_product\\_details.asp?pid=68](http://www.radiometer-analytical.com/en_product_details.asp?pid=68).
- [10] xCELLingence RTCA DP Instrument. [http://www.aceabio.com/UserFiles/doc/literature/product\\_info/RTCA\\_DP\\_Brochure\\_ACEA\\_LoRes.pdf](http://www.aceabio.com/UserFiles/doc/literature/product_info/RTCA_DP_Brochure_ACEA_LoRes.pdf).
- [11] Zentrum für Krebsregisterdaten. [http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/krebs\\_in\\_deutschland\\_node.html](http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html).
- [12] 2012. SeahorseBioscience. <http://www.seahorsebio.com/>.
- [13] 2013. cellasys\_GmbH. <http://www.cellasys.com/>.
- [14] 2014. HP\_Medizintechnik\_GmbH. <http://www.hp-med.com/>.
- [15] Abdul, M. and Hoosein, N. 2002. Expression and activity of potassium ion channels in human prostate cancer. *Cancer Lett* 186, 1, 99–105.
- [16] Abdul, M. and Hoosein, N. 2002. Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer. *Oncol Rep*.
- [17] Abdul, M. and Hoosein, N. 2002. Voltage-gated potassium ion channels in colon cancer. *Oncol Rep* 9, 5, 961–964.
- [18] Adams, D. S., Masi, A., and Levin, M. 2007. H<sup>+</sup> pump-dependent changes in membrane voltage are an early mechanism necessary and sufficient to induce *Xenopus* tail regeneration. *Development (Cambridge, England)* 134, 7, 1323–1335.
- [19] Adrian, R. H. 1956. The effect of internal and external potassium concentration on the membrane potential of frog muscle. *The Journal of Physiology* 133, 3, 631–658.
- [20] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P., and Häcker, B. 2011. *Molekularbiologie der Zelle*. Wiley-VCH-Verlag.
- [21] Applied\_BioPhysics. 2013. *Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS)*. <http://www.biophysics.com/>.
- [22] Auerhoff, Harry, Joachim Knabe, and Hans-Dieter Höltje. 1978. *Lehrbuch der pharmazeutischen Chemie*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- [23] Azadniv, M., Miller, M. W., Cox, C., and Valentine, F. 1993. On the mechanism of a 60-Hz electric field induced growth reduction of mammalian cells *in vitro*. *Radiat Environ Biophys* 32, 1, 73–83.
- [24] AZARNIA, R. and Loewenstein, W. R. 1973. Parallel Correction of Cancerous Growth and of a Genetic Defect of Cell-to-Cell Communication. *Nature* 241, 5390, 455–457.
- [25] B. Wolf, M. Brischwein, V. Lob, J. Ressler, J. Wiest. 2007. Cellular signaling: aspects for tumor diagnosis and therapy. *Biomedizinische Technik*, vol. 52, pp. 164-168.
- [26] Barbault, A., Costa, F. P., Bottger, B., Munden, R. F., Bomholt, F., Kuster, N., and Pasche, B. 2009. Amplitude-modulated electromagnetic fields for the treatment of cancer: discovery of tumor-specific frequencies and assessment of a novel therapeutic approach. *Journal of experimental & clinical cancer research* : CR 28, 51.
- [27] Barnes, F. S. and Greenebaum, B. 2007. *Handbook of biological effects of electromagnetic fields*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- [28] Bashford, C. L. 1981. The measurement of membrane potential using optical indicators. *Biosci Rep* 1, 3, 183–196.
- [29] Becker, B., Grundl, D., Etzbach, S., Zottmann, M., Brischwein, M., and Wolf, B. 2010. Automation of Chemosensitivity Testing - Enabling Personalized Cancer Therapy. In *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7 - 12, 2009, Munich, Germany*, R. Magjarevic, O. Dössel and W. C. Schlegel, Eds. *IFMBE Proceedings*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 136–139. DOI=10.1007/978-3-642-03887-7\_37.
- [30] Bezaniilla, F. 2000. The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels. *Physiol Rev* 80, 2, 555–592.

- [31] Bianchi, L., Wible, B., Arcangeli, A., Tagliatalata, M., Morra, F., Castaldo, P., Crociani, O., Rosati, B., Faravelli, L., Olivotto, M., and Wanke, E. 1998. *herg* encodes a K<sup>+</sup> current highly conserved in tumors of different histogenesis: a selective advantage for cancer cells? *Cancer research* 58, 4, 815–822.
- [32] Binggeli, R. and Weinstein, R. C. 1986. Membrane potentials and sodium channels: Hypotheses for growth regulation and cancer formation based on changes in sodium channels and gap junctions. *Journal of Theoretical Biology* 123, 4, 377–401.
- [33] Bio Rad. Automated Cell Counter. [http://www.bio-rad.com/en-us/product/tc20-automated-cell-counter?WT.srch=1&WT.mc\\_id=aw-gxd-EU-tc20\\_cell\\_counter\\_brand\\_gold&WT.knsh\\_id=e3b7b789-81f7-455a-8ce3-984af7e8d8e0](http://www.bio-rad.com/en-us/product/tc20-automated-cell-counter?WT.srch=1&WT.mc_id=aw-gxd-EU-tc20_cell_counter_brand_gold&WT.knsh_id=e3b7b789-81f7-455a-8ce3-984af7e8d8e0).
- [34] Blau, A., Ziegler, C., Heyer, M., Endres, F., Schwitzgebel, G., Matthies, T., Stieglitz, T., Meyer, J.-U., and Göpel, W. 1997. Characterization and optimization of microelectrode arrays for *in vivo* nerve signal recording and stimulation. *Biosensors and Bioelectronics* 12, 9–10, 883–892.
- [35] BMG LABTECH. FLUOstar. <http://www.bmglabtech.com/en/products/microplate-readers/fluostar-omega-obj-42-743.html>.
- [36] Bourguignon, Lilly Y W, Singleton, P. A., Diedrich, F., Stern, R., and Gilad, E. 2004. CD44 interaction with Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) creates acidic microenvironments leading to hyaluronidase-2 and cathepsin B activation and breast tumor cell invasion. *J Biol Chem* 279, 26, 26991–27007.
- [37] Bronner, C. and Landry, Y. 1991. The use of the potential-sensitive fluorescent probe bisoxonol in mast cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1070, 2, 321–331.
- [38] Brüggemann, A., Stoelzle, S., George, M., Behrends, J. C., and Fertig, N. 2006. Microchip technology for automated and parallel patch-clamp recording. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 2, 7, 840–846.
- [39] Brummer, S. B. and Turner, M. J. 1975. Electrical stimulation of the nervous system: The principle of safe charge injection with noble metal electrodes. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 2, 1, 13–25.
- [40] Brummer, S. B. and Turner, M. J. 1977. Electrical stimulation with Pt electrodes: II-estimation of maximum surface redox (theoretical non-gassing) limits. *IEEE Trans Biomed Eng* 24, 5, 440–443.
- [41] C. Lindsay BASHFORD. 1981. The measurement of membrane potential using optical indicators. Review. *The Biochemical Society, Bioscience Reports*, 1, 183–196.
- [42] Cain, C. A. 1981. Biological effects of oscillating electric fields: role of voltage-sensitive ion channels. *Bioelectromagnetics* 2, 1, 23–32.
- [43] Chang, K.-W., Yuan, T.-C., Fang, K.-P., Yang, F.-S., Liu, C.-J., Chang, C.-S., and Lin, S.-C. 2003. The increase of voltage-gated potassium channel Kv3.4 mRNA expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 32, 10, 606–611.
- [44] Chang, K.-W., Yuan, T.-C., Fang, K.-P., Yang, F.-S., Liu, C.-J., Chang, C.-S., and Lin, S.-C. 2003. The increase of voltage-gated potassium channel Kv3.4 mRNA expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 32, 10, 606–611.
- [45] Chang, Y., Bruni, R., Kloss, B., Assur, Z., Kloppmann, E., Rost, B., Hendrickson, W. A., and Liu, Q. 2014. Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes. *Science (New York, N.Y.)* 344, 6188, 1131–1135.
- [46] Chifflet, S., Hernandez, J. A., and Grasso, S. 2005. A possible role for membrane depolarization in epithelial wound healing. *American journal of physiology. Cell physiology* 288, 6, C1420-30.
- [47] Cogan, S. F. 2008. Neural stimulation and recording electrodes. *Annual review of biomedical engineering* 10, 275–309.
- [48] Cone, C. D. and Tongier, M. 1973. Contact inhibition of division: involvement of the electrical transmembrane potential. *Journal of cellular physiology* 82, 3, 373–386.
- [49] Cone Jr, Clarence D. 1971. Unified theory on the basic mechanism of normal mitotic control and oncogenesis. *Journal of Theoretical Biology* 30, 1, 151–181.
- [50] Conrad. VOLTCRAFT® 8202 1-Kanal-Funktionsgenerator 0.02hz - 2 MHz Signal-Ausgangsform(en) Sinus, Rechteck, Dreieck, Rampe, Puls. <http://www.conrad.de/ce/de/product/123113/VOLTCRAFT-8202-1-Kanal-Funktionsgenerator-002-Hz-2-MHz-Signal-Ausgangsformen-Sinus-Rechteck-D>.
- [51] Cornelia Pfister. 2010. Elektro-chemische vs. opto-chemische Mikrosensor-Technologien in zellbasierten Elektro-chemische vs. opto-chemische Mikrosensor-Technologien in zellbasierten Assays: Konstruktion eines Experimentalplatzes und Durchführung von korrelativen Tests und Durchführung von korrelativen Tests. Diplomarbeit, Technische Universität München.
- [52] Costa, F. P., de Oliveira, A C, Meirelles, R., Machado, M C C, Zanesco, T., Surjan, R., Chammas, M. C., de Souza Rocha, M, Morgan, D., Cantor, A., Zimmerman, J., Brezovich, I., Kuster, N., Barbault, A., and Pasche, B. 2011. Treatment of advanced hepatocellular carcinoma with very

- low levels of amplitude-modulated electromagnetic fields. *British journal of cancer* 105, 5, 640–648.
- [53] Counillon, L. and Pouyssegur, J. 2000. The expanding family of eucaryotic Na(+)/H(+) exchangers. *J Biol Chem* 275, 1, 1–4.
- [54] Cucullo, L., Dini, G., Hallene, K. L., Fazio, V., Ilkanich, E. V., Igboechi, C., Kight, K. M., Agarwal, M. K., Garrity-Moses, M., and Janigro, D. 2005. Very low intensity alternating current decreases cell proliferation. *Glia* 51, 1, 65–72.
- [55] Davies, A. M., Weinberg, U., and Palti, Y. 2013. Tumor treating fields: a new frontier in cancer therapy. *Ann NY Acad Sci* 1291, 86–95.
- [56] de Boer, R. W. and van Oosterom, A. 1978. Electrical properties of platinum electrodes: Impedance measurements and time-domain analysis. *Med. Biol. Eng. Comput.* 16, 1, 1–10.
- [57] Demetrius, L. A., Coy, J. F., and Tuszynski, J. A. 2010. Cancer proliferation and therapy: the Warburg effect and quantum metabolism. *Theoretical biology & medical modelling* 7, 2.
- [58] Dzamba BJ, Bolton MA, Desimone DW. 2001. The integrin family of cell adhesion molecules. In: Beckerle MC, editor. *Frontiers in molecular biology: cell adhesion*. p. 100–54. Oxford: Oxford University Press.
- [59] Ehrenberg, B., Farkas, D. L., Fluhler, E. N., Lojewska, Z., and Loew, L. M. 1987. Membrane potential induced by external electric field pulses can be followed with a potentiometric dye. *Biophysical Journal* 51, 5, 833–837.
- [60] Ehrenberg, B., Farkas, D. L., Fluhler, E. N., Lojewska, Z., and Loew, L. M. 1987. Membrane potential induced by external electric field pulses can be followed with a potentiometric dye. *Biophysical Journal* 51, 5, 833–837.
- [61] Eilon D. Kirson, Moshe Giladi, Zoya Gurvich, Aviran Itzhaki, Daniel Mordechovich, Rosa S. Schneiderman, Yoram Wasserman, Bernhard Ryffel, Dorit Goldsher, Yoram Palti. 2009. Alternating electric fields (TTFs) inhibit metastatic spread of solid tumors to the lungs. *Clinical & Experimental Metastasis*, Volume 26, Issue 7, (Oct. 2009), 633–640.
- [62] Epps, D. E., Wolfe, M. L., and Groppi, V. 1994. Characterization of the steady-state and dynamic fluorescence properties of the potential-sensitive dye bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol (Dibac4(3)) in model systems and cells. *Chem Phys Lipids* 69, 2, 137–150.
- [63] F G Toback. 1980. Induction of growth in kidney epithelial cells in culture by Na+. *Proc. natn Acad.*, 77, 6654–6656.
- [64] F. Hofmann, H. Ohnimus, C. Scheller, W. Strupp, U. Zimmermann, C. Jassoy. 1999. Electric Field Pulses Can Induce Apoptosis. *The Journal of membrane biology*, Volume 169, Issue 2 (May. 1999), 103–109.
- [65] Farias, Luz María Barajas, Ocaña, D. B., Díaz, L., Larrea, F., Avila-Chavez, E., Cadena, A., Hinojosa, L. M., Lara, G., Villanueva, L. A., Vargas, C., Hernandez-Gallegos, E., Camacho-Arroyo, I., Duenas-Gonzalez, A., Perez-Cardenas, E., Pardo, L. A., Morales, A., Taja-Chayeb, L., Escamilla, J., Sanchez-Pena, C., and Camacho, J. 2004. Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer research* 64, 19, 6996–7001.
- [66] Farias, Luz María Barajas, Ocaña, D. B., Díaz, L., Larrea, F., Avila-Chávez, E., Cadena, A., Hinojosa, L. M., Lara, G., Villanueva, L. A., Vargas, C., Hernández-Gallegos, E., Camacho-Arroyo, I., Dueñas-González, A., Pérez-Cárdenas, E., Pardo, L. A., Morales, A., Taja-Chayeb, L., Escamilla, J., Sánchez-Peña, C., and Camacho, J. 2004. Ether a go-go potassium channels as human cervical cancer markers. *Cancer research* 64, 19, 6996–7001.
- [67] Ferrick, D. A., Neilson, A., and Beeson, C. 2008. Advances in measuring cellular bioenergetics using extracellular flux. *Drug discovery today* 13, 5-6, 268–274.
- [68] Fertig, N., Blick, R. H., and Behrends, J. C. 2002. Whole Cell Patch Clamp Recording Performed on a Planar Glass Chip. *Biophysical Journal* 82, 6, 3056–3062.
- [69] Finkelstein, E., Chang, W., Chao, P.-H. G., Gruber, D., Minden, A., Hung, C. T., and Bulinski, J. C. 2004. Roles of microtubules, cell polarity and adhesion in electric-field-mediated motility of 3T3 fibroblasts. *J Cell Sci* 117, Pt 8, 1533–1545.
- [70] Fiorani, M., Cantoni, O., Sestili, P., Conti, R., Nicolini, P., Vetrano, F., and Dachà, M. 1992. Electric and/or magnetic field effects on DNA structure and function in cultured human cells. *Mutation Research Letters* 282, 1, 25–29.
- [71] Fiske, J. L., Fomin, V. P., Brown, M. L., Duncan, R. L., and Sikes, R. A. 2006. Voltage-sensitive ion channels and cancer. *Cancer metastasis reviews* 25, 3, 493–500.
- [72] Fluhler, E., Burnham, V. G., and Loew, L. M. 1985. Spectra, membrane binding, and potentiometric responses of new charge shift probes. *Biochemistry* 24, 21, 5749–5755.
- [73] Fraser, S. P., Diss, James K J, Chioni, A.-M., Mycielska, M. E., Pan, H., Yamaci, R. F., Pani, F., Siwy, Z., Krasowska, M., Grzywna, Z., Brackenbury, W. J., Theodorou, D., Koyuturk, M., Kaya, H., Battaloglu, E., De Bella, Manuela Tamburo, Slade, M. J., Tolhurst, R., Palmieri, C., Jiang, J., Latchman, D. S., Coombes, R. C., and Djamgoz, Mustafa B A. 2005. Voltage-gated sodium

- channel expression and potentiation of human breast cancer metastasis. *Clin Cancer Res* 11, 15, 5381–5389.
- [74] Fromherz, P. and Lambacher, A. 1991. Spectra of voltage-sensitive fluorescence of styryl-dye in neuron membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1068, 2, 149–156.
- [75] Fromherz, P. and Röcker, C. 1994. Staining of biomembranes with amphiphilic hemicyanine dyes. *Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie* 98, 1, 128–131.
- [76] Funk, Richard H W and Monsees, T. K. 2006. Effects of electromagnetic fields on cells: physiological and therapeutical approaches and molecular mechanisms of interaction. A review. *Cells Tissues Organs* 182, 2, 59–78.
- [77] Funk, Richard H. W., Monsees, T., and Özkucur, N. 2009. Electromagnetic effects – From cell biology to medicine. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry* 43, 4, 177–264.
- [78] Geiger, B., Bershadsky, A., Pankov, R., and Yamada, K. M. 2001. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 11, 793–805.
- [79] Gileadi, E. 2011. *Physical Electrochemistry*. Wiley.
- [80] Glaser, R. 1996. *Biophysik. Mit 14 Tabellen*. UTB 8116. G. Fischer, Jena [u.a.].
- [81] Goldman, D. E. 1943. POTENTIAL, IMPEDANCE, AND RECTIFICATION IN MEMBRANES. *J Gen Physiol* 27, 1, 37–60.
- [82] Grassi, C., D'Ascenzo, M., Torsello, A., Martinotti, G., Wolf, F., Cittadini, A., and Azzena, G. B. 2004. Effects of 50 Hz electromagnetic fields on voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels and their role in modulation of neuroendocrine cell proliferation and death. *Cell Calcium* 35, 4, 307–315.
- [83] Gray, L. S., Perez-Reyes, E., Gamorra, J. C., Haverstick, D. M., Shattock, M., McLatchie, L., Harper, J., Brooks, G., Heady, T., and Macdonald, T. L. 2004. The role of voltage gated T-type Ca<sup>2+</sup> channel isoforms in mediating “capacitative” Ca<sup>2+</sup> entry in cancer cells. *Cell Calcium* 36, 6, 489–497.
- [84] Grimnes, S. and Martinsen, O. G. 2014. *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*. Elsevier Science.
- [85] Grinstein, S. and Rothstein, A. 1986. Mechanisms of regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *The Journal of membrane biology* 90, 1, 1–12.
- [86] Grinvald, A., Fine, A., Farber, I. C., and Hildesheim, R. 1983. Fluorescence monitoring of electrical responses from small neurons and their processes. *Biophysical Journal* 42, 2, 195–198.
- [87] Gross, D., Loew, L. M., and Webb, W. W. 1986. Optical imaging of cell membrane potential changes induced by applied electric fields. *Biophysical Journal* 50, 2, 339–348.
- [88] Grundl, D., Zhang, X., Messaoud, S., Pfister, C., Demmel, F., Mommer, M. S., Wolf, B., and Brischwein, M. 2013. Reaction-diffusion modelling for microphysiometry on cellular specimens. *Med Biol Eng Comput* 51, 4, 387–395.
- [89] Habel Beate. April/2004. *Elektrische Stimulation von Zellen und Elektrische Stimulation von Zellen und Geweben am besonderen Beispiel von Knochenzellen*. Dissertation, Humboldt-Universität Berlin.
- [90] Hallmann, J. 2004. *Bichromophore Fluoreszenzfarbstoffe als Sonden für Membranpotentiale - Synthese und Untersuchungen zum spektralen und potentialsensitiven Verhalten*. Dissertation, HHU Düsseldorf.
- [91] Hamann, C. H. and Vielstich, W. 2005. *Elektrochemie*. Wiley-VCH, Weinheim.
- [92] Hansruedi Kiefer, Arthur J. Blume, and H. Ronald Kaback. 1980. Membrane potential changes during mitogenic stimulation of mouse spleen lymphocytes. *Proc. natn Acad.*, 77, 2220.
- [93] Harguindey, S., Arranz, J. L., Wahl, M. L., Orive, G., and Reshkin, S. J. 2009. Proton transport inhibitors as potentially selective anticancer drugs. *Anticancer Res* 29, 6, 2127–2136.
- [94] Harguindey, S., Orive, G., Luis Pedraz, J., Paradiso, A., and Reshkin, S. J. 2005. The role of pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin--one single nature. *Biochimica et biophysica acta* 1756, 1, 1–24.
- [95] Harguindey, S., Orive, G., Luis Pedraz, J., Paradiso, A., and Reshkin, S. J. 2005. The role of pH dynamics and the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in the etiopathogenesis and treatment of cancer. Two faces of the same coin--one single nature. *Biochimica et biophysica acta* 1756, 1, 1–24.
- [96] Harris, A. K., Pryer, N. K., and Paydarfar, D. 1990. Effects of electric fields on fibroblast contractility and cytoskeleton. *J Exp Zool* 253, 2, 163–176.
- [97] HEB Rudolf Herzog Digitaltechnik. Signalgenerator SG801. [http://www.radiomuseum.org/r/heb\\_signalgenerator\\_sg801sg\\_8.html](http://www.radiomuseum.org/r/heb_signalgenerator_sg801sg_8.html).
- [98] Heinrich, P. C., Müller, M., and Graeve, L. 2014. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Berlin Heidelberg.
- [99] Henning, T., Kraus, M., Brischwein, M., Otto, A. M., and Wolf, B. 2004. Relevance of tumor microenvironment for progression, therapy and drug development. *Anticancer Drugs* 15, 1, 7–14.

- [100]Hinkle, L., McCaig, C. D., and Robinson, K. R. 1981. The direction of growth of differentiating neurones and myoblasts from frog embryos in an applied electric field. *The Journal of Physiology* 314, 121–135.
- [101]Hladky, S. B. and Rink, T. J. 1976. Potential difference and the distribution of ions across the human red blood cell membrane; a study of the mechanism by which the fluorescent cation, diS-C3-(5) reports membrane potential. *The Journal of Physiology* 263, 2, 287–319.
- [102]Hodgkin, A. L. and Horowicz, P. 1959. The influence of potassium and chloride ions on the membrane potential of single muscle fibres. *The Journal of Physiology* 148, 1, 127–160.
- [103]Hodgkin, A. L. and Katz, B. 1949. The effect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *The Journal of Physiology* 108, 1, 37–77.
- [104]Hsu, P. P. and Sabatini, D. M. 2008. Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 5, 703–707.
- [105]I. L. Cameron, N. K. R. Smith, T. B. Pool, and R. L. Sparks. 1980. Intracellular Concentration of Sodium and Other Elements as Related to Mitogenesis and Oncogenesis in Vivo. *Cancer research*, 40, 1493.
- [106]J. Jirsch, R. G. Deeley, S. P. C. Cole, A. J. Stewart, and D. Fedida. 1993. Inwardly Rectifying K<sup>+</sup> Channels and Volume-regulated Anion Channels in Multidrug-resistant Small Cell Lung Cancer Cells. *Cancer research*, 53, 4156–4160.
- [107]J. Reshkin, S., A. Cardone, R., and Harguindey, S. 2012. Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> Exchanger, pH Regulation and Cancer. *PRA* 8, 1, 85–99.
- [108]Jaffe, L. F. 1977. Electrophoresis along cell membranes. *Nature* 265, 5595, 600–602.
- [109]Jamakosmanovicacute, A. 1968. INTERCELLULAR COMMUNICATION AND TISSUE GROWTH: III. Thyroid Cancer. *The Journal of Cell Biology* 38, 3, 556–561.
- [110]Jamakosmanovicacute, A. 1968. INTERCELLULAR COMMUNICATION AND TISSUE GROWTH: III. Thyroid Cancer. *The Journal of Cell Biology* 38, 3, 556–561.
- [111]James D. Anderson<sup>1</sup>, Todd P. Hansen<sup>1</sup>, Paul W. Lenkowski, Alison M. Walls, Indrani M. Choudhury, Hilary A. Schenck, Mati Friebling, Genevieve M. Höll, Manoj K. Patel, Robert A. Sikes and Milton L. Brown. 2003. Voltage-gated sodium channel blockers as cytostatic inhibitors of the androgen-independent prostate cancer cell line PC-3. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2 (11), 1149–1154.
- [112]Jaromir Pledge, Karel Sigler. 1996. New Trends in Photobiology (Invited Review). Slow fluorescent indicators of membrane potential" a survey of different approaches to probe response analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology B Biology*, 33, 101–124.
- [113]Kaelin, W. G. and Thompson, C. B. 2010. Q&A: Cancer: clues from cell metabolism. *Nature* 465, 7298, 562–564.
- [114]Kheifets, L., Renew, D., Sias, G., and Swanson, J. 2010. Extremely low frequency electric fields and cancer: assessing the evidence. *Bioelectromagnetics* 31, 2, 89–101.
- [115]Kiefer, H., Blume, A. J., and Kaback, H. R. 1980. Membrane potential changes during mitogenic stimulation of mouse spleen lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 77, 4, 2200–2204.
- [116]Killion, J. J. 1984. Electrical properties of normal and transformed mammalian cells. *Biophysical Journal* 45, 3, 523–528.
- [117]Kim, I. S., Song, J. K., Zhang, Y. L., Lee, T. H., Cho, T. H., Song, Y. M., Kim, D. K., Kim, S. J., and Hwang, S. J. 2006. Biphasic electric current stimulates proliferation and induces VEGF production in osteoblasts. *Biochimica et biophysica acta* 1763, 9, 907–916.
- [118]Kindzelskii, A. L. and Petty, H. R. 2005. Ion channel clustering enhances weak electric field detection by neutrophils: apparent roles of SKF96365-sensitive cation channels and myeloperoxidase trafficking in cellular responses. *Eur Biophys J* 35, 1, 1–26.
- [119]Kirson, E. D. 2004. Disruption of Cancer Cell Replication by Alternating Electric Fields. *Cancer research* 64, 9, 3288–3295.
- [120]Kirson, E. D., Dbalý, V., Tovarys, F., Vymazal, J., Soustiel, J. F., Itzhaki, A., Mordechovich, D., Steinberg-Shapira, S., Gurvich, Z., Schneiderman, R., Wasserman, Y., Salzberg, M., Ryffel, B., Goldsher, D., Dekel, E., and Palti, Y. 2007. Alternating electric fields arrest cell proliferation in animal tumor models and human brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 24, 10152–10157.
- [121]Kleinig, H. and Sitte, P. 1999. *Zellbiologie*. Fischer, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
- [122]Koo, J. Y., Parekh, D., Townsend Jr, C. M., Saydjari, R., Evers, B. M., Farre, A., Ishizuka, J., and Thompson, J. C. 1992. Amiloride inhibits the growth of human colon cancer cells in vitro. *Surgical Oncology* 1, 6, 385–389.
- [123]Koo, J. Y., Parekh, D., Townsend, C M Jr, Saydjari, R., Evers, B. M., Farre, A., Ishizuka, J., and Thompson, J. C. 1992. Amiloride inhibits the growth of human colon cancer cells in vitro. *Surgical Oncology* 1, 6, 385–389.
- [124]Koolman, J. and Röhm, K. H. 2009. *Taschenatlas Biochemie des Menschen*. Thieme.

- [125] Kornberg, A. and Baker, T. A. 2005. *DNA Replication*. University Science.
- [126] Kraus, M. and Wolf, B. 1996. Implications of Acidic Tumor Microenvironment for Neoplastic Growth and Cancer Treatment: A Computer Analysis. *Tumor Biol* 17, 3, 133–154.
- [127] Kraus, M., and B. Wolf. 1996. Zum Einfluß der zellulären Mikroumgebung auf das neoplastische Wachstum. *ZEITSCHRIFT FÜR ONKOLOGIE*, 28, 65–76.
- [128] Kreuzig, T. 2006. *Kurzlehrbuch Biochemie. Vorklinik*. Elsevier, Urban & Fischer, München [u.a.].
- [129] Kroemer, G. and Pouyssegur, J. 2008. Tumor cell metabolism: cancer's Achilles' heel. *Cancer cell* 13, 6, 472–482.
- [130] Kunzelmann, K. 2005. Ion channels and cancer. *The Journal of membrane biology* 205, 3, 159–173.
- [131] L. Hafner. 2009. *Elektrische und magnetische Wachstumsmanipulationen an Mausfibroblasten*. Masterarbeit, Technische Universität München.
- [132] Lacouture, M. E., Elizabeth Davis, M., Elzinga, G., Butowski, N., Tran, D., Villano, J. L., DiMeglio, L., Davies, A. M., and Wong, E. T. 2014. Characterization and Management of Dermatologic Adverse Events With the NovoTTF-100A System, a Novel Anti-mitotic Electric Field Device for the Treatment of Recurrent Glioblastoma. *Characterization and Management of Dermatologic Adverse Events With the NovoTTF-100A System, a Novel Anti-mitotic Electric Field Device for the Treatment of Recurrent Glioblastoma* 41, Supplement 4, 0, S1.
- [133] Lang, F., Lang, K. S., Wieder, T., Myssina, S., Birka, C., Lang, P. A., Kaiser, S., Kempe, D., Durantion, C., and Huber, S. M. 2003. Cation channels, cell volume and the death of an erythrocyte. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 447, 2, 121–125.
- [134] Langheinrich, U. and Daut, J. 1997. Hyperpolarization of isolated capillaries from guinea-pig heart induced by K<sup>+</sup> channel openers and glucose deprivation. *The Journal of Physiology* 502, 2, 397–408.
- [135] Levin, M. 2007. Large-scale biophysics: ion flows and regeneration. *Trends Cell Biol* 17, 6, 261–270.
- [136] Levin, M. 2009. Bioelectric mechanisms in regeneration: unique aspects and future perspectives. *Semin Cell Dev Biol* 20, 5, 543–556.
- [137] Life Technologies. DiBAC4(3) (Bis-(1,3-Dibutylbarbituric Acid)Trimethine Oxonol). Katalognummer: B-438. <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/B438>.
- [138] Lobikin, M., Chernet, B., Lobo, D., and Levin, M. 2012. Resting potential, oncogene-induced tumorigenesis, and metastasis: the bioelectric basis of cancer in vivo. *Phys Biol* 9, 6, 065002.
- [139] Loew, L. M. 1993. Chapter 6 Confocal Microscopy of Potentiometric Fluorescent Dyes. In *Methods in Cell Biology : Cell Biological Applications of Confocal Microscopy*, Brian Matsumoto, Ed. Academic Press, 195–209. DOI=10.1016/S0091-679X(08)61003-1.
- [140] Loew, L. M. 1996. Potentiometric dyes: Imaging electrical activity of cell membranes. *Pure and Applied Chemistry* 68, 7.
- [141] Loewenstein, W. R. 1979. Junctional intercellular communication and the control of growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 560, 1, 1–65.
- [142] Loewenstein, W. R. 1981. Junctional intercellular communication: the cell-to-cell membrane channel. *Physiol Rev* 61, 4, 829–913.
- [143] Lvovich, V. F. 2012. *Impedance Spectroscopy: Applications to Electrochemical and Dielectric Phenomena*. Wiley.
- [144] Macdonald, D. D., Sikora, E., and Engelhardt, G. 1998. Characterizing electrochemical systems in the frequency domain. *Corrosion* 43, 1–2, 87–107.
- [145] Marc E. Laniado, Scott P. Fraser and Mustafa B.A. Djamgoz. 2001. Voltage-gated K<sup>+</sup> channel activity in human prostate cancer cell lines of markedly different metastatic potential: Distinguishing characteristics of PC-3 and LNCaP cells. *The Prostate*, 46 (4), 262–274.
- [146] Mariana Ruiz Villarreal. Cell membrane detailed diagram. [http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell\\_membrane\\_detailed\\_diagram\\_en.svg](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cell_membrane_detailed_diagram_en.svg).
- [147] McCaig, C. D., Song, B., and Rajnicek, A. M. 2009. Electrical dimensions in cell science. *J Cell Sci* 122, Pt 23, 4267–4276.
- [148] McCaig, C. D. and Zhao, M. 1997. Physiological electrical fields modify cell behaviour. *Bioessays* 19, 9, 819–826.
- [149] McCreery, D. B., and W. F. Agnew. 1990. Mechanisms of stimulation-induced neural damage and their relation to guidelines for safe stimulation Neural prostheses fundamental studies (1990): 297. *Neural prostheses fundamental studies* (1990): 297., 297.
- [150] McNutt, N. S. 1970. THE ULTRASTRUCTURE OF THE NEXUS: A Correlated Thin-Section and Freeze-Cleave Study. *The Journal of Cell Biology* 47, 3, 666–688.
- [151] Mendoza, S. A., Wigglesworth, N. M., Pohjanpelto, P., and Rozengurt, E. 1980. Na entry and Na-K pump activity in murine, hamster, and human cells--effect of monensin, serum, platelet extract, and viral transformation. *Journal of cellular physiology* 103, 1, 17–27.



- [152]Merrill, D. R., Bikson, M., and Jefferys, John G R. 2005. *Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols*. *Journal of neuroscience methods* 141, 2, 171–198.
- [153]Michael K. Stehling, Enric Günther, Boris Rubinsky. 2014. *Mit Stromstößen gegen Krebs*. *Spektrum der Wissenschaft*, April, 40–46.
- [154]Nancy R. Smith, Rodney L. Sparks, Thomas B. Pool, and Ivan L. Cameron. 1978. *Differences in the Intracellular Concentration of Elements in Normal and Cancerous Liver Cells as Determined by X-ray Microanalysis*. *Cancer research*, 38, 1952.
- [155]NAZMUTDINOVA, G., SENSFUSS, S., SCHRODNER, M., HINSCH, A., SASTRAWAN, R., GERHARD, D., HIMMLER, S., and WASSERSCHIED, P. 2006. *Quasi-solid state polymer electrolytes for dye-sensitized solar cells: Effect of the electrolyte components variation on the triiodide ion diffusion properties and charge-transfer resistance at platinum electrode*. *Solid State Ionics* 177, 35-36, 3141–3146.
- [156]Nilius, B. and Wohlrab, W. 1992. *Potassium channels and regulation of proliferation of human melanoma cells*. *The Journal of Physiology* 445, 537–548.
- [157]Nishimura, K. Y., Isseroff, R. R., and Nuccitelli, R. 1996. *Human keratinocytes migrate to the negative pole in direct current electric fields comparable to those measured in mammalian wounds*. *J Cell Sci* 109 (Pt 1), 199–207.
- [158]NS McNutt, RS Weinstein. 1970. *THE ULTRASTRUCTURE OF THE NEXUS A Correlated Thin-Section and Freeze-Cleave Study*. *The Journal of Cell Biology*, 51, 805.
- [159]Nuccitelli, R. 2003. *A role for endogenous electric fields in wound healing*. *Curr Top Dev Biol* 58, 1–26.
- [160]OLYMPUS. *Objektiv UPLSAPO20X*. [http://www.olympus.fi/medical/en/microscopy/components/component\\_details/component\\_detail\\_10433.jsp](http://www.olympus.fi/medical/en/microscopy/components/component_details/component_detail_10433.jsp).
- [161]OriginLab. *Origin, Version 8G*. <http://www.originlab.de/>.
- [162]Orlowski J, Kandasamy RA, Shull GE. 1992. *Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins*. *J Biol Chem*, 267, 9331–9339.
- [163]Ouadid-Ahidouch, H. and Ahidouch, A. 2013. *K(+) channels and cell cycle progression in tumor cells*. *Frontiers in physiology* 4, 220.
- [164]Ouadid-Ahidouch, H., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Ahidouch, A., Joury, N., and Prevarskaya, N. 2004. *Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression*. *American journal of physiology. Cell physiology* 287, 1, C125-34.
- [165]Ouadid-Ahidouch, H., Roudbaraki, M., Delcourt, P., Ahidouch, A., Joury, N., and Prevarskaya, N. 2004. *Functional and molecular identification of intermediate-conductance Ca(2+)-activated K(+) channels in breast cancer cells: association with cell cycle progression*. *American journal of physiology. Cell physiology* 287, 1, C125-34.
- [166]Palti, Y. 1966. *Stimulation of internal organs by means of externally applied electrodes*. *Journal of Applied Physiology* 21, 5, 1619–1623.
- [167]Panagopoulos, D. J., Messini, N., Karabarbounis, A., Philippetis, A. L., and Margaritis, L. H. 2000. *A mechanism for action of oscillating electric fields on cells*. *Biochemical and biophysical research communications* 272, 3, 634–640.
- [168]Pardo, L. A. and Stühmer, W. 2014. *The roles of K(+) channels in cancer*. *Nature reviews. Cancer* 14, 1, 39–48.
- [169]Parks, S. K., Chiche, J., and Pouysségur, J. 2013. *Disrupting proton dynamics and energy metabolism for cancer therapy*. *Nature reviews. Cancer* 13, 9, 611–623.
- [170]Pauli, B. U. and Weinstein, R. S. 1981. *Structure of gap junctions in cultures of normal and neoplastic bladder epithelial cells*. *Experientia* 37, 3, 248–250.
- [171]Pavlin, M. and Miklavcic, D. 2009. *The Effective Conductivity and the Induced Transmembrane Potential in Dense Cell System Exposed to DC and AC Electric Fields*. *IEEE Trans. Plasma Sci.* 37, 1, 99–106.
- [172]Petersen, O. H. and Ueda, N. 1976. *Pancreatic acinar cells: the role of calcium in stimulus-secretion coupling*. *The Journal of Physiology* 254, 3, 583–606.
- [173]Polk, C. and Postow, E. 1995. *Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields, Third Edition - 2 Volume Set*. Taylor & Francis.
- [174]PreSens. 2010. *Non-Invasive Optical Oxygen Sensors*. *Produktinformation*. <http://www.presens.de/products/brochures/category/sensor-probes/brochure/non-invasive-oxygen-sensors.html>.
- [175]PreSens. 2010. *Non-Invasive pH Sensors*. *Produktinformation*. <http://www.presens.de/products/brochures/category/sensor-probes/brochure/non-invasive-ph-sensors.html>.

- [176]Preußat, K., Beetz, C., Schrey, M., Kraft, R., Wölfl, S., Kalff, R., and Patt, S. 2003. Expression of voltage-gated potassium channels Kv1.3 and Kv1.5 in human gliomas. *Neuroscience Letters* 346, 1–2, 33–36.
- [177]Prevarskaya, N., Skryma, R., and Shuba, Y. 2010. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends in molecular medicine* 16, 3, 107–121.
- [178]Price, M., Lee, S. C., and Deutsch, C. 1989. Charybdotoxin inhibits proliferation and interleukin 2 production in human peripheral blood lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 24, 10171–10175.
- [179]Pucihar, G., Kotnik, T., Valic, B., and Miklavcic, D. 2006. Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells. *Annals of biomedical engineering* 34, 4, 642–652.
- [180]Pullar, C. E., Rizzo, A., and Isseroff, R. R. 2006. beta-Adrenergic receptor antagonists accelerate skin wound healing: evidence for a catecholamine synthesis network in the epidermis. *J Biol Chem* 281, 30, 21225–21235.
- [181]R. Kleinhans. *Etablierung und Validierung eines prädiktiven metabolischen Chemosensitivitätstests mittels automatisierter chipgestützter Analytik. Dissertation, Technische Universität München.*
- [182]Reshkin, S. J., Cardone, R. A., and Harguindey, S. 2013. Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger, pH regulation and cancer. *PRA* 8, 1, 85–99.
- [183]Richard Binggeli, and Ivan L. Cameron. 1980. Cellular Potentials of Normal and Cancerous Fibroblasts and Hepatocytes. *Cancer research*, 40, 1830.
- [184]Robblee, L. S., McHardy, J., Agnew, W. F., and Bullara, L. A. 1983. Electrical stimulation with Pt electrodes. VII. Dissolution of Pt electrodes during electrical stimulation of the cat cerebral cortex. *Journal of neuroscience methods* 9, 4, 301–308.
- [185]Robblee, Lois S., and Timothy L. Rose. 1990. Electrochemical guidelines for selection of protocols and electrode materials for neural stimulation. *Neural Prostheses: Fundamental Studies*, 25–66.
- [186]Robinson, K. R. 1985. The responses of cells to electrical fields: a review. *The Journal of Cell Biology*, 101.6, 2023–2027.
- [187]Rose, T. L. and Robblee, L. S. 1990. Electrical stimulation with Pt electrodes. VIII. Electrochemically safe charge injection limits with 0.2 ms pulses. *IEEE Trans Biomed Eng* 37, 11, 1118–1120.
- [188]Rouzaire-Dubois, B. and Dubois, J. M. 1998. K<sup>+</sup> channel block-induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. *The Journal of Physiology* 510, 1, 93–102.
- [189]Rozenfurt, E. and Mendoza, S. 1980. MONOVALENT ION FLUXES AND THE CONTROL OF CELL PROLIFERATION IN CULTURED FIBROBLASTS. *Ann NY Acad Sci* 339, 1 Growth Regula, 175–190.
- [190]S Rotshenker, Y. P. 1973. Changes in fraction of current penetrating an axon as a function of duration of stimulating pulse. *Journal of Theoretical Biology* 41, 3, 401–407.
- [191]Schneiderman, R. S., Shmueli, E., Kirson, E. D., and Palti, Y. 2010. TFields alone and in combination with chemotherapeutic agents effectively reduce the viability of MDR cell sub-lines that over-express ABC transporters. *BMC Cancer* 10, 229.
- [192]Schreiber, R. 2005. Ca<sup>2+</sup> signaling, intracellular pH and cell volume in cell proliferation. *The Journal of membrane biology* 205, 3, 129–137.
- [193]Schwab, A. 2001. Function and spatial distribution of ion channels and transporters in cell migration. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* 280, 5, F739–F747.
- [194]Schwab, A. 2001. Ion Channels and Transporters on the Move. *Physiology* 16, 1, 29–33.
- [195]Schwab, A., Fabian, A., Hanley, P. J., and Stock, C. 2012. Role of ion channels and transporters in cell migration. *Physiol Rev* 92, 4, 1865–1913.
- [196]Schwab, A., Hanley, P., Fabian, A., and Stock, C. 2008. Potassium Channels Keep Mobile Cells on the Go. *Physiology* 23, 4, 212–220.
- [197]Schwab, A., Nechyporuk-Zloy, V., Fabian, A., and Stock, C. 2007. Cells move when ions and water flow. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 453, 4, 421–432.
- [198]Seifter, J. L. and Aronson, P. S. 1986. Properties and physiologic roles of the plasma membrane sodium-hydrogen exchanger. *The Journal of clinical investigation* 78, 4, 859–864.
- [199]Sguilla, F. S., Tedesco, A. C., and Bendhack, L. M. 2003. A membrane potential-sensitive dye for vascular smooth muscle cells assays. *Biochemical and biophysical research communications* 301, 1, 113–118.
- [200]Shibuya, K., Mathers, C. D., Boschi-Pinto, C., Lopez, A. D., and Murray, C. J. L. 2002. Global and regional estimates of cancer mortality and incidence by site: II. results for the global burden of disease 2000. *BMC Cancer* 2, 1, 37.

- [201]Shrode, L. D., Tapper, H., and Grinstein, S. 1997. Role of intracellular pH in proliferation, transformation, and apoptosis. *J Bioenerg Biomembr* 29, 4, 393–399.
- [202]Shuba, Y. M., Prevarskaya, N., Lemonnier, L., van Coppenolle, F., Kostyuk, P. G., Mauroy, B., and Skryma, R. 2000. Volume-regulated chloride conductance in the LNCaP human prostate cancer cell line. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 279, 4, C1144–C1154.
- [203]SIEMS, L. L., KOSMAN, A. J., and OSBORNE, S. L. 1948. A comparative study of short wave and microwave diathermy on blood flow; the role of the somatic and sympathetic nerves in the vascular response to deep tissue heating. *Arch Phys Med Rehabil* 29, 12, 759–764.
- [204]Sigma Aldrich. DMEM. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d0572?lang=de&region=DE&gclid=CPurzqHm7sUCFTLLtAod5XUAnA>.
- [205]SIGMA-ALDRICH. Gramicidin from *Bacillus aneurinolyticus* (*Bacillus brevis*). <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/g5002?lang=de&region=DE>.
- [206]SIGMA-ALDRICH. N-Methyl-D-glucamine. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/fluka/66930?lang=de&region=DE>.
- [207]Silva, A. S., Yunes, J. A., Gillies, R. J., and Gatenby, R. A. 2009. The potential role of systemic buffers in reducing intratumoral extracellular pH and acid-mediated invasion. *Cancer research* 69, 6, 2677–2684.
- [208]Sims, P. J., Waggoner, A. S., Wang, C.-H., and Hoffman, J. F. 1974. Mechanism by which cyanine dyes measure membrane potential in red blood cells and phosphatidylcholine vesicles. *Biochemistry* 13, 16, 3315–3330.
- [209]Spyridonidis, A., Bernhardt, W., Behringer, D., Köhler, G., Azemar, M., Pflug, A., and Henschler, R. 1999. Proliferation and Survival of Mammary Carcinoma Cells Are Influenced by Culture Conditions Used for Ex Vivo Expansion of CD34 Blood Progenitor Cells. *Blood* 93, 2, 746–755.
- [210]Stock, C. and Schwab, A. 2009. Protons make tumor cells move like clockwork. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 458, 5, 981–992.
- [211]Strong, K., Mathers, C., Leeder, S., and Beaglehole, R. 2005. Preventing chronic diseases: how many lives can we save? *Lancet* 366, 9496, 1578–1582.
- [212]Sullivan, J. M., Harken, D. E., and Gorlin, R. 1968. Pharmacologic control of thromboembolic complications of cardiac-valve replacement. A preliminary report. *The New England journal of medicine* 279, 11, 576–580.
- [213]Sundelacruz, S., Levin, M., and Kaplan, D. L. 2009. Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev* 5, 3, 231–246.
- [214]Tang, L., Yao, C., and Sun, C. 2009. Apoptosis induction with electric pulses - a new approach to cancer therapy with drug free. *Biochemical and biophysical research communications* 390, 4, 1098–1101.
- [215]Teissié, J., Eynard, N., Gabriel, B., and Rols, M. P. 1999. Electroporation of cell membranes. *Enhanced Drug Delivery Using High-voltage Pulses* 35, 1, 3–19.
- [216]Tipler, P. A. 1995. *Physik. Spektrum-Lehrbuch*. Spektrum, Akad. Verl., Heidelberg [u.a.].
- [217]V. Lob, T. Geisler, M. Brischwein, R. Uhl, B. Wolf. 2007. Automated live cell screening system based on a 24-well-microplate with integrated micro fluidics. *Med Biol Eng Comput*, 45 (11), 1023–1028.
- [218]Vander Heiden, Matthew G, Cantley, L. C., and Thompson, C. B. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)* 324, 5930, 1029–1033.
- [219]Technisches Datenblatt PROBIMER 77 HALOGEN-FREI SEMI-MATT. [http://www.pcb-specification.com/images/stories/Datenblatt/deu\\_PR77\\_7177\\_1.pdf](http://www.pcb-specification.com/images/stories/Datenblatt/deu_PR77_7177_1.pdf).
- [220]Vodovnik, L., Miklavcic, D., and Sersa, G. 1992. Modified cell proliferation due to electrical currents. *Med Biol Eng Comput* 30, 4, CE21-8.
- [221]Wang, E., Yin, Y., Zhao, M., Forrester, J. V., and McCaig, C. D. 2003. Physiological electric fields control the G1/S phase cell cycle checkpoint to inhibit endothelial cell proliferation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17, 3, 458–460.
- [222]Wang, L., Zhou, P., Craig, R. W., and Lu, L. 1999. Protection from cell death by mcl-1 is mediated by membrane hyperpolarization induced by K(+) channel activation. *The Journal of membrane biology* 172, 2, 113–120.
- [223]Wang, X.-T., Nagaba, Y., Cross, H. S., Wrba, F., Zhang, L., and Guggino, S. E. 2000. The mRNA of L-Type Calcium Channel Elevated in Colon Cancer: Protein Distribution in Normal and Cancerous Colon. *The American Journal of Pathology* 157, 5, 1549–1562.
- [224]Wang, Z. 2004. Roles of K+ channels in regulating tumour cell proliferation and apoptosis. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 448, 3, 274–286.
- [225]Weinstein, R. S., Merk, F. B., and Alroy, J. 1976. The structure and function of intercellular junctions in cancer. *Adv Cancer Res* 23, 23–89.

- [226] Whitfield, J. F. and Youdale, T. 1966. A comparison of the effects of radiation and inhibitors of oxidative phosphorylation on the nuclear structure of rat thymocytes. *Experimental Cell Research* 43, 1, 153–166.
- [227] Wike-Hooley, J. L., Haveman, J., and Reinhold, H. S. 1984. The relevance of tumour pH to the treatment of malignant disease. *Radiotherapy and Oncology* 2, 4, 343–366.
- [228] Winter, R. 1990. Struktur und Dynamik von Modell-Biomembranen. *Chem. Unserer Zeit* 24, 2, 71–81.
- [229] Wissenbach, U., Niemeyer, B., Himmerkus, N., Fixemer, T., Bonkhoff, H., and Flockerzi, V. 2004. TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca<sup>2+</sup> channel expression. *Biochemical and biophysical research communications* 322, 4, 1359–1363.
- [230] Wolf, P., Brischwein, M., Kleinhans, R., Demmel, F., Schwarzenberger, T., Pfister, C., and Wolf, B. 2013. Automated platform for sensor-based monitoring and controlled assays of living cells and tissues. *Biosensors & bioelectronics* 50, 111–117.
- [231] Wolf, B., and M. Kraus. pH-abhängige Selbstorganisation von Tumorstadium und Invasion. *Dtsch. Zschr. Onkol.* 1995, 27, 57–71.
- [232] Wonderlin, W. F. and Strobl, J. S. 1996. Potassium Channels, Proliferation and G1 Progression. *Journal of Membrane Biology* 154, 2, 91–107.
- [233] Wonderlin, W. F., Woodfork, K. A., and Strobl, J. S. 1995. Changes in membrane potential during the progression of MCF-7 human mammary tumor cells through the cell cycle. *Journal of cellular physiology* 165, 1, 177–185.
- [234] Wong, P., Kleemann, H.-W., and Tannock, I. F. 2002. Cytostatic potential of novel agents that inhibit the regulation of intracellular pH. *British journal of cancer* 87, 2, 238–245.
- [235] Yamada, A., Gaja, N., Ohya, S., Muraki, K., Narita, H., Ohwada, T., and Imaizumi, Y. 2001. Usefulness and Limitation of DiBAC4(3), a Voltage-Sensitive Fluorescent Dye, for the Measurement of Membrane Potentials Regulated by Recombinant Large Conductance Ca<sup>2+</sup>-Activated K<sup>+</sup> Channels in HEK293 Cells. *Jpn.J.Pharmacol* 86, 3, 342–350.
- [236] Yang, M. and Brackenbury, W. J. 2013. Membrane potential and cancer progression. *Frontiers in physiology* 4, 185.
- [237] Yang, W. J. and Wang, J. H. 1979. Shortwave and microwave diathermy for deep-tissue heating. *Med Biol Eng Comput* 17, 4, 518–524.
- [238] Zhao, M., Forrester, J. V., and McCaig, C. D. 1999. A small, physiological electric field orients cell division. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 9, 4942–4946.
- [239] Zhao, M., Forrester, J. V., and McCaig, C. D. 1999. A small, physiological electric field orients cell division. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, 9, 4942–4946.
- [240] Zhao, Y., Inayat, S., Dikin, D. A., Singer, J. H., Ruoff, R. S., and Troy, J. B. 2008. Patch clamp technique: review of the current state of the art and potential contributions from nanoengineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part N: Journal of Nanoengineering and Nanosystems* 222, 1, 1–11.
- [241] Zimmerman, J. W., Pennison, M. J., Brezovich, I., Yi, N., Yang, C. T., Ramaker, R., Absher, D., Myers, R. M., Kuster, N., Costa, F. P., Barbault, A., and Pasche, B. 2012. Cancer cell proliferation is inhibited by specific modulation frequencies. *British journal of cancer* 106, 2, 307–313.
- [242] Hyperthermie in der Onkologie: Eine in die Zukunft weisende Therapieoption?; Informationen der ESHO zur Methode Hyperthermie; <http://haematologie-onkologie.universimed.com/artikel/hyperthermie-der-onkologie-eine-die-zukunft-weisende-therapieoptionen>.
- [243] Scheiner, A., Mortimer, J. T., Roessmann, U. 1990. Imbalanced biphasic electrical stimulation: muscle tissue damage. *Ann Biomed. Eng.* 18, 4, 407-425
- [244] Chung, S., Lee, M.Y., Soh, H., Jung, W., and Joe, E. 1998. Modulation of membrane potential by extracellular pH in activated microglia in rats. *Neuroscience Letters* 249, 2-3, 139-142.

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1-1: Transmembranpotentiale verschiedener Zellen und zellulärer Zustände. Das Transmembranpotential verschiedener Zellen verändert sich in Abhängigkeit von ihrer Proliferation. Die teilungsfähigen Zellen, wie Tumorzellen oder embryonale Zellen, weisen Transmembranpotentiale auf, die oberhalb eines Grenzwertes von ca.  $-37\text{mV}$  liegen. Die nicht teilungsfähigen Zellen, wie Muskel- und Nervenzellen, weisen Transmembranpotentiale auf, die zwischen  $-70\text{mV}$  und  $-90\text{mV}$  liegen. Erstellt nach einer Vorlage aus [80], basierend auf den Daten von [32]. ..... 2
- Abbildung 2-1: Der Aufbau einer Krebszelle (Kolorektales Karzinom). Elektronenmikroskopische Aufnahme (TEM). Der Zellkern, die Mitochondrien, die Ribosomen und die Zellmembran sowie weitere Zellorganellen sind deutlich zu erkennen. Nicht nur die Zellmembran selbst, sondern auch die intrazellulären Membranen stellen die strukturbildenden Elemente in Zellen dar und zeigen elektrische Effekte. Aufnahme: B. Wolf [25]. ..... 6
- Abbildung 2-2: Tumormikroumgebung, welche die Tumorentwicklung begünstigt. Die Abbildung zeigt am Beispiel eines Adenokarzinoms die Aktivierung des Schlüsselproteins für Gefäßwachstum (hypoxia-inducible factor-1, HIF1 $\alpha$ ) und der carbonischen Anhydrase IX. Entnommen aus [169]. ..... 10
- Abbildung 2-3: Überblick über den Einfluss der erhöhten intrazellulären pH-Werte und der Expressierung der Na $^+$ /H $^+$ -Antiporter auf die Tumorentwicklung. Die Expression der Kanäle führt zu intrazellulärer Alkalinisation und extrazellulärer Azidose. Nur die Apoptose wird bei der Erhöhung dieser beiden Parameter unterdrückt. Entnommen aus [95]. ..... 12
- Abbildung 2-4: Amilorid: Strukturformel. Es ist ein Arzneistoff aus der Gruppe der kaliumsparenden Diuretika. Die Verwendung von Amilorid führt zur Blockierung des epithelialen Natriumkanals (ENaC). Durch die Hemmung der Natrium-Wiederaufnahme führt Amilorid zu einem erhöhten Natrium- und Wasserverlust. Dabei wird die Kaliumausscheidung nicht erhöht. Entnommen aus [22]. ..... 12
- Abbildung 2-5: Physikalische Einschränkungen für die wirksame Reduktion des intrazellulären pH-Werts, die zum Zelltod führen können. Die Reduktion des intrazellulären pH-Werts unter Verwendung eines Kanalblockers z. B. Amilorid (untere Hälfte der schematischen Zelle) führt zu einem veränderten Gleichgewicht des Nernst-Potentials für H $^+$  ( $E_{\text{H}^+}$ ). Der passive Ausstrom von schwachen Säuren (H $^+$ -Ausstrom) könnte helfen, den pH $_{\text{in}}$ -Wert auf einem Niveau zu halten, dass dadurch keinen Zelltod sondern einen Zellzyklusarrest verursacht wird. Dieser passive Ausstrom wird auch durch das weniger negative Membranpotential an Tumorzellen begünstigt (sich nicht teilende, normale Zellen weisen ein weniger positives Membranpotential auf). Generell tritt ein zytotoxischer Effekt erst ab pH $_{\text{ex}} < 6,5$  auf. Entnommen aus [169]. ..... 13
- Abbildung 2-6: Schematische Darstellung der Zellmembran: Die Grundstruktur einer solchen Membran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht (etwa 50% der Membranmasse und ca. 5nm dick), die durch nicht kovalente Wechselwirkungen zusammengehalten wird. Weitere essentielle Bestandteile der Zellmembran sind die Membranproteine. Diese sind in die Lipid-Doppelschicht der Zellmembran eingebettet. Der äußere Teil der Doppelschicht ist mit komplexen Polysacchariden überzogen, die in ihrer Gesamtheit als Glykokalix bezeichnet wird. Entnommen aus [146]. ..... 14
- Abbildung 2-7: Ein möglicher Synchronisationsmechanismus von spannungssensitiven Ionenkanälen in Tumoren. Die Aktivierung der spannungssensitiven Natriumkanäle führt zum Einstrom von Natrium. Dies könnte zur Depolarisation der Membran und gleichzeitig zur Aktivierung der spannungssensitiven Kalziumkanäle führen. Dieses resultiert in einem Einstrom von Natrium und Kalzium und in der Aktivierung der spannungssensitiven Kaliumkanäle. Durch den Ausstrom von Kalium wird die Zellmembran repolarisiert und die spannungssensitiven Natrium- und Kalziumkanäle werden inaktiviert [71]. ..... 16
- Abbildung 2-8: Einfluss der spannungssensitiven Ionenkanäle auf zelluläre Prozesse in Tumorzellen. Die spannungssensitiven Kaliumkanäle ( $K_{\text{v}}$ ) sind für die Regulation des Membranpotentials verantwortlich. Sie wurden in Leberkarzinom nachgewiesen. Die spannungssensitiven Natriumkanäle ( $\text{Na}_{\text{v}}$ ) wurden in Brust- und Prostata Tumoren nachgewiesen.  $\text{Na}_{\text{v}}$  spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation, Migration, Adhäsion und Muskelkontraktion. Die spannungssensitiven Kalziumkanäle ( $\text{Ca}_{\text{v}}$ ) wurden bisher in Prostata-, Kolontumoren, Fibrosarkoma und Neuroblastoma nachgewiesen. Diese Kanäle sind in 6 Gruppen (L-, N-, P-, Q-, R- und T-Typ) unterteilt. T-Typ Kanäle werden durch

die Membrandepolarisation aktiviert. Eine kleine Membrandepolarisation reicht bereits aus. Sie werden jedoch sehr schnell wieder inaktiviert. Die Zunahme an spannungssensitiven Kalziumkanälen beeinflusst die Proliferation der Prostatakarzinome (T-Typ $Ca_v$ ), die Differenzierung der Darmkrebszellen (L-Typ $Ca_v$ ) und die Motilität von Fibrosarkomazellen. [71] .....	17
Abbildung 2-9: Einfluss des Kaliumstroms auf die Proliferation von Tumorzellen. Zum einen verursacht die Zunahme die Hyperpolarisation der Membran. Dadurch steigt die Konzentration an intrazellulärem Kalzium $Ca^{2+}$ in der späteren G1-Phase und S-Phase. Diese Erhöhung wirkt als Trigger-Mechanismus auf die Proliferation. Die Zunahme des intrazellulären Kalziums kann aber auch die Apoptose hervorrufen. Zum anderen wird durch die Zunahme des Kaliumstroms das Zellvolumen gemindert, was zu einem Anstieg der Zellproliferation führt. Weiterhin hat die Zunahme des Kaliumstromes einen Einfluss auf die Zunahme der mitogenen Signale. Entnommen aus [224]. .....	18
Abbildung 2-10: Zusammenfassung der wachstumsregulierenden Konzepte einer normalen Zelle im Vergleich zu einer Tumorzelle. Es wurde einen Zusammenhang zwischen dem Transmembranpotential und der mitotischen Aktivität normaler Zellen und Tumorzellen hergestellt. Eine wichtige Rolle spielt dabei die intrazelluläre Ionenkonzentration [32, 49]. Diese Idee wurde später von mehreren Autoren durch den Nachweis des wenig negativen Transmembranpotentials an Tumorzellen unterstützt [32]. Ein weiteres Konzept besagt, dass normalproliferierende Zellen und Tumorzellen eine höhere intrazelluläre Konzentration an Natriumionen im Vergleich zu nicht proliferierenden Zellen aufweisen [105, 154]. Es wurde gezeigt, dass eine erhöhte intrazelluläre Natriumionenkonzentration zu einer Erhöhung der DNA Synthese [63] und der Mitose [226] führt. Binggeli und Weinstein zeigten in der Zellkultur einen Membranpotentialabfall an der Zelle kurz vor der Bildung eines Zell-Zell-Kontaktes. Sie vermuten, dass dieser Abfall die Mitose nicht inhibiert. Er kann jedoch zur Reduktion der DNA Synthese führen [32]. Außerdem wurde ein Einfluss von Gap Junctions auf das Zellwachstum gezeigt. Erstellt nach einer Vorlage aus [32]. .....	21
Abbildung 2-11: Transmembranpotentiale verschiedener Zellen und zellularer Zustände. Das Transmembranpotential verschiedener Zellen verändert sich in Abhängigkeit von ihrer Proliferation. Die teilungsfähigen Zellen, wie Tumorzellen oder embryonale Zellen, weisen Transmembranpotentiale auf, die oberhalb eines Grenzwertes von ca. $-37mV$ liegen. Die nicht teilungsfähigen Zellen, wie Muskel- und Nervenzellen, weisen Transmembranpotentiale auf, die zwischen $-70mV$ und $-90mV$ liegen. Leicht modifiziertes Diagramm nach Binggeli und Weinstein, erstellt nach einer Vorlage aus [32]. .....	22
Abbildung 2-12: Einfluss verschiedener Parameter auf das Tumorwachstum. Die DNA-Mutationen können die Signalkette auslösen, die zum Tumorwachstum führt. Man vermutet, dass ab einem Schwellenwert von $-37mV$ eine DNA-Synthese initiiert wird. Diese führt bei Tumorzellen, die ein Transmembranpotential über dem Schwellenwert aufweisen, zu einer kontinuierlichen DNA Synthese und Mitose. Daraus folgen die Probleme mit der Zell-Zell-Adhesion. Erstellt nach einer Vorlage aus [32]. .....	23
Abbildung 2-13: Membranpotential- und Zellzyklusprogressions-regulierende-Kanäle in Tumorzellen: Hyperpolarisierende Kanäle ermöglichen einen erhöhten $Ca^{2+}$ -Ausstrom durch die spannungs-unabhängigen Kanäle ( $I_K$ Ausstrom, rot), während apikale Kalium- und Chloridkanäle ( $I_K$ Einstrom, $Cl^-$ Ausstrom, grün) zur Membrandepolarisation führen können, was einen spannungssensitiven $Ca^{2+}$ -Einstrom ermöglicht. Entnommen aus [195]. .....	26
Abbildung 2-14: Schematische Darstellung der Ladungs- und Potentialverteilung an einer Membran: $\Delta\Psi$ : das Transmembranpotential als Differenz der Potentiale beider Phasen (inneres und äußeres Membranpotential); $\Delta x$ : Membrandicke. Entnommen aus [80]. .....	27
Abbildung 2-15: Darstellung eines Ersatzschaltbildes für den Stromfluss durch eine kugelförmige Zelle. $R_a$ : Widerstand des Außenmediums; $R_i$ : Widerstand des Zellplasmas; $R_m$ : Membranwiderstand; $C_m$ : Membrankapazität. Entnommen aus [80]. .....	28
Abbildung 2-16: Darstellung eines Ersatzschaltbildes von biologischem Gewebe. $\epsilon^*$ : Komplexe Dielektrizitätskonstante; $g^*$ : Komplexe spezifische Leitfähigkeit. Entnommen aus [80]. .....	29
Abbildung 2-17: Darstellung der Frequenzbereiche für die $\alpha$ -, $\beta$ -, und $\gamma$ -Dispersion am Beispiel der Abhängigkeit der Kurve der komplexen Dielektrizitätskonstante für ein biologisches Gewebe. Entnommen aus [80]. .....	29

Abbildung 2-18: Zelle in einem elektrostatischen Feld und entsprechender Ladungs-, Potential- und Feldverlauf an dieser Zelle. Im oberen Bildteil wird die Richtung und die Stärke des elektrischen Feldes durch Pfeile charakterisiert. Im unteren Bildteil ist der Potentialverlauf über die x-Achse dargestellt. — — : Membranpotential ohne Feldeinwirkung; — · — : Durch E-Feld induzierter Potentialverlauf, $\Delta\Psi_{ind}$ ; — : Resultierender Potentialunterschied. Entnommen aus [80].	30
Abbildung 2-19: Feldverlauf um und in einer kugelförmigen Zelle in einem homogenen elektrischen Wechselfeld (entnommen aus Glaser, Abb. 3.41, Seite 185) Äquipotentiallinien(---) und Feldlinien( ) ; (A) Feldverlauf bei niedriger Frequenz; (B) Feldverlauf bei hoher Frequenz, Leitwert des Umgebungsmilieus niedriger als in Zelle; (C) Feldverlauf bei hoher Frequenz; Leitwert im intra- und extrazellulärem Raum gleich [80].	31
Abbildung 2-20: Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt. Oben: Ladungen und Gegenladungen an einer Grenzflächen; Unten: Potentialverlauf entsprechend dem Modell nach Stern: $\Psi_0$ : Oberflächenpotential; $\Psi_H$ : Potential am Ende der Helmholtzschicht; $X_H$ : Dicke der Helmholtzschicht; $\lambda_D$ -Debye-Hückel-Länge als Maß für die effektive Dicke der diffusen Doppelschicht. Entnommen aus [80].	33
Abbildung 2-21: Ersatzschaltbild der Phasengrenze Elektrode/Elektrolyt: $R_D$ : Durchtrittswiderstand; $Z_W=R_K+1/(i\omega C_K)$ : Warburg-Impedanz; $R_E$ : Elektrolytwiderstand; $C_D$ : Doppelschichtkapazität. Entnommen aus [91].	34
Abbildung 2-22: Impedanzmessung: Schaltung bipolarer Messaufbau. Bei der 2-Elektroden-Anordnung wird eine Wechselspannung im definierten Frequenzbereich angelegt und die frequenzabhängige Wechselstromantwort des Systems gemessen. Zu den Vorteilen der 2-Elektroden-Impedanzmessung gehören der einfache Messaufbau und Messtechnik. Zusätzlich liegt das Messobjekt vollständig in der Messstrecke. Zu den Nachteilen zählen folgende Faktoren: Zum einen prägen Impedanzen von Leiterbahnen, Elektroden und dem Messobjekt die Gesamtimpedanz. Zum anderen können die Messdaten von einer frequenzabhängigen Polarisation der Elektroden verfälscht werden.	37
Abbildung 2-23: Schaltung eines tetrapolaren Messaufbaus. Dank dieser Methode ist die vollständige Kompensation der Effekte durch Elektroden und Zuleitungen möglich. Dies ermöglicht auch die Messung sehr niedriger Impedanzen. Weiterhin gewährleistet diese Messmethode eine räumliche Auflösung durch Mehrelektrodensysteme. Die Messtechnik mit Erregersystem und Antwortsystem ist jedoch aufwändiger als bei den anderen Messmethoden. Zusätzlich ist dieses Messsystem empfindlich gegenüber parasitären Kapazitäten an Elektroden.	39
Abbildung 2-24: Darstellung der Patch Clamp-Konfigurationen: Cell-Attached-Konfiguration (a): Bei dieser Methode wird eine Glaspipette, die mit einer Elektrolytlösung gefüllt ist, auf die Zellmembran aufgesetzt. Zwischen der Pipettenspitze und der Zellmembran entsteht durch leichtes Ansaugen ein Abdichtwiderstand, das sogenannte Giga-seal. Das ermöglicht es, auftretende Leckströme zu vernachlässigen; Whole-Cell-Konfiguration (b): Dank des hohen Widerstands des Giga-seals fließt durch die Pipette ein Strom, der auch durch den Ionenkanal des Patches fließt. In die Pipettenlösung taucht eine Elektrode. Diese Elektrode ist an einen Verstärker angeschlossen. Durch verstärktes Ansaugen oder kurze Pulse elektrischer Spannung kann die Zellmembran eingerissen werden. Dabei bleibt die Membran nicht mehr intakt. Es entsteht eine Kontinuität zwischen dem Zellinneren und der Glaspipette. Entnommen aus [240].	40
Abbildung 2-25: Schematischer Aufbau eines Patch-Clamp-Experiments in der Whole-Cell-Konfiguration: a) konventionelle Technik; b) planare Technik. Beim konventionellen Patchen wird die Pipette unter optischer Kontrolle auf einer adhärennten Zelle positioniert. Relativbewegungen zwischen Zelle und Pipette müssen vermieden werden. Dadurch bleibt die Verbindung intakt. Beim planaren Patchen wird die suspendierte Zelle auf ein Loch positioniert. Das wird mit Hilfe von Unterdruck ermöglicht. Dabei sind Relativbewegungen ausgeschlossen. Die planare Technik bietet den Vorteil, dass kein schwingungsgedämpfter Tisch, kein Mikroskop und keine Abschirmung für die Messungsdurchführung erforderlich sind. Entnommen aus [68].	41
Abbildung 2-26: Membranpotential-Messung: Fluoreszenzintensitäts-Antwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von 53 V/cm in der Richtung von links nach rechts ausgesetzt ist (a) mit zugehöriger Fluoreszenzintensitäts-Tabelle (b). Die linke Zelhälfte ist hyperpolarisiert, die rechte Zelhälfte ist depolarisiert. Die Membranpotential-Messung ist in Pseudofarben dargestellt: Rot ist die positive	

Fluoreszenzänderung, blau die negative Fluoreszenzänderung. Die Farbintensität entspricht der Fluoreszenzintensität. Anhand einer Kalibrierungskurve wird die Fluoreszenzänderung in die Membranpotentialänderung umgerechnet. Entnommen aus [87].	42
Abbildung 2-27: Eingangs- und Ausgangssignale lebender Zellen. Man betrachtet die verwendeten Zellen als „Black Box“ und beobachtet nur die Eingangs- und die Ausgangssignale. Durch die oxydative Phosphorylierung wird der Sauerstoff von den Zellen verbraucht. Zusätzlich wird durch die mitochondriale Aktivität CO <sub>2</sub> erzeugt und Laktat durch die Glykolyse gebildet. Diese Prozesse sind proportional zur intrazellulär verbrauchten Energie. Die sensorbasierte Messung ermöglicht es, die in einer Zelle ablaufenden Mechanismen zu erfassen. Durch diese Messung der Veränderungen des O <sub>2</sub> -Gehalts und des pH-Werts des extrazellulären Mediums können Rückschlüsse auf die mitochondriale und glykolytische Zellaktivität gezogen werden [25].	44
Abbildung 2-28: Der Intelligent Microplate Reader befindet sich in einem Zellkulturinkubator (A); Der Pipettierroboter (C) wechselt das Medium in den einzelnen Wells einer sensorbestückten Multiwellplatte (B) in definierten Zeitabständen aus. Das Medium stellt man in Vorrats- und Abfallgefäßen bereit (D). Das IMR-System beinhaltet ein inverses unter der Probe verfahrbares Mikroskop (E). Abbildung (modifiziert): Heinz Nixdorf-Lehrstuhl für Medizinische Elektronik und HP Medizintechnik GmbH [4, 14].	45
Abbildung 2-29: Multiwellplatte mit 24 Wells für die Zell- und Gewebekultur für das IMR-System und Glassubstrat mit Elektroden-Kontakten. Oben : Deckel der Platte mit Verdrängungskörpern. Ein Well der Multiwellplatte mit Einlass- und Auslasskammern mit Medium aufgefüllt (a); Aufgesetzter Deckel mit Verdrängungskörper, der ein Mikrovolumen von 23 µl gewährleistet (b); Die Seitenkammern sind mit Mittelkammer durch Mikrokanäle verbunden, was einen Medien austausch ermöglicht (c); Layout eines Wells mit optochemischen Sensoren und IDES (d), über die die Zellen elektrisch stimuliert werden können. Entnommen aus [230].	46
Abbildung 2-30: Berechnung der Sauerstoffverbrauchsrate von Zellen: Für jedes Well wird aus den gemessenen Rohdaten die Steigung zwischen den Pipettierzyklen berechnet (A). Die Sauerstoffverbrauchsrate werden für alle Zyklen berechnet und über die Zeit aufgetragen (B). Entnommen aus [230].	47
Abbildung 2-31: Mikroskop (ohne Kamera). Nutzungsmöglichkeiten sind die Messung der Optronen durch ein externes Messgerät und als weitere Option die Fluoreszenzmessung [3].	48
Abbildung 2-32: Mausfibroblasten (L929 Zellen), Monolayer. Durchlichtaufnahme. (Aufgenommen mit einem iMIC Digital Mikroskop, Objektivvergrößerung 10x).	49
Abbildung 2-33: Fluoreszenzaufnahme von Tumorzellen (MCF-7 Zellen). Zellen sind mit einem spannungssensitiven Fluoreszenzfarbstoff für die Membranpotentialmessung DiBAC <sub>4</sub> (3) markiert. Aufgenommen mit einem iMIC Digital Mikroskop, Objektivvergrößerung 20x.	49
Abbildung 2-34: Ein Überblick von möglichen biologischen Effekten auf eine Zelle, die durch ein extern appliziertes elektrisches Feld hervorgerufen werden können (entnommen aus [220]). Ein extern appliziertes elektrisches Feld kann sowohl die Zellmembran als auch das Milieu der Zellmikroumgebung beeinflussen. Dadurch kann die Mitose beeinflusst werden.	50
Abbildung 3-1: Durchlichtaufnahme von MCF-7 Zellen, adhärenente Monolayerkultur. Die Zellen wurden routinemäßig in Kulturmedium kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 10% CO <sub>2</sub> -Begasung.	54
Abbildung 3-2: Durchlichtaufnahme von MDA-MB-231 Zellen, adhärenente Monolayerkultur. Die Zellen wurden routinemäßig in Kulturmedium kultiviert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 10% CO <sub>2</sub> -Begasung.	54
Abbildung 3-3: FLUOstar Galaxy, ein Fluoreszenz Microplate Reader zur Messung der Fluoreszenz-Intensität (z. B. im Resazurin-Assay), Firma BMG LABTECH (entnommen aus [35]).	55
Abbildung 3-4: Multiparametrischer Glas-Sensorchip zur Messung des Membranpotentials während der elektrischen Stimulation von Zellen (A); Schematische Abbildung des Glas-Sensorchips (B). Der Glas-Sensorchip hat zwei Sauerstoffsensoren, zwei pH-Metalloxid-Sensoren und zwei Interdigitale Elektrodenstrukturen (IDES) aus Platin. In Blau ist die Fläche markiert, auf der die Zellen kultiviert werden. In Rot sind die Elektroden markiert, über die die Zellen elektrisch stimuliert wurden. Der mit Gelb markierte Bereich ist der Kontaktierungsbereich. [4].	56



- Abbildung 3-5: Chronoamperometrie: Potentialverlauf und resultierender Strom. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Relaxationsmethode, bei der ein Potentialsprung erzeugt und der sich ändernde Elektrolysestrom betrachtet wird. Zuerst wird eine Ruhespannung von 0V an die Arbeitselektrode angelegt. Dadurch erfolgt kein Umsatz des Analyten. Durch einen Potentialsprung auf einen konstanten Wert beginnt ein elektrochemischer Strom zu fließen (Oxidation oder Reduktion an der Elektrodenoberfläche). Dieser hat unmittelbar nach dem Potentialsprung (Zeitpunkt  $t_0$ ) seinen maximalen Wert und fällt dann ab [91]. ..... 57
- Abbildung 3-6: Vorrichtung zur chronoamperometrischen Messung. Doppelwellkammer mit angeschlossenem Kontaktstecker: Die Wells sind mit DMEM + 5% FCS gefüllt (A); MCF-7 Zellen zwischen IDEs Strukturen auf Glas-Sensorchip (B). Die elektrochemische Zelle baute man in den Versuchen mit 3 Elektroden auf: einer Messelektrode, einer Gegenelektrode und einer Referenzelektrode. Als Mess- und Gegenelektrode wurden Platin-Elektroden verwendet (IDES). Die Glas-Sensorchips wurden in einer Doppelwellkammer aus PEEK installiert und mittels eines Federkontaktsteckers kontaktiert. Über die Federkontaktstifte legte man die Spannung an. .... 58
- Abbildung 3-7: Potentiostat PGZ 402, Firma Volta Lab Instruments. Der resultierende Stromdichteverlauf ist graphisch durch Volta Master 4 (Version 7.8.26338.3) aufgezeichnet worden (entnommen aus [9]). ..... 59
- Abbildung 3-8: Die elektrochemische Elektrodenimpedanz kann mit einem Randles Ersatzschaltbild beschrieben werden. Dieses Ersatzschaltbild ermöglicht es, reale Messergebnisse physikalischen Effekten zu zuordnen. Dabei ist der Durchtrittswiderstand  $R_D$  (Faraday'scher Widerstand) parallel mit der elektrochemischen Doppelschichtkapazität  $C_D$  geschaltet. Der Durchtrittswiderstand ist zudem seriell zur Warburg-Impedanz  $Z_W$  geschaltet. Das Ganze ist wiederum mit dem Elektrolytwiderstand  $R_E$  in Serie geschaltet. Der relative Anteil der Doppelschicht-Impedanz an der Gesamtimpedanz ist frequenzabhängig und liegt in Serie zum Elektrolytwiderstand (entnommen aus [91]). ..... 60
- Abbildung 3-9. Nyquist-Diagramm eines Randles Ersatzschaltbildes:  $Z_{real}$ : Realteil der Impedanz;  $Z_{im}$ : Imaginärteil der Impedanz. Die Transportkontrolle ist mit dem Massentransport (Warburg Impedanz,  $Z_W$ ) und die kinetische Kontrolle mit Ladungstransfers über der Phasengrenze (faraday'sche Widerstand  $R_D$ ) verbunden. Weitere Prozesse, die nicht mit Ladungstransfer in Zusammenhang stehen, spiegeln die elektrochemische Doppelschichtkapazität  $C_D$  wieder. Diese Prozesse erfolgen ohne Ladungstransfer über die Phasengrenze. Sie sind mit einer Auf- und Entladung der elektrochemischen Doppelschicht verbunden. Erstell nach einer Vorlage aus [2, 143]. ..... 60
- Abbildung 3-10. Vorrichtung zur Impedanzmessung; Doppelwellkammer mit Glas-Sensorchips mit an einer Seite angeschlossenem Kontaktstecker. Die Kultivierungsfläche ist mit DMEM+5% FCS gefüllt (A); Die Kontaktierung erfolgt über einen Federkontaktstecker, der am Impedanzmessgerät Solartron 1260 angeschlossen ist (B). ..... 61
- Abbildung 3-11. Simulationsmodell einer Zelle, welche sich auf dem Boden eines Wells zwischen zwei Elektroden befindet (Seitenansicht). Das Well ist mit Zellkulturmedium befüllt. Der Abstand zwischen den Elektroden beträgt  $50\mu\text{m}$  und die Elektrodenlänge ist jeweils  $50\mu\text{m}$ . Zwischen zwei Elektroden ist eine kugelförmige Zelle mit einem Durchmesser von  $15\mu\text{m}$  positioniert. Die Mediumhöhe beträgt  $50\mu\text{m}$ . ..... 62
- Abbildung 3-12. Seitenansicht eines Wells einer auf die Befeldungsplatine gestellte 6-Well-Platte. Simulationsmodell einer Zelle in einem Well der 6-Well-Platte (Seitenansicht). Auf dieser Platine befinden sich zwei Stimulationselektroden. Diese haben einen Abstand von 1mm (3mm). Die Elektrodenquerschnittslänge beträgt ebenso jeweils 1mm (3mm). Dabei sind die Elektroden mit einer Lötstopplack-Schicht (Schichtdicke  $8\mu\text{m}$ ) beschichtet. Die Bodendicke der 6-Well-Platte beträgt 1mm. Die Lötstopplack-Schicht und der Boden der 6-Well-Platte schwächen dabei die auftretende Spannung und das elektrische Feld ab. Auf dem Boden der 6-Well-Platte ist eine kugelförmige Zelle mit einem Durchmesser von  $15\mu\text{m}$  positioniert. Die simulierte Höhe des Mediums beträgt 1mm. Die elektrischen Eigenschaften der Membran wurden in die Simulation integriert. .... 64
- Abbildung 3-13. Schematischer zeitlichen Ablauf für die IMR-Messung von elektrisch stimulierten MCF-7 Zellen: Versuchsplanung. Die MCF-7 Zellen wurden mit niederfrequenten gepulsten elektrischen Feldern stimuliert. Die elektrische Stimulation wurde mittels der direkten Feldeinspeisung durchgeführt. .... 66

Abbildung 3-14. Vorbefeldungsplatine. Diese wurde als Spannungsteiler konzipiert und statt der IDEs Elektronik in das IMR-System montiert. Goldfarben sind die Federkontaktstifte erkennbar, welche die Kontaktierung zu Messplatte gewährleisten [4].	66
Abbildung 3-15. Schematischer zeitlichen Ablauf der IMR-Messungen an elektrisch stimulierten MCF-7 Zellen. Die MCF-7 Zellen wurden mit sinusförmigen elektrischen Feldern stimuliert. Die elektrische Stimulation wurde mittels der direkten Feldeinspeisung durchgeführt.	67
Abbildung 3-16: 6-fach Messsystem während eines Pipettiervorgangs im IMR-System. Ein montierter Deckel gewährleistet die elektrische Kontaktierung. Eine sogenannte 6-fach-Messkammer kann statt der 24-fach Multiwellplatten im IMR-System verwendet werden (entnommen aus [51]).	68
Abbildung 3-17: 6-fach-Messkammer mit aufgesetzten Fluidikköpfen. Sie besteht aus 6 Wells. Den Boden der Wells bilden sensorbestückte Glas-Sensorchips. Die Glas-Sensorchips könnten mit elektrochemischen, elektrischen und/oder opto-chemischen Sensoren bestückt werden (entnommen aus [51]).	68
Abbildung 3-18: Deckel mit integrierter Ringplatine. Über die Federkontakte der Ringplatine wird die Spannung für die elektrische Stimulation der Zellen angelegt. Die Ringplatine dient der Weiterleitung der Signale des Signalgenerators an die Federkontaktstifte über die Steckverbinder. Deshalb ist sie einerseits mit den Federkontaktstiften und andererseits mit den Sub-D-Steckern zur Weiterleitung der Signale verlötet. Die Leiterbahnen der Glas-Sensorchips (IDES und Längselektroden) eins bis drei werden auf den linken und die Leiterbahnen der Glas-Sensorchips vier bis sechs auf den rechten Sub-D-Stecker geleitet.	69
Abbildung 3-19: 6-fach-Messkammer mit dem montierten Deckel. Dieser beinhaltet die elektrische Kontaktierung (entnommen aus [51]).	70
Abbildung 3-20: Schematische Darstellung des Signalwegs. An dieser Platine wurde wiederum ein Frequenzgenerator SG801 (HEB Rudolf Herzog Digitaltechnik, [97]) angeschlossen, der die Anregungsspannung (15V) erzeugt.	70
Abbildung 3-21: Versuchsaufbau: Elektrische Stimulation, kapazitive Feldeinspeisung. Die Kulturplatte (6-Well-Platte) ist auf eine Befeldungsplatine mit IDEs-Abstand 1mm (links) und 3mm (rechts) gestellt. Jeweils 3 Wells wurden mit der gleichen Feldstärke beaufschlagt. Gleichzeitig stellte man eine weitere 6-Well-Platte als Kontrolle in den Inkubator. Die ist genauso mit Zellen besiedelt, ist aber mit keinem E-Feld beaufschlagt [4].	71
Abbildung 3-22: Schematischer zeitlichen Ablauf für die elektrische Stimulation von MCF-7 Zellen. Die MCF-7 Zellen wurden mit sinusförmigen elektrischen Feldern durch kapazitive Feldeinspeisung elektrisch stimuliert.	72
Abbildung 3-23: Spannungssensitiver Slow-Response Farbstoff DiBAC <sub>4</sub> (3): Strukturformel [137].	72
Abbildung 3-24: Sauerstoffverbrauchsmessung an den MCF-7 Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 20µM) des Membranpotentialfarbstoffs DiBAC <sub>4</sub> (3) markiert wurden. Die Werte sind auf den Wert von 24.h normiert. Gesamtzellzahl 5×10 <sup>4</sup> Zellen/Well.	74
Abbildung 3-25: Ansäuerungsrate an den MCF-7 Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 20µM) von Membranpotentialfarbstoff DiBAC <sub>4</sub> (3) angefärbt wurden. Die Werte sind auf den Wert von 24h normiert. Gesamtzellzahl 5×10 <sup>4</sup> Zellen/Well. Ab der Konzentration von 5µM DiBAC <sub>4</sub> (3) wurden die pH-Spots verfärbt und es konnten keine weiteren opto-chemischen Signale erfasst werden.	74
Abbildung 3-26: Impedanzwerte der MCF-7 Zellen, angefärbten mit verschiedenen Konzentrationen (1, 5, 10, 20µM) des Membranpotentialfarbstoffs DiBAC <sub>4</sub> (3). Die Werte sind auf den Wert von 24.h normiert. Gesamtzellzahl 5×10 <sup>4</sup> Zellen/Well.	75
Abbildung 3-27: Die photodynamischen Eigenschaften des Farbstoffes in verschiedenen Konzentrationen: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zeit in mit 1, 2 und 5µM DiBAC <sub>4</sub> (3) markierten MCF 7 Zellen. Die Inkubationszeit betrug jeweils 45 min.	76
Abbildung 3-28: Fluoreszenzintensität von mit verschiedenen Farbstoffkonzentrationen markierten MCF-7 Zellen auf einem Glas-Sensorchip: a) 1µM DiBAC <sub>4</sub> (3); b) 2µM DiBAC <sub>4</sub> (3); c) 5µM DiBAC <sub>4</sub> (3). Bei 5µM DiBAC <sub>4</sub> (3) Konzentration scheint das Fluoreszenz-Signal an den Zellen übersteuert und bei 1µM DiBAC <sub>4</sub> (3) Konzentration untersteuert zu sein. Folglich liegt die optimale Farbstoffkonzentration bei 2µM. Die Inkubationszeit betrug jeweils 45 min.	76

Abbildung 3-29: Die photodynamischen Eigenschaften des Farbstoffes: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität von der Zeit in mit $2\mu\text{M DiBAC}_4(3)$ beladenen MCF 7 Zellen. Messdauer 45 min. Die Inkubationszeit betrug 45 min. ....	77
Abbildung 3-30: Zeitabhängigkeit der Fluoreszenzintensität von $[K^+]_{ex}$ in $2\mu\text{M DiBAC}_4(3)$ markierten MCF 7 Zellen. Die Inkubationszeit betrug jeweils 20 min. In Blau sind die Region of Interest (ROIs) markiert, über die die Fluoreszenzintensität ermittelt wurde. ....	78
Abbildung 3-31: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in mit $2\mu\text{M DiBAC}_4(3)$ markierten MCF 7 Zellen. Kalibrierungskurve. ....	80
Abbildung 3-32: Multiparametrischer Glas-Sensorchip mit bioelektronischen Sensoren für pH, Sauerstoff und elektrische Impedanz, sowie für mikroskopische Analysen. Die Kontakte I1.1, I1.2, I2.1, I2.2 dienen für die Weiterleitung der Anregungsspannung von dem Signalgenerator zu beiden IDES. Die Kontakte pH Ref 1 und pH Ref 2 sind für die Weiterleitung der Anregungsspannung von dem Signalgenerator zu beiden Streifen-Elektroden vorgesehen. [4]. ....	81
Abbildung 3-33: Abgegebene Anregungsspannung (gemessen an Glas-Sensorchip mit Messmedium). Rechteck-Puls von $750\text{mV}$ , monopolar, Periodendauer $10\text{ms}$ und einem Tastverhältnis 1:15. ....	82
Abbildung 3-34: Schematischer zeitlichen Ablauf der Messung des Membranpotentials an MCF-7 Zellen während der elektrischen Stimulation. Die MCF-7 Zellen wurden mit niederfrequenten gepulsten elektrischen Feldern stimuliert. Die elektrische Stimulation wurde mittels der direkten Feldeinspeisung durchgeführt. ....	83
Abbildung 3-35: Titrationskurve: Ein physiologisches Medium a) HEPES-PS; b) MES-PS mit $1\text{M HCL}$ Lösung titriert. Die HEPES und MES Pufferkonzentrationen ermittelte man aus den Titrationskurven mit zwei verschiedenen Pufferkonzentrationen von $10\text{mM}$ und $25\text{mM}$ . Um das Hintergrundrauschen zu minimieren, wurden die Messungen in FCS-freiem Medium durchgeführt. ....	84
Abbildung 3-36: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in mit $\text{DiBAC}_4(3)$ markierten MCF 7 Zellen. Die Kalibrierlösung wurde auf drei unterschiedliche pH-Werte ( $7,4$ ; $7,0$ und $6,5$ ) eingestellt. ....	85
Abbildung 3-37: Schematischer zeitlichen Ablauf für die Messung des Membranpotentials an MCF-7 Zellen unter Variation der extrazellulären pH-Werte. Die Fluoreszenzintensität wurde mit dem Fluoreszenz Microplate Reader (FLUOstar Galaxy) gemessen. ....	86
Abbildung 4-1: Nyquistplot der Impedanzwerte der untersuchten Mikroelektroden (Platin-Elektroden) in einer PBS Lösung (a); Phasenwinkel und Betrag der Impedanz von Mikroelektroden gemessen mit einer Spannung von $750\text{mV}$ (b). ....	87
Abbildung 4-2: Impedanzmessung ohne Zellen: Direkte und kapazitive Feldeinspeisung. Bode-Diagramm der untersuchten Mikroelektroden (Platin-Elektroden) in einer PBS Lösung. Phasenwinkel und Betrag der Impedanz von Mikroelektroden, gemessen mit einer Spannung von $200\text{mV}$ , $500\text{mV}$ und $750\text{mV}$ im Frequenzbereich von $1\text{Hz}$ bis $10^6\text{Hz}$ . ....	89
Abbildung 4-3: Chronoamperometrie: Stromdichteverlauf gemessen an den IDES des Glas-Sensorchips. Direkte elektrische Stimulation mit $750\text{mV}$ . ....	90
Abbildung 4-4: Theoretischer Stromverlauf an Elektroden: Kapazitiver Strom (rote Kurve); Faraday'scher Strom (blaue Kurve). Entnommen aus [2]. ....	91
Abbildung 4-5: Impedanzmessung mit MCF-7 Zellen: Direkte und kapazitive Feldeinspeisung. Bode-Diagramm: Phasenwinkel und Betrag der Impedanz von Mikroelektroden gemessen mit einer Spannung von $200\text{mV}$ , $500\text{mV}$ und $750\text{mV}$ im Frequenzbereich von $1\text{Hz}$ bis $10^6\text{Hz}$ . ....	92
Abbildung 4-6: Stromdichteverlauf gemessen an den IDES der Glas-Sensorchips; Messung mit MCF-7 Zellen – Direkte elektrische Stimulation mit $750\text{mV}$ (blau); Kapazitive elektrische Stimulation mit $750\text{mV}$ (rot). ....	93
Abbildung 4-7: Spannungsverlauf in der Simulation in und an einer Zelle, die sich zwischen zwei Stimulationselektroden in einem Messmedium befindet, mit einer Stimulationsspannung von $750\text{mV}$ und einer Frequenz von $100\text{Hz}$ (a) und $150\text{kHz}$ (b). Unten links und rechts von der Zelle sind zwei Stimulationselektroden angebracht. ....	94
Abbildung 4-8: Simulationsmodell einer Zelle zwischen zwei Elektroden in $[\mu\text{m}]$ , Seitenansicht. In Blau ist die Linie markiert, deren entlang des Spannungsabfalls gemessen wurde. Unten links und rechts von der Zelle sind zwei Stimulationselektroden angebracht. ....	95

Abbildung 4-9: Spannungsabfall [V] durch den Messaufbau (schwarze Linie in Abbildung 4-8) am Grenzübergang Elektrode/Elektrolyt entlang der X-Achse [ $\mu\text{m}$ ] und der Zellebene für die Frequenzen $f=100\text{Hz}$ (schwarze Kurve) und $f=150\text{kHz}$ (rote Kurve). .....	95
Abbildung 4-10: Berechneter Feldverlauf in und an einer Zelle, die sich zwischen zwei Stimulationselektroden in einem Messmedium befindet, mit einer Stimulationsspannung von $750\text{mV}$ und einer Frequenz von $100\text{Hz}$ (a) und $150\text{kHz}$ (b). .....	96
Abbildung 4-11: Berechneter Spannungsverlauf am Boden eines Wells der 6-Well-Platte in und an einer Zelle, die sich am Boden eines Wells der 6-Well-Platte befindet. Die 6-Well-Platte ist auf eine Befeldungsplatine gestellt. Die Zellen wurden mit einer Spannung von $15\text{V}$ und einer Frequenz von $100\text{Hz}$ (a) und $150\text{kHz}$ (b) stimuliert. Der Elektrodenabstand beträgt $1\text{mm}$ . .....	97
Abbildung 4-12: Berechneter Feldverlauf am Boden eines Wells der 6-Well-Platte in und an einer Zelle, die sich am Boden eines Wells der 6-Well-Platte befindet. Die 6-Well-Platte ist auf eine Befeldungsplatine gestellt. Die Zellen wurden mit einer Spannung von $15\text{V}$ und einer Frequenz von $100\text{Hz}$ (a) und $150\text{kHz}$ (b) stimuliert. Der Elektrodenabstand beträgt $1\text{mm}$ . .....	97
Abbildung 4-13: Seitenansicht eines Teils der Befeldungsplatine mit IDEs-Abstand $1\text{mm}$ . Auf einem Glas-Substrat (grau) sind Elektroden-Strukturen (gelb) aufgetragen. Diese sind mit einem Lötstopplack (grün) mit einer Schichtdicke von $8\text{ }\mu\text{m}$ überzogen. Die Elektroden-Strukturen haben einen Abstand von $1\text{mm}$ ( $3\text{mm}$ ). Die Elektrodenquerschnittslänge beträgt ebenso jeweils $1\text{mm}$ ( $3\text{mm}$ ). .....	98
Abbildung 4-14: Einfluss der elektrischen Felder, auf das Teilungsverhalten von MDA-MB-231 Zellen nach $71\text{h}/95\text{h}$ in Kultur auf Glas-Sensorchips. Die Zellen wurden mit einem direkt eingekoppelten elektrischen Feld stimuliert. Daraufhin wurden die Wachstumsänderung und damit der Einfluss der elektrischen Stimulation auf die Zellen bestimmt. Nach $50\text{h}$ der Kultivierung wurden zwei Glas-Sensorchips zum Versuch aufgebaut und für $21\text{h}$ stimuliert. Nach der Befeldung, $71\text{h}$ nach Aussaat, wurde der erste Versuch abgebaut und die Zellzahl auf den befeldeten Glas-Sensorchips und dem Kontrollchip bestimmt. $74\text{h}$ nach Aussaat wurde die nächsten Versuche mit 2 weiteren Glas-Sensorchips gestartet. Diese wurden ebenfalls $21\text{h}$ lang befeldet und im Anschluss die Zellzahl ermittelt. Nach $21\text{h}$ Befeldung fiel die Zellzahl um ca. $40\%$ . .....	99
Abbildung 4-15: Zellzahlbestimmung von elektrisch stimulierten MCF-7 Zellen gegenüber nicht stimulierten Zellen. Die Untersuchung des Teilungsverhaltens der MCF-7 Zellen, die einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld ausgesetzt waren, zeigte eine um ca. $20\%$ reduzierte Proliferation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. .....	100
Abbildung 4-16: Resazurinmessung der metabolischen Aktivität an MCF-7 Zellen im Überstand. Im Zellüberstand wurde kein signifikanter Unterschied gemessen. .....	101
Abbildung 4-17: Temperaturverlauf auf den verwendeten Glas-Sensorchips mit Hilfe eines Temperatursensors PT1000 aufgezeichnet. Die Temperaturmessung wurde dann bei beiden Glas-Sensorchips während der elektrischen Stimulation d.h., Stimulation mit $750\text{mV} - 10\text{ms}$ , entsprechend dem Befeldungsprotokoll (siehe Kapitel 3.8.1, Abbildung 3-13) über $30\text{h}$ durchgeführt. ....	101
Abbildung 4-18: Metabolische Messung zur Bestimmung des Einflusses von einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld auf MCF-7 Zellen: Statistische Auswertung des Sauerstoffverbrauchs von mit einem elektrischen Feld behandelten und unbehandelten MCF-7 Zellen (normiert auf den Anfangswert der Stimulation). Die Messung des Sauerstoffverbrauchs der stimulierten Zellen weist keine signifikante Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Gesamtzellzahl $5 \times 10^4$ Zellen/Well. Nach $12\text{h}$ Monitoring im IMR ohne E-Feld wurden die Zellen für $30\text{h}$ elektrisch stimuliert. ....	102
Abbildung 4-19: Metabolische Messung zur Bestimmung des Einflusses von einem niederfrequenten gepulsten elektrischen Feld auf MCF-7 Zellen: Statistische Auswertung der Ansäuerung von mit einem elektrischen Feld behandelten und unbehandelten MCF-7 Zellen (normiert auf den Anfangswert der Stimulation). Die Messung der Ansäuerung der stimulierten Zellen weist keine signifikante Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Gesamtzellzahl $5 \times 10^4$ Zellen/Well. Nach $12\text{h}$ Monitoring im IMR ohne E-Feld wurden die Zellen $30\text{h}$ elektrisch stimuliert. ....	103
Abbildung 4-20: Morphologie von MCF-7 Zellen nach Anlegen eines elektrischen Feldes (Pulsfelder $750\text{mV}$ , $100\text{Hz}$ ) a) Kontrolle, 1.Tag; b) Kontrolle, 2.Tag; c) Behandelnde Zellen vor elektrischer Stimulation, 1.Tag; d) Behandelnde Zellen nach $30\text{h}$ elektrischer Stimulation, 2.Tag. Die morphologische Untersuchung zeigte, dass die elektrische Stimulation die Zellmorphologie nicht unmittelbar erkennbar beeinflusst. In anderen Wells sind die Ergebnisse vergleichbar. ....	104

- Abbildung 4-21: *Metabolische Messung zur Bestimmung des Einflusses von einem sinusförmigen elektrischen Feld (Frequenz 100Hz) auf MCF-7 Zellen: Sauerstoffverbrauch von mit einem elektrischen Feld behandelten und nicht behandelten MCF-7 Zellen (auf Start der Stimulation normierte Mittelwerte). Wechselspannungen: 50mV, 200mV und 715mV. Die Gruppen mit niedriger angelegter Spannung (50mV; 200mV) zeigen nach 40h einen beinahe konstanten Sauerstoffverbrauch, der zwischen 2 und 2,5 schwankt. Bei der Gruppe mit der höchsten Spannungsamplitude (715mV) zeigt sich nach 50h ein starker Rückgang des Sauerstoffverbrauchs. Liegen die Verbrauchswerte bei t=40 h bei der Gruppe noch zwischen 2–2,5, geht er bis zum Ende der Messung auf 0,8–1,5 zurück. Der Sauerstoffverbrauch der stimulierten MCF-7 Zellen zeigt ab ca. 70h einen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen bei einer Spannungsamplitude von 715mV. Nach der Stimulation (Zeitpunkt t=120h) wurde der Versuch mit einem Tritonabschluss (0,1% Triton X-100) als Positivkontrolle beendet. Gesamtzellzahl  $5 \times 10^4$  Zellen/Well. Nach 12h Monitoring im IMR ohne E-Feld wurden die Zellen 108h elektrisch stimuliert. n: Anzahl auswertbarer Wells einer Gruppe.....* 105
- Abbildung 4-22: *Metabolische Messung zur Bestimmung des Einflusses von einem sinusförmigen elektrischen Feld (Frequenz 100Hz) auf MCF-7 Zellen: Ansäuerung an den mit einem elektrischen Feld behandelten und unbehandelten MCF-7 Zellen (auf Start der Stimulation normierte Mittelwerte). Wellspannungen: 715mV, 200mV, 50mV. Die Ansäuerungsraten an den stimulierten MCF-7 Zellen zeigen keinen deutlichen Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen. Sie sind bei fast allen Gruppen sehr konstant und schwanken in den ersten 50h zwischen 0,8 und 1,2. Nach 50h zeigen die meisten Gruppen Ansäuerungsraten zwischen 0,6 und 1. n: Anzahl auswertbarer Wells einer Gruppe. ....* 106
- Abbildung 4-23: *Morphologie von MCF-7 Zellen nach Anlegen des elektrischen Feldes (Wechselspannung 715mV, 100Hz). a) Kontrolle, 1.Tag; b) Kontrolle, 5.Tag; c) Behandelnde Zellen vor elektrischer Stimulation, 1.Tag; d) Behandelnde Zellen nach 108h elektrischer Stimulation, 5.Tag. Die morphologische Untersuchung zeigte, dass die elektrische Stimulation die Zellmorphologie nicht unmittelbar erkennbar beeinflusst. In anderen Wells zeigte sich ein vergleichbares Verhalten. ....* 107
- Abbildung 4-24: *Metabolische Messung zur Bestimmung des Einflusses von einem sinusförmigen elektrischen Feld (Frequenz 150kHz) auf MCF-7 Zellen: Sauerstoffverbrauch von mit einem elektrischen Feld behandelten und nicht behandelten MCF-7 Zellen (auf Start der Stimulation normierte Mittelwerte). Wechselspannungen: 50mV, 200mV und 715mV. Bei der Stimulation mit 150kHz tritt zunächst bei allen Gruppen nach ca. 15h ein plötzlicher Abfall im Sauerstoffverbrauch ein, der bei der Gruppe mit der höchsten angelegten Spannungsamplitude (715mV) am stärksten ist. Der Sauerstoffverbrauch geht dabei um die Hälfte zurück. Zwischen 20h und 60h zeigen alle Kurven einen Anstieg, der ab 75h langsam in eine Sättigung übergeht. Die Gruppe ohne angelegte Spannung (Kontrollgruppe) zeigt den größten Sauerstoffverbrauch. Die Gruppen mit niedriger angelegter Spannung (50mV; 200mV) zeigen nach 80 h einen beinahe konstanten Sauerstoffverbrauch, der zwischen 1,5 und 1,7 schwankt. Bei der Gruppe mit der höchsten Spannungsamplitude (715mV) zeigt sich nach dem Erreichen 80h ein beinahe konstanter Sauerstoffverbrauch, der zwischen 1 und 1,2 schwankt. Nach der Stimulation (Zeitpunkt t=120h) wurde der Versuch mit einem Tritonabschluss (0,1% Triton X-100) als Positivkontrolle beendet. Gesamtzellzahl  $5 \times 10^4$  Zellen/Well. Nach 12h Monitoring im IMR ohne E-Feld wurden die Zellen 108h elektrisch stimuliert. n: Anzahl auswertbarer Wells einer Gruppe. ....* 109
- Abbildung 4-25: *Metabolische Messung zur Bestimmung des Einflusses von einem sinusförmigen elektrischen Feld (Frequenz 150kHz) auf MCF-7 Zellen: Ansäuerung an den mit einem elektrischen Feld behandelten und unbehandelten MCF-7 Zellen (auf Start der Stimulation normierte Mittelwerte). Wellspannungen: 715mV, 200mV, 50mV. Die Ansäuerungsraten an den stimulierten MCF-7 Zellen zeigen keinen deutlichen Unterschied zu den nicht stimulierten MCF-7 Zellen. Die extrazellulären Ansäuerungsraten zeigen ein sehr starkes Rauschen und ebenso einen starken Abbau nach 10h. Hierbei fallen die Raten von 1 auf zwischen 0,4 und 0,8. Nach 50h nähern sich sämtliche Kurven einander an und schwankt bis Ende der Messung zwischen 0,4 und 0,8. n: Anzahl auswertbarer Wells einer Gruppe. ....* 110
- Abbildung 4-26: *Morphologie von MCF-7 Zellen nach Anlegen des elektrischen Feldes (Wechselspannung 715mV, 150kHz). a) Kontrolle, 1.Tag; b) Kontrolle, 5.Tag; c) Behandelnde Zellen*

vor elektrischer Stimulation, 1.Tag; d) Behandelnde Zellen nach 108h elektrischer Stimulation, 5.Tag. Während der Messung sieht man keine unmittelbar erkennbaren Unterschiede in der Morphologie der beiden Gruppen. In anderen Wells zeigte sich ein vergleichbares Verhalten.....	111
Abbildung 4-27: Elektrische Stimulation von MCF-7 Zellen, kapazitive Befeldung, 15V; Mittelwerte der gemessenen Zellzahlen (n=3) mit dazugehörigen Standardabweichungen bei (a) 100Hz und (b) 150kHz. Bei der Stimulation mit 100Hz ist der Mittelwert der Gruppe mit 1mm Elektrodenabstand leicht geringer als in der Kontrollgruppe. Der Mittelwert der Gruppe mit 3mm Elektrodenabstand ist hingegen sogar höher als in der Kontrollgruppe. Die Standardabweichungen der Tests überschneiden sich jeweils mit der Kontrolle. Die mit 150kHz stimulierten Gruppen weisen bei beiden Elektrodenabständen niedrigere Mittelwerte als die nicht stimulierte Kontrollgruppe auf. Dabei unterscheiden sich die Standardabweichungen der stimulierten Wells mit der Kontrolle nicht. ....	112
Abbildung 4-28: Morphologie von MCF-7 Zellen nach Anlegen des kapazitiv eingespeisten elektrischen Feldes (Wechselspannung 15V, 100Hz). a) Kontrolle, 1.Tag; b) Kontrolle, 4.Tag; c) Behandelnde Zellen vor der elektrischen Stimulation, 1.Tag; d) Behandelnde Zellen nach 96h elektrischer Stimulation, 4.Tag. Beide Gruppen zeigen größtenteils intakte Zellen, jedoch zeigte sich kein unmittelbar erkennbarer Unterschied in der Morphologie der beiden Gruppen. Elektrodenabstand 3mm. In anderen Wells zeigte sich ein vergleichbares Verhalten.....	115
Abbildung 4-29: Morphologie von MCF-7 Zellen nach Anlegen des kapazitiv eingespeisten elektrischen Feldes (Wechselspannung 15V, 150kHz). a) Kontrolle, 1.Tag; b) Kontrolle, 4.Tag; c) Behandelnde Zellen vor der elektrischen Stimulation, 1.Tag; d) Behandelnde Zellen nach 96h elektrischer Stimulation, 4.Tag. In beiden Gruppen sind die meisten Zellen intakt, jedoch zeigte sich kein unmittelbar erkennbarer Unterschied in der Morphologie der beiden Gruppen. Elektrodenabstand 3mm. In anderen Wells zeigte sich vergleichbares Verhalten. ....	117
Abbildung 4-30: Mammakarzinomzellen (MCF-7) auf einem Glas-Sensorchip in HEPES-PS unter Zugabe von 2µM DiBAC <sub>4</sub> (3). Die Zellen sind einem elektrischen Feld von -2,3kV/m (rechnerische Werte) über den IDEs ausgesetzt. Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten. ....	118
Abbildung 4-31: MCF-7 Zellen in HEPES-gepufferter Salzlösung, beladen mit 2µM DiBAC <sub>4</sub> (3), pH=7,4: a) Fluoreszenzantwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von -2,3kV/m ausgesetzt ist (Feldrichtung von unten nach oben); b) Zelle ohne appliziertes elektrisches Feld; c) Fluoreszenzantwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von +2,3kV/m in Gegenrichtung ausgesetzt ist (Feldrichtung von oben nach unten) d) Differenz der Bilder c) und a). Der graue Hintergrund wurde als Null-Wert angenommen. ....	119
Abbildung 4-32: Membranpotentialänderung an einer MCF-7 Zelle induziert durch ein extern appliziertes elektrisches Feld von -2,3kV/m: a) DiBAC <sub>4</sub> (3) Fluoreszenzänderung an einer Zelle; b) theoretischer Kurvenverlauf eines Membranpotentials entlang der Zellmembran. ....	119
Abbildung 4-33: Fluoreszenzintensität, gemessen an der Zellmembran einer MCF-7 Zelle: Zelle einem elektrischen Feld von -2,3kV/m ausgesetzt (rote Kurve); Zelle keinem elektrischen Feld ausgesetzt (schwarze Kurve, Kontrolle). ....	120
Abbildung 4-34: Membranpotentialverlauf an einer Mammakarzinomzelle (MCF-7) in HEPES-gepufferter Salzlösung mit 2µM DiBAC <sub>4</sub> (3), pH=7,4, die einem elektrischen Feld von -2,3kV/m ausgesetzt war. ....	120
Abbildung 4-35: Membranpotentialänderung an einer MCF-7 Zelle induziert durch ein in Gegenrichtung extern appliziertes elektrisches Feld von 2,3kV/m: a) DiBAC <sub>4</sub> (3) Fluoreszenzänderung an der Zelle; b) theoretischer Kurvenverlauf des Membranpotentials entlang der Zellmembran. ....	121
Abbildung 4-36: Fluoreszenzintensität, gemessen an der Zellmembran einer MCF-7 Zelle: Zelle einem elektrischen Feld von -2,3kV/m ausgesetzt (rote Kurve), Zelle einem in Gegenrichtung geschalteten elektrischen Feld von +2,3kV/m ausgesetzt (blaue Kurve). ....	121
Abbildung 4-37: Membranpotentialverlauf an einer Mammakarzinomzelle (MCF-7) in HEPES-gepufferter Salzlösung mit 2µM DiBAC <sub>4</sub> (3), pH=7,4, die zuerst einem elektrischen Feld von -2,3kV/m und dann einem Gegenfeld von +2,3kV/m über die IDEs ausgesetzt war. ....	122
Abbildung 4-38: Membranpotentialänderung induziert durch ein in Gegenrichtung extern appliziertes elektrisches Feld von +2,3kV/m an einer MCF-7 Zelle: a) DiBAC <sub>4</sub> (3) Fluoreszenzänderung an einer Zelle; b) theoretischer Kurvenverlauf eines Membranpotentials entlang der Zellmembran. ....	123

<i>Abbildung 4-39: MCF-7 Zellen in HEPES-gepufferter Salzlösung, beladen mit 2µM DiBAC<sub>4</sub>(3), pH=7,4:</i>	
<i>a) Fluoreszenzantwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von +2,3kV/m ausgesetzt ist (Feldrichtung von oben nach unten); b) Zelle ohne appliziertes elektrisches Feld; c) Fluoreszenzantwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von -2,3kV/m in Gegenrichtung ausgesetzt ist (Feldrichtung von unten nach oben) d) Differenz der Bilder c) und a). Der graue Hintergrund wurde als Null-Wert angenommen.</i>	123
<i>Abbildung 4-40: Fluoreszenzintensität, gemessen an der Zellmembran einer MCF-7 Zelle: Zelle einem elektrischen Feld von +2,3kV/m ausgesetzt (blaue Kurve); Zelle keinem elektrischen Feld ausgesetzt, Kontrolle (schwarze Kurve).</i>	
	124
<i>Abbildung 4-41: Membranpotentialverlauf an einer Mammakarzinomzelle (MCF-7) in HEPES-gepufferter Salzlösung mit 2µM DiBAC<sub>4</sub>(3), pH=7,4, die einem elektrischen Feld von +2,3kV/m ausgesetzt war.</i>	
	124
<i>Abbildung 4-42: Mammakarzinomzellen (MCF-7) auf einem Glas-Sensorchip in HEPES-PS unter Zugabe von 2µM DiBAC<sub>4</sub>(3). Die Zellen sind einem elektrischen Feld von -230V/m über die Längenelektroden ausgesetzt. Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten.</i>	
	125
<i>Abbildung 4-43: MCF-7 Zellen in HEPES-gepufferter Salzlösung, beladen mit 2µM DiBAC<sub>4</sub>(3), pH=7,4:</i>	
<i>a) Fluoreszenzantwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von -230V/m ausgesetzt ist (Feldrichtung von unten nach oben); b) Zelle ohne appliziertes elektrisches Feld; c) Fluoreszenzantwort einer Zelle, die einem elektrischen Feld von +230V/m in Gegenrichtung ausgesetzt ist (Feldrichtung von oben nach unten) d) Differenz der Bilder c) und a). Der graue Hintergrund wird als Null-Wert angenommen.</i>	126
<i>Abbildung 4-44: Fluoreszenzintensität, gemessen an der Zellmembran einer MCF-7 Zelle: Zelle einem elektrischen Feld von -230V/m ausgesetzt (rote Kurve); Zelle keinem elektrischen Feld ausgesetzt, Kontrolle (schwarze Kurve).</i>	
	126
<i>Abbildung 4-45: Membranpotentialverlauf an einer Mammakarzinomzelle (MCF-7) in HEPES-gepufferter Salzlösung mit 2µM DiBAC<sub>4</sub>(3), pH=7,4, die einem elektrischen Feld von -230V/m ausgesetzt war.</i>	
	127
<i>Abbildung 4-46: Sauerstoffverbrauchsmessung von MCF-7 Zellen in einer 24-Well iMWP unter Verwendung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporters Amilorid (40µM) und Variation der extrazellulären pH-Werte. Die Werte sind auf den Wert der Wirkstoffzugabe 24h normiert. Gesamtzellzahl 5×10<sup>4</sup> Zellen/Well. Entnommen aus [181].</i>	
	128
<i>Abbildung 4-47: Membranpotential gemessen an MCF-7 Zellen in HEPES-PS bei pH=7,4; pH=7,0 und MES-PS bei pH=6,5. Die Inkubationszeit betrug 45 min.</i>	
	129
<i>Abbildung 4-48: Morphologie der MCF-7 Zellen nach Variation des extrazellulären pH-Werts (pH=7,4) unter Verwendung des Kanalblockers Amilorid (40µM). Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten. Die morphologische Untersuchung zeigte, dass die Zellmorphologie nicht unmittelbar erkennbar beeinflusst wurde. In anderen Wells zeigte sich ein vergleichbares Verhalten.</i>	
	130
<i>Abbildung 4-49: Morphologie der MCF-7 Zellen nach Variation des extrazellulären pH-Werts (pH=7,0) unter Verwendung des Kanalblockers Amilorid (40µM). Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten. Die morphologische Untersuchung zeigte, dass die Zellmorphologie nicht unmittelbar erkennbar beeinflusst wurde. In anderen Wells zeigte sich ein vergleichbares Verhalten.</i>	
	131
<i>Abbildung 4-50: Morphologie der MCF-7 Zellen nach Variation des extrazellulären pH-Werts (pH=6,5) unter Verwendung des Kanalblockers Amilorid (40µM). Die Inkubationszeit betrug 45 Minuten. Die morphologische Untersuchung zeigte, dass die Zellmorphologie nicht unmittelbar erkennbar beeinflusst wurde. In anderen Wells zeigte sich ein vergleichbares Verhalten.</i>	
	132
<i>Abbildung 5-1: Schema der Signaltransduktion, die durch die Wirkung externer elektrischer Felder hervorgerufen wird. Dadurch können das Membranpotential, der intrazelluläre pH-Wert, die Bildung des Spindelapparates und die Kaliumionenkonzentration beeinflusst werden (entnommen aus [135]).</i>	
	144
<i>Abbildung 6-1: Berechneter Spannungsverlauf (a) und Feldverlauf (b) am Boden eines Wells der 6-Well-Platte in und an einer Zelle, die sich am Boden eines Wells der 6-Well-Platte befindet. Die 6-Well-Platte ist auf eine Befeldungsplatine gestellt. Die Zellen wurden mit einer Spannung von 15V und einer Frequenz von 100Hz stimuliert. Der Elektrodenabstand beträgt 3mm.</i>	
	158

Abbildung 6-2: Berechneter Spannungsverlauf (a) und Feldverlauf (b) am Boden eines Wells der 6-Well-Platte in und an einer Zelle, die sich am Boden eines Wells der 6-Well-Platte befindet. Die 6-Well-Platte ist auf eine Befeldungsplatine gestellt. Die Zellen wurden mit einer Spannung von 15V und einer Frequenz von 150kHz stimuliert. Der Elektrodenabstand beträgt 3mm. ....	158
Abbildung 6-3: Berechneter Spannungsverlauf (a) und Feldverlauf (b) am Boden eines Wells der 6-Well-Platte in und an einer Zelle, die sich am Boden eines Foliensubstrates befindet. Die 6-Well-Platte ist auf eine Befeldungsplatine gestellt. Die Zellen wurden mit einer Spannung von 10kV und einer Frequenz von 150kHz stimuliert. Der Elektrodenabstand beträgt 1mm. ....	159
Abbildung 6-4: Berechneter Spannungsverlauf (a) und Feldverlauf (b) in und an einer Zelle, die sich am Boden eines mit SU-8 Lack passivierten Glas-Sensorchips befindet. Die Zellen wurden mit einer Spannung von 50V und einer Frequenz von 150kHz stimuliert. Der Elektrodenabstand beträgt 50µm. ....	160
Abbildung 6-5: Berechneter Feldverlauf in und an einer Zelle, die sich zwischen zwei Stimulationselektroden in einem Messmedium befindet, mit einer Stimulationsspannung von 750mV und einer Frequenz von 100Hz. Elektrodenabstand beträgt 3mm. Vergrößerte Abbildung. ....	161
Abbildung 6-6: Layout eines Wells der Multiwellplatte. Die Sauerstoffverbrauchs- und Ansäuerungsrate sind Indikatoren für den Stoffwechsel. A1: Fläche, die durch die Diffusionslänge, die Sauerstoffionen in Zellkulturmedium während der Ruhephase zwischen Pipettierzyklen zurücklegen, bestimmt wird; A2: Fläche des Sauerstoffsensors; A3 und A4: Flächen, die keine stimulierten Zellen bewachsen.....	176
Abbildung 6-7: Layout eines Wells der Multiwellplatte. Die Sauerstoffverbrauchs- und Ansäuerungsrate sind Indikatoren für den Stoffwechsel. A <sub>5</sub> : Fläche, die durch die Diffusionslänge, die Protonen in Zellkulturmedium während der Ruhephase zwischen Pipettierzyklen zurücklegen, bestimmt wird; A <sub>6</sub> : Fläche des pH-Wert-Änderung-Sensors; A <sub>7</sub> und A <sub>8</sub> : Flächen, die keine stimulierten Zellen bewachsen.....	177
Abbildung 6-8: Ringplatine: Layout. Rot: oberer Layer, blau: unterer Layer, schwarz: oberer mittlerer Layer, grün: unterer mittlerer Layer. ....	179
Abbildung 6-9: Ringplatine: Schaltüplan. ....	183



## TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 2-1: Übersicht über Systeme des Ionentransportes durch biologische Membranen. Ein passiver Transport erfolgt entweder durch Diffusion oder den Cotransport. Bei der Diffusion wird ein Solut von einer Seite der Membran zur anderen durch Poren oder Kanäle transportiert. Solche Transporter bezeichnet man als Uniporter. Zum anderen kann der passive Transport durch Cotransport erfolgen, wobei man zwischen dem Symport und dem unterscheidet. Ebenfalls als passiven Transport betrachtet man die Elektrodifffusion für Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>- Kanäle. Im Falle des aktiven Transports ist das Transportsystem an einen energielieferenden Prozess gebunden. Dabei passiert der Transport gegen einen elektrochemischen Gradienten. Den größten Teil solcher Transporter bilden die sogenannten Transport-ATPasen, wobei die Energie aus der Hydrolyse des ATP zu ADP gewonnen wird. Aktive Transporter können sowohl elektroneutral als auch rheogen sein. Entnommen aus [80].</i>	15
<i>Tabelle 3-1: IMR Spannungen an Wells. Durch verschiedene Vorwiderstände kommt es zu unterschiedlichen Spannungsstärken an den IDEs. Jeweils drei Wells bilden dabei eine Gruppe durch identische Vorwiderstände. Bei einer Spannungsamplitude von 750mV tritt eine Feldstärke von ca. 2,3kV/m auf.</i>	67
<i>Tabelle 3-2: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in mit 2 µM DiBAC<sub>4</sub>(3) markierten MCF-7 Zellen bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Die Inkubationszeit betrug jeweils 45 min.</i>	79
<i>Tabelle 5-1: Elektrochemische Reaktionen auf den Platin-Elektroden. Die Elektrode wird als Anode betrachtet (entnommen aus [39]).</i>	134
<i>Tabelle 5-2: Mögliche Reaktionen, die den Ladungstransfer zwischen den Platin-Elektroden und dem Medium bzw. Zellen beschreiben (entnommen aus [39]).</i>	135
<i>Tabelle 6-1: Zusammenfassung der verwendeten Chemikalien und Lösungen.</i>	152
<i>Tabelle 6-2: Zusammensetzung der DiBAC<sub>4</sub> (3) Eichlösungen.</i>	153
<i>Tabelle 6-3: Zusammenfassung der verwendeten Geräte.</i>	154
<i>Tabelle 6-4: Zusammenfassung der verwendeten Software.</i>	155
<i>Tabelle 6-5: Impedanzmessung: Betrag der Impedanz von Mikroelektroden, gemessen mit einer Spannung von 200mV, 500mV und 750mV im Frequenzbereich von 10<sup>0</sup>Hz bis 10<sup>6</sup>Hz. Chip ohne Zellen. Direkte Feldeinspeisung, Kontrolle.</i>	156
<i>Tabelle 6-6: Impedanzmessung: Betrag der Impedanz von Mikroelektroden, gemessen mit einer Spannung von 200mV, 500mV und 750mV im Frequenzbereich von 10<sup>0</sup>Hz bis 10<sup>6</sup>Hz. Chip ohne Zellen. Kapazitive Feldeinspeisung, Kontrolle.</i>	156
<i>Tabelle 6-7: Impedanzmessung: Betrag der Impedanz von Mikroelektroden, gemessen mit einer Spannung von 200mV, 500mV und 750mV im Frequenzbereich von 10<sup>0</sup>Hz bis 10<sup>6</sup>Hz. Messung mit MCF-7 Zellen. Direkte Feldeinspeisung.</i>	156
<i>Tabelle 6-8: Impedanzmessung: Betrag der Impedanz von Mikroelektroden, gemessen mit einer Spannung von 200mV, 500mV und 750mV im Frequenzbereich von 10<sup>0</sup>Hz bis 10<sup>6</sup>Hz. Messung mit MCF-7 Zellen. Kapazitive Feldeinspeisung.</i>	157
<i>Tabelle 6-9: Zelldichte der auf dem Glas-Sensorchip kultivierten Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten bei unbehandelten MDA-MB-231 Zellen (Kontrolle) und mit elektrischem Feld stimulierten Zellen.</i>	163
<i>Tabelle 6-10: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test bei zwei Stichproben, p&lt;0,05). Elektrische Stimulation der MDA-MB<sub>231</sub> Zellen auf den Glas-Sensorchip, n=6.</i>	163
<i>Tabelle 6-11: Zellzahl von elektrisch stimulierten MCF-7 Zellen gegenüber nicht stimulierten Zellen.</i>	164
<i>Tabelle 6-12: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test bei zwei Stichproben, p&lt;0,05). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP, n=6.</i>	164
<i>Tabelle 6-13: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, p&lt;0,05). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Niederfrequente Feldpulse, 100Hz.</i>	165

Tabelle 6-14: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 100Hz. Anregungsspannung 50mV. ....	166
Tabelle 6-15: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 100Hz. Anregungsspannung 200mV. ....	166
Tabelle 6-16: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 100Hz. Anregungsspannung 715mV. ....	166
Tabelle 6-17: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 150kHz. Anregungsspannung 50mV. ....	167
Tabelle 6-18: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 150kHz. Anregungsspannung 200mV. ....	167
Tabelle 6-19: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 150kHz. Anregungsspannung 715mV. ....	168
Tabelle 6-20: Widerstandswerte, gemessen an Temperatursensor Pt1000 an beiden Glas-Sensorchips bei 37°C und 40°C. ....	169
Tabelle 6-21: Widerstandswerte, gemessen an Temperatursensor Pt1000, während der elektrischen Stimulation (30h) an beiden Glas-Sensorchips. ....	169
Tabelle 6-22: Temperaturwerte, gemessen an Temperatursensor Pt1000, während der elektrischen Stimulation (30h) an beiden Glas-Sensorchips. ....	170
Tabelle 6-23: Elektrische Stimulation: Kapazitive Befeldung 100Hz; Zellzahl. ....	170
Tabelle 6-24: Elektrische Stimulation: Kapazitive Befeldung 150kHz; Zellzahl. ....	170
Tabelle 6-25: Elektrische Stimulation: Kapazitive Befeldung 150kHz; Zellzahl. ....	171
Tabelle 6-26: Elektrische Stimulation: Kapazitive Befeldung 100Hz; Fluoreszenzanalyse. ....	171
Tabelle 6-27: Elektrische Stimulation: Kapazitive Befeldung 150kHz; Fluoreszenzanalyse. ....	171
Tabelle 6-28: Elektrische Stimulation: Kapazitive Befeldung 150kHz; Fluoreszenzanalyse. ....	171
Tabelle 6-29: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 100Hz. Anregungsspannung 15V. Kapazitive Feldeinspeisung. ....	172
Tabelle 6-30: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 100Hz. Anregungsspannung 15V. Kapazitive Feldeinspeisung. ....	172
Tabelle 6-31: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 150kHz. Anregungsspannung 15V. Kapazitive Feldeinspeisung. ....	173
Tabelle 6-32: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, $p < 0,05$ ). Elektrische Stimulation der MCF-7 Zellen in einer iMWP. Harmonische Feldpulse, 150kHz. Anregungsspannung 15V. Kapazitive Feldeinspeisung. ....	173
Tabelle 6-33: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in 2µM DiBAC <sub>4</sub> (3) beladenen MCF-7 Zellen bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Inkubationszeit betrug 20 min. ....	174
Tabelle 6-34: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in 2µM DiBAC <sub>4</sub> (3) beladenen MCF-7 Zellen bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Inkubationszeit betrug 45 min. ....	174
Tabelle 6-35: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in 2µM DiBAC <sub>4</sub> (3) beladenen MCF-7 Zellen bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Inkubationszeit betrug 65 min. ....	174
Tabelle 6-36: Abhängigkeit der Fluoreszenzintensität vom Nernst-Potential in 2µM DiBAC <sub>4</sub> (3) beladenen MCF-7 Zellen bei verschiedenen extrazellulären Kaliumkonzentrationen. Inkubationszeit betrug 80 min. ....	175

---

<i>Tabelle 6-37: Messung des Membranpotentials unter Verwendung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austausch-Karrierblockers Amilorid und Variationen der extrazellulären pH-Werte. Fluoreszenzanalyse. ....</i>	<i>181</i>
<i>Tabelle 6-38: Messung des Membranpotentials unter Verwendung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austausch-Karrierblockers Amilorid und Variationen der extrazellulären pH-Werte nach einer Kalibrierungskurve in mV umgerechnet. ....</i>	<i>181</i>
<i>Tabelle 6-39: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, p&lt;0,05). Messung des Membranpotentials unter Variationen der extrazellulären pH-Werte. ....</i>	<i>181</i>
<i>Tabelle 6-40: Statistische Auswertung der Versuchsergebnisse (t-Test, p&lt;0,05). Messung des Membranpotentials unter Verwendung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austausch-Karrierblockers Amilorid und Variation der extrazellulären pH-Werte.....</i>	<i>182</i>



## VERÖFFENTLICHUNGEN

Hafner, L., Wolf, B.: *Effects of electric and magnetic fields on tumor cell growth*, European Journal of Cell Biology, S.33, Vol. 89 S1, Suppl. 60, ISSN 0171-9335, Elsevier, 33. Annual meeting of the DGZ, Regensburg 2010

Hafner, L., Wolf, B.: *Feldinduzierte metabolische Veränderungen an Tumorzellen*, Heinz Nixdorf Symposium 12.-13.10.2010, München

Hafner L., Brischwein M., Wolf B.: *Metabolic changes in tumor cells induced by electric fields*, 34. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, 30.3.- 2.4.11, Bonn

Hafner, L., Brischwein, M., Wolf, B.: *Effect of electric field on metabolism of tumor cells*, 35. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, 21.3.- 24.3.12, Dresden

B. Wolf, L. Hafner, M. Brischwein, H. Grothe, M. Remm, A. Michelfelder: *EvoPot: Konzepte für eine bioelektronische Tumorthherapie*. In: Bernhard Wolf (Hg.): Bioelektronische Diagnose- und Therapiesysteme. m3: microelectronic meets medicine, 1. Aufl. 2012, Aachen: Shaker Verlag, pp. 139–146. ISBN: 978-3-8440-0831-9

L. Hafner, B. Wolf: *Feldinduzierte metabolische Veränderungen an Tumorzellen*. In: Bernhard Wolf (Hg.): Bioelektronische Diagnose- und Therapiesysteme. m3: microelectronic meets medicine, 1. Aufl. 2012, Aachen: Shaker Verlag, pp. 139–146. ISBN: 978-3-8440-0831-9

Hafner, L., Wolf, B.: *Feldinduzierte metabolische Veränderung an Tumorzellen*, 128. Versammlung der GDNÄ, 13.-15.09.2014, Mainz

L. Hafner, Brischwein, M., Wolf, B.: *Effect of electric field on tumor cell growth: Beiträge zur 49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Biomedizinische Technik im VDE - BMT 2015*, 16.09.-18.09.2015, Lübeck