

***Untersuchungen zu der Fragestellung, ob
makroskopische dielektrische
Gewebeeigenschaften auch auf Zellebene
bzw. im subzellulären Bereich
uneingeschränkte Gültigkeit besitzen***

Abschlussbericht

Autoren:

Lehrstuhl für Experimentalphysik V

Prof. Dr. A. Loidl

Priv.-Doz. Dr. P. Lunkenheimer

Dipl. Phys. R. Gulich

Lehrstuhl für Experimentalphysik I

Prof. Dr. Achim Wixforth

Dr. Matthias Schneider

Lehrstuhl für Theoretische Physik I

Prof. Dr. Peter Hänggi

Dr. Gerhard Schmid

Institut für Physik

Universität Augsburg

Februar 2008

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

Studies on the issue, if macroscopic dielectric properties of tissues have unlimited validity in both cellular and subcellular dimensions

Summary

Dielectric properties of biological tissues are typically considered as homogeneous macroscopic quantities. The challenge of this present study is to perform dielectric spectroscopy in a variety of cells and cell suspensions which are exposed to frequencies between 100 MHz and 40 GHz, at temperatures ranging between 20° C and 50° C. The aim has been at identifying and searching for specific absorption or resonance phenomena, possibly occurring specifically at frequencies that are typical for modern telecommunication techniques. In addition these measurements were performed at varying excitation voltages, thus exploring possible non-linear effects. These dielectric investigations can be directly compared to patch clamp measurements conducted on single cells. Utilizing patch-clamp techniques permeability measurements have been accomplished with and without exposure to high-frequency radiation. Moreover, suitable theoretical modelling studies, using state-of-the art theories on charge transfer in biological materials do provide insight into the complex response and absorption processes in cells, arrays of cells and also on the sub-cellular range. By modelling the dynamics of the membrane potential it is documented that in linear-response theory the biological system generically responds inversely to the excitation frequency and hence the response behaviour to exposed GHz electromagnetic radiation is weak. This result is corroborated with diverse experimental results which demonstrate that the absorption of electromagnetic radiation in biological matter in fact mainly results from water-like relaxation phenomena.

The first part of this report deals with the dielectric spectroscopy on pure water, on electrolytic solutions, on membranes and on a variety of cells dissolved in different solutions including whole blood, fibroblasts and melanoma cells. In a first step we provide extensive measurements and a detailed analysis of pure water. In biological matter, the relevant relaxation processes in the GHz regime are similar to the case of pure water relaxation. Moreover, when aiming to detect additional relaxation or resonance processes in cell solutions, it is indispensable to obtain an optimal description of dielectric relaxation phenomena in water. These results are depicted with figures 1.7, 1.8 and 1.9; to our best knowledge, these are presently the best data available in a broad frequency range.

In a second step we studied the influence of electrolytes to dielectric relaxation. DC-conductivity and relaxation phenomena of water molecules which are embedded in ions of the electrolyte are studied for NaCl and KCl solutions as function of frequency, temperature and electrolyte concentration. By detailed analysis we were able to parameterize the complex relaxation in the two electrolytes under

consideration as function of frequency, temperature and concentration by use of 14 parameters. Within this set of 14 parameters it is possible to compute all, the dielectric constant, the loss or the conductivity at any given frequency, temperature or concentration. This method can naturally be extended to other electrolytes and can be used to predict the conductivity of a biological system, which ultimately determines the SAR values at any frequency and temperature values.

Within this project we mainly elaborate on the physics of the complex dielectric constant, documented throughout this report with corresponding physical, real-valued quantities such as the dielectric constant, the dielectric loss and the conductivity. These measures were studied for model membranes (DMPC, DPPC and DOPC), on blood and on red blood cells with different concentrations. In blood and in the red blood cells we found indications of an additional relaxation close to 3 GHz. An experimental demonstration of the fact that this relaxation does exist is shown in Fig. 2.35. It constitutes a weak relaxation and increases the loss of the water-type relaxation close to 3 GHz by approximately 20 %. Finally, a detailed study of nerve cells, fibroblasts, keratinocytes and melanoma cells in different solutions is provided. For all cell types we systematically searched for non-linear effects. However, even at the largest applied external fields the results still were within the linear response regime and consistent with general predictions from theory. We also tried to estimate the values of the local electric field in the suspensions. Based on modern theories we claim that the local field that acts on cells in solutions with a dielectric constant larger than 30 is of the order $E_a/3$, where E_a is the externally applied voltage.

In the second part of this project, ion transport across cell membranes has been studied utilizing patch-clamp techniques. Ion currents result from transport of ions across the cell membrane. To gain insight of the lipid bi-layer in these transport phenomena we performed experiments on Black Lipid Membranes (BLM), using artificial lipid membranes. Surprisingly, we were able to demonstrate the existence of discrete current fluctuations in protein free systems, with different time scales (1...2 orders of magnitude) both in the fluid and the fluid – gel coexisting phases. We propose a model, which is able to describe those different time scales, exploiting the fact of the observed proportionality between heat capacity and ion permeability as well as the proportionality between heat capacity and compressibility put forward by Heimburg (1998). Permeability measurements have been performed both in the absence and presence of high frequency radiation, in order to study a possibly harmful influence. However, within the resolution of our experiments, we did not find any effect of such radiation for SAR levels exceeding 15 W/kg.

Following these experiments, we performed patch-clamp experiments on living cells using three different types of cell lines: Melanoma cells, fibroblast and keratinocytes. Melanoma cells were studied at 900, 1800, 2400 MHz and 22 GHz. Furthermore a frequency sweep was performed between 700 MHz and 33 GHz at SAR values significantly above 1 W/kg ($\overline{SAR} \approx 25...100 \cdot 10^3 \text{ W / kg}$).

In conclusion, no reproducible gating effects were observed given the precision of our data. In fact, all reproducible data seem can consistently be described as a consequence of an accompanying increase of the surrounding bath temperature. This finding is in good agreement with measurements and theory over a wider frequency range, where we observe increased ion permeability around 22 GHz

independent of cell type and applied power. A simple model for the absorbed power revealed an RF induced increase in temperature between 3 and 9° C ($P = +12$ dBm, $f \approx 22$ GHz). At the same time, when tracing the increase in ion permeability back to elevated ion mobility, we predict a temperature increase of 6° C, well in the range calculated above. This good agreement supports the assumption that the increase of the observed current is a direct consequence of the absorption characteristics of water.

Although it turned out, that our used experimental set-up has its limitations in terms of sensitivity and robustness, we are confident to supply some useful results concerning the impact of RF on a single cell level.

The fact that even highly active melanoma cells seem not to be influenced in their gating behaviour at SAR values exceeding 15 W/kg suggests that an influence of RF signals on less active cells is unlikely. However, because of the complexity of biological systems we went on to confirm this assumption and performed further frequency sweeps at different temperatures on melanoma cells as well as on fibroblast and keratinocytes. Again, we were able to explain all reproducible experimental findings by temperature effects in the surrounding water.

The final part of this project deals with the theoretical modelling. The charge transport in cells occurs via ion channels. They are made up of transport proteins which are embedded in the cell membrane. Typically these ion channels exhibit a voltage sensitivity which is controlled by charged segments of the protein. During gating, i.e. when the switching process between open and closed states takes place, this charge is transported across the cell membrane. This polarization current was measured earlier within Patch Clamp experiments. In our studies we theoretically investigate the influence of this polarization current and of stochastic channel gating on membrane potential dynamics. We found that within the generally accepted Hodgkin-Huxley-type modelling the intrinsic time scales of the dynamics of the membrane potential are slightly modified by gating charge effects. Within linear response theory the system's response decays inversely to the frequency of an external stimulus. This implies that the response to electromagnetic radiation in the regime of MHz - GHz is naturally quite weak, at such high frequencies. Within the report this fact is demonstrated theoretically and experimentally both for the deterministic as well as for the stochastic situations with fluctuations present. Moreover, we show that ensembles of weakly coupled cells exhibit a relative response function similar to that of a single cell. Therefore, we conclude that the ensemble response to a weak electromagnetic field would decay with the inverse frequency of the radiation in the MHz-to-GHz regime. From this observation we clearly cannot expect resonances of the membrane dynamics due to a high frequency electromagnetic radiation. We could exclude omnipresent intrinsic noise for generating resonances in this high frequency regime. In fact, possible anomalous signal amplification due to noise, namely the effect of Stochastic Resonance, can not cause the amplification of weak signals within the MHz-to-GHz regime. The amplification factor scales with one over the squared signal frequency in this regime; hence the effect of Stochastic Resonance is dramatically suppressed in the high frequency limit.

A detected, very weak maximum of the induced membrane potentials in the GHz regime is mainly due to the dispersion of the surrounding water. For weak signals

taken within the basis restriction regime this later effect is very small compared to voltage fluctuations stemming from intrinsic conductance fluctuations.

According to our findings we theoretically and experimentally detected no evidence for the emergence of resonant behaviour of aggregates of cellular systems being exposed to high frequency electromagnetic waves which in turn would pose a risk to health. Therefore, we see no need to adjust the present valid values of basis restrictions (such as for SAR, current-densities, etc.) that would prevent a harmful generation of resonance phenomena in the physiologically MHz-to-GHz response regime.

Untersuchungen zu der Fragestellung, ob makroskopische dielektrische Gewebeeigenschaften auch auf Zellebene bzw. im subzellulären Bereich uneingeschränkte Gültigkeit besitzen

Zusammenfassung

Eine dieser Studie vorgelagerte Bestandsaufnahme (Loidl *et al.* 2006) brachte eine detaillierte Gesamtschau über die existierende Literatur zu dielektrischen Untersuchungen an Zellsuspensionen, Blut, unterschiedlichen Gewebetypen und an Elektrolytlösungen. Von experimenteller Seite kann gesagt werden, dass sehr umfassende dielektrische Studien vorliegen. Es fehlen aber systematische Untersuchungen der Temperatur- und Frequenzabhängigkeit von Zellsuspensionen und Modell-Membranen gerade in dem Frequenzbereich der Mobilfunkfrequenzen. Diese Untersuchungen sollten Hinweise auf mögliche Relaxationsphänomene oder auf resonante Absorptionsprozesse zulassen. Es war bereits vor Beginn dieser Studie klar, dass die Absorption elektromagnetischer Strahlung im GHz Bereich wesentlich durch wasser-ähnliche Relaxationsprozesse verursacht wird. Daher erscheint es sinnvoll, Hinweise auf ein mögliches universelles Absorptions-Verhalten von Zellsuspensionen bei Einwirkung hochfrequenter elektromagnetischer Strahlung zu erhalten. Erst die systematische Untersuchung der Temperaturabhängigkeit der dielektrischen Antwort auf elektromagnetische Felder erlaubt die Entwicklung physikalischer Modelle über die zugrunde liegende Natur der Absorptionsprozesse. In der existierenden Literatur fehlt auch der direkte Fokus auf den Frequenzbereich um 1 GHz, den für den Mobilfunk typischen Frequenzbereich. Diese Schwächen sollen im Rahmen der hier vorgelegten Studie verringert werden.

Theoretische Modellierungsansätze, die bis dato bestanden, betrafen vor allem die Wirkung von ELF (Extremely Low Frequency) und VLF (Very Low Frequency). Allerdings können diese keineswegs als zufrieden stellend bezeichnet werden. So werden hauptsächlich rein deterministische Modelle zur Beschreibung der hochkomplexen Fragestellungen herangezogen. Die Auswirkungen von Fluktuationen und von intrinsischem Rauschen werden fälschlicherweise oft vernachlässigt. Experimentelle Befunde können daher theoretisch nur unzureichend erklärt werden. Insbesondere werden durch die existierenden Theorien die experimentell gefundenen Schwellenwerte nicht reproduziert, bzw. diese überschätzt. Rein deterministische Untersuchungen zeigen, dass über einen sehr großen Frequenzbereich die eingestrahlte elektromagnetische Energie in der Zellmembran dissipiert wird. In der Literaturstudie wurde auf die besondere Rolle eingegangen, die der Zellmembran bezüglich der elektrischen Eigenschaften zukommt. Es ist unsere tiefste Überzeugung, dass die vorhandenen Modellierungsansätze, die vornehmlich auf deterministische Theorien aufbauen, nicht ausreichen, um die experimentellen Ergebnisse zu erklären. Soll ein fundamentales Verständnis zur Fragestellung zum

Einfluss von elektromagnetischer Strahlung im GHz Bereich entwickelt werden, scheint die Herangehensweise mit Methoden der statistischen Physik somit zwingend. Derartige Methoden berücksichtigen die Rolle von intrinsisch auftretenden Fluktuationen, die sich zum Beispiel im thermischen Rauschen oder im so genannten Kanalrauschen äußern. Wie diverse Studien zeigten, können Fluktuationen die Wirkung äußerer Signale bzw. Felder verstärken. Ein prominentes Beispiel hierfür ist der Effekt der Stochastischen Resonanz in der Biologie (Gammaitoni *et al.* 1998). In einer grundlagenorientierten Arbeit gelang es zu zeigen, dass der Effekt der Stochastischen Resonanz im neuronalen Netzwerk eines Säugetiergehirns nachweisbar ist (Gluckman *et al.* 1996). In einer anderen Arbeit konnte das Auftreten des Effekts der Stochastischen Resonanz im Fressverhalten von jungen Löffelstören beobachtet werden (Russel *et al.* 1999).

Dieser Abschlussbericht ist in 3 Teilbereiche unterteilt: Teil I beschreibt makroskopische dielektrische Messungen an Zellsuspensionen unter wohl definierten externen elektrischen Hochfrequenz (HF) Feldern. Teil II beschäftigt sich mit Permeabilitätsmessungen an einzelnen künstlichen Membranen und an Einzel-Zellen mittels Patch Clamp Methoden und Teil III berichtet über die theoretische Modellbildung wie sie im Rahmen dieses Projekts in Abstimmung mit den experimentellen Teilbereichen entwickelt wurde. In Teil I dieses Berichts werden dielektrische Messungen an ultrareinem Wasser, an NaCl- und KCl-Elektrolytlösungen unterschiedlicher Konzentration, an Modellmembranen, an Blut, an Erythrozytensuspensionen mit unterschiedlichen Hämatokritwerten und an Zellsuspensionen verschiedener Körperzellen systematisch durchgeführt und vollständig analysiert und modellhaft beschrieben. Im Abschnitt zur dielektrischen Spektroskopie sind auch einige präparative Arbeiten beschrieben, die von der Biologiegruppe sowohl für die Permeabilitätsmessungen als auch für die dielektrischen Messungen durchgeführt wurden. Ohne diese aufwändige Probenpräparation wäre die Fülle der dielektrischen Messungen, die in dieser Projektstudie durchgeführt wurden, so nicht möglich gewesen.

Die dielektrischen Untersuchungen wurden, wie es im Arbeitsprogramm spezifiziert war, in einem weiten Frequenzbereich von 100 MHz bis 40 GHz und in engen Temperaturschritten in einem Temperaturbereich von 20 °C bis 60 °C durchgeführt, wobei der Schwerpunkt der Messungen natürlich im Bereich der menschlichen Normaltemperatur liegt. Diese detaillierten und systematischen Messungen erlauben eine signifikante und aussagekräftige Analyse. Insbesondere zeigt der direkte Vergleich der Messungen an Elektrolytlösungen und an Zellsuspensionen mögliche Charakteristika der Absorption elektromagnetischer Wellen an Zellen im Hochfrequenzbereich. So finden wir an Vollblut und an Erythrozyten eine zusätzliche Relaxation im Bereich von ca. 3 GHz, die bisher in der Literatur noch nicht beschrieben wurde. Diese Relaxation konnte nur detektiert und analysiert werden, da wir das Spektrum der wasserähnlichen Relaxation in Elektrolytlösungen detailliert charakterisieren konnten. Diese Zusatz-Relaxation trägt zur Leitfähigkeit bei 3 GHz ca. 20 % bei. Die Untersuchungen der Temperaturabhängigkeit der dielektrischen Relaxationen an Zellsuspensionen werden durch Messungen der Feldabhängigkeit ergänzt.

Zusammenfassend kann man aber sagen, dass die Leitfähigkeit, die für die Berechnung von SAR Werten von Bedeutung ist, im Frequenzbereich von 100 MHz

bis zu 40 GHz fast ausschließlich durch DC-Leitfähigkeitsprozesse und durch eine wasserähnliche Relaxation beschrieben werden kann. Es gibt keine Hinweise auf resonante oder parametrisch verstärkte Prozesse, die auf spezielle Absorptionsprozesse in Zellen hinweisen würden.

Schließlich bemühten wir uns um Aufklärung der Feldverteilungen in Zellsuspensionen. Diese Aussagen sind mittels dielektrischer Spektroskopie an makroskopischen Proben sehr schwer zu realisieren. Allerdings wurde diese Fragestellung auch in den anderen Teilbereichen dieser Projektstudie behandelt: Durch Vergleiche der Ergebnisse der dielektrischen Spektroskopie und der von uns zugrunde gelegten Verteilungen der HF-Felder mit Abschätzungen von Feldstärken, wie sie aus Patch-Clamp Messungen abgeleitet wurden und theoretisch simulierten elektrischen Feldverteilungen, lassen sich doch Rückschlüsse ziehen. Auf der Basis neuer theoretischer Arbeiten können wir die Felder in Zellsuspensionen abschätzen. Für alle Zellsuspensionen, bei denen die dielektrische Konstante größer als ca. 30 ist, eine Bedingung, die im Frequenzbereich von 100 MHz bis 10 GHz in allen untersuchten Systemen erfüllt ist, kann das lokale Feld, das auf die Zellen wirkt mit $E_a/3$ abgeschätzt werden. E_a bezeichnet dabei das von außen angelegte Feld.

Im letzten Teil von Abschnitt I untersuchten wir in allen hier analysierten biologischen Systemen mögliche nicht-lineare Effekte in Abhängigkeit der von außen angelegten elektrischen Feldern. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnten selbst bei sehr großen externen elektrischen Feldern keine nicht-linearen Effekte detektiert werden.

Die dielektrischen Experimente werden durch direkte Permeabilitätsmessungen an Membranen ergänzt, die in Teilbereich II dieses Berichtes dokumentiert sind. Mit Hilfe einer neuen, planaren und Chip-basierten Patch-Clamp Technologie ist es uns gelungen HF-Felder im Bereich von 10 MHz bis 33 GHz in unser System einzukoppeln ohne die hochempfindlichen Bauteile des Patch-Clamp Verstärkers zu stören. Mit Hilfe einer Koaxialanordnung als Einstrahlquelle konnte gezeigt werden, dass HF-Felder keine reproduzierbaren Effekte auf das Schaltverhalten spannungsabhängiger Ionenkanäle haben

Ionenströme repräsentieren den Transport von Ionen über die Zellmembran. Um einen Einblick in die Rolle der Lipiddoppelschicht bei dieser Art von Transport zu bekommen, wurden zunächst so genannte Black Lipid Membrane (BLM) Experimente an künstlichen Membranen durchgeführt. Erstaunlicherweise konnten diskrete Stromfluktuationen selbst in Abwesenheit von Proteinen in der Membran gefunden werden, die sich in ihrer Zeitskala zwischen fluider und Koexistenzphase um 1 bis 2 Größenordnungen unterschieden. In einem Modell, das von der gemessenen Proportionalität zwischen Wärmekapazität und Leitfähigkeit sowie der von Heimburg (1998) beschriebenen Proportionalität zwischen Wärmekapazität und Kompressibilität ausgeht, konnten die unterschiedlichen Zeitskalen befriedigend erklärt werden. Experimente unter gleichzeitiger HF-Einstrahlung zeigten bis zu SAR Werten größer als 15 W/kg im Rahmen unserer Messgenauigkeit keinen Einfluss auf die Membranpermeabilität.

Im Anschluss an die Messungen an Modellmembranen wurden patch-clamp Messungen an insgesamt drei verschiedenen humanen Zelllinien durchgeführt: Melanomzellen, Fibroblasten sowie Keratinozyten. Melanomzellen wurden dabei sowohl in Gegenwart der speziellen Frequenzen von 900, 1800, 2400 MHz und

22 GHz sowie über einen weiten Frequenzbereich von ca. 700 MHz bis 33 GHz bei SAR Werten deutlich oberhalb von 1 W/kg ($\overline{SAR} \approx 25 \dots 100 \cdot 10^3 \text{ W/kg}$) untersucht.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass im Bereich der Messgenauigkeit keine reproduzierbaren „gating“ Effekte in den Ionenkanalströmen gefunden wurden. Sämtliche reproduzierbaren Effekte können allem Anschein nach auf eine Erwärmung des umgebenden Mediums zurückgeführt werden. Dies zeigt sich vor allem bei den Messungen über einen erweiterten Frequenzbereich, da dort um 22 GHz konsistent für alle Leistungen und Zelltypen eine erhöhte Leitfähigkeit gefunden wird. Ein einfaches Modell zur Berechnung der absorbierten HF-Strahlung liefert für die hier vorliegenden experimentellen Bedingungen ($P = +12 \text{ dBm}$ an der Antenne, $f \approx 22 \text{ GHz}$) eine Temperaturerhöhung von 3° bis 9° C ($P = +12 \text{ dBm}$, $f \approx 22 \text{ GHz}$). Eine in diesem Temperaturbereich veränderte Ionenbeweglichkeit allein erklärt den gemessenen Anstieg des Ionenstroms und kann somit auf die Absorptionseigenschaften des Wassers zurückgeführt werden.

Da der für dieses Projekt verwendete Messaufbau, wie sich im Verlauf unserer Experimente herausstellte, für patch clamp Messungen bei hohen HF Leistungen nur bedingt geeignet ist, konnten unsere Einzelzellmessungen nur qualitative Ergebnisse liefern. Es wurde jedoch trotzdem versucht, ein verwertbares Ergebnis zum Einfluss von hochfrequenten Feldern auf Einzelzellbasis zu liefern.

Die Tatsache, dass selbst hoch aktive Melanomzellen bei SAR Werten von über 15 W/kg sowohl in Einzelmessungen als auch in Frequenzsweeps keine Hinweise auf eine Beeinflussung des „gating“ Verhaltens lieferten, lässt einen messbaren Effekt auf weniger aktive Zellen als eher unwahrscheinlich erscheinen. Da biologische System jedoch sehr komplex sind, wurden weitere Frequenzsweeps bei unterschiedlichen Temperaturen an Melanomzellen, sowie bei konstanter Temperatur an Fibroblasten und Keratinozyten durchgeführt. Diese Messungen bestätigen unsere Interpretationen und waren im Einklang mit den oben erwähnten Einzelmessungen allein durch Temperatureffekte zu erklären.

Schließlich findet man in Teil III den Schlussbericht über die theoretische Modellbildung. In der abschließenden Projektphase wurde eine theoretische Modellierung entwickelt, mit deren Hilfe es möglich sein sollte, den Einfluss sowohl des Kanalausgangs als auch polarisationsspezifische Besonderheiten der Zellmembran zu berücksichtigen. Insbesondere gelang es uns, den Einfluss des Verschiebungsstroms in einer mathematischen Modellierung zu beschreiben. Dieser Verschiebungsstrom wird durch das Öffnen und Schließen der in der Zellmembran eingelagerten Ionenkanäle verursacht. Es wird gezeigt, dass dieser zusätzliche Strom sich auf die effektive Kapazität der Zellmembran auswirkt und somit die passiven elektrischen Eigenschaften der Zellmembran beeinflussen kann.

Beim Öffnen und Schließen von in Zellmembranen eingelagerten Ionenkanälen verschieben sich geladene Segmente des Ionenkanalproteins (Hille, 2001). Dadurch ergeben sich Polarisierungseffekte, die in Lipid-Doppelschichten, in die keine Transportproteine eingelagert sind, nicht beobachtet werden können. Es konnte – qualitativ und quantitativ für das Mustermmodell für die Dynamik eines neuronalen Membranpotentials – gezeigt werden, dass die Berücksichtigung dieser Schaltladungen zu einer veränderten effektiven Membrankapazität führt. Die dadurch verursachte veränderte zeitliche Dynamik modifiziert daher auch die passiven

elektrischen Eigenschaften. Aufgrund der in der Modellierung auftretenden Zeitskalen, erwarten wir höchstens Resonanzen in Frequenzbereichen, die unter den Mobilfunkfrequenzen GSM 900/1800 und UMTS sowie unter den Frequenzbändern um 2,4 GHz und 5,5 GHz liegen. Es muss, wenn ein elementares Verständnis der dielektrischen Eigenschaften auf zellulärem bzw. subzellulärem Niveau entwickelt werden soll, neben dem Einfluss der Schaltladungen, auch der Einfluss des Kanalrauschens berücksichtigt werden (Loidl *et al.*, 2006). Wir untersuchten den Einfluss von Schaltladungen auf die Erzeugung von spontanen Aktionspotentialen an dem Mustermmodell zur Beschreibung der Membrandynamik – dem Hodgkin-Huxley Modell (Schmid *et al.*, 2006). Die notwendigen Erweiterungen des Urmodells beruhen dabei auf experimentellen Befunden, wonach (i) sich ein einzelner Ionenkanal stochastisch, aber dennoch von der Membranspannung abhängig, öffnet und schließt, und (ii) beim Öffnen und Schließen Ladung innerhalb der Membran transportiert wird.

Das Auftreten dieser Effekte wurde in so genannten single-channel-recordings nachgewiesen (s. Loidl *et al.*, 2006). Innerhalb dieser Modellierung untersuchten wir den Einfluss von intrinsischem Rauschen, und insbesondere das Auftreten des Effekts der Intrinsischen Stochastischen Resonanz. Letzterer Effekt der anomalen Signalverstärkung mittels Rauschen ist für Frequenzen, die in der Nähe der intrinsischen Zeitskalen des Modells liegen, maximal. Für höhere als die optimalen Frequenzen nimmt der Effekt der Intrinsischen Stochastischen Resonanz kontinuierlich ab. Mittels der Theorie der Linearen Antwort konnte gezeigt werden, dass die spektrale Verstärkung für hohe Frequenzen mit $1/\omega^2$ abnimmt. Daneben konnten wir mit unserer Modellierung zeigen, dass der Effekt der Intrinsischen Stochastischen Resonanz für kleiner werdende Antriebsamplituden abnimmt. Im Bereich der heute gültigen Basisgrenzwerte für die Stromdichten findet die Theorie der Linearen Antwort Anwendung. Diese sagt voraus, dass das Signal-zu-Rauschverhältnis des Antwortsignals proportional zum Quadrat der Antriebsamplitude wächst. Der Effekt der Intrinsischen Stochastischen Resonanz spielt somit für Antriebsfrequenzen im MHz-GHz-Bereich und für Antriebsamplituden, die unter den vorgeschlagenen Basisgrenzwerten der ICNIRP liegen, keine signifikante Rolle und eventuell dadurch verursachte Resonanzen bleiben unbeobachtbar. Überlegungen zum Antwortverhalten von Zellverbänden auf schwache Signale zeigen, dass mit zunehmender Anzahl der beteiligten schwach koppelnden Einzelzellen, sich das komplexe System mehr und mehr wie ein Einzelsystem verhält, dessen Antwortfunktion proportional zum Inversen der Antriebsfrequenz im MHz-GHz-Bereich abfällt. Im Falle unterschiedlicher Einzelzellen findet man eine „mittlere Transferfunktion“ (Antwortfunktion) mit ebensolchen Eigenschaften. Eine langreichweitige Kopplung führt zu einer Renormalisierung der Antwortfunktion mit dem gleichen Verhalten für hohe Frequenzen. Deterministische, d. h. rauschfreie, Modellierungsansätze einzelner idealisierter Zellen zeigen, dass das durch elektrische Wechselfelder induzierte Membranpotential zwar bei Frequenzen im unteren GHz-Bereich ein Maximum aufweist, dieses sich aber kaum vom Hintergrund abhebt und in erster Linie auf das Vorhandensein von Wasser zurückzuführen ist. Der absolute Wert des induzierten Membranpotentials ist, sofern man unter dem Grenzwert der Feldamplitude von 61 V/m bleibt, kleiner als die thermisch verursachten Spannungsfluktuationen.

INHALT

Summary	4
Zusammenfassung	8
I Dielektrische Spektroskopie an wässrigen Lösungen und an Zellsuspensionen	17
1 Stand der Forschung	17
1.1 Dielektrische Untersuchungen an Wasser	17
1.2 Dielektrische Untersuchungen wässriger Lösungen	29
2 Dielektrische Spektroskopie im Rahmen dieses Projektes	33
2.1 Dielektrische Messungen an wässrigen NaCl Lösungen	36
2.2 Dielektrische Messungen an wässrigen KCl Lösungen	45
2.3 Analyse der Messergebnisse an wässrigen Lösungen von NaCl und KCl	51
2.4 Dielektrische Messungen an Modellmembranen	62
2.5 Dielektrische Messungen an Blut	71
2.6 Dielektrische Messungen an verschiedenen Zelltypen	82
2.6.1 Dielektrische Messungen an Nervenzellen	86
2.6.2 Dielektrische Messungen an Fibroblasten	95
2.6.3 Dielektrische Messungen an Keratinozyten und Melanomzellen (A7)	104
3 Elektrische Feldverteilung, makroskopische und lokale Felder und nicht-lineare Effekte	116
3.1 Lokale Felder	116
3.2 Makroskopische Feldverteilung bei den Messungen an biologischen Suspensionen	119
3.3 Dielektrische Messungen bei unterschiedlichen elektrischen Feldstärken	124
4 Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse der dielektrischen Spektroskopie	133

II	Permeabilitätsmessungen an künstlichen Membranen und lebenden humanen Zellen.....	136
1	Präparation und Charakterisierung künstlicher Membranen und humaner Zelllinien für die Messung der elektrischen Permeabilität sowie der dielektrischen Eigenschaften	137
1.1	Herstellung und Charakterisierung künstlicher Membranen	137
2	Vorrichtung zur Permeabilitätsmessung an künstlichen Membranen	139
3	Thermodynamische Charakterisierung der künstlichen Membranen mittels Mikrokalorimetrie	143
4	Permeabilität künstlicher Membranen ohne HF Einstrahlung	146
5	Permeabilitätsmessungen an künstlichen Membranen unter HF Einstrahlung	156
6	Aufbau und Charakterisierung der patch clamp Anlage mit HF Einstrahlung	158
7	Patch clamp Messungen an humanen Zellen ohne HF Einstrahlung	164
7.1	Präparation der Zellen.....	165
7.2	Patch Clamp Messungen ohne HF	167
7.2.1	Melanomzellen.....	167
7.2.2	Fibroblasten	170
7.2.3	Keratinozyten	171
8	Patch clamp Messungen an humanen Zellen mit HF Einstrahlung	172
8.1	Melanomzellen im HF-Feld	172
8.2	Keratinozyten, Fibroblasten und Melanomzellen im HF-Feld....	178

III	THEORETISCHE MODELLIERUNG	184
1	Modellierung der experimentellen Ausgangssituation im Hinblick auf die polarisationsspezifischen Besonderheiten der neuronalen Zellmembran	184
1.1	Spannungsabhängige Ionenkanäle.....	184
1.2	Überhöhte Membrankapazität.....	184
1.3	Schaltstrom	185
1.4	Effektive Membrankapazität.....	186
1.5	Kapazitätserhöhung aufgrund von Schaltladungseffekten am Beispiel eines Archetyps einer neuronalen Zelle	188
1.5.1	Bestimmung der effektiven Kapazitätserhöhung	188
1.5.2	Vergleich mit dem Experiment.....	190
1.6	Lineare Antwort einer neuronalen Zellmembran – deterministischer Fall	190
1.7	Zusammenfassung: Einfluss von Schaltladungseffekten	194
2	Einfluss von Rauschen: Anomale Signalverstärkung – Effekt der Stochastischen Resonanz	195
2.1	Der Effekt der Stochastischen Resonanz.....	195
2.2	Theorie der linearen Antwort in Systemen mit Rauschen	196
2.3	Analyse der Nichtlinearen Antwort einer periodisch stimulierten Zellmembran	197
2.3.1	Einfluss der membranspezifischen Besonderheiten auf den Effekt der Stochastischen Resonanz – Antwortverhalten hinsichtlich unterschiedlicher Komplexität.....	200
2.3.2	Anomale Verstärkung als Funktion der Signalamplitude.....	201
2.3.3	Anomale Verstärkung als Funktion der Frequenz	203
2.3.4	Einfluss der Temperatur auf den Effekt der Stochastischen Resonanz	205
2.4	Zusammenfassung: Einfluss von intrinsischem Rauschen	205
3	Einzelzellmodellierung bezüglich der Realsituation	206
3.1	Experimentelle Ausgangssituation	206
3.2	Induziertes Membranpotential und resultierendes elektrisches Feld	206

4	Kooperative komplexe Dynamik: Antwort von Zellverbänden auf schwache Signale	210
4.1	Antwortverhalten von Verbänden von Zellen: Schwache Kopplung	210
4.2	Frequenzverhalten	212
4.3	Einfluss starker Strahlung	212
4.4	Kooperatives Verhalten	212
4.5	Einfluss von Unordnung: der Fall mit unterschiedlichen Zelltypen (random media und Hybridsysteme)	213
A	Berücksichtigung der polarisationsspezifischen Besonderheiten der Zellmembran im Prototyp der Modelle zur Beschreibung der Dynamik des Membranpotentials..	214
	Literaturverzeichnis	218

I Dielektrische Spektroskopie an wässrigen Lösungen und an Zellsuspensionen

Obwohl wir im Rahmen dieses Projektes im ersten Abschnitt eine ausführliche Literaturstudie durchgeführt haben, möchten wir hier noch einmal den Stand der Forschung kurz zusammenfassen. Dies erlaubt einen kritischen Vergleich unserer Daten mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, ermöglicht aber auch auf bereits bekannte experimentelle Tatsachen hinzuweisen. Die Gesamtschau der Ergebnisse dielektrischer Spektroskopie an Wasser und wässrigen Lösungen ist unabdingbar für eine weitergehende Analyse experimenteller Ergebnisse an Zellsuspensionen und an Geweben.

1 Stand der Forschung

1.1 Dielektrische Untersuchungen an Wasser

Für eine detaillierte Untersuchung von Zellen in Lösung, von Gewebe und vieler anderer biologischer Materialien ist zu allererst eine exakte Kenntnis der dielektrischen Eigenschaften von Wasser und wässriger Lösungen notwendig. Wasser ist die Grundsubstanz allen Lebens und ein wesentlicher Bestandteil fast aller biologischen Systeme. Zudem zeigt Wasser eine ungewöhnlich hohe Absorption elektromagnetischer Strahlung im Mikrowellenbereich sowie im fernen Infrarot (FIR) eine Tatsache, die nicht wirklich verstanden ist. Aufgrund der Omnipräsenz und der grundlegenden biologischen Bedeutung wurde Wasser sehr viel untersucht. Trotzdem sind sehr viele grundlegende Eigenschaften von Wasser immer noch nicht endgültig geklärt. So kennt man z. B. weder die genaue Größe des Dipolmomentes in der flüssigen Phase von Wasser, noch ist die ungewöhnlich hohe statische dielektrische Konstante verstanden. Die Relaxationsdynamik von Wasser zwischen dem Millimeter-Wellenlängenbereich und dem fernen Infrarot (5 cm^{-1} bis 100 cm^{-1} : $1\text{ cm}^{-1} \triangleq 30\text{ GHz}$) ist Gegenstand wissenschaftlicher Kontroversen, die bisher nicht zufrieden stellend geklärt werden konnten. Grundlegende Lehrbücher über dielektrische Untersuchungen von Wasser, wässrigen Lösungen und kleinen biologischen Molekülen gelöst in Wasser findet man z. B. von Hasted (1973) und von Grant *et al.* (1978). Eine Sammlung aller wesentlichen Publikationen über Wasser bis ca. 1995 wurde von Ellison *et al.* (1996) veröffentlicht. Eine komplette Kompilierung der Daten des komplexen Brechungsindex von 10^{-4} meV bis 100 eV findet man bei Querry *et al.* (1991). Im Folgenden sind die wesentlichen bisherigen Erkenntnisse aus dielektrischen Messungen an Wasser zusammengefasst, auf die im Laufe dieses Berichtes immer wieder verwiesen werden kann (siehe auch Hasted *et al.* 1948 und Hasted und Roderick 1958).

Das H_2O Molekül ist ein nicht-lineares Molekül der Symmetrie C_{2v} . Eine theoretische Ladungsverteilung ist in Abbildung 1.1 dargestellt. Aus Infrarot-Spektroskopie kann der H-O-H Bindungswinkel zu 104.5° und die mittleren H-O Abstände zu 0.09572 nm bestimmt werden. Diese Werte werden aber offensichtlich in der konzentrierten Flüssigkeit verändert. Da Sauerstoff elektronegativer als Wasserstoff ist, bildet sich

ein molekularer Dipol aus, der vom negativen Sauerstoff, den Bindungswinkel halbierend, zwischen die beiden Wasserstoffatome zeigt.

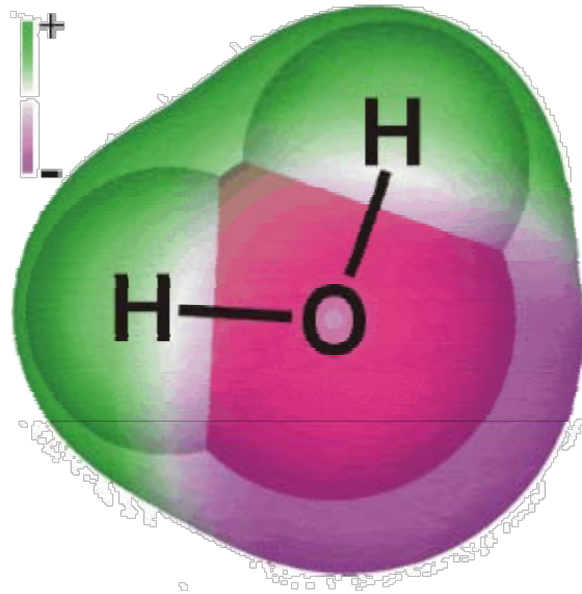


Abb. 1.1: Ladungsverteilung im Wassermolekül

Aus der Debye Gleichung für Dipolgase (Debye 1912)

$$\frac{\varepsilon_s - 1}{\varepsilon_s + 2} \cdot \frac{M}{\rho} = \frac{N_0}{3\varepsilon_0} \left(\alpha_i + \alpha_e + \frac{\mu^2}{3k_B T} \right) \quad (1.1)$$

in der M das Molekulargewicht, ρ die Dichte, N_0 die Avogadro-Zahl, k_B die Boltzmannkonstante, T die Temperatur, α_i die ionische und α_e die elektronische Polarisierbarkeit ist, kann das Dipolmoment μ aus der Messung verdünnter Gase zu 1.84 D bestimmt werden (1 D = $3.33564 \cdot 10^{-30}$ Cm). (McClellan 1963). Es ist bekannt, dass dieser Wert in der Flüssigkeit viel höher sein muss. In modernen ab-initio Molekulardynamik-Simulationen (z. B. Silvestrelli und Parrinello 1999) wird das Dipolmoment von konzentriertem Wasser zu 3.0 D berechnet, also 60 % höher als in der verdünnt gasförmigen Phase.

In einer linearen Antworttheorie ist die statische dielektrische Konstante durch die Fluktuationen der Dipole in einer makroskopischen Probe bestimmt (Sharma *et al.* 2007).

$$\varepsilon_s = \varepsilon_\infty + \frac{4\pi}{3} \cdot \frac{N\mu g}{V k_B T} \quad (1.2)$$

Dieser Ausdruck definiert einen Korrelationsfaktor g , der die winkelabhängigen Korrelationen der Dipole berücksichtigt. Für unkorrelierte Dipole gilt $g = 1$. Aufgrund der langreichweitigen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen hängt g sehr stark von den Randbedingungen und den Einschränkungen des Modells ab. Mit Randbedingungen, die das Reaktionsfeld berücksichtigen, kommt man zur Kirkwood-Fröhlich Gleichung:

$$\frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)(2\varepsilon_s + \varepsilon_\infty)}{\varepsilon_s(\varepsilon_\infty + 2)^2} \cdot \frac{M}{\rho} = \frac{N_0 g_K \mu^2}{9\varepsilon_0 k_B T} \sim \frac{g_K \mu^2}{T} \quad (1.3)$$

Hier bezeichnet g_K den Kirkwood Korrelationsparameter. Diese Gleichungen sollen später bei der Analyse der Temperaturabhängigkeit der dielektrischen Konstante benutzt werden. Analysiert man auf der Basis dieser Modelle die dielektrischen Eigenschaften von Wasser, so findet man, dass die ungewöhnlich hohe statische dielektrische Konstante von Wasser ($\varepsilon_s = 78$ bei Raumtemperatur) durch ein Dipolmoment von 3.0 D und einen Korrelationsfaktor $g > 2$ erklärt werden kann (Sharma *et al.* 2007). Die lokale tetraedrische Koordination der Wassermoleküle und die Eis-Regeln der Wasserstoffbrückenbindungen tragen wahrscheinlich zu dem hohen Korrelationsfaktor bei.

Nun wollen wir uns der Relaxationsdynamik von Wasser zuwenden. Misst man die dielektrische Dispersion von Wasser erwartet man ein Ergebnis, das sehr nahe am Debye Fall liegt, der durch

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + i\omega\tau} \quad (1.4)$$

gegeben ist, wobei τ die mittlere dipolare Relaxationszeit bezeichnet.

Die Debye'sche Funktion entspricht in der Zeitdomäne einem exponentiellen Zerfall der makroskopischen Polarisation (siehe Abb. 1.2). Dabei ist in der Zeit τ die Polarisation P auf $1/e$ abgefallen.

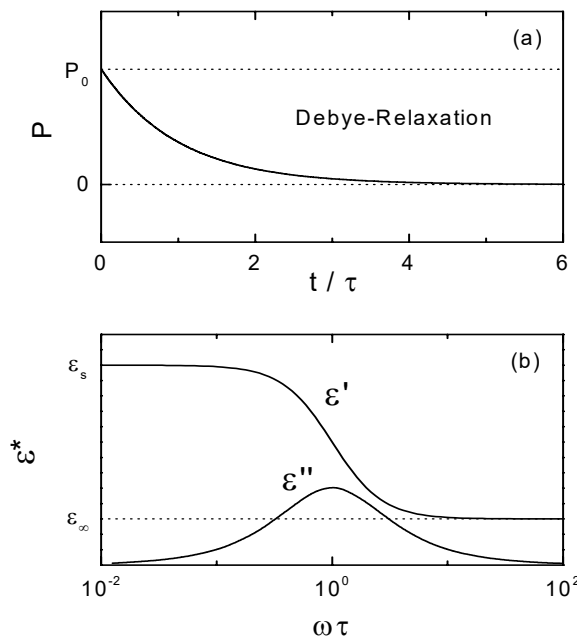


Abb. 1.2: (a) Zeitabhängige Polarisation (b) Real und Imaginärteil von $\varepsilon^*(\nu)$ für den Debye-Fall

Die Analyse von Real- und Imaginärteil der Frequenzabhängigkeit der dielektrischen Konstante erlaubt die Bestimmung der statischen dielektrischen Konstante ε_s , der Relaxationsstärke $\Delta\varepsilon$, die gleichzeitig der Stufe im Realteil der dielektrischen Konstante entspricht, und einer mittleren Relaxationszeit τ . Physikalisch wird die mittlere Relaxationszeit durch den exponentiellen Zerfall der elektrischen

Orientierungspolarisation bestimmt. Es besteht kein Konsens inwieweit diese Zeit mit der Reorientierungszeit eines einzelnen Moleküls übereinstimmt. In der ursprünglichen Theorie von Debye findet man

$$\tau' = \left(\frac{\varepsilon_{\infty} + 2}{\varepsilon_s + 2} \right) \tau \quad (1.5)$$

Wobei τ' die mikroskopischen Relaxationszeit bezeichnet, die die Relaxation des einzelnen Moleküls wiedergibt und in frequenzabhängiger dielektrischer Spektroskopie vermessen wird. Unter der Annahme, dass $\varepsilon_s = 78$ und $\varepsilon_{\infty} = 4$, ergibt Gleichung 1.5 $\tau' = 0.075 \tau$. Davon abweichende Vorschläge, die Gleichung 1.5 ersetzen sollten, findet man in Hasted (1973).

Die Temperaturabhängigkeit der statischen dielektrischen Konstante von Wasser wurde sehr oft vermessen und publiziert. Man findet kaum Dispersion unterhalb von 100 MHz, so dass bis 100 MHz $\varepsilon(\omega) \approx \varepsilon_s$ gilt. Die Temperaturabhängigkeit von Malmberg und Maryott (1956) wird mit Gleichung 1.6 beschrieben

$$\varepsilon_s = 87.740 - 0.40008T + 9.398 \cdot 10^{-4} T^2 - 1.410 \cdot 10^{-6} T^3 \quad (1.6)$$

wobei die Temperatur T in °C angegeben wird ($0^\circ\text{C} = 273.16 \text{ K}$).

In einem engeren Temperaturintervall um Körpertemperatur kann die Temperaturabhängigkeit der statischen dielektrischen Konstante von Wasser mit einem linearen Temperaturgradienten beschrieben werden.

$$\varepsilon_s = 86.596 - 0.336T \quad (1.7)$$

Mason *et al.* (1974) publizierten sehr detaillierte Messungen von Wasser als Funktion von Temperatur und Frequenz. Sie fanden, dass eine Verteilung von Relaxationszeiten, wie sie im Ansatz von Cole-Cole benutzt wird, die Daten etwas besser beschreibt als durch einen reinen Debye-Formalismus. Ihre wesentlichen Ergebnisse zur Temperaturabhängigkeit der Relaxationszeit sind in Abb. 1.3 dargestellt.

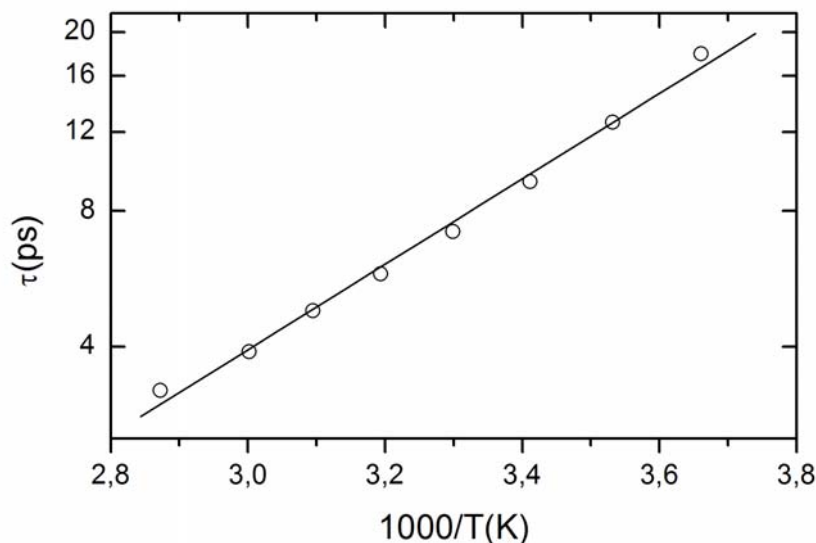


Abb. 1.3: Temperaturabhängigkeit der Relaxationszeit in Arrhenius-Auftragung.

Man sieht, dass τ mit steigender Temperatur exponentiell abnimmt und einem Arrheniusgesetz genügt, das auf eine rein thermische Anregung der molekularen Dipolrelaxation hindeutet. Berechnet man aus diesen τ -Werten unter Benutzung eines Arrhenius-Formalismus eine mittlere Energiebarriere E_τ und eine inverse Anklopfrequenz τ_0 , so findet man $\tau_0 = 5.6 \cdot 10^{-15}$ s und $E_\tau = 0.188$ eV. Die Relation $\omega_0 \tau_0 = 2\pi \nu_0 \tau_0 = 1$ liefert eine mikroskopische Frequenz ν_0 die einer primären molekularen Anregung entsprechen sollte.

Im Cole-Cole Formalismus wird eine symmetrische Verteilung von Relaxationszeiten angenommen und phänomenologisch durch einen Breitenparameter α beschrieben.

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (i\omega\tau)^{1-\alpha}} \quad (1.8)$$

In ihrer Analyse finden Mason *et al.* (1974) α -Werte von ca. 0.012, die nur unwesentlich vom reinen Debye-Fall $\alpha = 0$ abweichen.

In unterkühlten Flüssigkeiten oder in Flüssigkeiten die durch starke kooperative Wechselwirkungen geprägt sind, findet man in der dielektrischen Spektroskopie sehr oft asymmetrische Verlust-Peaks. Diese können am besten durch eine Cole-Davidson Funktion beschrieben werden (Davidson und Cole 1950, 1951):

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{[1 + (i\omega\tau)]^\beta} \quad (1.9)$$

Im Cole-Davidson Fall zeigt die Niederfrequenzflanke des Verlustpeaks einen Debye-ähnlichen Anstieg, der in doppeltlogarithmischer Auftragung durch einen Exponenten 1 beschrieben werden kann. Auf der Hochfrequenzseite folgt der Verlust einem Anstieg von $-\beta$, mit $\beta < 1$. Eine Zusammenstellung der Verteilungsfunktionen der Relaxationszeiten, wie man sie in wässrigen Lösungen oder in biologischen Materialien erwartet, findet man in Abbildung 1.4.

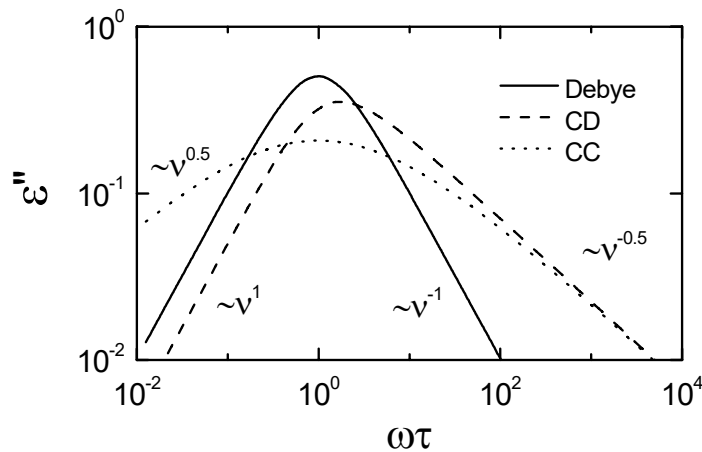


Abb. 1.4: $\varepsilon''(\nu)$ für den Debye-Fall und für die beiden Grenzfälle der Havriliak-Negami-Formel, die Cole-Davidson (CD, $\beta=0.5$) und Cole-Cole (CC) Formel ($\alpha=0.5$).

Eine breitbandige Gesamtschau der dielektrischen Dispersion von Wasser wird in Abb. 1.5 wiedergegeben, die aus Hasted (1973) entnommen wurde. Hier sind als

Übersicht dielektrische Messungen, Mikrowellen- und Infrarot-Messungen aneinandergesetzt.

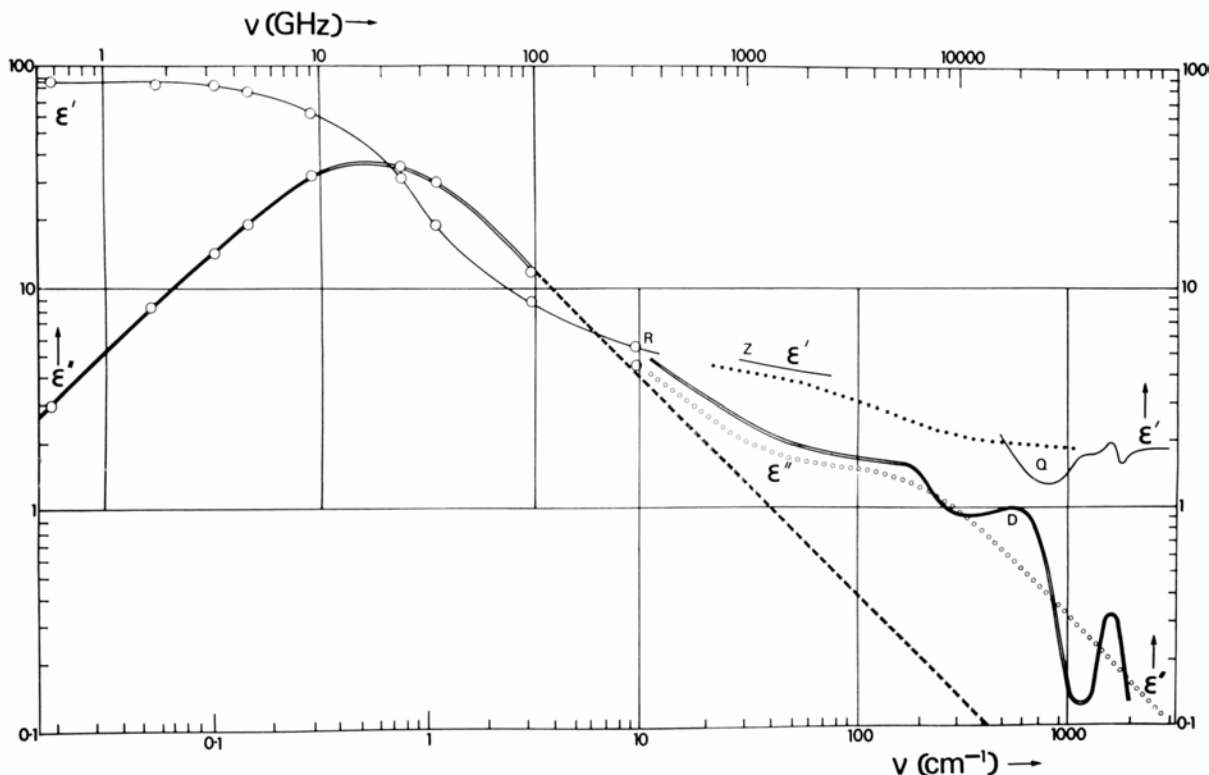


Abb. 1.5: Frequenzabhängigkeit von ϵ' und ϵ'' für flüssiges H_2O bei 25°C (Hasted 1973)

Eine vollständige Sammlung aller dielektrischen Messungen an Wasser bis ca. 1995 findet man bei Ellison *et al.* (1996). Doch die dielektrischen Messungen an Wasser wurden auch später noch deutlich verbessert und es wurde versucht die bestehenden Lücken im Submillimeter-Wellenlängenbereich zu schließen. Offene Fragen waren weiterhin Abweichungen von der reinen Debye Relaxation und die Existenz einer möglichen weiteren Relaxation in Wasser bei ca. 100 GHz. Neuere dielektrische Messungen an Wasser findet man bei Kaatz (1993), Thrane *et al.* (1995), Ronne *et al.* (1997), Buchner *et al.* (1999a) und Catenaccio *et al.* (2003).

Buchner *et al.* (1999a) benutzen für die Analyse der Dispersion von Wasser zwischen 100 MHz und 400 GHz zwei Debye-Relaxationen und erzielen damit den besten Fit. Die mittleren Relaxationszeiten der beiden Debye-Relaxationen liegen bei Raumtemperatur (298.15 K) bei 8.38 ps und 1.1 ps, wobei die hochfrequente Relaxation nur eine sehr geringe Dipolstärke zeigt.

Kaatz konnte an etwas älteren Daten zeigen, dass sich die Relaxation von Wasser annähernd mit gleicher Güte unter der Annahme nur einer asymmetrischen Cole-Davison Relaxation (Gleichung 1.9) beschreiben lässt.

Er erreicht mit diesem Formalismus eine ähnlich gute Beschreibung wie bei Benutzung von zwei Relaxationen, allerdings mit weniger freien Parametern. Dies ist eine wesentliche Begründung, warum wir bei der Analyse unserer Daten eine Cole-Davidson-Funktion benutzen.

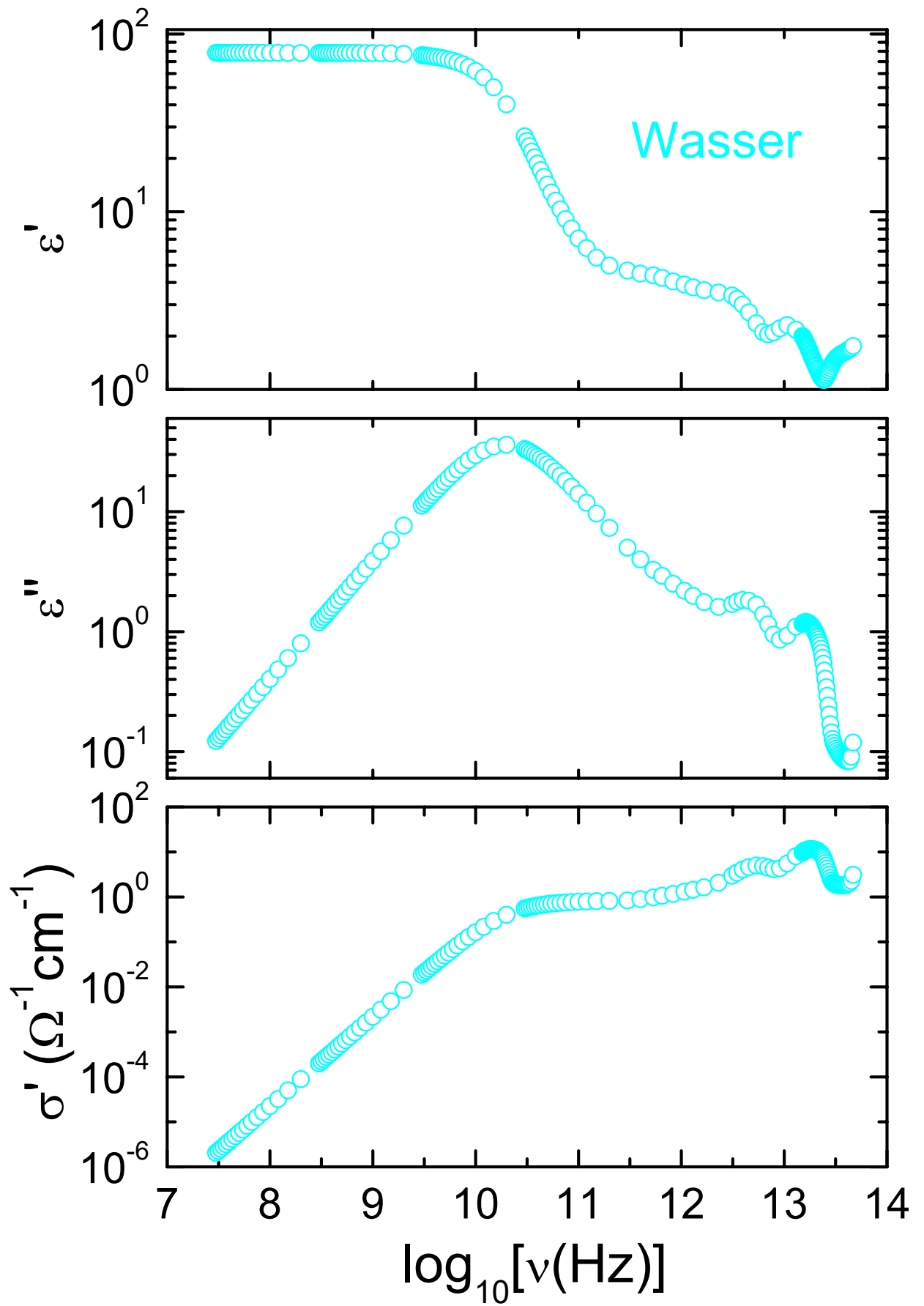


Abb. 1.6: Dielektrische Eigenschaften von Wasser (nach Segelstein 1981)

Bei Raumtemperatur (293.2 K) findet Kaatzke eine mittlere Relaxationszeit von 9.83 (6) ps und einen Asymmetrie-Parameter $\beta = 0.041$ (4). Bei dieser Analyse findet er $\varepsilon_s = 80.29$ (13) und $\varepsilon_\infty = 4.66$ (11), wobei die Zahlen in Klammern die Unsicherheiten in den letzten Stellen angeben. Die Existenz einer zweiten Relaxation von Wasser, die bei ca. 100 GHz liegen sollte, ist nach unserer Meinung durch Experimente keinesfalls zweifelsfrei bewiesen. Sie begründet sich daraus, dass es bisher nicht gelungen ist Fern-Infrarot- (FIR-) und Mikrowellen-Daten zufrieden stellend zusammenzufügen. Dieses Problem könnte aber auch gelöst werden, wenn komplexere Verteilungsfunktionen angenommen werden oder man die Existenz von frequenzunabhängigen konstanten Verlusten postuliert, die man in sehr vielen unterkühlten Flüssigkeiten findet. Dazu müssen aber zusätzliche hochfrequente Messungen im Submillimeter-Wellenlängenbereich durchgeführt werden. Vorläufige Ergebnisse werden hier im Folgenden vorgestellt.

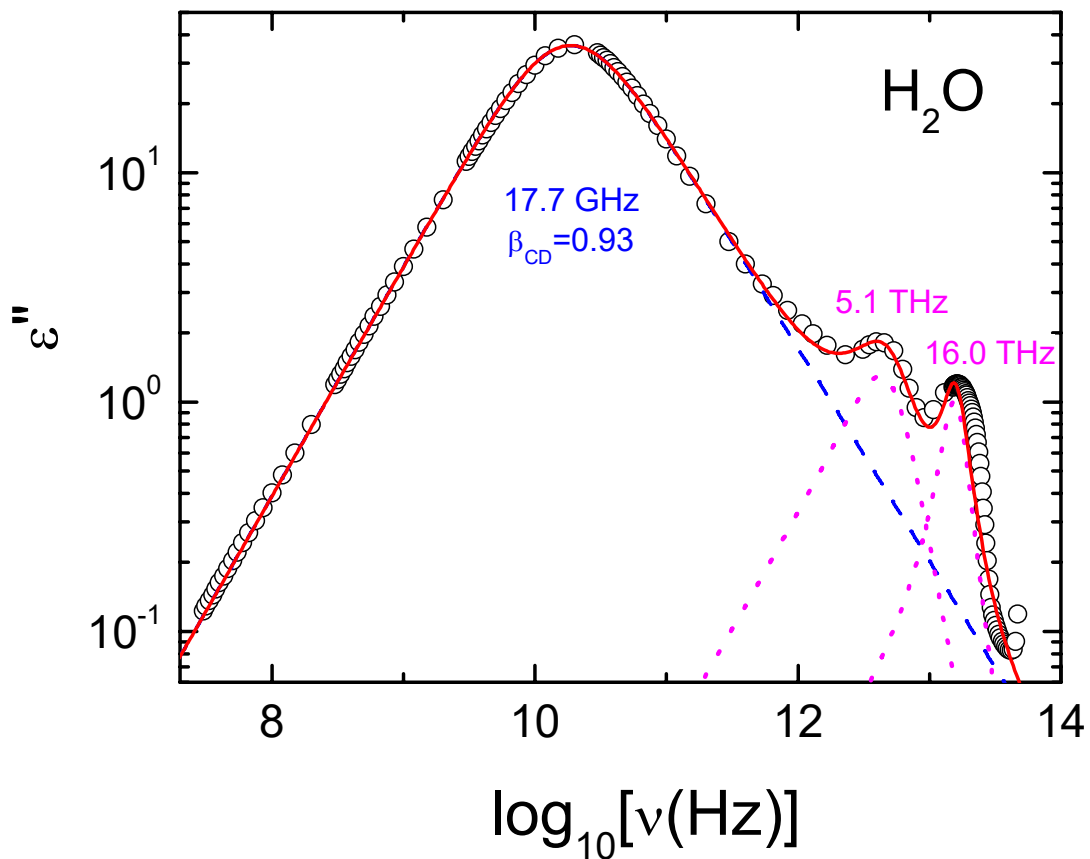


Abb. 1.7: Fit des Verlustspektrum aus Abbildung 1.6 mit einer Summe aus Cole-Davidson Relaxation und zwei Lorentz-Funktionen

Da diese oben aufgeworfenen Fragen von fundamentaler Bedeutung für alle dielektrischen Untersuchungen an Zellsuspensionen und biologischen Materialien sind, wollen wir einen kompletten Datensatz (Segelstein 1981) genauer betrachten. In Abbildung 1.6 zeigen wir die dielektrische Konstante (oberer Rahmen), den dielektrischen Verlust (mittlerer Rahmen) und die Leitfähigkeit (unterer Rahmen) von H_2O bei Raumtemperatur. Die Relaxationsdynamik von Wasser wird durch die Dipolrelaxation bei ca. 20 GHz dominiert. Bei ca. 5 THz findet man im FIR Spektrum einen weiteren kleinen Verlustpeak, der wahrscheinlich einer intramolekularen Streckschwingung entspricht. In der Literatur wird diese als O-O Streckschwingung

interpretiert (Krishnamurthy *et al.* 1983). Schließlich findet man bei ca. 20 THz einen breiten Doppelpeak, der einer Überlagerung von 2 Librationsschwingungen entspricht und nicht weiter betrachtet werden soll.

Eine Entscheidung, ob die Relaxation von Wasser vom reinen Debye Fall abweicht, kann möglicherweise durch eine genauere Betrachtung der Frequenzabhängigkeit des dielektrischen Verlustes getroffen werden. Dies wollen wir im Folgenden tun. In Abbildung 1.7 zeigen wir noch einmal das Verlustspektrum aus Abbildung 1.6. Die gesamte Relaxationsdynamik wurde nun mit einer Summe aus Cole-Davidson Relaxation und zwei Lorentz-Funktionen für Streckschwingung und Librationsmoden beschrieben. Der Fit ist gut, allerdings findet man bei genauer Betrachtung signifikante Abweichungen ab ca. 1 THz. Dies ist der Frequenzbereich, in dem eine zusätzliche Relaxation, deren Existenz in frühen Raman-Experimenten (Krishnamurthy *et al.* 1983) und in FIR Messungen (Hasted *et al.* 1985) erahnt wurde. Weitere Hinweise auf die Existenz dieser „60 cm⁻¹“ Mode, die oft im Rahmen einer beschränkten Translationsschwingung beschrieben wird, fand man in depolarisierten Raman Spektren (Mizoguchi *et al.* 1992). Daher haben wir versucht, das dielektrische Verlustspektrum aus Abbildung 1.6 mit einer zusätzlichen Debye-Funktion zu beschreiben. Das Ergebnis dieses Fits ist in Abbildung 1.8 dargestellt. Wir finden eine zusätzliche Debye-Relaxation bei ca. 25 cm⁻¹. Der Fit ist etwas besser als der in Abbildung 1.7, allerdings unter Zuhilfenahme eines weiteren Parameters (Debye-Stärke und Relaxationszeit der Relaxation bei 723 GHz, bei Beschränkung auf einen reinen Debye Peak für die primäre Wasser-Relaxation).

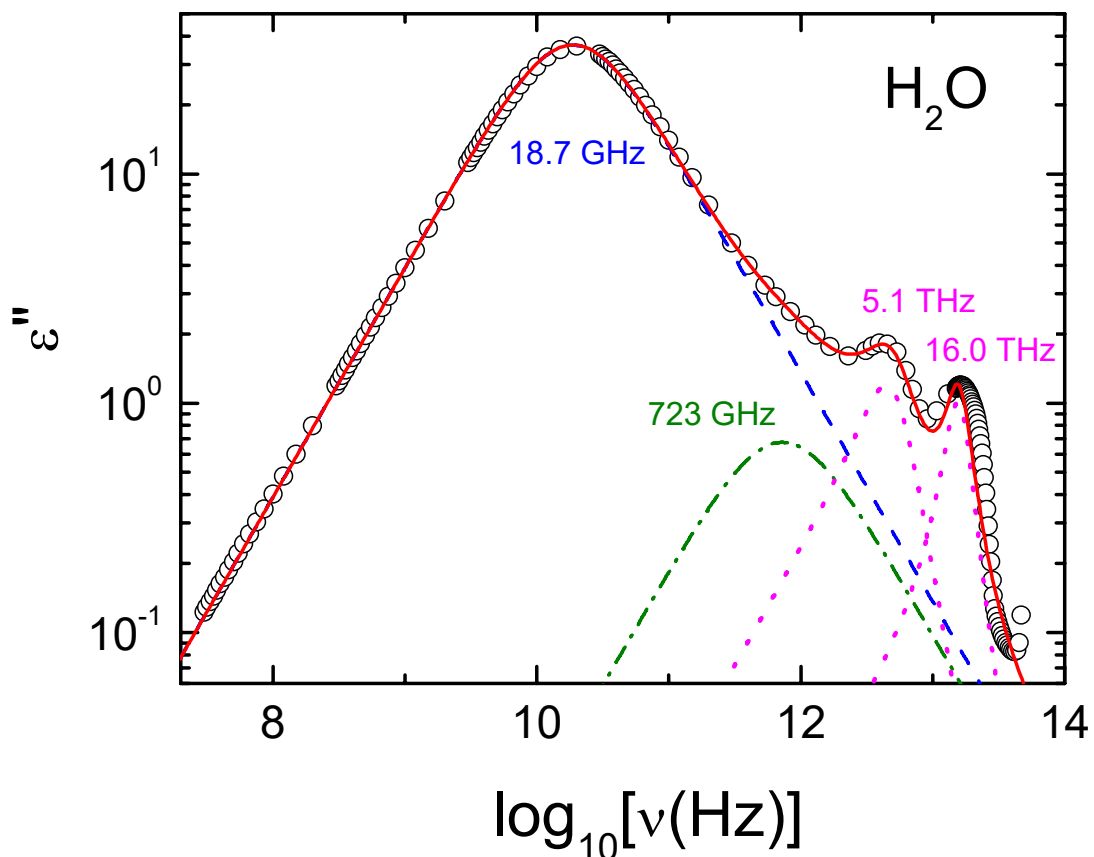


Abb. 1.8: Fit des Verlustspektrum aus Abbildung 1.6 mit einer Summe aus zwei Debye-Relaxationen und zwei Lorentz-Funktionen

Für eine endgültige Klärung der Frage ob z. B. eine 60 cm^{-1} Relaxation wirklich existiert, muss die Wasserdispersion breitbandig als Funktion der Temperatur gemessen und vollständig modelliert werden.

Wir haben in diesem Frequenzbereich ebenfalls die Relaxationsdynamik an ultrareinem Wasser bei Raumtemperatur vermessen. Die Ergebnisse sind für den Real- und Imaginärteil der dielektrischen Konstante, sowie für die Leitfähigkeit in Abbildung 1.9 dargestellt. Die experimentellen Daten können gut mit dem Cole-Davidson Formalismus zuzüglich von DC-Leitfähigkeit beschrieben werden. Der Asymmetrieparameter β liegt bei ca. 0.9. Die Abweichungen im Realteil der dielektrischen Konstante bei niederen Frequenzen können wahrscheinlich durch Effekte blockierender Elektroden beschrieben werden. Da diese Effekte für die Untersuchungen im Rahmen dieses Berichtes ohne Bedeutung sind, werden diese Effekte nicht näher behandelt.

Aus der Analyse von Literaturdaten und eigenen THz Experimenten schließen wir, dass die Relaxationsdynamik von Wasser eine asymmetrische Verteilung zeigt. Diese müssen durch eine asymmetrische Verteilung der Relaxationszeiten oder durch zusätzliche Absorptionsprozesse beschrieben werden. Zum Beispiel kennt man von der Relaxationsdynamik unterkühlter Flüssigkeiten derartige Beiträge, die durch den sogenannten „Excess wing“ beschrieben werden (Schneider *et al.* 2000). In H_2O wird bei ca. 1 THz eine breite Bande vermutet, die einem Käfig-Effekt zugeschrieben wird, der eine lokale Anregung in einer Käfig-Struktur beschreibt. Diese Vermutungen müssten durch FIR Messungen und THz Spektroskopie abgesichert und bestätigt werden. Allerdings sind FIR Messungen an H_2O infolge der hohen Absorption und notwendiger Fensterkorrekturen sehr schwer zu interpretieren. So müssen z. B. für Transmissionsexperimente im FIR Bereich bis zu Wellenzahlen von 1000 cm^{-1} Wasserschichten von $10\text{ }\mu\text{m}$ benutzt werden.

Schließlich haben wir für niedrige Frequenzen die Temperaturabhängigkeit der dielektrischen Konstante und der DC-Leitfähigkeit von ultrareinem Wasser vermessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 1.10 dargestellt. Zwischen 290 K und 360 K nimmt die dielektrische Konstante kontinuierlich von ca. $\epsilon_s = 80$ auf $\epsilon_s = 55$ ab. Diese Abnahme ist in guter Übereinstimmung mit Literaturwerten (Malmberg und Maryott 1956), die ebenfalls in Abbildung 1.10 eingezeichnet sind). In guter Näherung können die Daten durch ein Curie-ähnliches Gesetz, wie es in Gleichung 2.6 angegeben ist mit $T_C = 104\text{ K}$ und $C = 14.3 \cdot 10^3\text{ K}$ beschrieben werden. Der untere Rahmen von Abbildung 1.10 zeigt die Temperaturabhängigkeit der DC-Leitfähigkeit in einer Arrhenius-Auftragung. Die Leitfähigkeit folgt einer thermisch aktivierten Diffusion mit einem Vorfaktor $\sigma_0 = 6.8\text{ mS/cm}$ und einer Energiebarriere $E_\sigma = 0.1589\text{ eV}$ (durchgezogene Linie).

Es sei noch darauf hingewiesen, dass die Dipolrelaxation in reinem Wasser einem Arrheniusgesetz mit einer Energiebarriere $E_\tau = 0.188\text{ eV}$ folgt. Für die DC-Leitfähigkeit findet man eine ähnliche Barriere $E_\sigma = 0.159\text{ eV}$. Reorientierung und Diffusion werden durch also sehr ähnliche Potentialflächen bestimmt.

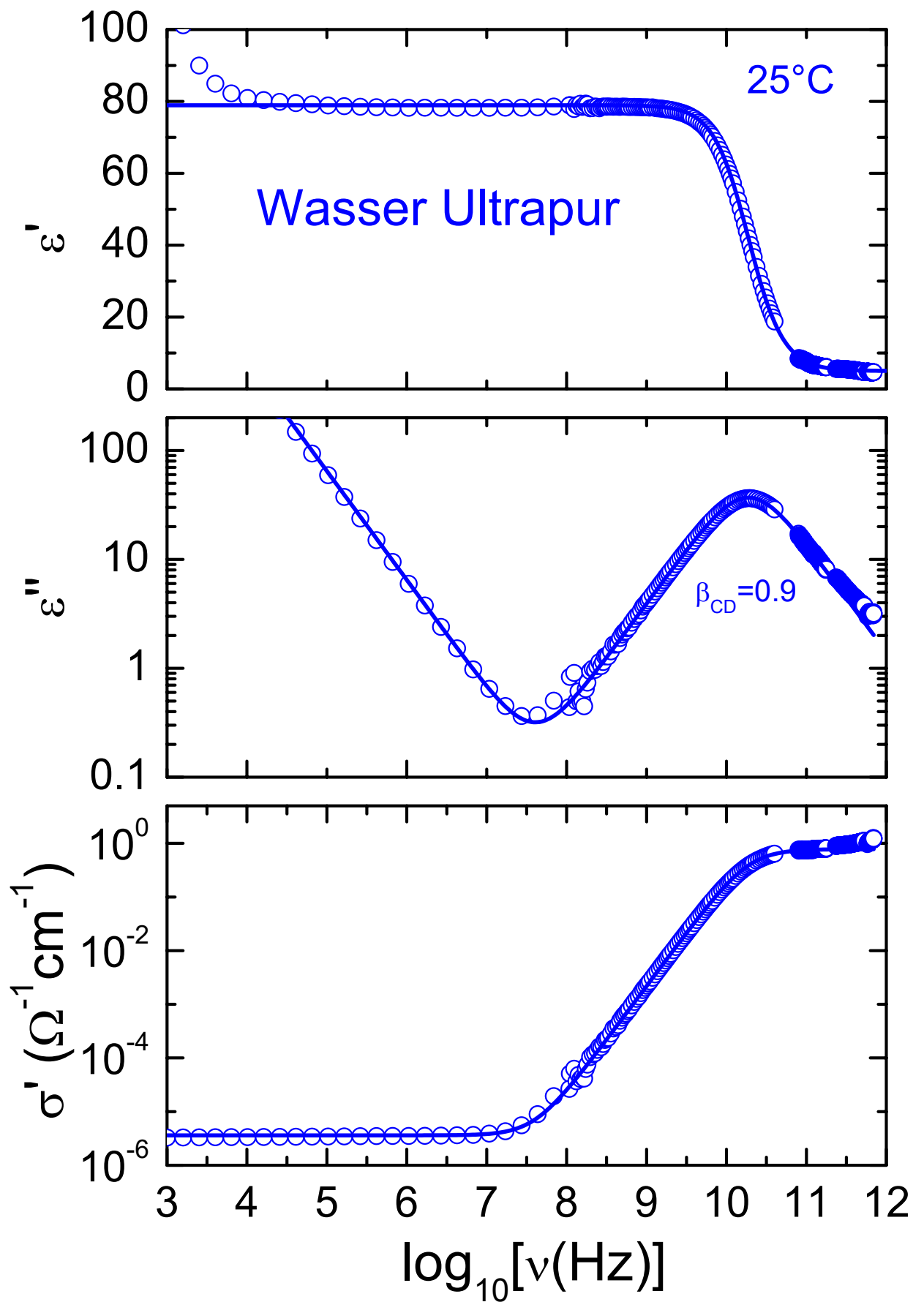


Abb. 1.9: Dielektrische Eigenschaften von Wasser Ultrapur mit Cole-Davidson-Fit

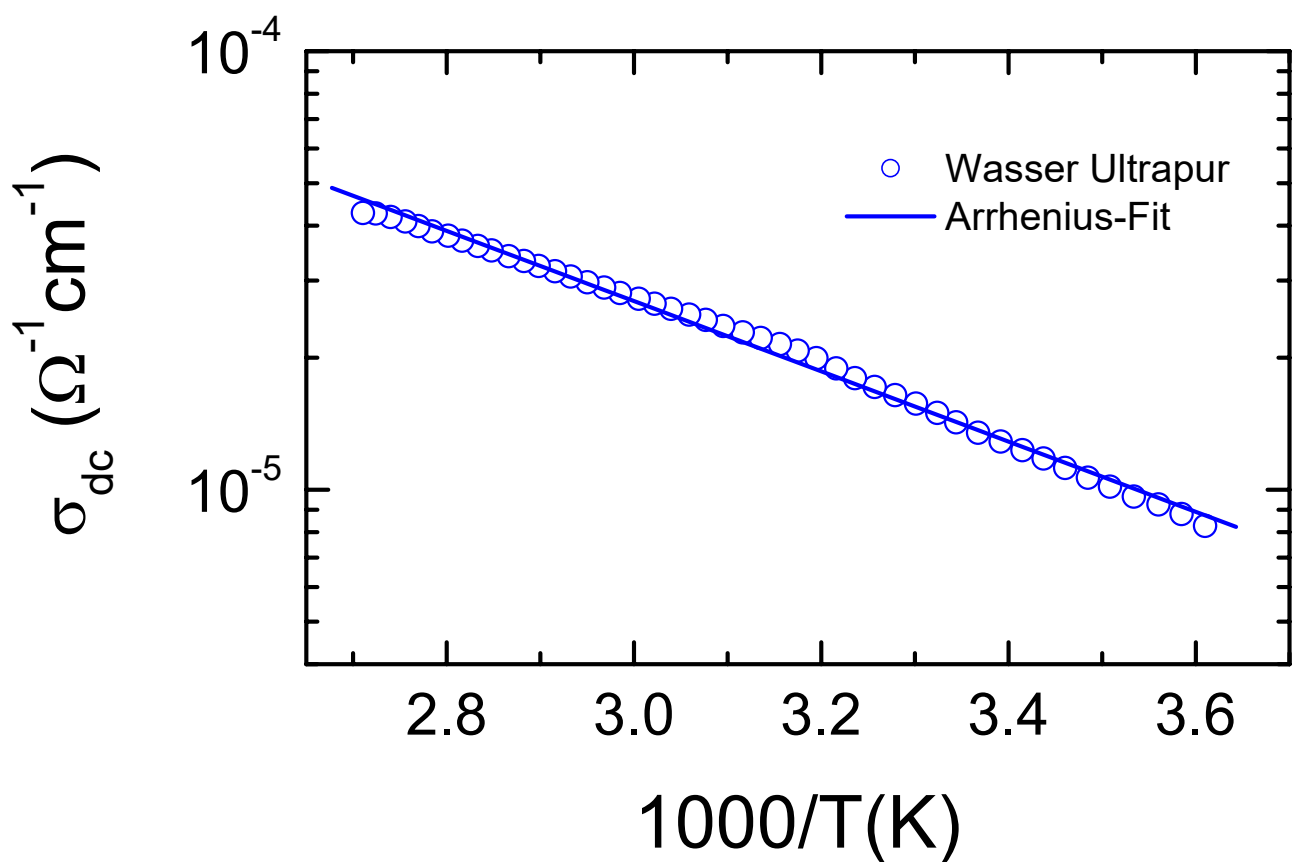
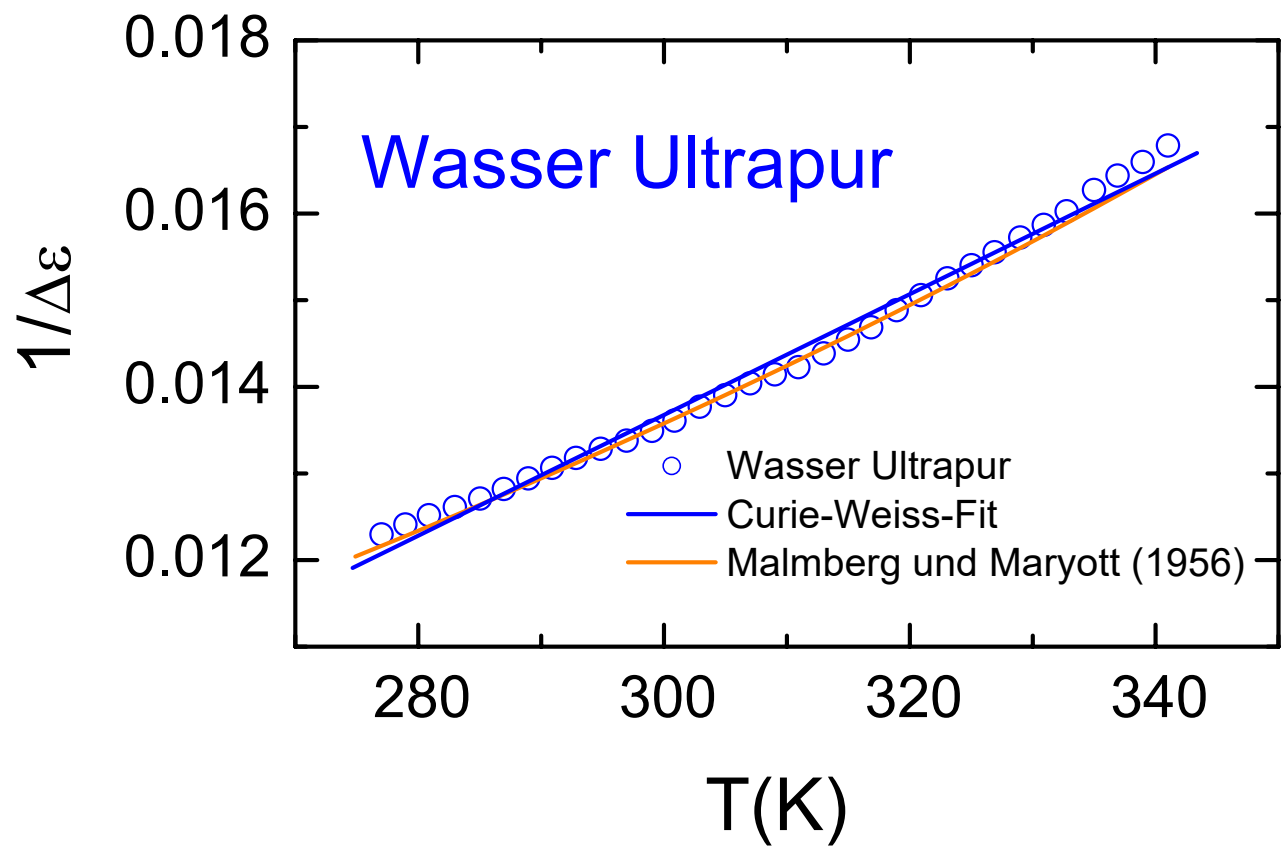


Abb. 1.10: Temperaturabhängigkeit der dielektrischen Konstante und der DC-Leitfähigkeit von ultrareinem Wasser

1.2 Dielektrische Untersuchungen wässriger Lösungen

Dielektrische Messungen an Elektrolyten sind sehr schwierig durchzuführen, da ionische Leitfähigkeit und blockierende Elektroden mit sinkender Frequenz eine immer dominierendere Rolle spielen. Präzise Aussagen über die dielektrische Konstante als Funktion der Ionenkonzentration und der Temperatur lassen sich daher am besten im MHz- und GHz-Bereich gewinnen.

In den meisten Fällen wurden dielektrische Daten an wässrigen Lösungen mit einer Debye- oder einer Cole-Cole-Relaxation unter Berücksichtigung von DC-Leitfähigkeitsprozessen ausgewertet:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (i\omega\tau)^{1-\alpha}} - i \frac{\sigma_{dc}}{\varepsilon_0\omega} \quad (1.10)$$

Beispiele früher Messungen an wässrigen Lösungen findet man bei Hasted (1973). Aktuellere Arbeiten von einfachen Salzen in wässriger Lösung wurden von Wei *et al.* (1992), Nörtemann *et al.* (1997), Buchner *et al.* (1999b) und Chen *et al.* (2003) publiziert.

Schon frühzeitig wurde klar, dass die dielektrische Konstante als Funktion der Ionenkonzentration c mit zunehmender Konzentration abnimmt. Physikalisch gesehen versuchen die gelösten Ionen die Wassermoleküle auszurichten und diese verlieren damit ihre Fähigkeit zu schneller Reorientierung und die dielektrische Konstante wird durch lokale Feld-Effekte vermindert. Frühe Beispiele über die Verminderung der dielektrischen Konstante durch die Lösung von Ionen findet man in Tabelle 1.1 und in Abb. 1.11.

Kation	$\delta^+(\pm 1)$	Anion	$\delta^-(\pm 1)$
H ⁺	-17	F ⁻	-5
Li ⁺	-11	Cl ⁻	-3
Na ⁺	-8	I ⁻	-7
K ⁺	-8	OH ⁻	-13
Mg ²⁺	-24	SO ₄ ²⁻	-7

Tab. 1.1: Dielektrische Dekrementwerte für Ionen in wässriger Lösung (Hasted 1973)

Mit der Einschränkung niedriger Konzentrationen lässt sich die Abhängigkeit der statischen Dielektrizitätskonstanten der Lösung ε_{ss} von der Konzentration c durch eine lineare Beziehung annähern:

$$\varepsilon_{ss} = \varepsilon_{sw} + \delta c \quad (1.11)$$

wobei ε_{sw} für die statische Dielektrizitätskonstante des Wassers steht und δ die Summe der Dekremente ist, die sich durch die Kationen und Anionen ergeben:

$$\delta = \delta^+ + \delta^- \quad (1.12)$$

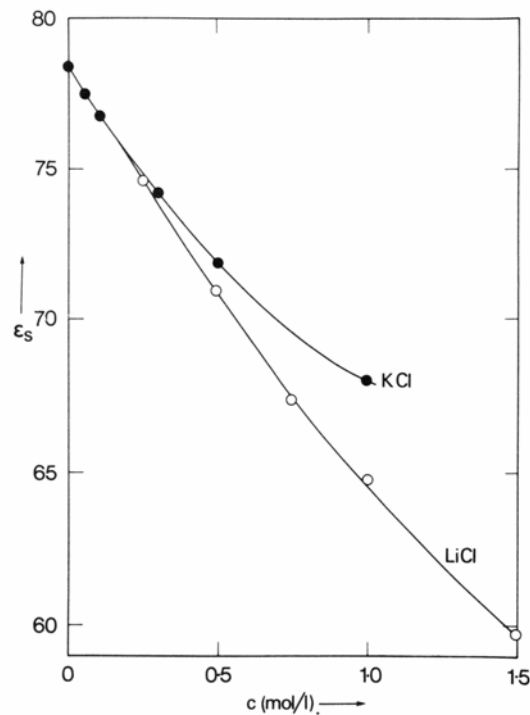


Abb. 1.11: Konzentrationsabhängigkeit der statischen dielektrischen Konstanten (Hasted *et al.* 1948) von KCl (volle Kreise) und LiCl (offene Kreise)

Eine detaillierte Untersuchung wässriger NaCl Lösungen findet man bei Nörtemann *et al.* (1997) und Buchner *et al.* (1999b). In einem Bereich niedermolarer Lösungen ($< 0.2 \text{ mol/l}$) finden die Autoren (Nörtemann *et al.*)

$$\frac{\varepsilon_s(0)}{\varepsilon_w(0)} = 1 + \delta c \quad (1.13)$$

mit $\delta = -0.17 (\text{mol/l})^{-1}$. Mit $\varepsilon_s(\omega)$ und $\varepsilon_w(\omega)$ bezeichnen Nörtemann *et al.* die frequenzabhängigen dielektrischen Konstanten der Lösung bzw. des reinen Wassers. Einen vermuteten Anstieg der dielektrischen Konstante der Lösung bei sehr geringen Verdünnungen, können die Autoren mit ihren experimentellen Ergebnissen nicht belegen. Die Abnahme der dielektrischen Konstante mit steigender Ionenkonzentration führen die Autoren auf die gängigen theoretischen Modelle zurück:

- i) Verdünnung des dipolaren Lösungsmittels und die sich daraus ergebende Veränderung der inneren Depolarisationsfelder,
- ii) kinetische Depolarisation, die von der relativen Bewegung der Ionen und des umgebenden Lösungsmittel stammt und
- iii) strukturelle Sättigungsprozesse, die auf das Einfrieren der Dynamik von Wassermolekülen in der Nähe der gelösten Ionen zurückgeführt werden können.

Ganz analoge Untersuchungen an KCl und CsCl Lösungen wurden von Chen *et al.* (2003) durchgeführt.

Sehr große Fortschritte zur Beschreibung der Lösung von Ionen in Wasser wurden in der jüngsten Vergangenheit durch molekulardynamische Methoden, insbesondere durch Benutzung des Car-Parrinello Codes (Car und Parrinello 1985) erzielt. In diesen Rechnungen können Struktur der umgebenden Wassermoleküle, deren effektive Dipolmomente, Bindungswinkel und Bindungsabstände, sowie Hydrations-Enthalpien berechnet werden (Bako *et al.* 2002, Krekeler *et al.* 2006, Ikeda *et al.* 2007, Krekeler und Delle Site 2007). In diesen Systemen ist das Dipolmoment des Wasser-Moleküls nicht konstant (~ 3 D) wie in reinem Wasser. Abhängig von der Anzahl der Wassermoleküle, die ein gelöstes Ion umgeben findet man starke Änderungen des Dipolmomentes von Wasser. Ein M^+ -H₂O und ein A^- -H₂O Molekül sind in Abbildung 1.12 dargestellt.

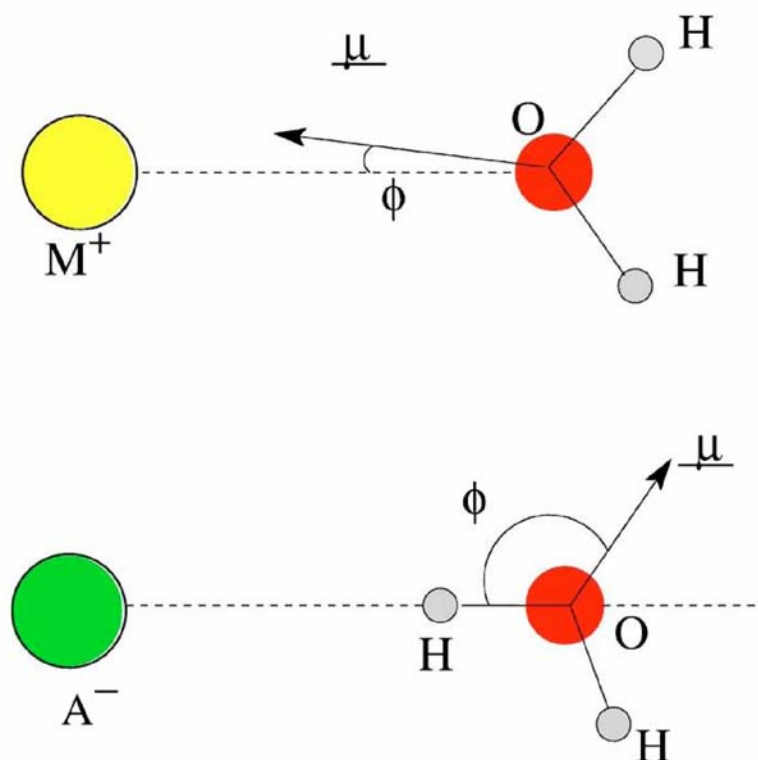


Abb. 1.12: Definition der Richtung der Wasserdipolvektoren für $M = \text{Li, Na, K}$ und $A = \text{F, Cl, Br}$. Die berechneten Winkel ϕ liegen zwischen der M^+/A^- -O Achse und dem Dipolvektor μ (Krekeler *et al.* 2006)

Das Dipolmoment von Wasser ändert sich nun sehr stark als Funktion der Anzahl der das Ion umgebenden Wassermoleküle. Das Dipolmoment beträgt z. B. 4.5 D im System H₂O gebunden an Mg²⁺ oder 2.75 D im System H₂O gebunden an K⁻. Allerdings nähert sich das Dipolmoment der Wassermoleküle sehr schnell dem Dipolmoment von freiem Wasser an und bereits wenn das gelöste Ion von Wassermolekülen vollständig umgeben ist, liegen die Dipolmomente zwischen 2.9 und 3.2 D. Diese Abhängigkeit des Dipolmomentes als Funktion der umgebenden Wassermoleküle ist in Abbildung 1.13 dokumentiert. Trotzdem muss diese extrem starke Abhängigkeit des Dipolmomentes von Wasser von der Konzentrationsabhängigkeit der gelösten Salze in diesen Abschätzungen neu überdacht werden. Molekular-Dynamik Methoden werden hier in Zukunft eine herausragende Rolle spielen.

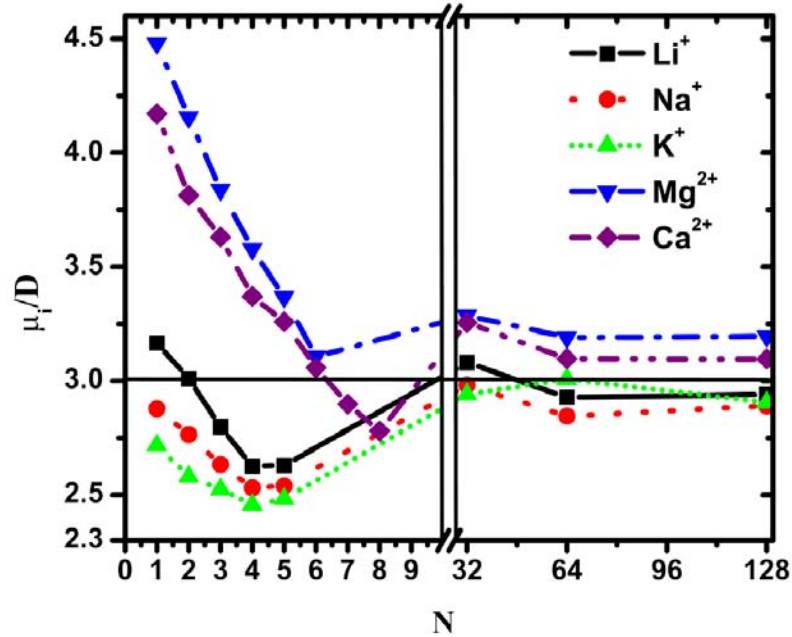


Abb. 1.13: Mittleres molekulares Dipolmoment für verschiedene Systeme; gezeigt sind Cluster zunehmender Größe, angefangen bei einem einzelnen Molekül bis hin zur charakteristischen Koordinationszahl des betrachteten Ions (links) und bis zur ersten Solvationsschale erweiterter Systeme verschiedener Größen, 32, 64 und 128 Moleküle (rechts). (Krekeler und Delle Site 2007)

Ebenso muss man davon ausgehen, dass die mittleren Relaxationszeiten in Elektrolytlösungen im Vergleich zu Wasser signifikant verändert werden. Experimentell findet man eine Absenkung der Relaxationszeiten bei kleinen, aber teilweise eine stetige Erhöhung bei größeren Ionenkonzentrationen.

In NaCl Lösungen fanden Buchner *et al.* (1999b) eine kontinuierliche Abnahme der Relaxationszeiten, die sie für alle Temperaturen zwischen 5 °C und 35 °C mit

$$\tau_s = \tau_w - \delta c + \gamma c^{3/2} \quad (1.14)$$

parametrisieren konnten. Dabei bezeichnet τ_w die mittlere Relaxationszeit von Wasser, τ_s die der wässrigen Lösung. δ und γ sind empirisch ermittelte Vorfaktoren, die durch Anpassung von Gleichung 1.14 an experimentelle Daten ermittelt wurden.

Ein ganz ähnliches Verhalten finden Chen *et al.* (2003) für KCl und CsCl Lösungen. Auch in diesen wässrigen Lösungen finden sie für kleine Konzentrationen (< 2 mol/l) eine kontinuierliche Abnahme der Relaxationszeiten, die sie mit

$$\tau_s = a \cdot \exp(-b \cdot c) + \tau_w - a \quad (1.15)$$

zumindest annähernd beschreiben können, wobei a und b empirisch zu bestimmende Parameter sind.

Unserer Meinung nach ist die bisher gängige Beschreibung der Konzentrationsabhängigkeiten von ε_{ss} und τ_s äusserst unbefriedigend. Es ist klar, dass Einflüsse von Temperatur und Konzentration gelöster Moleküle stark korreliert sind und nicht getrennt beschrieben werden sollten. Wir werden in unseren Arbeiten den Weg beschreiten, die Änderungen der primären Relaxationsparameter universell in Abhängigkeit von Frequenz, Temperatur und molarer Konzentration zu beschreiben.

2 Dielektrische Spektroskopie im Rahmen dieses Projektes

Die Messungen erfolgen unter Verwendung der Open Ended Coaxial Methode. Das Messsystem besteht dabei aus dem Messkopf, einem Agilent E8363B PNA Netzwerkanalysator und einem externen Rechner mit Auswertesoftware. Der Messkopf, der einer abgeschnittenen Koaxialleitung entspricht, wird in die Flüssigkeit eingetaucht. Anhand des gemessenen Reflexionssignals (S_{11}) können die komplexen dielektrischen Eigenschaften der Probe berechnet werden. Dazu muss vor Beginn der Messung eine Kalibration mit drei bekannten Standards an der Spitze des Sensors durchgeführt werden. Die Differenz zwischen den erwarteten und den tatsächlichen Werten wird dazu genutzt die systematischen Fehler bei der Messung auszublenden. Es ist wichtig, dem Kabel (das den Netzwerkanalysator mit dem Messkopf verbindet) vor der Messung genügend Zeit zur Stabilisation zu geben und sicherzustellen, dass das Kabel zwischen Kalibration und Messung nicht gebogen wird. Alternativ können auch starre oder halbstarre Kabel zum Einsatz kommen.

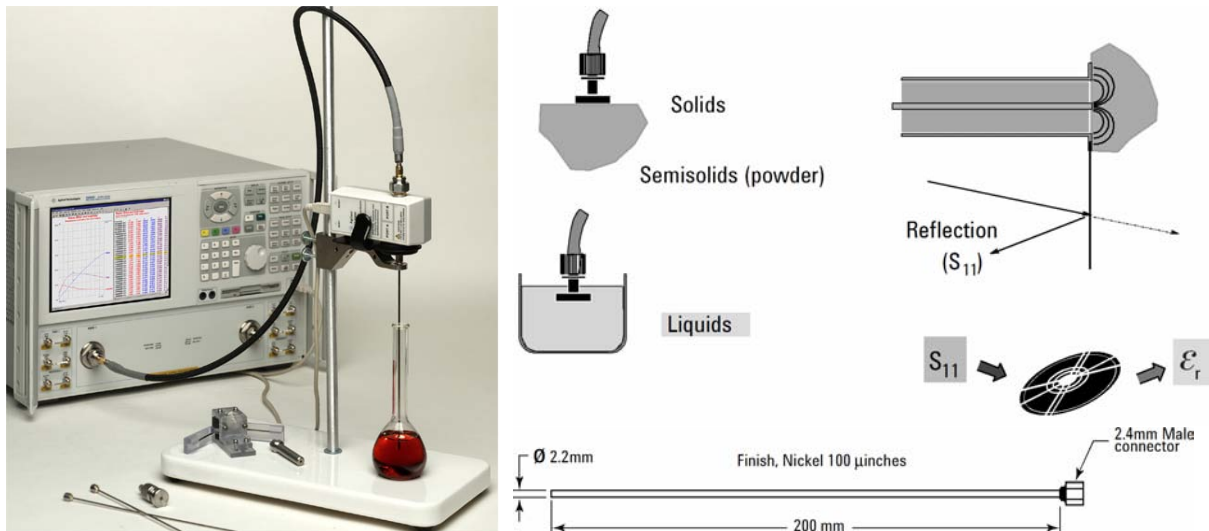


Abb. 2.0: Darstellung des schematischen Messaufbaus (links), des Reflexionssignals (S_{11}) (rechts oben) und der eingesetzten Slim Form Probe (rechts unten) [Agilent]

Die wässrigen Lösungen werden zur Messung in 1,5 ml *eppendorf*-Reaktionsgefäße gefüllt, die sich in einen Thermomixer befinden. Der Thermomixer ermöglicht während der Messung das gleichzeitige Mischen und Temperieren der Proben. Die genaue Temperatur wird beim Messvorgang durch drei Temperatursensoren überwacht. Durch den massiven Probenblock ist eine hohe räumliche und zeitliche Temperaturstabilität von ± 0.1 °C gewährleistet.

Der Frequenzfehler des verwendeten Netzwerkanalysators ist für die im Rahmen dieser Untersuchungen benötigte Genauigkeit vernachlässigbar klein. Die Genauigkeit der dielektrischen Materialgrößen bei dieser Messmethode ist durch den Betrag der dielektrischen Permittivität gegeben und somit abhängig von gemessenem Probenmaterial, Messfrequenz und Temperatur. Insbesondere können

sich für Bereiche mit kleinem ε'' und großem ε' größere Fehlergrenzen für den Verlust ε'' ergeben.

Zusätzlich zur Grundgenauigkeit der Messapparatur müssen noch weitere Fehlerquellen in Betracht gezogen werden:

1. Driftfehler der Kalibration: Durch eine zeitabhängige Systemdrift des Gerätes verliert die Kalibration der Apparatur ihre Gültigkeit. Dieser Fehler wurde dadurch minimiert, dass unmittelbar vor jeder Messserie (Messung einer Probe bei verschiedenen Temperaturen bzw. Anregungsfeldern) die Kalibration durchgeführt wurde. Der Fehler ist somit zu vernachlässigen. Für eine Messserie als Funktion der Temperatur wurde z. B. bei Raumtemperatur kalibriert und anschließend im vorgegebenen Frequenzintervall bei den unterschiedlichen Temperaturen gemessen. Für die Messungen bei verschiedenen elektrischen Feldstärken (Kapitel 3.3) wurde die Kalibration bei der entsprechenden Anregungsamplitude durchgeführt.
2. Probengröße: Bei den Messungen muss sichergestellt sein, dass das Ende der Slim Form Probe von genügend Probenmaterial umgeben ist. Beim Vorhandensein nur kleiner Probenmengen konnte die vom Hersteller verlangte Distanz von 5 mm teils nur knapp erreicht werden, was zu kleinen Messfehlern führen kann. Um diesen Effekt genauer einzuschätzen, wurden prototypische Proben mit verschiedenen Behältergrößen untersucht, was einen vernachlässigbaren Beitrag ergab.
3. Kabelstabilität: Hier ist insbesondere die Zeit- und Temperaturstabilität der verwendeten Zuleitungskabel und der in dem Messkopf verwendeten halbstarren Koaxialleitung zu nennen. Zum Beispiel ergeben sich Fehler durch die Tatsache, dass die Kalibration bei Raumtemperatur erfolgt, was zu Fehlern bei Schwankungen der Labortemperatur führen kann.
4. Ankopplung: Beim Eintauchen der Slim Form Probe wurde teils Bildung von Luftblasen am Ende der Leitung beobachtet. Dies beeinflusst natürlich die Reflexionseigenschaften und kann somit zu einer Verfälschung der Messergebnisse führen. Durch geeignete Manipulation beim Eintauchen konnte dieser Effekt weitestgehend minimiert werden.
5. Sedimentierung: Bei den gemessenen Modellmembran- und Zellsuspensionen besteht die Gefahr einer teilweisen Sedimentierung, was die Ergebnisse verfälschen kann. Durch regelmäßiges mechanisches Mischen zwischen den Messungen wurde angestrebt diesen Effekt zu minimieren.

Die Beiträge der unter 3. bis 5. erwähnten Fehlerquellen, zusätzlich zur Grundgenauigkeit des Messgerätes, sind schwer erfassbar und eine präzise quantitative Angabe schwierig. Die Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und geringe Streuung der Daten bei den temperaturabhängigen Messungen zeigt, dass der Fehler immer in der Größenordnung der Symbolgrade in den Abbildungen liegt. Der Fehler von ε'' im Bereich des Minimums erscheint nur leicht erhöht. Dies ergibt sich auch aus Vergleich mit anderen Messmethoden und Literaturwerten (z. B. bei reinem Wasser).

Eine Berücksichtigung aller aufgeführten Punkte führt zu der folgenden (konservativen) Abschätzung der Gesamt-Messfehler. Die Genauigkeit der dielektrischen Materialgrößen bei dieser Messmethode beträgt für Real- und Imaginärteil der dielektrischen Konstante:

Genauigkeit Realteil: ε' ca. ± 5 %

Genauigkeit Imaginärteil: $\varepsilon'' > 10$ ca. ± 5 % $\varepsilon'' < 10$ ca. $\pm 7-10$ %

Dem Arbeitsplan folgend wurden im Rahmen dieses Projektes in einem ersten Schritt wässrige NaCl und KCl Lösungen mit sehr unterschiedlichen molaren Konzentrationen, in einem Temperaturbereich von 5 °C bis 80 °C in engen Temperaturschritten, mit besonderer Berücksichtigung des Temperaturbereiches von 24 °C bis 50 °C und in einem Frequenzbereich von 100 MHz bis 40 GHz untersucht.

Alle Daten werden unter Benutzung einer asymmetrisch verbreiterten Cole-Davidson-Relaxationsfunktion und wann immer notwendig unter Berücksichtigung von Leitfähigkeitsprozessen gefittet.

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}}{[1 + (i\omega\tau)]^{\beta}} - i \frac{\sigma_{dc}}{\varepsilon_0 \omega} \quad (2.1)$$

Die relevanten Fitparameter (DC-Leitfähigkeit σ_{dc} , mittlere Relaxationzeit τ und Stärke der dipolaren Relaxation $\Delta\varepsilon = \varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}$) werden in übersichtlichen Schaubildern zusammengefasst und mit der bestehenden Literatur, wenn möglich verglichen. Diese Vorgehensweise ermöglicht uns signifikante Aussagen über Genauigkeit, Reproduzierbarkeit und mögliche Fehler der Messungen, die später auf Gewebe und Zellen ausgedehnt werden.

In den folgenden Bildern (ab Seite 39) findet sich für jede molare Konzentration von NaCl und KCl die dielektrische Konstante ε' , eine doppeltlogarithmische Darstellung des dielektrischen Verlustes ε'' (NB: $\varepsilon^* = \varepsilon' - i \varepsilon''$) und des Realteils der Leitfähigkeit σ' (NB: $\sigma' = \varepsilon_0 \varepsilon'' \omega$) vs. der Messfrequenz für eine charakteristische Auswahl von Temperaturen.

2.1 Dielektrische Messungen an wässrigen NaCl Lösungen

In den folgenden Unterkapiteln 2.1 bis 2.6 werden die wesentlichen Ergebnisse der dielektrischen Spektroskopie an wässrigen Elektrolytlösungen, Modell-Membranen, Blut mit unterschiedlichen Hämatokritwerten und an Zellsuspensionen vorgestellt. Das zugrunde liegende Konzept dieser Untersuchungsreihen besteht darin, durch die Untersuchung von biologischen Materialien unterschiedlicher Komplexität (ultra-reines Wasser, Ionen-Lösungen, Modellmembranen und unterschiedlichen Zelltypen) Rückschlüsse auf mikroskopische lokale Prozesse ziehen zu können. Es war bereits vor Durchführung dieser Messungen klar, dass die komplexe dielektrische Funktion im Bereich der Mobilfunkfrequenzen einen Übergang von der wasserähnlichen γ -Relaxation bei ca. 20 GHz, zur β -Relaxation im MHz-Frequenzbereich zeigt. Die β -Relaxation ist eine typische Maxwell-Wagner Relaxation und kann durch eine Suspension sphärischer Zellen, die durch eine Zellwand begrenzt sind, beschrieben werden. In einigen Proteinen liegt in diesem Übergangsbereich eine schwache zusätzliche Relaxation, die δ -Relaxation, die allerdings sehr schwach ausgeprägt und experimentell nicht mit letzter Sicherheit dokumentiert ist. Die δ -Relaxation, die zwischen 0.1 und 3 GHz vermutet wird (Schwan 1983), wird wahrscheinlich durch Schwingungen polarer Molekülgruppen oder durch Änderungen der dielektrischen Eigenschaften von an Zellen oder Proteinen gebundenem Wasser hervorgerufen. Durch die temperaturabhängigen dielektrischen Präzisionsmessungen dieser Arbeit möchten wir die Existenz derartiger Zusatzprozesse im Bereich der Mobilfunkfrequenzen überprüfen und Anzeichen für weitere mikroskopische Prozesse suchen; z. B. könnte man auch resonanz-artige Phänomene aufgrund von Ionenleitung durch Zell-Kanäle oder weitere hochfrequente Ladungsumlagerungen an Zellwänden vermuten.

Die Messungen an wässrigen Elektrolytlösungen sind aber auch notwendig, um die Zuverlässigkeit und die Genauigkeit der Messmethode zu testen. Dabei muss auch getestet werden, welche minimale Temperaturerhöhung dielektrisch noch verfolgt werden kann. Aus den systematischen temperaturabhängigen Messungen und der modellhaften Parametrisierung folgt, dass Temperaturänderungen von 0.5 Grad eindeutig identifiziert werden können.

Ziel dieser Messungen ist es zunächst, ein universelles Verhalten der Leitfähigkeit zu finden, das mit wenigen Parametern beschrieben werden kann. Der Realteil der Leitfähigkeit σ' ist schließlich die wesentliche Kenngröße, die die SAR-Werte bestimmt. Die spezifische Absorptionsrate ist durch

$$SAR = \sigma \frac{E^2}{\rho} \quad (2.2)$$

gegeben, wobei E die Feldstärke und ρ die Dichte des Mediums bezeichnen. Analysemethoden, die anhand dieser Messungen getestet werden, sollen dann zur Analyse von Absorptionsprozessen von Zellsuspensionen herangezogen werden.

Die Abbildungen 2.1 bis 2.5 zeigen Messungen an wässrigen NaCl-Lösungen in einem Temperaturbereich von 10 °C bis 80 °C und für Frequenzen von 100 MHz bis 40 GHz. Die Bilder dokumentieren Messungen an 10 mMol/l (Abbildung 2.1), 100 mMol/l (Abbildung 2.2), 154 mMol/l (Abbildung 2.3), 0.5 Mol/l (Abbildung 2.4)

und 1 Mol/l (Abbildung 2.5). Nur eine kleine Auswahl der tatsächlich gemessenen Daten wird hier gezeigt. Wie im Arbeitsprogramm festgelegt wurde zwischen 24 °C und 50 °C in Temperaturschritten von 2 °C gemessen. In jeder Abbildung ist der Realteil der dielektrischen Konstante (ϵ' : oberer Bildrahmen), der Imaginärteil der dielektrischen Konstante (ϵ'' : mittlerer Bildrahmen) und der Realteil der Leitfähigkeit (σ' : unterer Bildrahmen) dargestellt. σ' und ϵ'' sind über die Messfrequenz direkt verknüpft.

Alle Daten wurden mit einer Cole-Davidson-Funktion gefittet (durchgezogene Linien in den Abbildungen 2.1 bis 2.6). Die Verwendung dieser Funktion für die Analyse der Daten entspricht der Annahme einer asymmetrischen Verteilungsfunktion von Relaxationszeiten. Im Kapitel Stand der Forschung wurde gezeigt, dass eine Cole-Davidson-Funktion die dielektrische Relaxation in Wasser am besten beschreiben kann, unter der Voraussetzung auf die Beschränkung nur sehr weniger Fitparameter und insbesondere, wenn man auf eine zusätzliche schwache Hochfrequenzrelaxation verzichtet. Die Fitergebnisse wurden als durchgezogene Linien mit passenden Farben eingezeichnet. Es ist klar, dass der Asymmetrie-Parameter für die Messungen bei hohen Temperaturen nicht sehr gut definiert ist, da der Asymmetrie-Parameter durch die Steigung der Hochfrequenzflanke des Verlustpeaks (linear in doppeltlogarithmischer Darstellung, Loidl *et al.* 2006, Kap. I 1.5.3) festgelegt wird. Das Maximum des dielektrischen Verlustes verschiebt sich mit steigender Temperatur zu höheren Frequenzen, wodurch die Hochfrequenzflanke („rechte“ Seite der Verlustpeaks in ϵ'') am Rand bzw. außerhalb des gemessenen Frequenzbereichs liegt. Zur besseren Darstellung ist in allen Bildern ϵ' auf halblogarithmischen Skalen, ϵ'' und σ' auf doppelt-logarithmischen Skalen dargestellt.

Der steile Anstieg, den man bei kleinen Frequenzen im Realteil der dielektrischen Konstante findet, ist ein Artefakt niederfrequenter dielektrischer Messungen, der durch blockierende Elektroden zustande kommt. Bei kleinen Frequenzen gelangen positive und negative Ionen an die jeweiligen Elektroden und sperren den weiteren Ladungstransfer. Dieser Beitrag wird mit zunehmender molarer Konzentration immer stärker. In einer Netzwerkanalyse kann dieser Beitrag exakt beschrieben werden, wir gehen aber im weiteren Text nicht auf diesen Beitrag ein, da wir durch unsere Expertise von Untersuchungen von Ionenleitern in der Behandlung derartiger Terme große Erfahrung haben und diese zufrieden stellend in Fit-Routinen beschreiben können. Alle Daten können mit großer Genauigkeit mit einer verbreiterten dipolaren Relaxation und einem DC-Leitfähigkeits-Term gefittet werden. Unsere Analysen zeigen, dass AC-Leitfähigkeit, die man oft in unterkühlten Flüssigkeiten findet, im betrachteten Frequenzfenster keine Rolle spielt. Die dipolare Relaxation liegt noch ungefähr da, wo sie auch im reinen Wasser erwartet wird. Allerdings wird die Analyse zeigen, dass sich abhängig von der molaren Konzentration der Elektrolyte signifikante Unterschiede ergeben.

In der 10 mMol/l Lösung finden wir neben der dominierenden Relaxation bei ca. 10 GHz nur einen geringen Beitrag der DC-Leitfähigkeit unterhalb von 1 GHz. Mit steigender Mol-Konzentration nimmt die DC-Leitfähigkeit stark zu. DC-Leitfähigkeit spielt natürlich im Realteil der dielektrischen Konstante keine Rolle. Im Imaginärteil ϵ'' zeigt sich die DC-Leitfähigkeit als linearer Anstieg (in doppeltlogarithmischer Darstellung) zu tiefen Frequenzen. Für kleine Frequenzen nähert sich daher der

Realteil der Leitfähigkeit $\sigma'(\omega)$ oft einem konstanten Wert, der mit der DC-Leitfähigkeit σ_{dc} übereinstimmt (Loidl *et al.* 2006, Kap. I 1.6).

Mit zunehmender Temperatur verschiebt sich das Maximum der Relaxation, das die mittlere inverse Relaxationszeit beschreibt, zu höheren Frequenzen. Dabei wird das Maximum im dielektrischen Verlust abgesenkt. Die statische dielektrische Konstante zeigt also eine deutliche Abnahme mit steigender Temperatur. In einem Temperaturintervall von 10 °C bis 80 °C nimmt die statische dielektrische Konstante um etwas mehr als 20 ab. Nach Gleichung 1.7 würden wir in reinem Wasser ca. eine Abnahme von 23.5 erwarten. Mit steigender Mol-Konzentration nimmt ϵ_s weiter ab, die Lage der Relaxation verschiebt sich aber nur unwesentlich. Der Imaginärteil ϵ'' wird immer drastischer von DC-Leitfähigkeitsprozessen dominiert, die schließlich beginnen auch die dielektrischen Relaxationsprozesse im GHz-Bereich zu dominieren.

Die Konzentrationsabhängigkeit der dielektrischen Eigenschaften von NaCl Elektrolytlösungen ist in Abbildung 2.6 gezeigt. Hier kann man sehr deutlich erkennen, dass die Relaxationsdynamik im gesamten Konzentrationsbereich sich nur unwesentlich ändert. Einzig die DC-Leitfähigkeit nimmt mit der Mol-Konzentration signifikant zu.

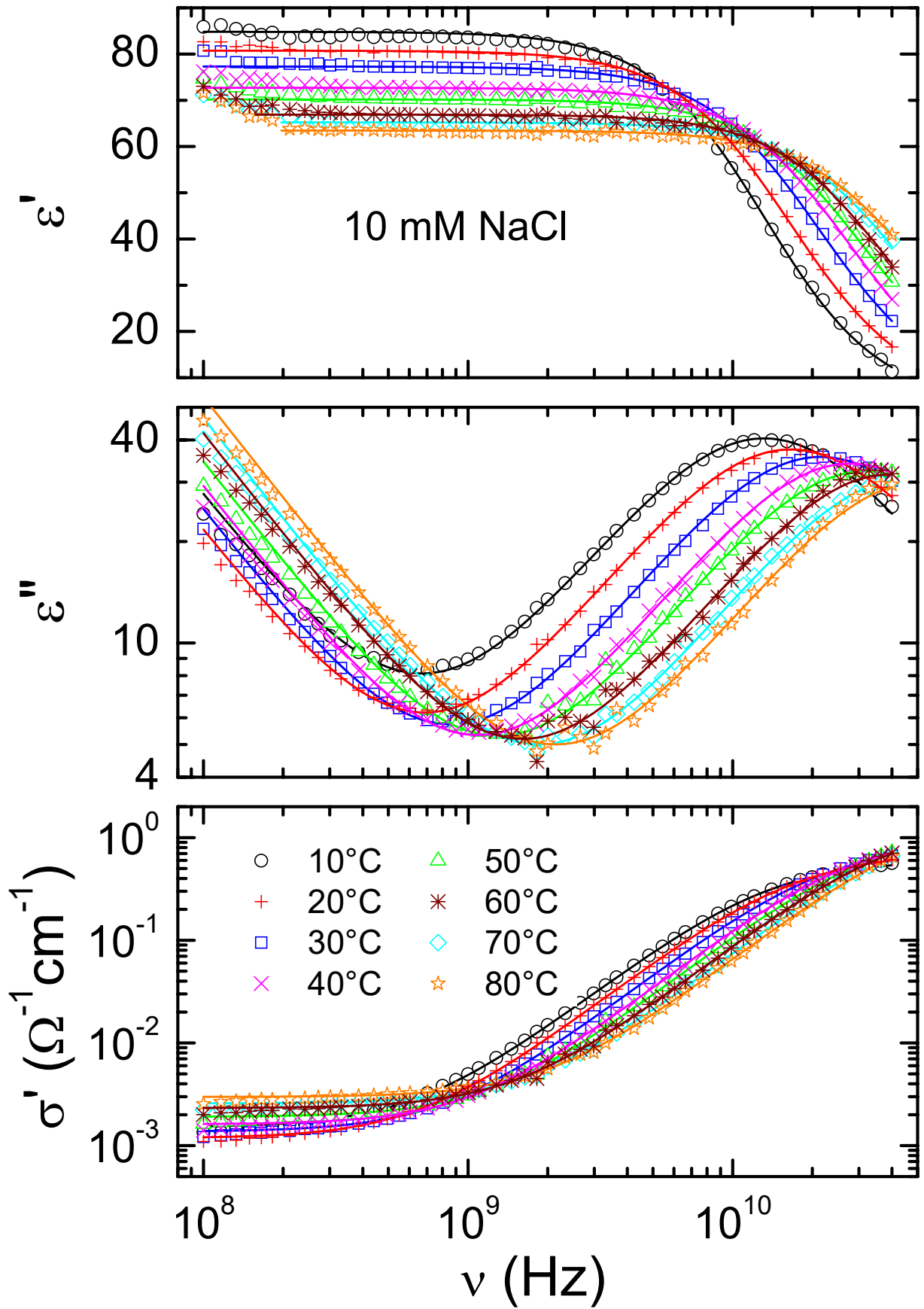


Abb. 2.1: Dielektrische Eigenschaften einer 10 mM NaCl Lösung

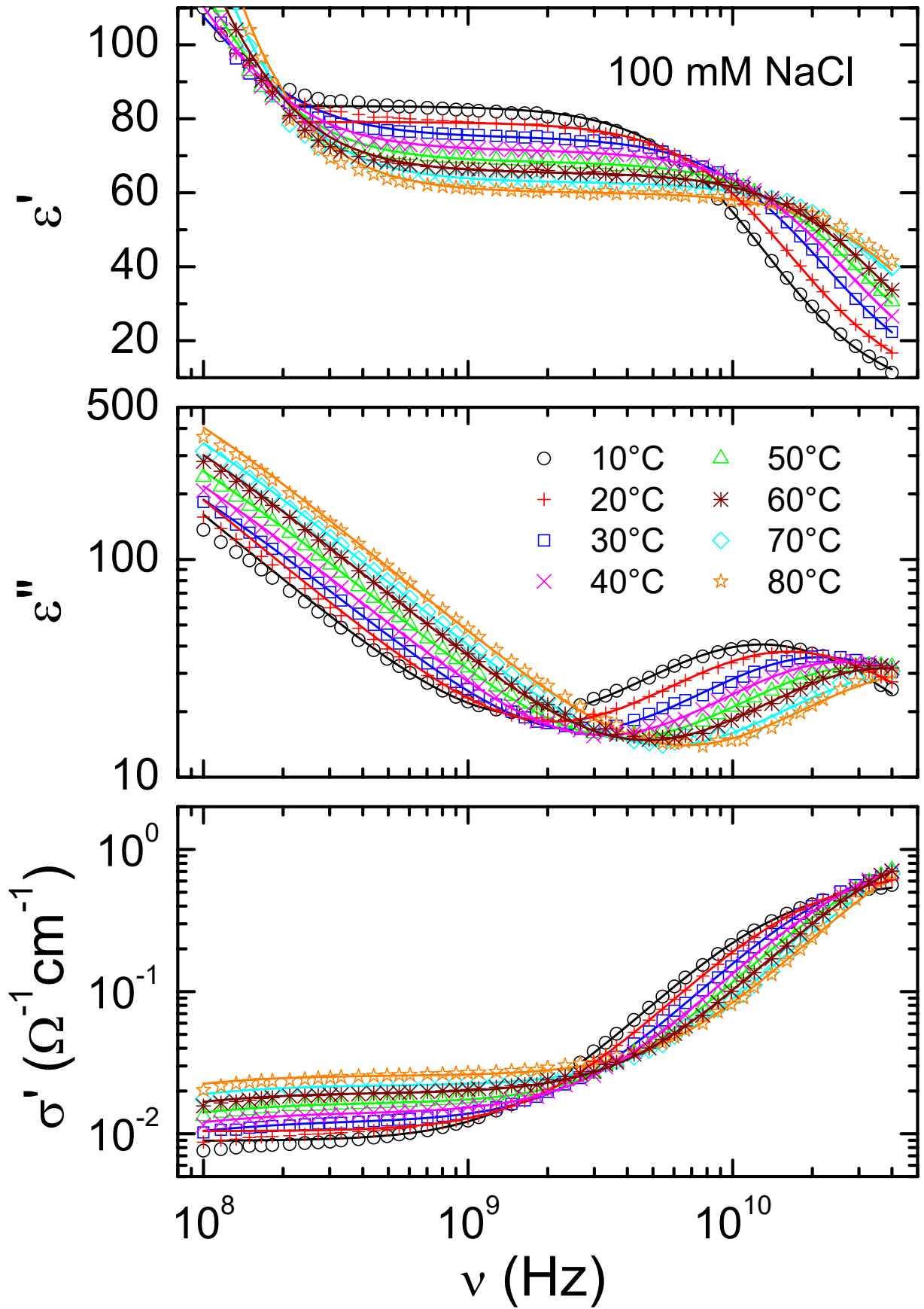


Abb. 2.2: Dielektrische Eigenschaften einer 100 mM NaCl Lösung

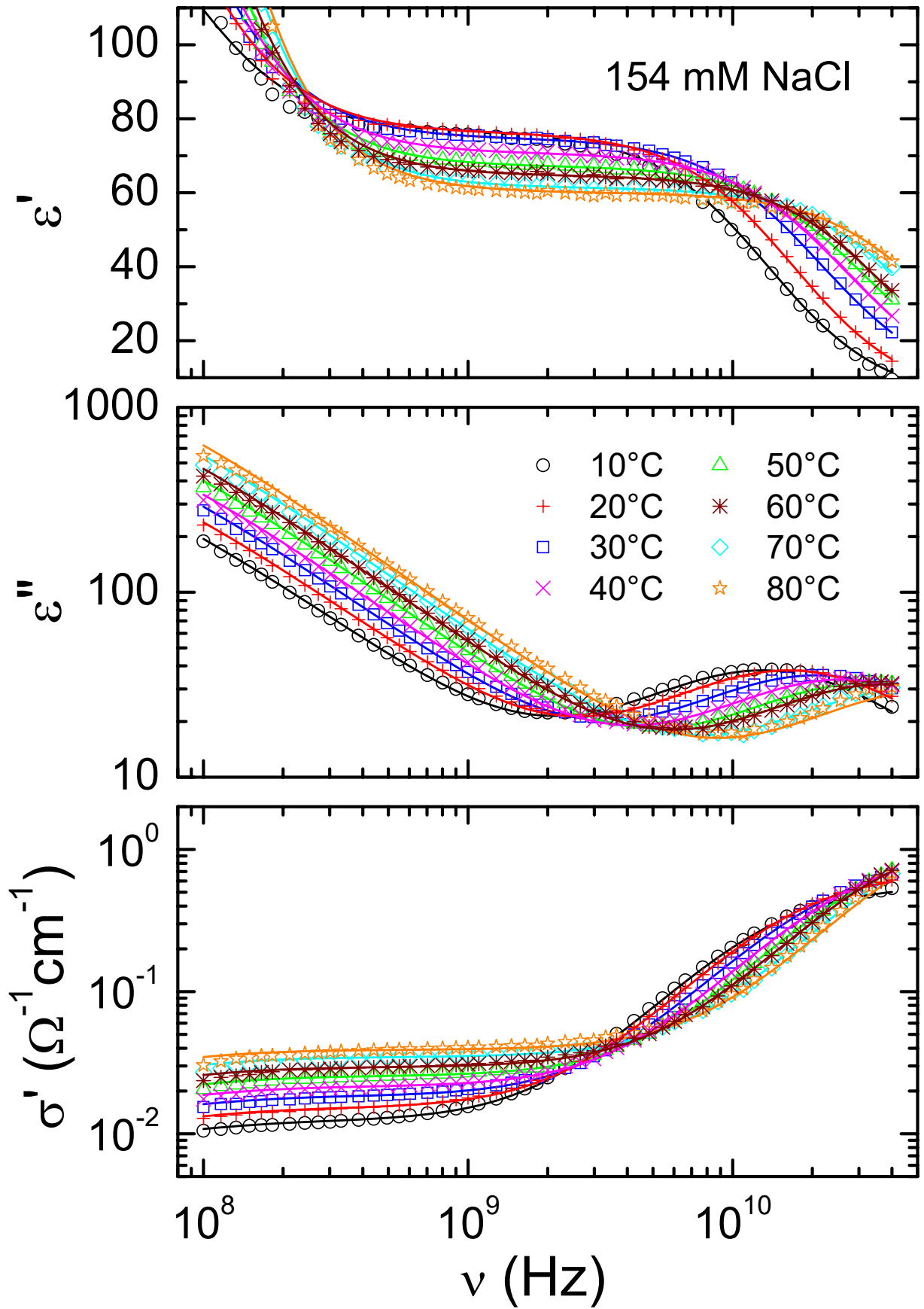


Abb. 2.3: Dielektrische Eigenschaften einer 154 mM NaCl Lösung

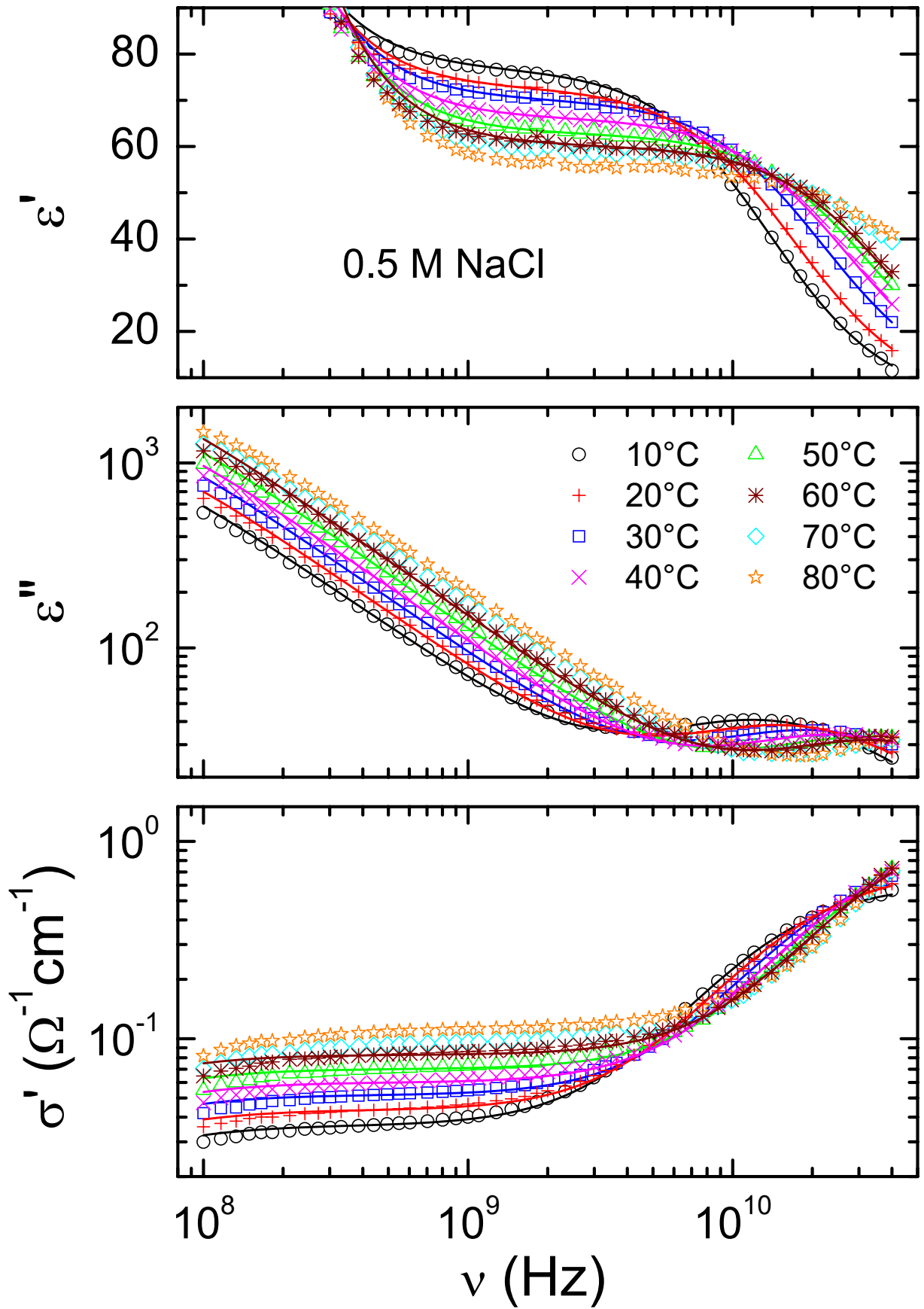


Abb. 2.4: Dielektrische Eigenschaften einer 0.5 M NaCl Lösung

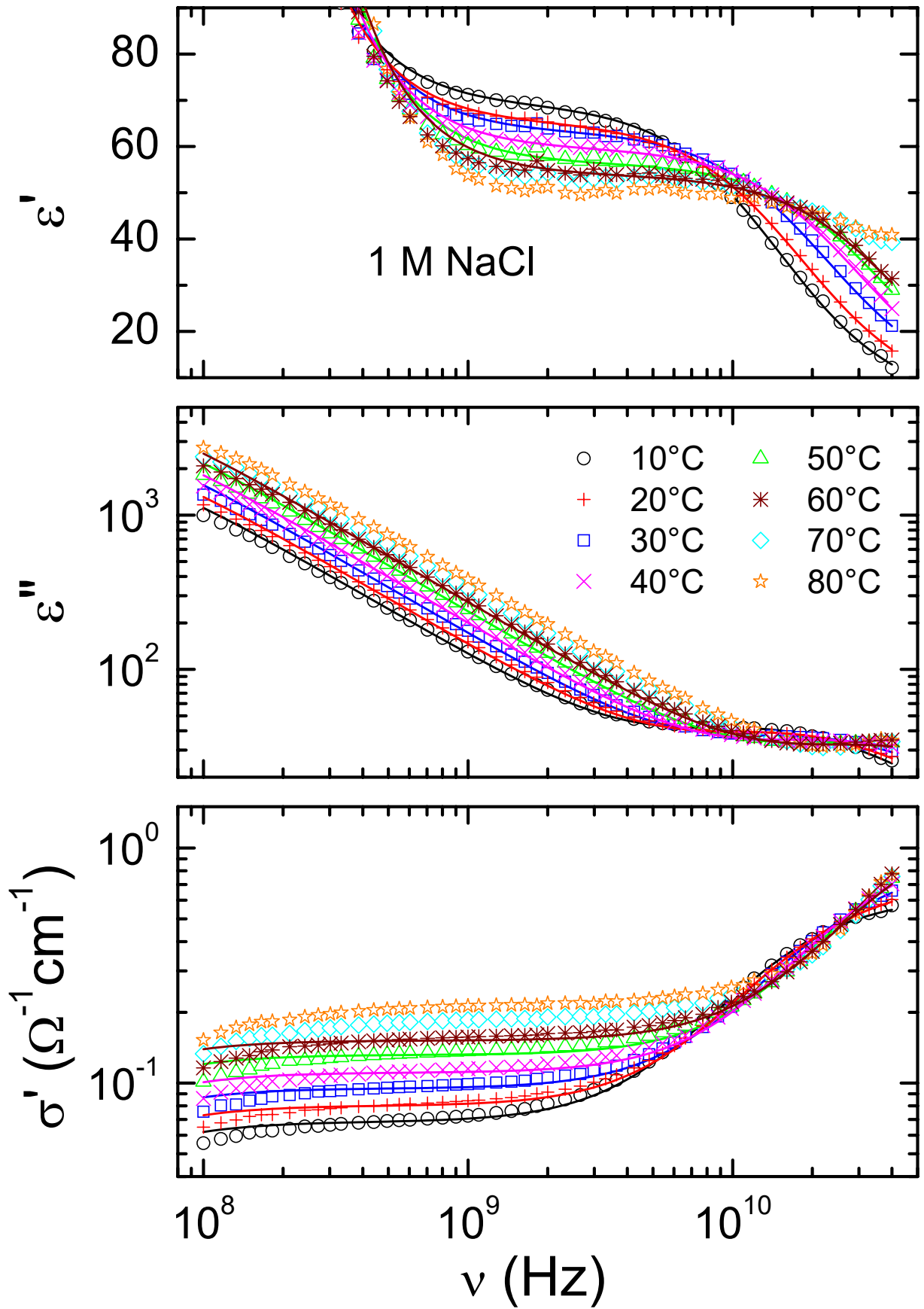


Abb. 2.5: Dielektrische Eigenschaften einer 1 M NaCl Lösung

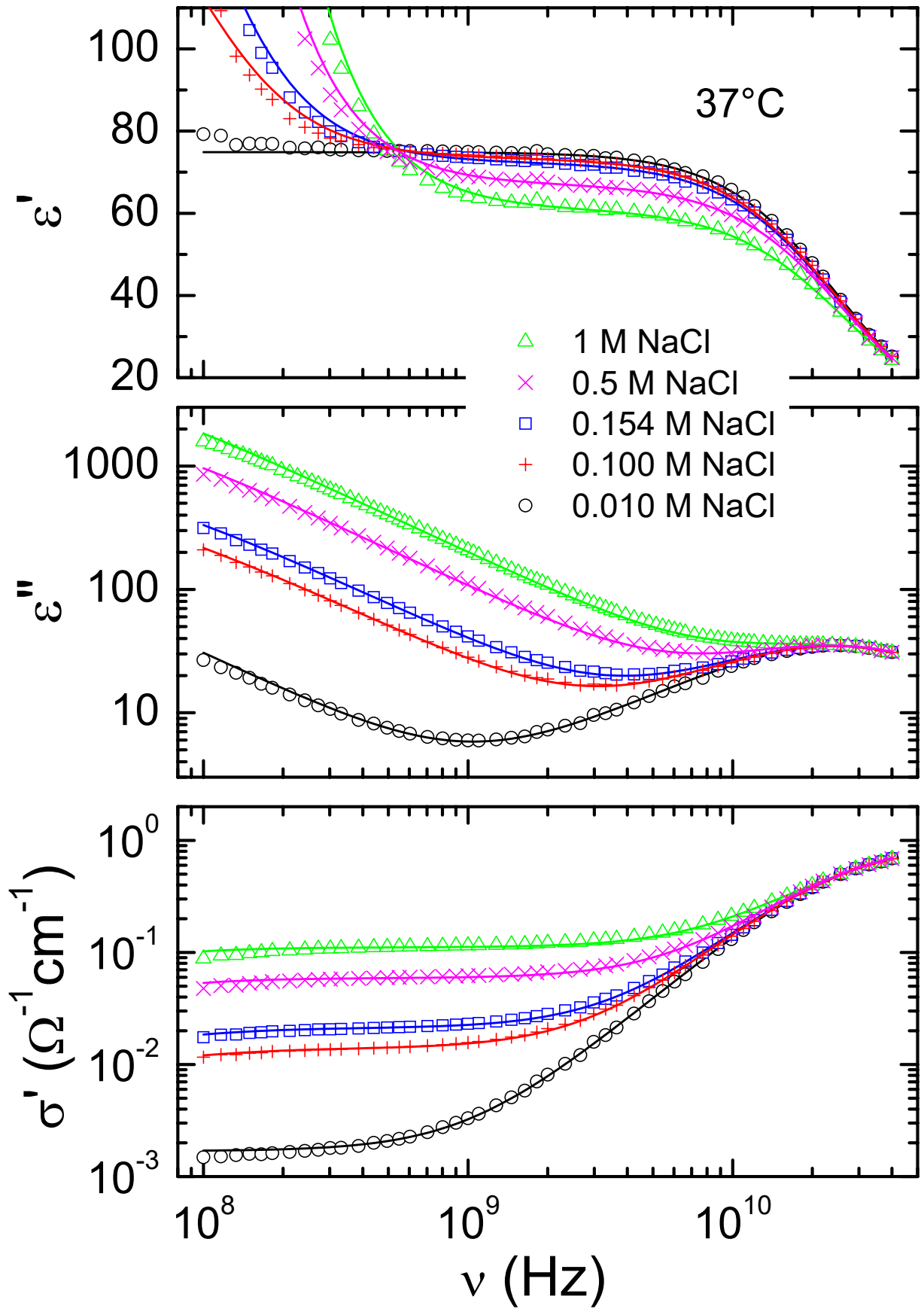


Abb. 2.6: Dielektrische Eigenschaften versch. NaCl-Lösungen bei 37°C

2.2 Dielektrische Messungen an wässrigen KCl Lösungen

Analog zu den Messungen an NaCl Elektrolytmessungen zeigen die nachfolgenden Abbildungen 2.7 bis 2.10 Mess- und Fitergebnisse an wässrigen KCl-Lösungen in einem Temperaturbereich von 10 °C bis 60 °C und für Frequenzen von 100 MHz bis 40 GHz. Die Bilder dokumentieren Messungen an 1 mMol/l (Abbildung 2.7), 10 mMol/l (Abbildung 2.8), 100 mMol/l (Abbildung 2.9) und 1 Mol/l (Abbildung 2.10). Auch hier wird nur eine kleine Auswahl der tatsächlich gemessenen Daten gezeigt. Wie im Arbeitsprogramm festgelegt wurde zwischen 24 °C und 40 °C in Temperaturschritten von 2 °C gemessen. In jeder Abbildung ist der Realteil der dielektrischen Konstante (ϵ' : oberer Bildrahmen), der Imaginärteil der dielektrischen Konstante (ϵ'' : mittlerer Bildrahmen) und der Realteil der Leitfähigkeit (σ' : unterer Bildrahmen) dargestellt. σ' und ϵ'' sind über die Messfrequenz direkt verknüpft. Alle Daten wurden mit einer Cole-Davidson Funktion gefittet (durchgezogene Linien in den Abbildungen 2.7 bis 2.11). Analog zeigen wir in Abbildung 2.11 die dielektrischen Eigenschaften verschiedener KCl-Lösungen bei 37 °C. Signifikante Änderungen gibt es nur in der DC-Leitfähigkeit, die mit zunehmender Molkonzentration stark zunimmt.

Die Phänomenologie der komplexen dielektrischen Eigenschaften von wässrigen KCl Lösungen ist sehr ähnlich zu denen in NaCl Lösungen. In der Literatur (Hasted 1973, Pethig und Kell 1987) gelten die dielektrischen Eigenschaften von niedermolaren NaCl- und KCl-Lösungen als identisch. Im Rahmen dieser systematischen Untersuchungen konnten jedoch Unterschiede herausgearbeitet werden (siehe Abbildung 2.18).

Für niedermolare KCl-Lösungen bei Körpertemperatur zeigt Abbildung 2.11 sehr deutlich, dass sich die Leitfähigkeit im Frequenzbereich von 900 MHz zu 2 GHz um ca. einen Faktor zwei ändert. D. h. in diesem Frequenzbereich würden auch die SAR-Werte um einen Faktor zwei steigen.

Abbildung 2.11 zeigt auch sehr deutlich den Einfluss der Molkonzentration auf die Absorption elektromagnetischer Strahlung. Während in der mM Lösung bei 1 GHz die Leitfähigkeit noch von Relaxationsphänomenen dominiert wird, ist in diesem Frequenzbereich in der 1 molaren Lösung DC-Leitfähigkeit der wesentliche Absorptionskanal.

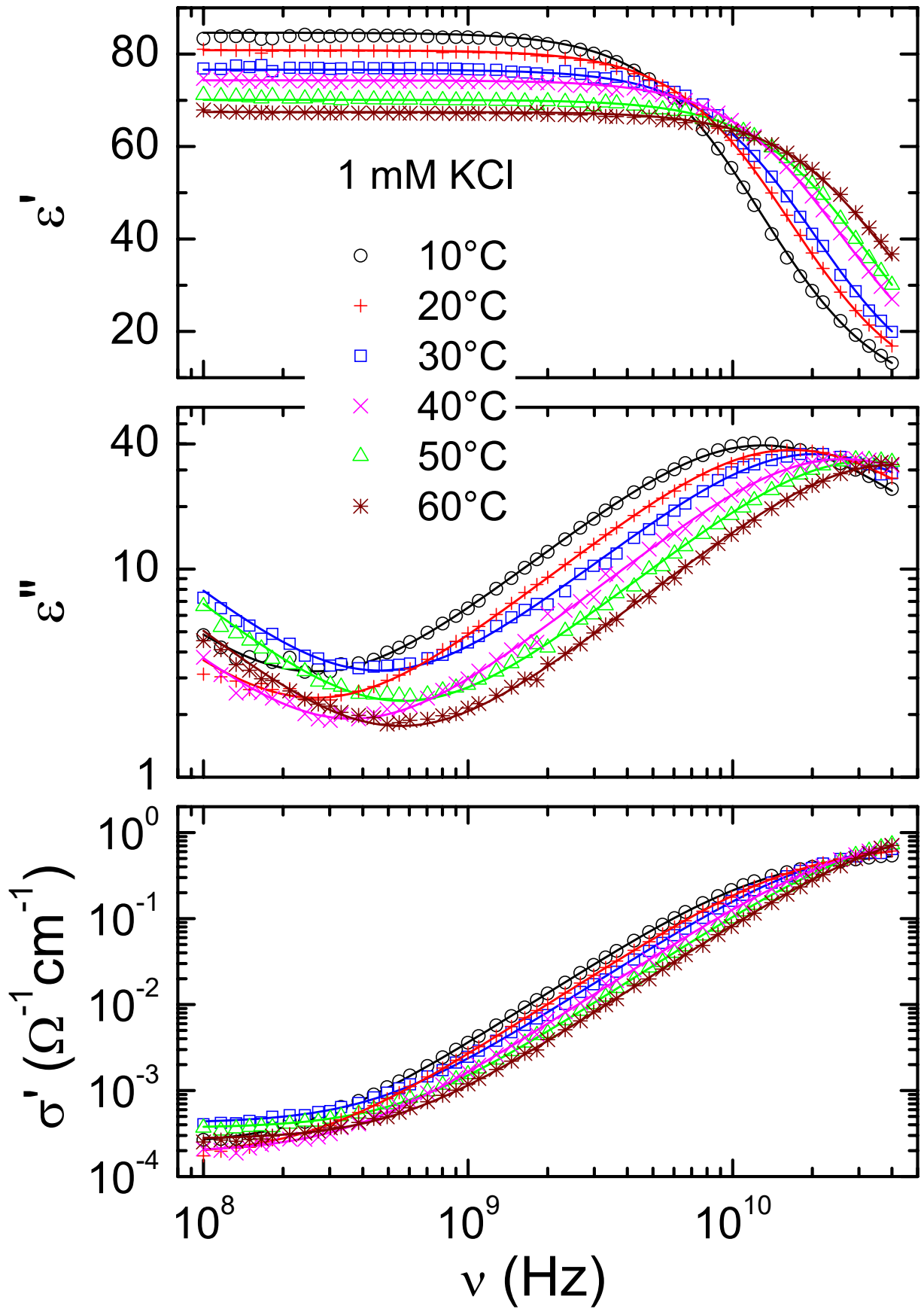


Abb. 2.7: Dielektrische Eigenschaften einer 0.001 M KCl Lösung

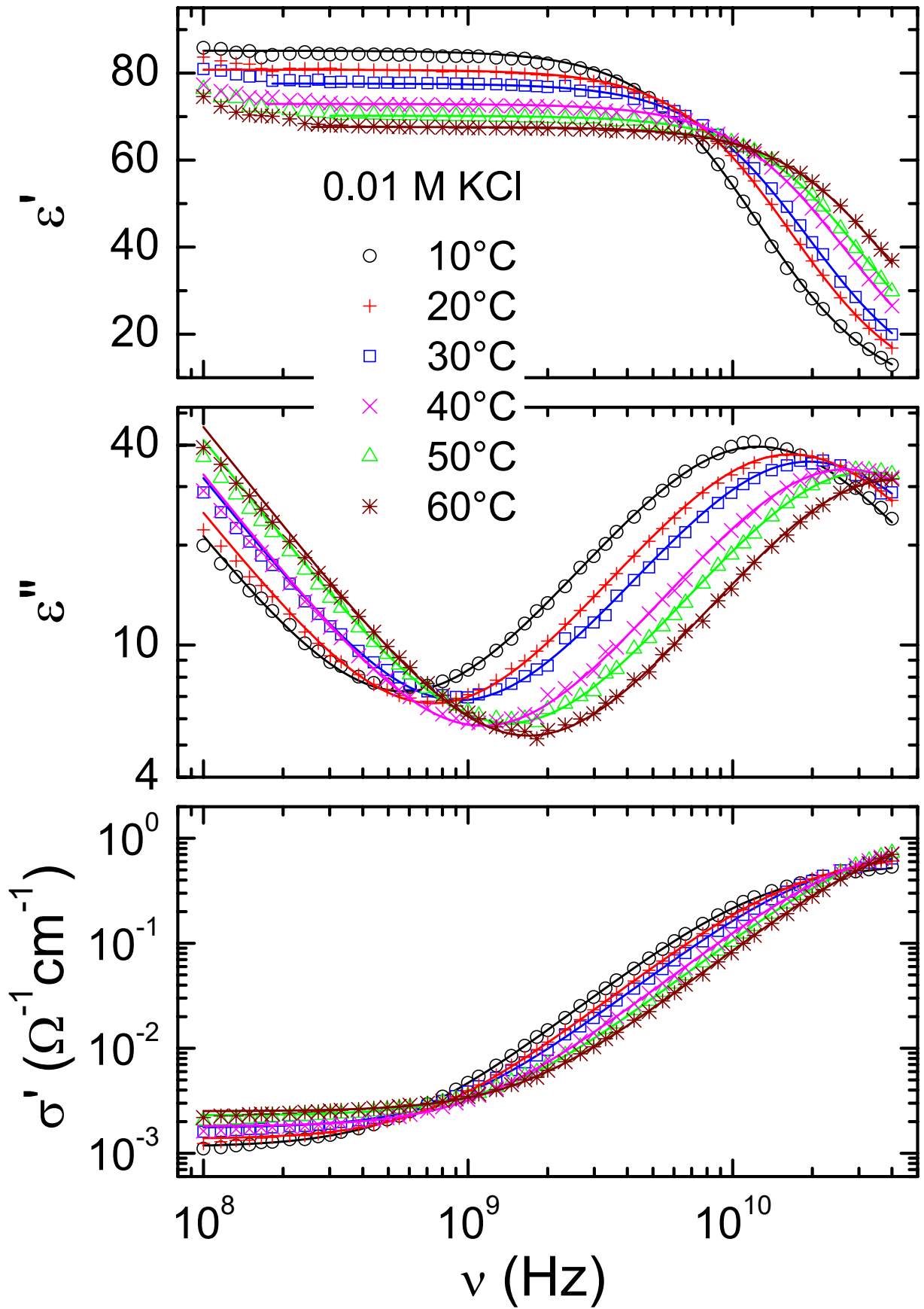


Abb. 2.8: Dielektrische Eigenschaften einer 0.01 M KCl Lösung

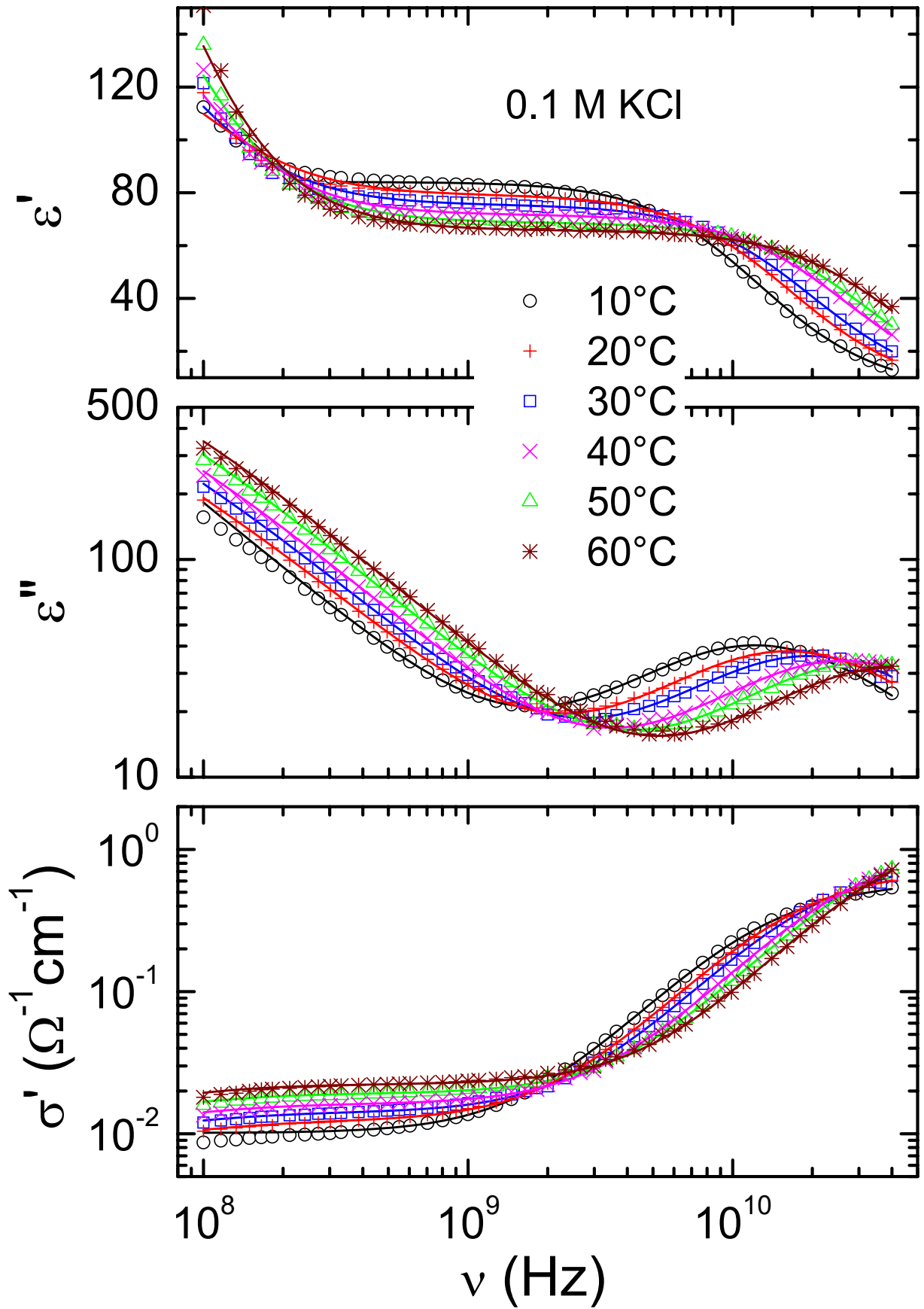


Abb. 2.9: Dielektrische Eigenschaften einer 0.1 M KCl Lösung

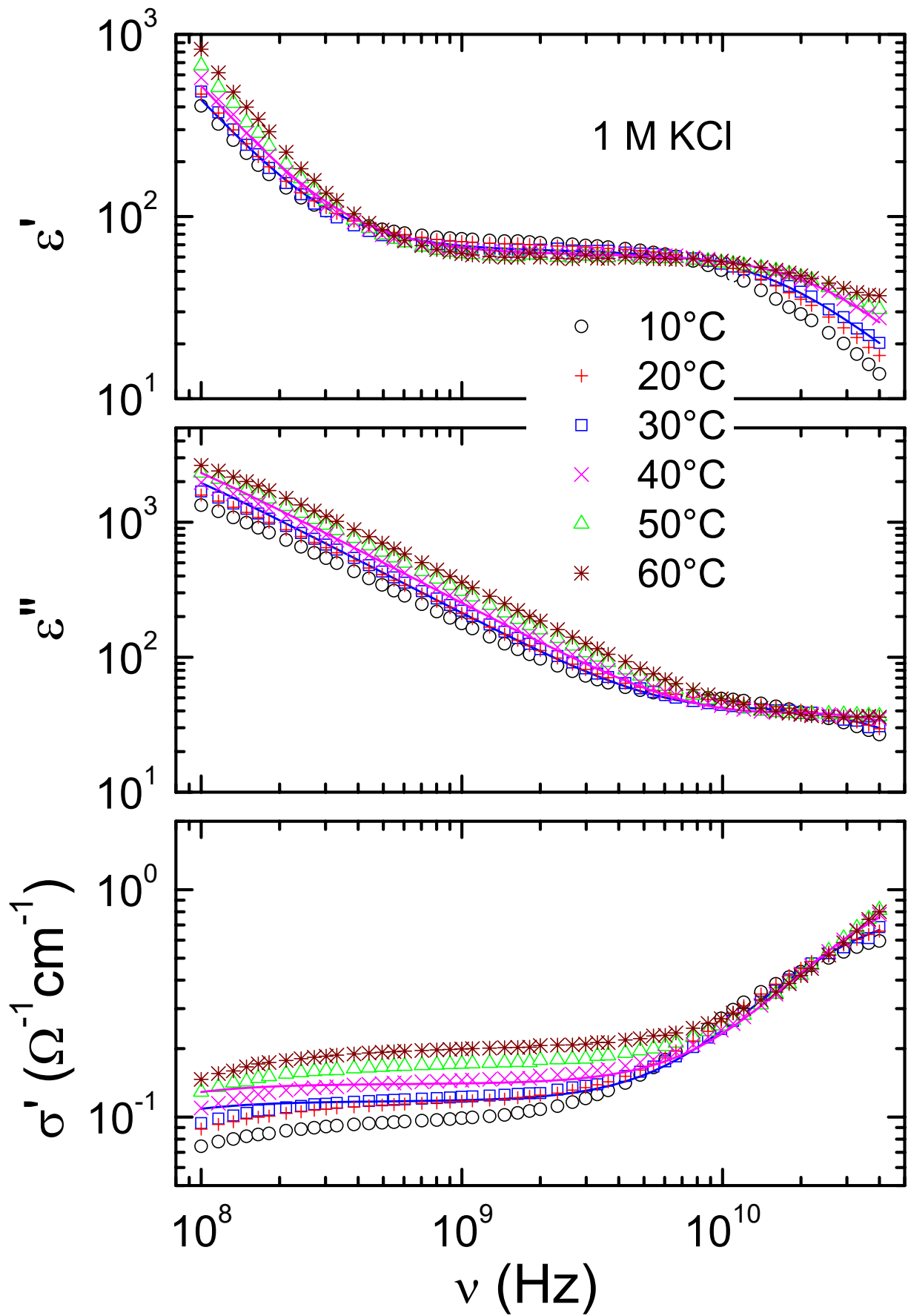


Abb. 2.10: Dielektrische Eigenschaften einer 1 M KCl Lösung

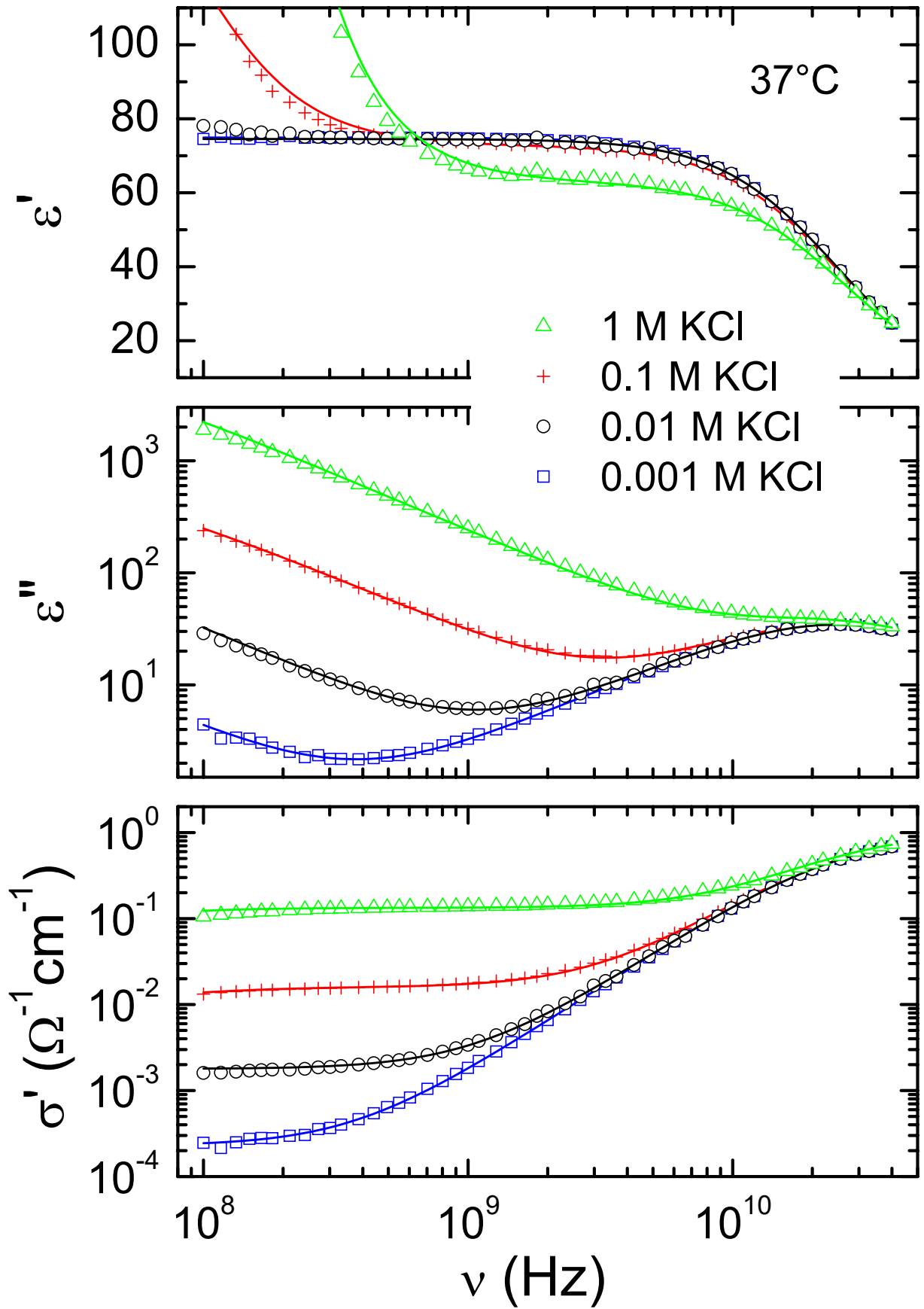


Abb. 2.11: Dielektrische Eigenschaften versch. KCl-Lösungen bei 37°C

2.3 Analyse der Messergebnisse an wässrigen Lösungen von NaCl und KCl

Wie weiter vorne beschrieben konnten alle Daten der komplexen dielektrischen Konstante mit Gleichung 2.1 beschrieben werden. Hier wird neben einer dipolaren Relaxation mit asymmetrischer Relaxationszeitenverteilung noch ein DC-Leitfähigkeitsterm benutzt. Außerdem berücksichtigen die Fits Effekte blockierender Elektroden. Der Asymmetrie-Parameter lag immer zwischen 0.9 und 1, also nahe einer symmetrischen Debye-Relaxation. Die verbleibenden Parameter, DC-Leitfähigkeit σ_{dc} , mittlere Relaxationszeit τ und Stärke der dipolaren Relaxation $\Delta\epsilon$ sind für NaCl in Abbildung 2.12 und für KCl in Abbildung 2.13 dargestellt. Dabei sind die DC-Leitfähigkeit (jeweils oberster Rahmen) und die mittlere Relaxationszeit (mittlerer Rahmen) halblogarithmisch als Funktion der inversen Temperatur (Arrhenius-Auftragung) für alle untersuchten molaren Konzentrationen dargestellt.

Für beide wässrigen Lösungen nimmt die Leitfähigkeit exponentiell mit steigender Temperatur zu, eine Tatsache, die auf einen einfach thermisch aktivierten Prozess hindeutet. Die mittlere Relaxationszeit wird mit steigender Temperatur exponentiell kleiner, was auf exponentielle Abnahme der Verweilzeiten in einem Potential-Minimum hinweist. Im untersten Rahmen zeigen wir für beide Lösungen die Temperaturabhängigkeit der Stärke der Dipolrelaxation. Nach Gleichung 1.3 wissen wir, dass $1/T$ der führende Term ist, die Dipolstärke aber in komplexer Weise um Beiträge von ϵ_∞ korrigiert werden muss. Zur Analyse zeigen wir in den Bildern 2.12 und 2.13 die inverse Relaxationsstärke gegenüber der Temperatur. Bei linearem Verhalten, würde dies im einfachstem Falle auf eine Curie-Weiss-ähnliche Suszeptibilität hindeuten.

Im Rahmen der hier untersuchten wässrigen Lösungen nehmen wir für die Temperaturabhängigkeit der mittleren Relaxationszeit τ und der DC-Leitfähigkeit rein thermisch aktiviertes Verhalten an, mit

$$\tau = \tau_0 \cdot \exp\left(\frac{E_\tau}{k_B T}\right) \quad (2.3)$$

und

$$\sigma_{dc} = \sigma_0 \cdot \exp\left(-\frac{E_\sigma}{k_B T}\right) \quad (2.4)$$

In Gleichung 2.3 entspricht τ_0 einer inversen Anklopf-Frequenz, mit der die Ionen vibrieren, ehe sie einen thermisch aktivierten Sprung über die Energiebarriere E_τ ausführen. τ_0 muss ein mikroskopischer Prozess sein und sollte im Bereich zwischen ps und fs liegen. σ_0 ist der Vorfaktor der thermisch aktivierten DC-Leitfähigkeit. Dieser Vorfaktor wird wesentlich durch die Ionenkonzentration n_0 , mit Ladung q , bestimmt und sollte mit dieser skalieren. Im einfachsten Fall einer Nernst-Einstein Leitfähigkeitsdiffusion gilt:

$$\sigma_0 = \frac{n_0 q^2 a^2 \nu_0}{6 k_B T} \quad (2.5)$$

Hier entspricht ν_0 einer Anklopfrequenz für diffusive Sprungprozesse, die der ionischen Leitfähigkeit zugrunde liegen. a ist ein effektiver Ionenradius. Man muss beachten, dass σ_0 selbst von der Temperatur abhängt. Allerdings kann man bereits an dieser Stelle sagen, dass der von uns untersuchte Temperaturbereich so klein ist, dass diese lineare Temperaturabhängigkeit im Vergleich zur exponentiellen (siehe Gleichung 2.4) vernachlässigbar ist und experimentell nicht nachgewiesen werden kann.

Eine weitere Zusatzbemerkung ist notwendig um die Analyse der Dipolstärke der dielektrischen Relaxationsprozesse zu rechtfertigen. In der Einleitung haben wir gezeigt, dass man erwartet, dass die Dipolstärke ungefähr mit einem Curie Gesetz beschreibbar ist. Die Analyse aber wird zeigen, dass dies nicht möglich ist. Zur Parametrisierung der experimentellen Ergebnisse muss deswegen ein Curie-Weiss ähnliches Gesetz herangezogen werden:

$$\Delta\varepsilon = \frac{C}{T - T_C} \quad (2.6)$$

Hier beschreibt der zusätzliche Parameter T_C , der formal einer ferroelektrischen Ordnungstemperatur entspricht, die effektive mittlere Wechselwirkung der molekularen Dipole. T_C ist die Curie-Weiss Temperatur und man erwartet, dass für Temperaturen $T < T_C$ das System ferroelektrische oder antiferroelektrische Ordnung der molekularen Dipole zeigt. Die Wechselwirkung ist also so stark, dass ein makroskopischer Ordnungszustand noch bei endlichen Temperaturen erreicht wird. In den hier untersuchten Systemen wird dieser polare Ordnungszustand der Moleküle nicht erreicht, da das System bereits bei höheren Temperaturen in einer thermodynamischen Phasenumwandlung 1. Art ohne langreichweitige Dipol-Ordnung der Moleküle erstarrt/einfriert.

Die Abbildungen 2.12 und 2.13 zeigen, dass die oben angeführten Parametrisierungen die temperaturabhängigen experimentellen Ergebnisse bei allen untersuchten Konzentrationen zufrieden stellend beschreiben. Signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Konzentrationen findet man für die dielektrische Stärke und natürlich für die DC-Leitfähigkeit. Die mittleren Relaxationszeiten sind nur sehr schwach von der Konzentration abhängig. In der 0.1 M NaCl Lösung kann die Temperaturabhängigkeit der Dipolstärke nur sehr ungenau mit einem Curie-Weiss Gesetz beschrieben werden. Der Grund hierfür ist unklar.

Die Ergebnisse für die Beschreibung der Dipolstärken mit Curie-Weiss Gesetzen sind für beide Lösungen in der Abbildung 2.16 dargestellt. Diese Abbildungen zeigen die Curie-Weiss Konstante C und die Curie-Weisstemperatur T_C auf halblogarithmischen Skalen.

Man würde naiver Weise erwarten, dass in einem System die Energiebarrieren von DC-Leitfähigkeit und Relaxation von ähnlicher Größenordnung sein sollten. In beiden Fällen müssen Energiebarrieren überwunden werden, die durch die lokale Struktur vorgegeben werden.

Ein zusammenfassendes Ergebnis ist für beide wässrigen Lösungen in den Abbildungen 2.14 und 2.15 dargestellt. Hier finden wir die Konzentrationsabhängigkeit der Energiebarrieren und der Vorfaktoren der DC-Leitfähigkeit (in den oberen beiden Rahmen) und Energiebarrieren und Vorfaktoren für die

Dipolrelaxation (in den unteren beiden Rahmen). Alle Darstellungen sind auf halblogarithmischen Achsen zur besseren Darstellung.

Die Energiebarrieren der DC-Leitfähigkeit liegen für beide Lösungen in der Größenordnung von ca. 100 meV und steigen mit steigender Konzentration leicht an. Für NaCl-Lösungen findet man einen Anstieg von 113 meV bis zu 129 meV, für KCl-Lösungen von ca. 77 meV bis zu 132 meV bei 1 molarer Lösung. Die Vorfaktoren der DC-Leitfähigkeit σ_0 zeigen lineare Anstiege. Der Grund hierfür liegt natürlich in der direkten Proportionalität zur Konzentration der gelösten Ionen. Der lineare Anstieg ist für die KCl-Lösungen etwas stärker, eine Tatsache, die sicherlich in den unterschiedlichen Ionenradien von Na (102 pm bei 6-er Koordination) und K (138 pm bei 6-er Koordination) begründet liegt (siehe dazu auch Gleichung 2.5). In den 1 molaren Lösungen findet man 13.8 S/cm für NaCl und 18.6 S/cm für KCl.

Die Energiebarrieren der Relaxationszeiten sind deutlich größer als die der DC-Leitfähigkeit. Dies ist Ausdruck dafür, dass die Reorientierung von Wassermolekülen mehr thermische Energie verlangt, als der Diffusionsprozess von gelösten Ionen. Für NaCl-Lösungen sind die Energiebarrieren konstant für alle Konzentrationen und liegen bei ca. 180 meV. Für die KCl Lösungen liegen sie etwas höher und zeigen zudem eine signifikante Temperaturabhängigkeit, von ca. 220 meV bei 0.001 molarer bis 260 meV bei 1 molarer Lösung.

Die Vorfaktoren τ_0 des Arrhenius-Gesetzes für die Relaxationszeiten zeigen eine signifikante Verlangsamung mit zunehmender Konzentration. Offensichtlich werden die Verweilzeiten in den Energieminima der Reorientierungsbewegung der Wassermoleküle mit zunehmender Konzentration gelöster Ionen etwas kürzer. Durch die gelösten Ionen wird die Wasserstoffbrückenbindung zwischen den Wassermolekülen deutlich gestört und somit die Reorientierung beschleunigt.

Schließlich finden wir aus Abbildung 2.16, dass die Curie-Weiss Temperaturen für beide Elektrolyt-Lösungen von ca. 100 K bei tiefen Konzentrationen zu ca. 150 K für die 1 molaren Lösungen ansteigen. Die Curie Konstanten C sind auch schwach konzentrationsabhängig und von der Größenordnung $10 - 15 \cdot 10^3$ K. Naiv betrachtet bedeutet die Zunahme von T_C mit steigender Ionenkonzentration eine deutliche Erhöhung der Wechselwirkung zwischen den H_2O -Dipolen. Es scheint als würden die gelösten Ionen eine effektive „ferroelektrische“ Korrelation zwischen den Wassermolekülen induzieren. Andererseits bedeutet die Abnahme der Curie Konstanten C , dass die effektiven Dipolmomente mit steigender Ionenkonzentration abnehmen.

Auf Basis dieser Parametrisierung der experimentellen Ergebnisse in NaCl- und KCl-Elektrolytlösungen können wir nun eine universelle Beschreibung der komplexen dielektrischen Eigenschaften von Elektrolytlösungen vorschlagen. Damit haben wir natürlich auch Zugriff auf den Realteil der Leitfähigkeit und damit auf die SAR-Werte. Durch die Angabe von maximal 14 Parametern und durch Benutzung der Gleichungen 2.3, 2.4, 2.6 und 2.7 kann der Realteil der dielektrischen Konstante und der Realteil der Leitfähigkeit für jede Frequenz, für jede molare Konzentration und für jede Temperatur berechnet werden:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{[1 + (i\omega\tau)^{1-\alpha}]^\beta} - i \frac{\sigma_{dc}}{\varepsilon_0\omega} \quad (2.7)$$

Gleichung 2.7 beschreibt zunächst für eine gegebene Konzentration und eine feste Temperatur die Frequenzabhängigkeit der komplexen dielektrischen Konstanten mit den 6 Parametern $\Delta\epsilon$, τ , σ_{dc} , α , β und ϵ_∞ . ϵ_∞ rührt von der ionischen und elektronischen Polarisierbarkeit her und kann oft als konstant angenommen werden. Die Verbreiterungs- und Asymmetrieparameter α und β aus der Havriliak-Negami-Formel werden in erster Näherung als unabhängig von Temperatur und molarer Konzentration angenommen. Bei der in unserer Analyse verwendeten asymmetrisch verbreiterten Cole-Davidson-Relaxationsfunktion ist $\alpha = 0$. Der Asymmetrieparameter β liegt in der Regel zwischen 0.9 und 1, also nahe einer symmetrischen Debye-Relaxation.

Die verbleibenden 3 signifikanten Parameter $\tau(\tau_0, E_\tau)$, $\sigma_{dc}(\sigma_0, E_\sigma)$ und $\Delta\epsilon(C, T_C)$ sind temperaturabhängig und werden mit den Gleichungen 2.3, 2.4 und 2.6 durch ein thermisch aktiviertes Verhalten mit Vorfaktor und Energiebarriere bzw. durch ein Curie-Weiss ähnliches Gesetz beschrieben. Somit ergeben sich für die temperatur- und frequenzabhängige Beschreibung einer Probe mit fester Konzentration insgesamt 9 Parameter ($\tau_0, E_\tau, \sigma_0, E_\sigma, C, T_C, \alpha, \beta$ und ϵ_∞).

Um den Realteil der dielektrischen Konstante und den Realteil der Leitfähigkeit für jede Frequenz, für jede molare Konzentration und für jede Temperatur berechnen zu können, ist es nötig die 6 signifikanten Parameter ($\tau_0, E_\tau, \sigma_0, E_\sigma, C, T_C$) der temperatur- und frequenzabhängigen Charakterisierung hinsichtlich ihrer Konzentrationsabhängigkeit zu parametrisieren (Abbildungen 2.14 bis 2.16). In erster Näherung sind hierfür weitere 5 Parameter erforderlich (1 Parameter für die Konzentrationsabhängigkeit von σ_0 und jeweils 2 Parameter für die Konzentrationsabhängigkeit von $\tau_0, E_\tau, E_\sigma, C$ und T_C). Folglich ergibt sich eine Gesamtanzahl von maximal 14 Parametern, um eine universelle Beschreibung der komplexen dielektrischen Eigenschaften von Elektrolytlösungen durchführen zu können.

Die Nützlichkeit und Bedeutung dieses Ansatzes wird in den folgenden Abbildungen durch einige Beispiele beleuchtet. Abbildung 2.17 zeigt den Realteil der dielektrischen Konstante (ϵ' : oberer Bildrahmen), den Imaginärteil der dielektrischen Konstante (ϵ'' : mittlerer Bildrahmen) und den Realteil der Leitfähigkeit (σ' : unterer Bildrahmen) als Funktion der Messfrequenz für 1 mmolare und 1 molare KCl-Lösung. Hier werden Ergebnisse unserer universellen Berechnungen mit den eigenen Messergebnissen verglichen. Dies zeigt, dass wir unsere experimentellen Daten vernünftig und exakt genug analysiert haben. In Abbildung 2.18 zeigen wir den Realteil der dielektrischen Konstante (oberer Rahmen) den Imaginärteil der dielektrischen Konstante (mittlerer Bildrahmen) und den Realteil der Leitfähigkeit (unterer Rahmen) bei niederen Frequenzen (100 MHz entspricht dem statischen Grenzwert) und bei 37° C als Funktion der molaren Konzentration von KCl und NaCl. Die Ergebnisse werden mit einer empirischen Formel aus der Literatur (Hasted 1973) verglichen. Da in der Literatur diese beiden Systeme gleich parametrisiert werden ($\epsilon_{ss} = \epsilon_{sw} - 11 \cdot c$), gibt es nur eine Literaturkurve. Die Berechnung der Konzentrationsabhängigkeit der dielektrischen Konstante aus dieser empirischen Formel wurde als Mittelwert über eine große Anzahl von Messungen bestimmt und stellt einen zuverlässigen experimentellen Literaturwert dar. Von unseren Ergebnissen ist klar, dass NaCl- und KCl-Elektrolytlösungen sehr ähnlich sind, aber im Detail doch unterschiedliche Frequenz- und Konzentrationsabhängigkeit zeigen.

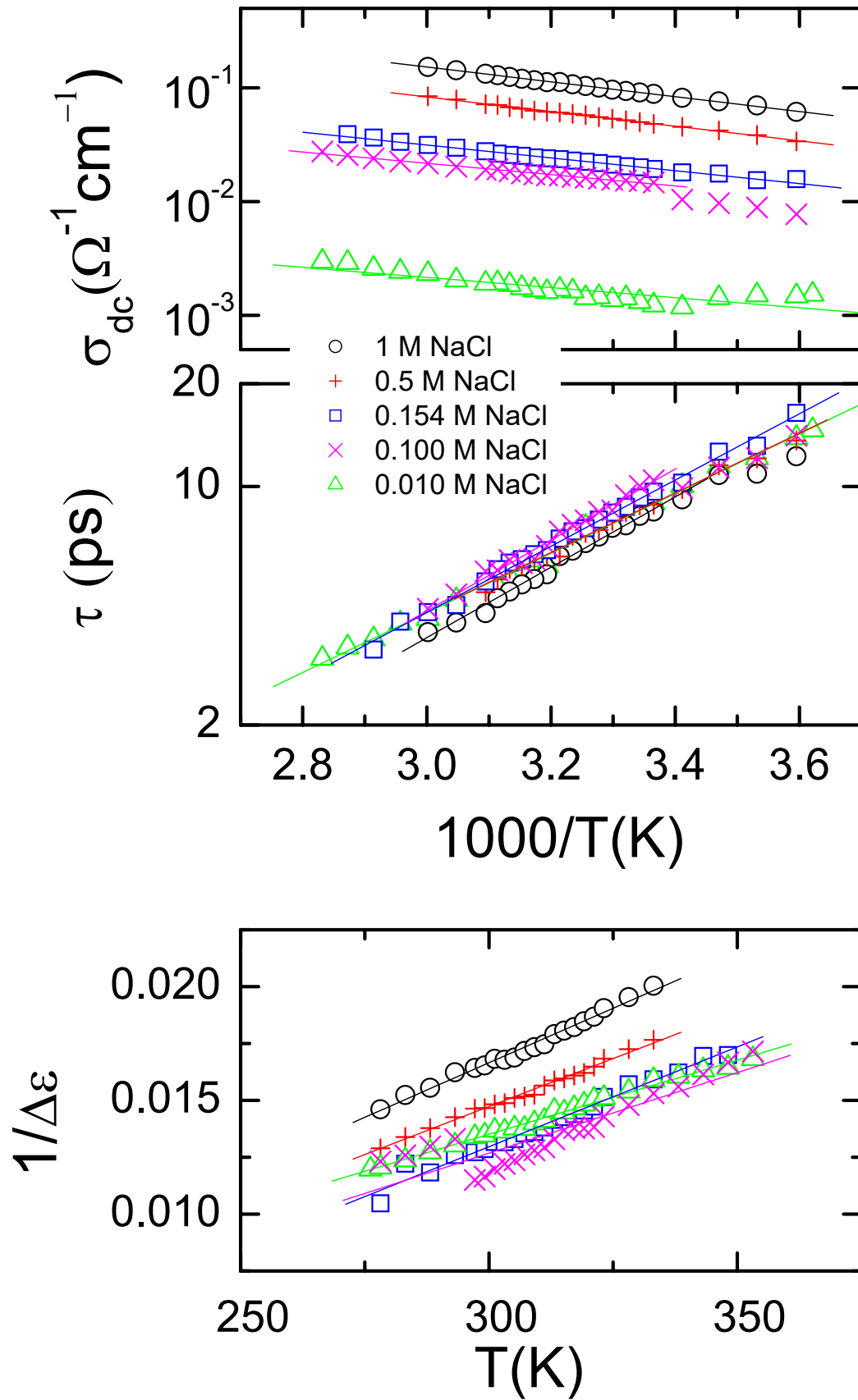


Abb. 2.12: Fitparameter NaCl-Lösungen

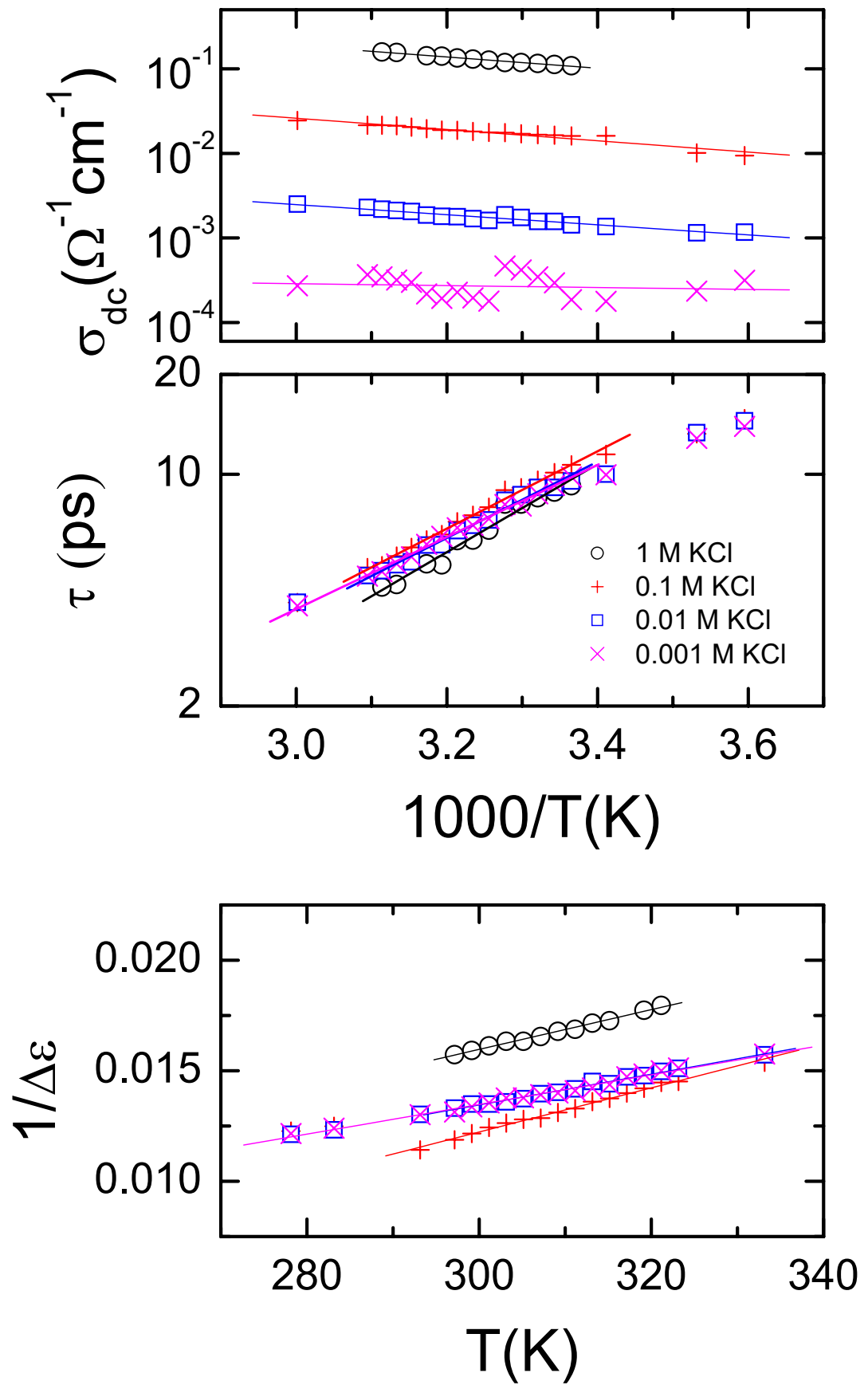


Abb. 2.13: Fitparameter KCl-Lösungen

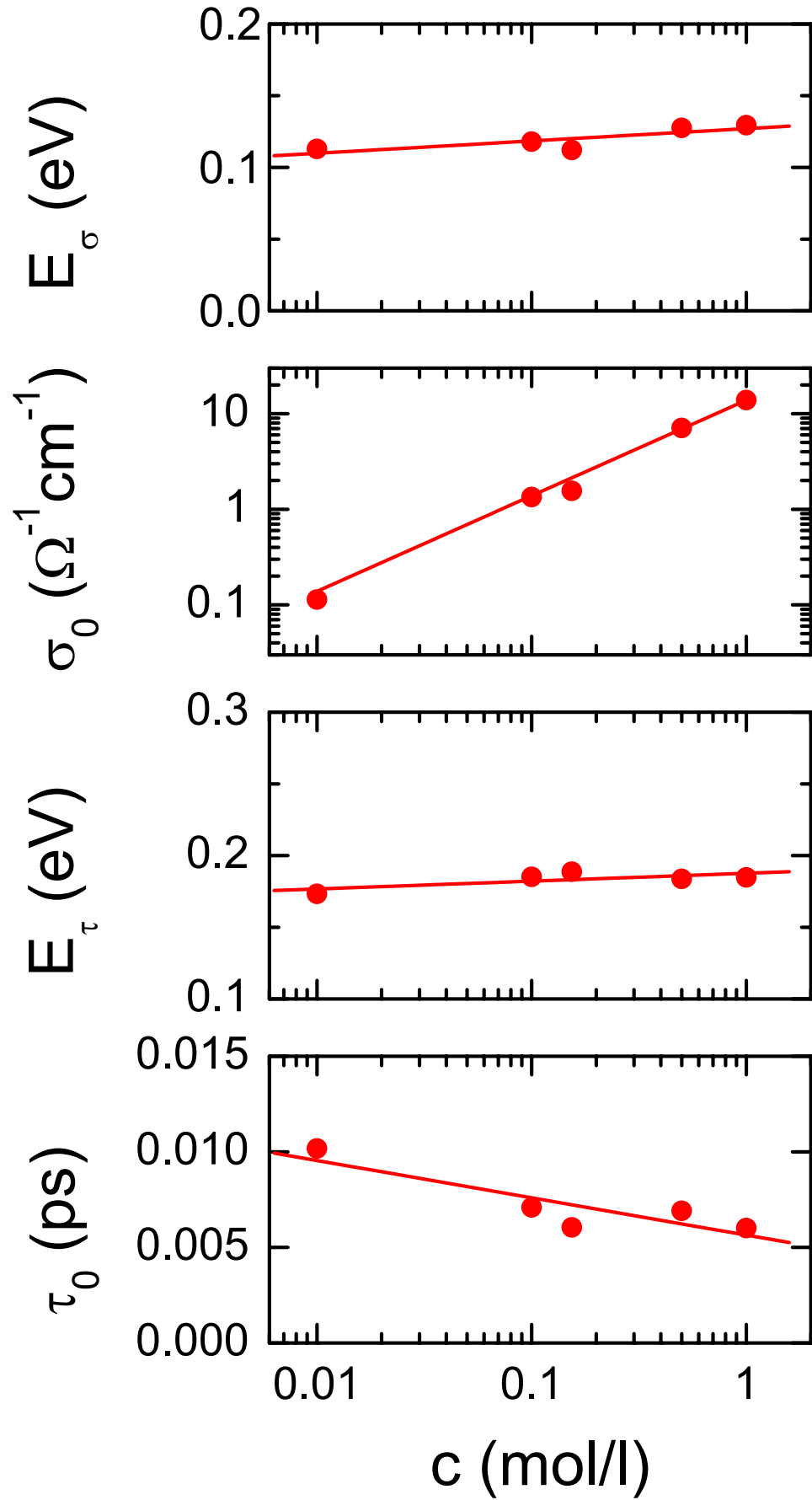


Abb. 2.14: Energiebarrieren von Diffusion E_σ und Relaxation E_τ sowie die zugehörigen Vorfaktoren σ_0 und τ_0 (NaCl-Lösungen)

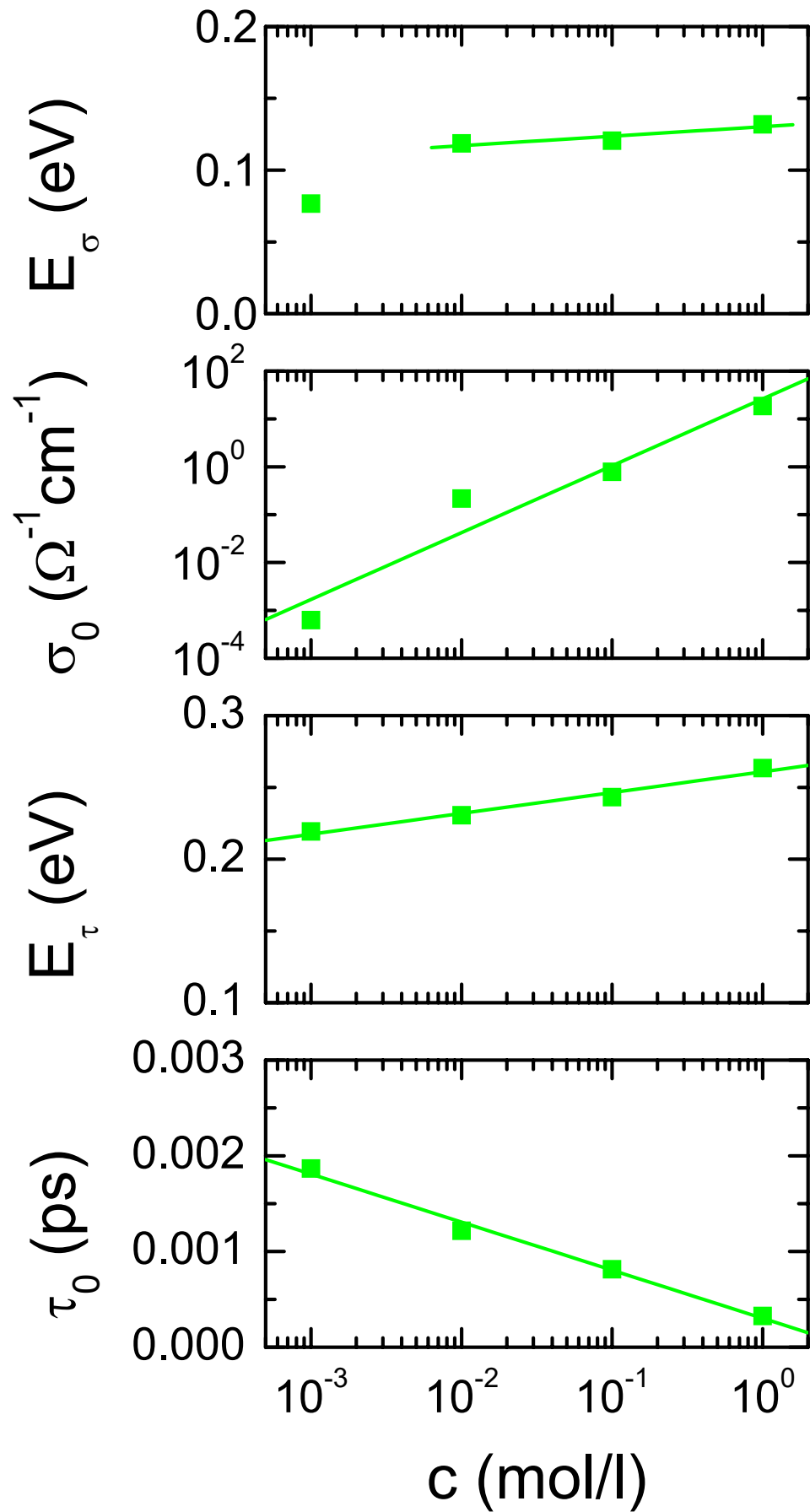


Abb. 2.15: Energiebarrieren von Diffusion E_{σ} und Relaxation E_{τ} sowie die zugehörigen Vorfaktoren σ_0 und τ_0 (KCl-Lösungen)

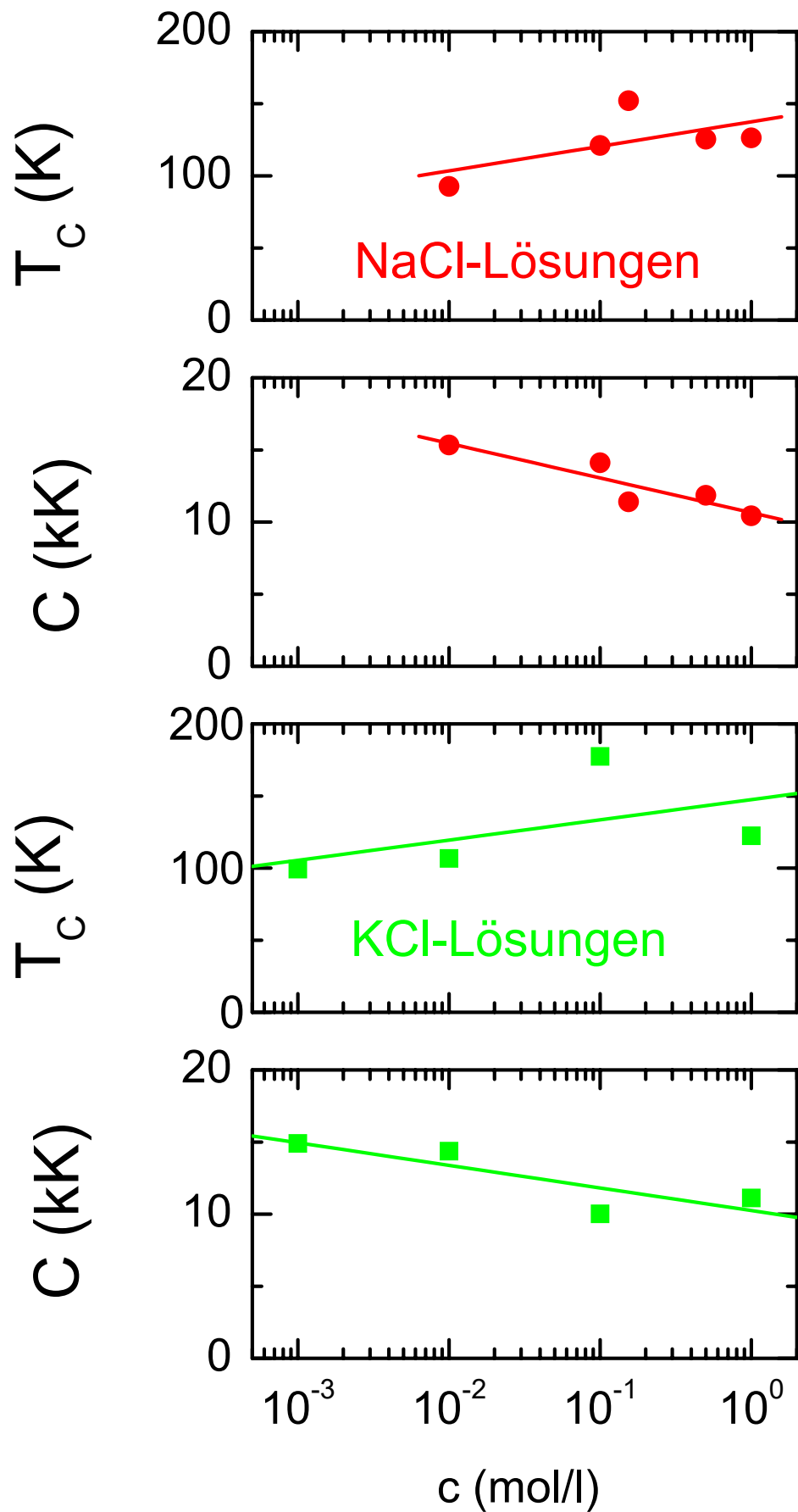


Abb. 2.16: Curie-Weiss-Temperaturen und Curie-Weiss-Konstanten für NaCl- und KCl-Lösungen

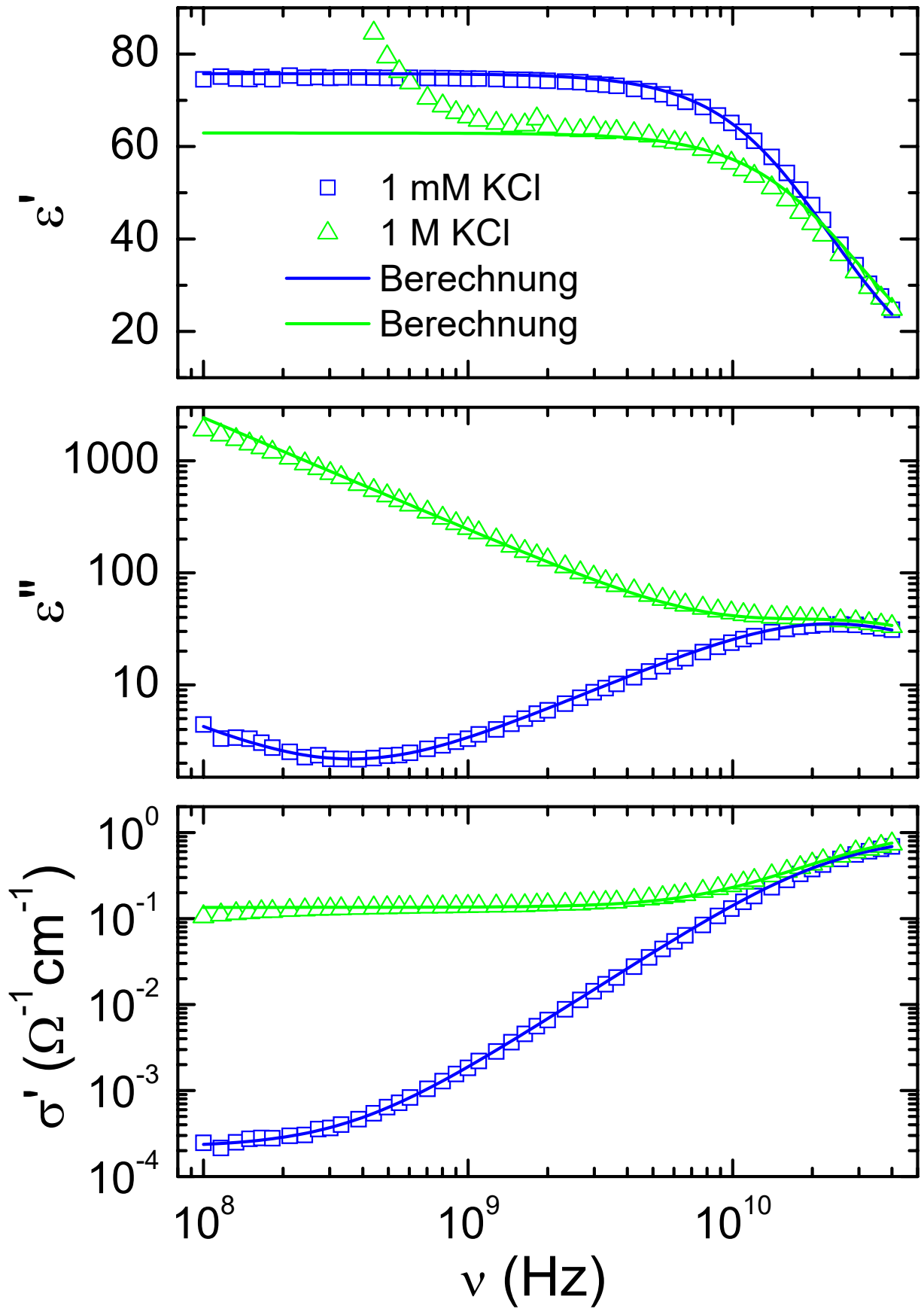


Abb. 2.17: Dielektrische Eigenschaften für 1 mM und 1 M KCl-Lösung
(Messung und universelle Berechnung)

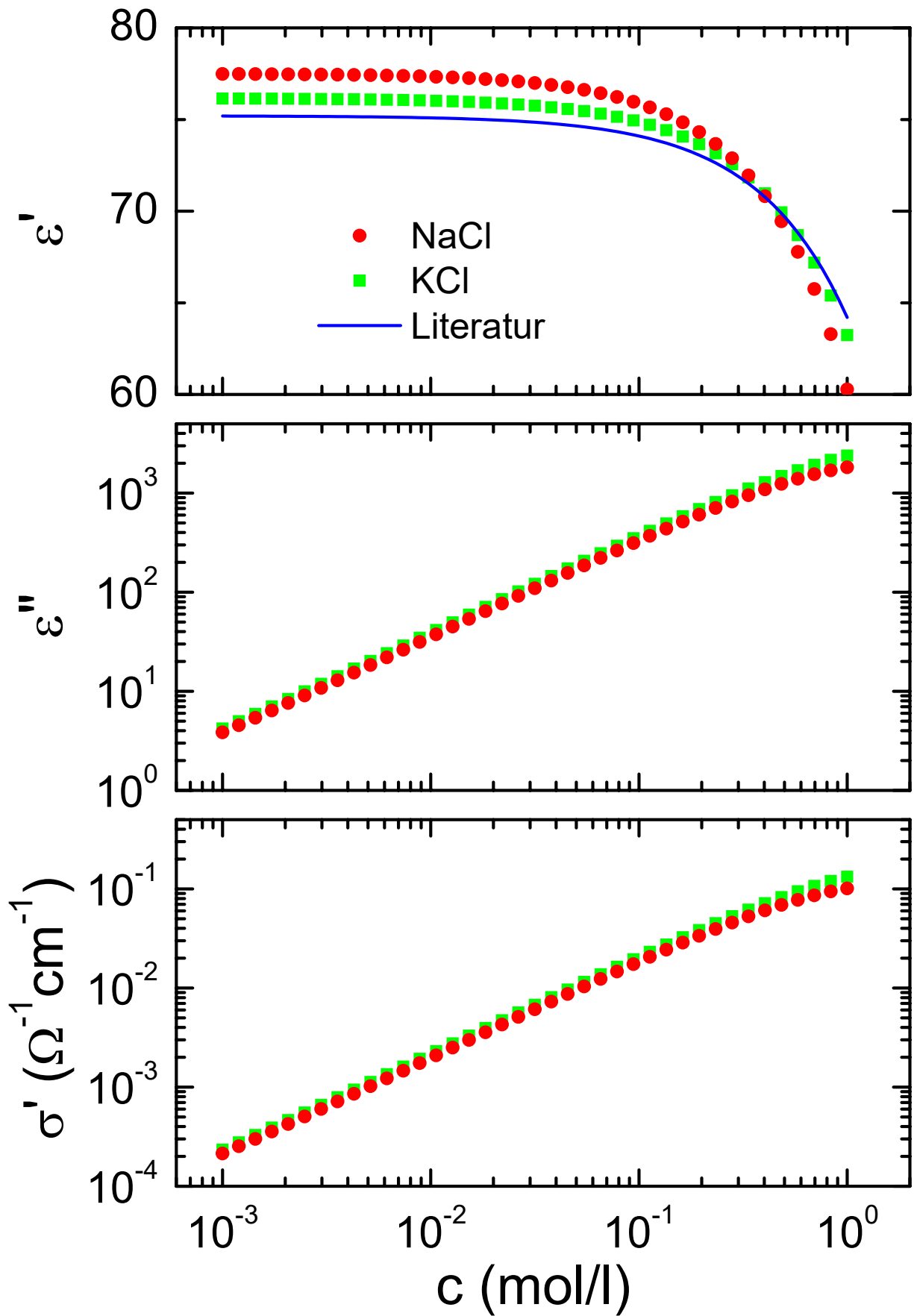


Abb. 2.18: Konzentrationsabhängigkeit der dielektrischen Eigenschaften von NaCl- und KCl-Lösungen

2.4 Dielektrische Messungen an Modellmembranen

Biologische Membranen, wie sie auch im menschlichen Körper vorkommen, bestehen aus verschiedenen Lipidtypen. Lipide sind zwitterionische Moleküle, die einen langkettigen, aus Kohlenstoffketten bestehenden hydrophoben Teil und einen polaren Kopf besitzen. Der Kopf passt sich gut an die Umgebung dipolarer Wassermoleküle an, der hydrophobe Teil vermeidet das Wasser. Aus diesem Grund bilden Lipidmoleküle im Wasser typische Doppelschichten.

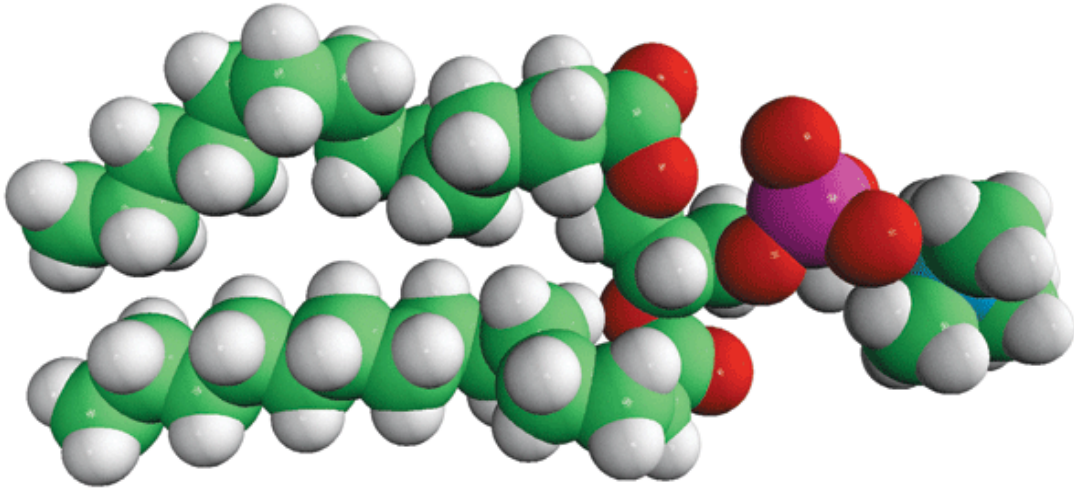


Abb. 2.19: Struktur eines DMPC-Moleküls: Kohlenstoff (grün), Wasserstoff (weiß), Sauerstoff (rot), Phosphor (magenta), Stickstoff (blau) [Avantilipids.com]

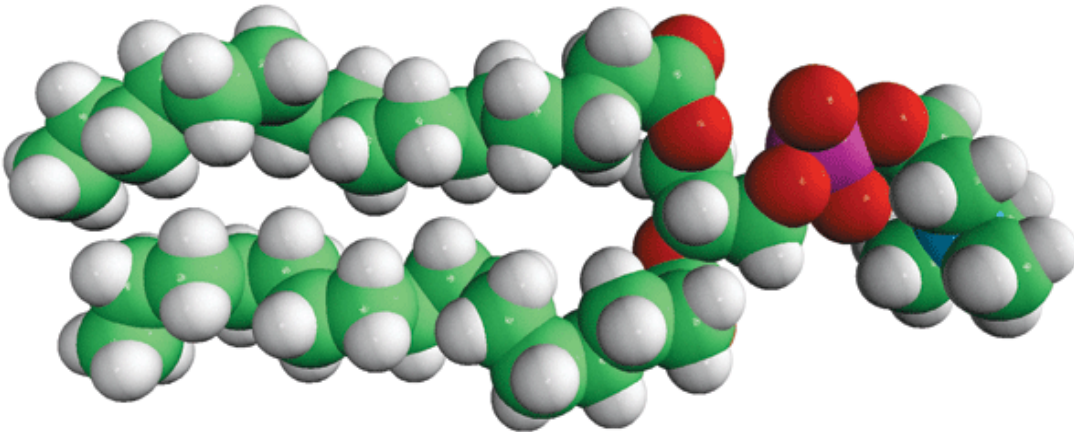


Abb. 2.20: Struktur eines DPPC-Moleküls: Kohlenstoff (grün), Wasserstoff (weiß), Sauerstoff (rot), Phosphor (magenta), Stickstoff (blau) [Avantilipids.com]

Im Rahmen dieser Untersuchungen werden im ersten Schritt natürlich keine komplexen Membranen untersucht, wie sie in der Natur vorkommen, sondern man beschränkt sich auf Modellmembranen, die aus nur einem Lipidtyp bestehen. Ordnen sich Lipide zu einer Membran, so bilden sie einen Flüssigkristall. In einer Membran spielen zwischenmolekulare Wechselwirkungen und die Kooperativität der Fluktuationen der einzelnen Moleküle eine große Rolle. Die charakteristischen Eigenschaften der Membransysteme werden auch im Rahmen der Permeabilitätsmessungen der Arbeitsgruppe Experimentalphysik I in Abschnitt II eingehend behandelt. In unserer Literaturstudie (Loidl *et al.* 2006) sind wir ausführlich auf den

Stand der Forschung im Bereich dielektrischer Spektroskopie an Phospholipid-Membranen eingegangen. Wie dort ausgeführt, haben sich dielektrische Untersuchungen sowohl für die Aufklärung von Struktur und Funktion dieser Systeme, als auch zur Erklärung ihrer Wechselwirkung mit elektromagnetischen Feldern als sehr hilfreich erwiesen. Wichtige dielektrische Arbeiten zu diesem Thema findet man bei Tirado *et al.* (2002), Schrader und Kaatz (2001) und Pottel *et al.* (1984).

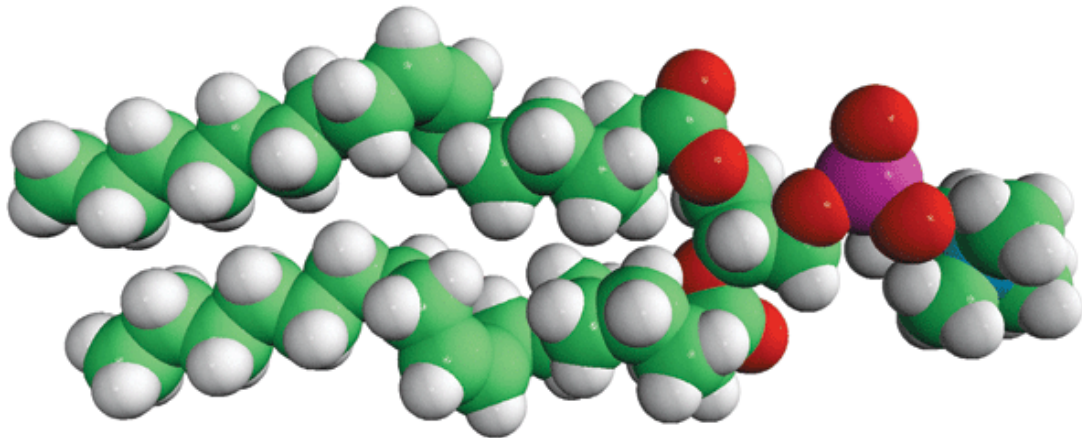


Abb. 2.21: Struktur eines DOPC-Moleküls: Kohlenstoff (grün), Wasserstoff (weiß), Sauerstoff (rot), Phosphor (magenta), Stickstoff (blau) [Avantlipids.com]

Im Rahmen dieser dielektrischen Untersuchungen wurden die folgenden Modellmembranen untersucht: DMPC (1,2-Dimyristoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine), DPPC (1,2-Dipalmitoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine) und DOPC (1,2-Dioleoyl-*sn*-Glycero-3-Phosphocholine).

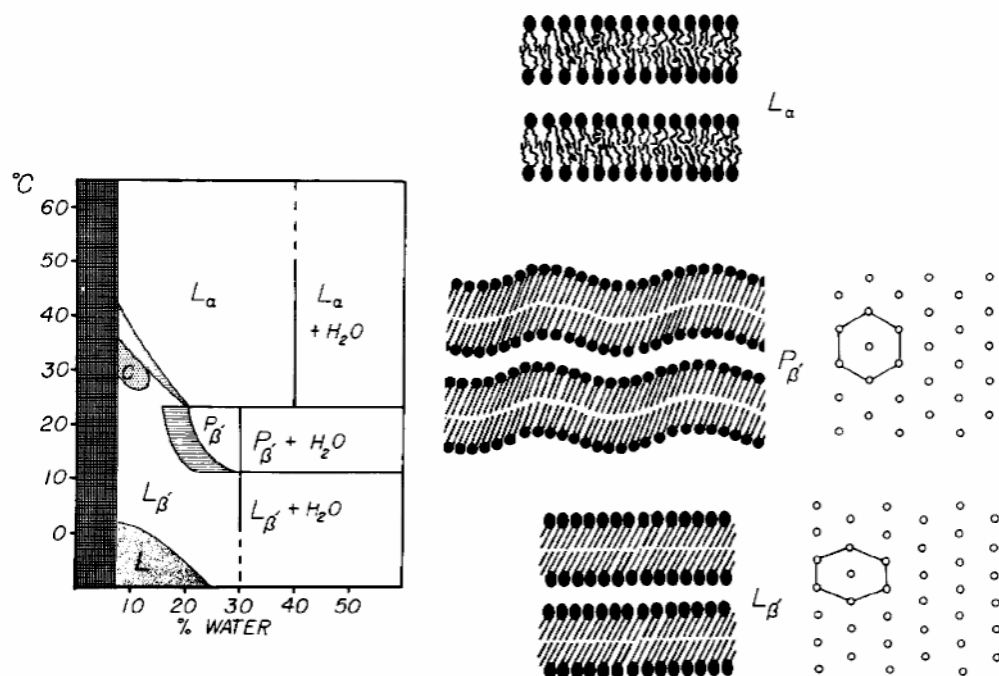


Abb. 2.22: (links) Phasendiagramm von hydratisiertem DML in Abhängigkeit von Temperatur und Wasseranteil, (rechts) Darstellung der Strukturen der $L_{\beta'}$, P_{β} , und L_{α} Phase (Janiak *et al.* 1979)

Die Strukturen von DMPC, DPPC und von DOPC sind in den Abbildungen 2.19, 2.20 und 2.21 dargestellt. Der wasserliebende Kopf dieser Phospholipide besitzt ein elektrisches Dipolmoment, das sich zwischen positivem Cholinanteil und negativem Phosphatanteil aufbaut. Die langkettigen Fettsäuren bestehen aus zahlreichen CH_2 -Gruppen, wobei diese in DMPC aus 14 Kohlenstoffatomen, in DPPC aus 16 Kohlenstoffatomen und DOPC aus 18 Kohlenstoffatomen bestehen.

Alle Lipid-Wasser-Mischungen zeigen in Abhängigkeit von Konzentration und Temperatur sehr komplexe Phasendiagramme. Abbildung 2.22 zeigt ein typisches Phasendiagramm, welches für viele wässrige Lipidlösungen charakteristisch ist. Daneben findet man eine schematische Darstellung der unterschiedlichen Phasen (Janiak *et al.* 1979). Wenn wir unser Augenmerk nur auf höhere Wasserkonzentrationen richten, die für die hier untersuchten Lösungen typisch sind, dann folgt auf eine plastische Hochtemperaturphase L_α , in der die Ketten ungeordnet sind zu tieferen Temperaturen eine gewellte Phase P_β , in der die Membran eine deutliche Rippelung zeigt und schließlich eine vollgeordnete kristalline Phase, mit idealer zweidimensionaler Struktur der Membran und exakter Ausrichtung der Fettsäureketten. Abbildung 2.23 zeigt ein verallgemeinertes Phasendiagramm (Janiak *et al.* 1979), das für die von uns untersuchten Lipid-Wasserlösungen gültig sein müsste. Man sieht, dass die Phasengrenze zwischen der plastischen Phase L_α und der gerippten Phase P_β sehr stark von der Kettenlänge abhängt. Diese Phasengrenze verschiebt sich von ca. 55 °C für Ketten mit 18 Kohlenstoffatomen zu 40 °C bei 16 Kohlenstoffatomen und schließlich zu 20 °C bei 14 Kohlenstoffatomen.

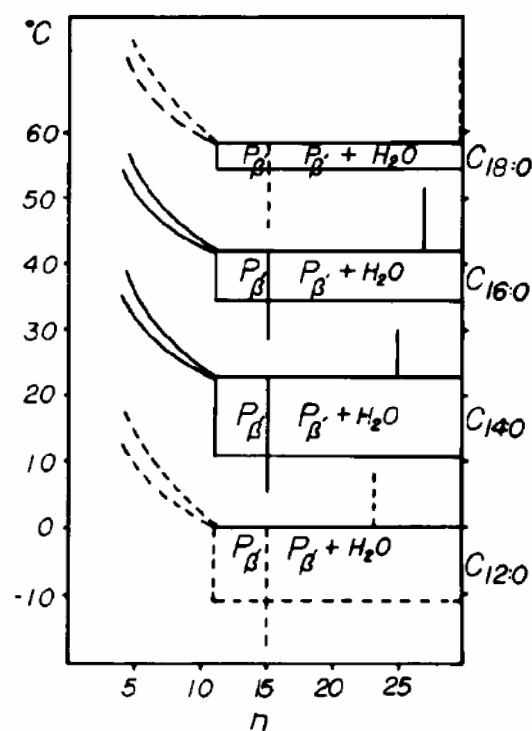


Abb. 2.23: Verallgemeinertes Phasenverhalten von synthetischen Lezithinen, Dilauroyl-Lezithinen, Dimyristoyl-Lezithinen, Dipalmitoyl-Lezithinen und Distearoyl-Lezithinen. n bezeichnet die Zahl der Wassermoleküle/Lezithinmolekül. (Janiak *et al.* 1979)

Die Abbildungen 2.24 – 2.26 zeigen unsere dielektrischen Messungen an Modellmembranen in einem Frequenzbereich von 100 MHz bis 40 GHz und im Temperaturbereich von 6 °C bis 38 °C bzw. von 10 °C bis 50 °C. Bei DMPC wurde aufgrund der niedrigeren Phasenübergangstemperatur von ca. 24 °C (siehe auch die Wärmekapazitätsprofile in Abschnitt II. 3) ein tieferer Temperaturbereich gewählt. In den Abbildungen ist nur eine Auswahl von Temperaturen gezeigt. Alle Modellmembranen, nämlich DMPC (Abbildung 2.24), DPPC (Abbildung 2.25) und DOPC (Abbildung 2.26), liegen in einer Vesikel Suspension von 40 mg/ml vor. Wie bei den Abbildungen über die Elektrolytlösungen zeigen wir für alle Suspensionen ε' (oberer Rahmen), ε'' (mittlerer Rahmen) und σ' (unterer Rahmen). ε' ist halblogarithmisch gegen die Frequenz aufgetragen, ε'' und σ' werden aus Gründen einer prägnanteren Darstellung doppeltlogarithmisch gezeigt.

Die experimentellen Daten wurden durch ein Modell mit Cole-Davidson-Funktion und zusätzlichen Leitfähigkeitsanteilen beschrieben (durchgezogene Linien in den Abbildungen 2.24 – 2.26). Da für jeden Lipidtyp nur eine Konzentration analysiert wurde, konnte die temperatur- und frequenzabhängige Parametrisierung einer Probe mit fester Konzentration (siehe Kapitel I 2.3) angewendet werden.

Alle hier untersuchten Modellmembranen verhalten sich bezogen auf ihre dielektrischen Eigenschaften phänomenologisch sehr ähnlich und können durch eine dominante Relaxation bei ca. 20 GHz und geringe DC-Leitfähigkeitsbeiträge beschrieben werden. Wie bereits in den Elektrolytlösungen gefunden, wird ε_s mit steigender Temperatur deutlich kleiner und die Relaxation verschiebt sich zu höheren Frequenzen. In allen hier untersuchten Substanzen findet man im dielektrischen Verlust bei niedrigen Frequenzen einen leichten aber signifikanten Anstieg. Dieser Anstieg könnte auf DC- oder AC-Leitfähigkeit zurückzuführen sein. Allerdings müssen auch andere Erklärungsmöglichkeiten überprüft werden: In „single-wall“ Phospholipiden wurde von einer schwachen dielektrischen Relaxation bei ca. 100 MHz berichtet (Pottel *et al.* 1984). Zudem findet man in Lipiden oft eine weitere signifikante Relaxation bei ca. 5 MHz (Pottel *et al.* 1984). Für eine endgültige Entscheidung über die Natur des Anstieges des dielektrischen Verlustes bei 100 MHz müssen unsere Messungen zu tieferen Frequenzen erweitert werden.

Es bleibt festzuhalten, dass die Phasenumwandlungstemperaturen zwischen der plastischen und der gewellten Phase in diesen dielektrischen Spektren nicht ohne weiteres identifiziert werden können. Alle Daten können zufrieden stellend mit einer Cole-Davidson-Funktion und Leitfähigkeitsanteilen gefittet werden. Die beiden Beiträge sind allerdings stark korreliert und lassen sich nicht eindeutig voneinander trennen. Wie oben erwähnt, sind breitbandige Messungen nötig, um dieses Problem eindeutig zu lösen. Deswegen konzentrieren wir uns hier nur auf den Relaxationsteil, der auch im GHz Bereich bereits dominant ist.

Lipidtyp	τ_0	E_τ	T_C	C
DMPC	23.3 fs	0.153 eV	88.0 K	$14.5 \cdot 10^3$ K
DPPC	29.8 fs	0.146 eV	56.1 K	$16.3 \cdot 10^3$ K
DOPC	17.2 fs	0.101 eV	27.9 K	$17.8 \cdot 10^3$ K

Tab. 2.1: Energiebarrieren E_τ und Vorfaktoren τ_0 für die Phospholipidsuspensionen

Die Temperaturabhängigkeit der Fitparameter τ und $\Delta\epsilon$ ist in Abbildung 2.27 dargestellt. Wir finden wiederum die Signatur thermisch aktivierter Prozesse für die mittlere Relaxationszeiten und ein Curie-Weiss ähnliches Verhalten der dielektrischen Suszeptibilität, die im Wesentlichen mit $1/(T-T_C)$ zu tiefen Temperaturen ansteigt.

Auch in der Temperaturabhängigkeit der mittleren Relaxationszeit und der inversen Dipolstärke findet man keine signifikanten Anomalien, die auf Phasenumwandlungen rückschließen ließen. Die entsprechenden Energiebarrieren E_τ und Vorfaktoren τ_0 die aus einem Arrhenius-Fit (Linien im oberen Rahmen von Abbildung 2.27) folgen, sind in Tabelle 2.1 aufgeführt. Ebenso wurde die dielektrische Stärke mit einem Curie-Weiss Gesetz parametrisiert (Linien im unteren Rahmen von Abbildung 2.27). Auch Curie-Weiss Temperaturen T_C und Konstanten C , die Dipolkonzentration und Dipolstärke angeben sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Die Vorfaktoren τ_0 , die mikroskopischen Versuchsfrequenzen entsprechen, liegen im Bereich von 20 – 30 fs. Die Energiebarrieren, liegen in DMPC und DPPC bei ca. 150 meV und bei DOPC bei 100 meV. Diese Werte zeigen deutlich, dass die Energiebarrieren gegen Dipol-Reorientierungen in keiner Weise mit den Kettenlängen korrelieren. Es ist ungeklärt, warum die Werte für T_C , die die Wechselwirkungen zwischen den Dipolmomenten angeben, derartig unterschiedlich sind. Da das Dipolmoment in diesen Modellmembranen wesentlich vom polaren Kopf stammt, würde man sehr ähnliche Wechselwirkungen erwarten. Dass die Dipolmomente in der Tat sehr ähnlich sind, zeigen die Werte der Curie Konstanten C , die wesentlich von den Dipolmomenten abhängen.

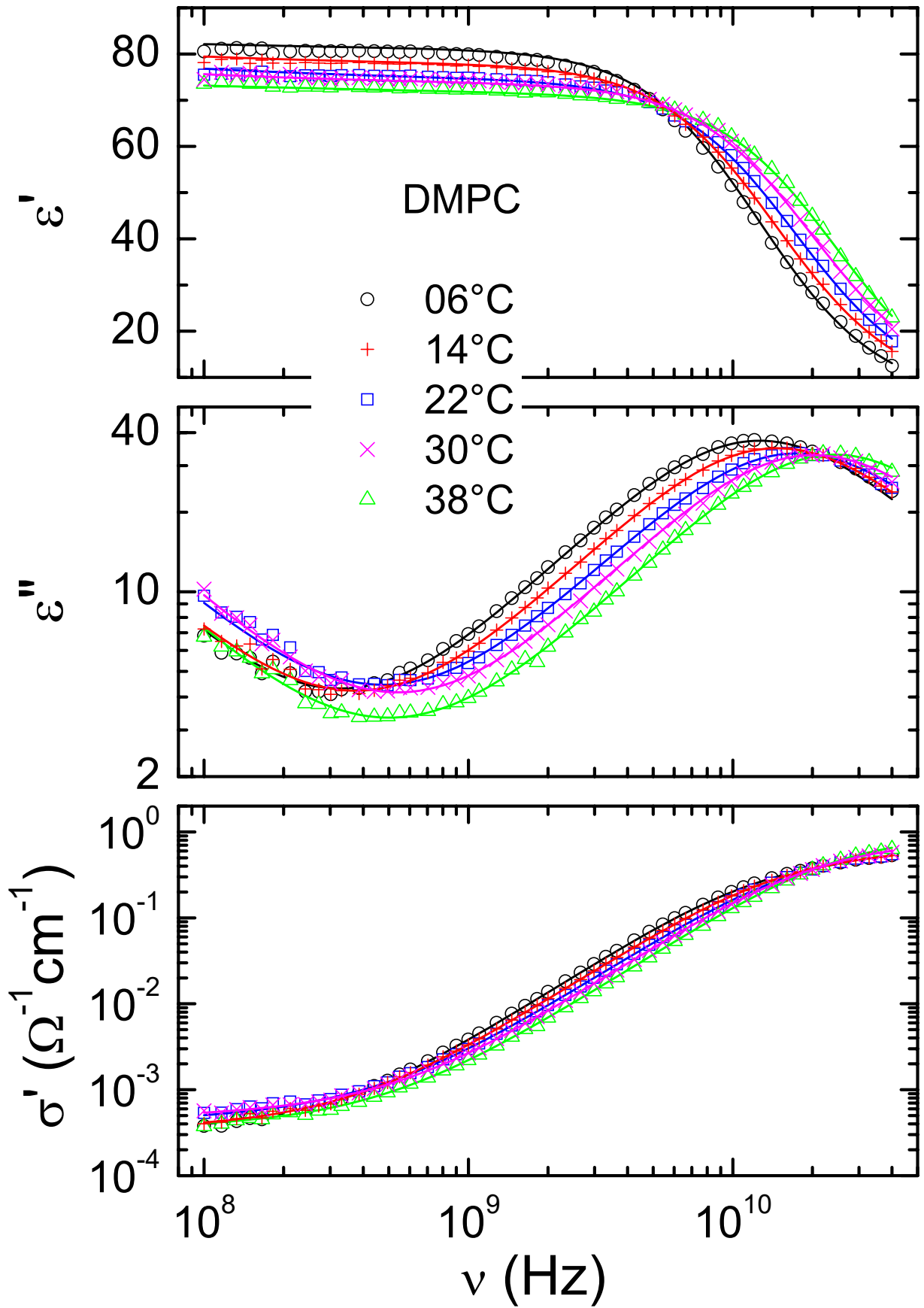


Abb. 2.24: Dielektrische Eigenschaften einer DMPC-Vesikel-Suspension (40mg/ml)

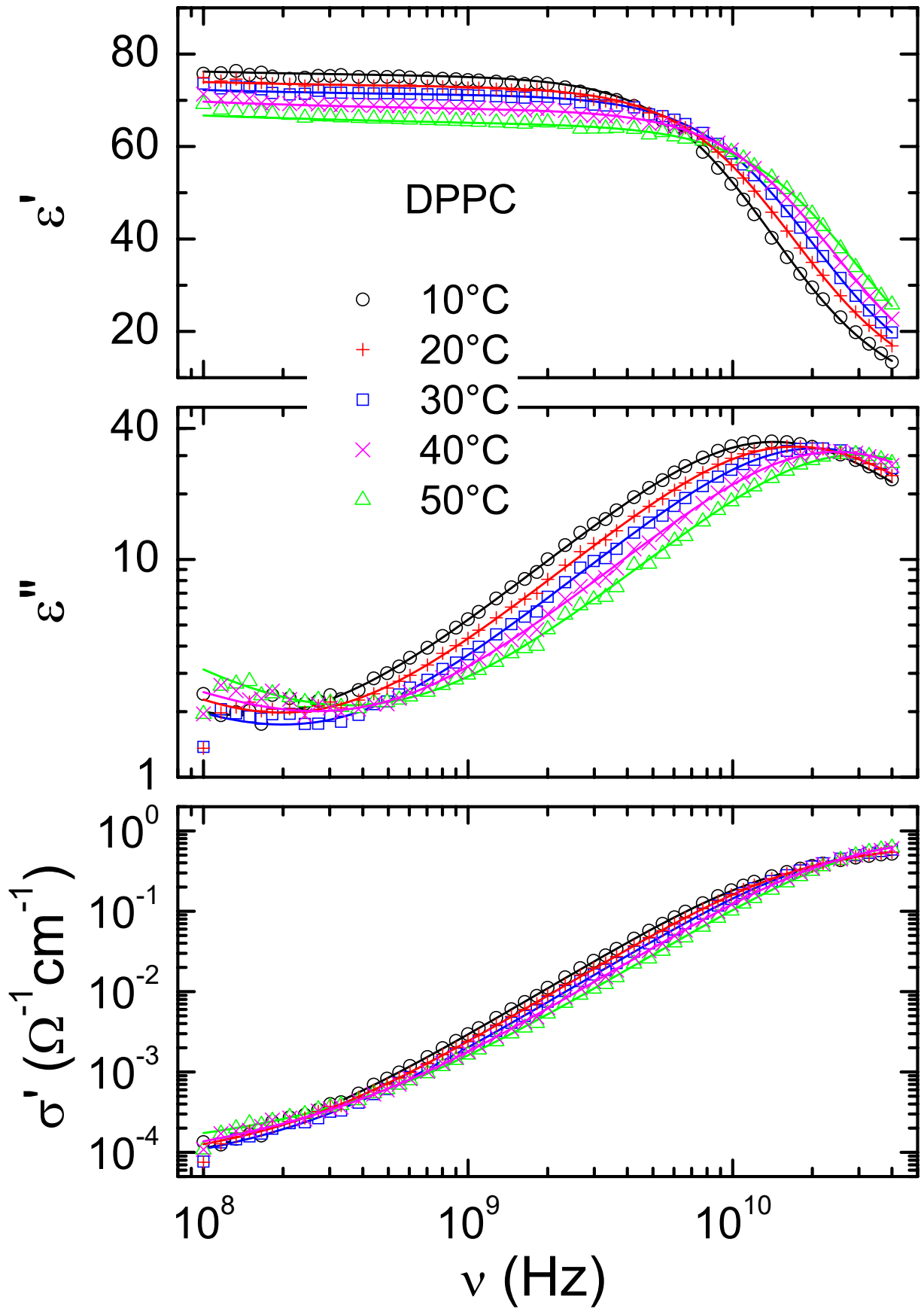


Abb. 2.25: Dielektrische Eigenschaften einer DPPC-Vesikel-Suspension (40mg/ml)

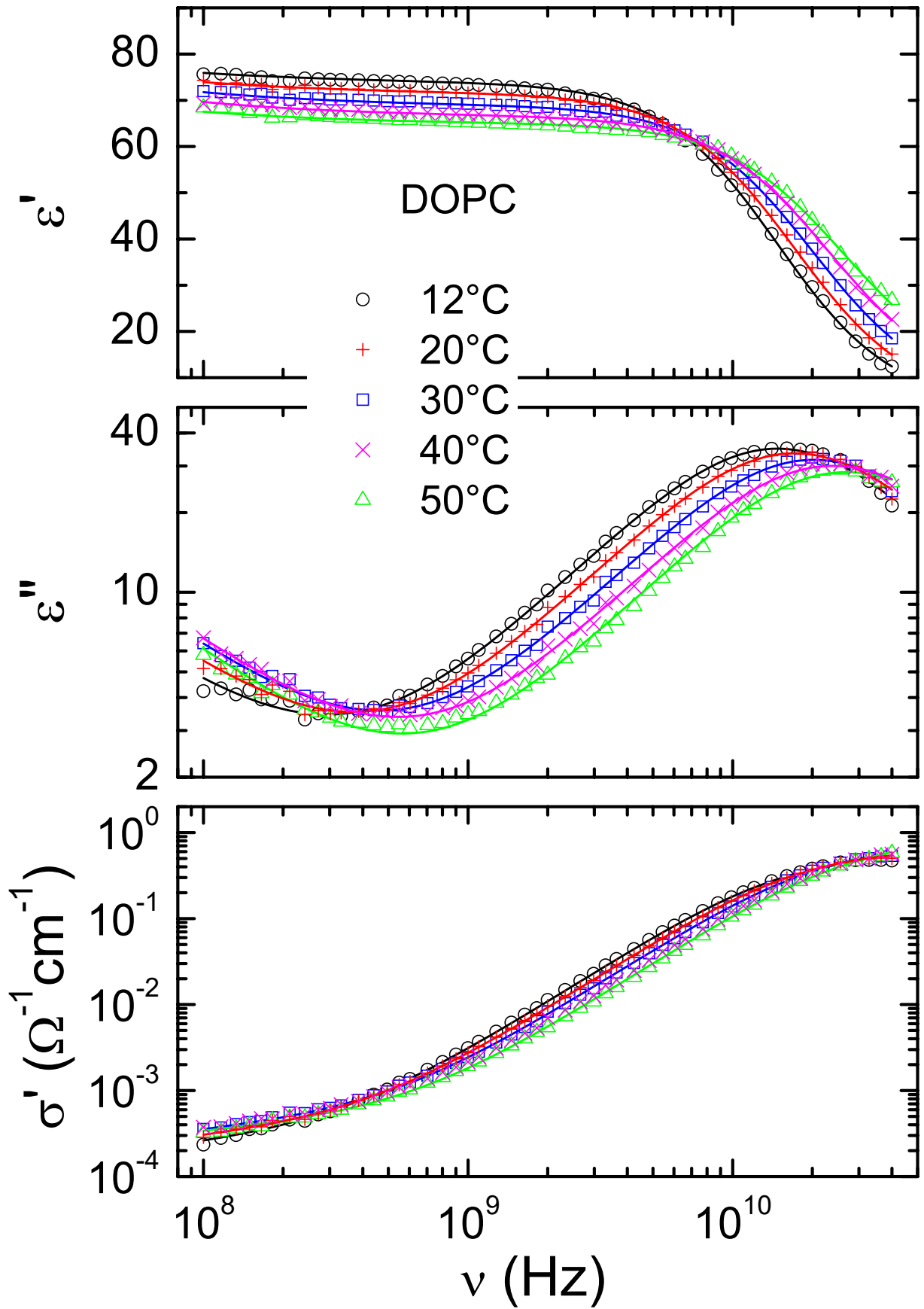


Abb. 2.26: Dielektrische Eigenschaften einer DOPC-Vesikel-Suspension (40mg/ml)

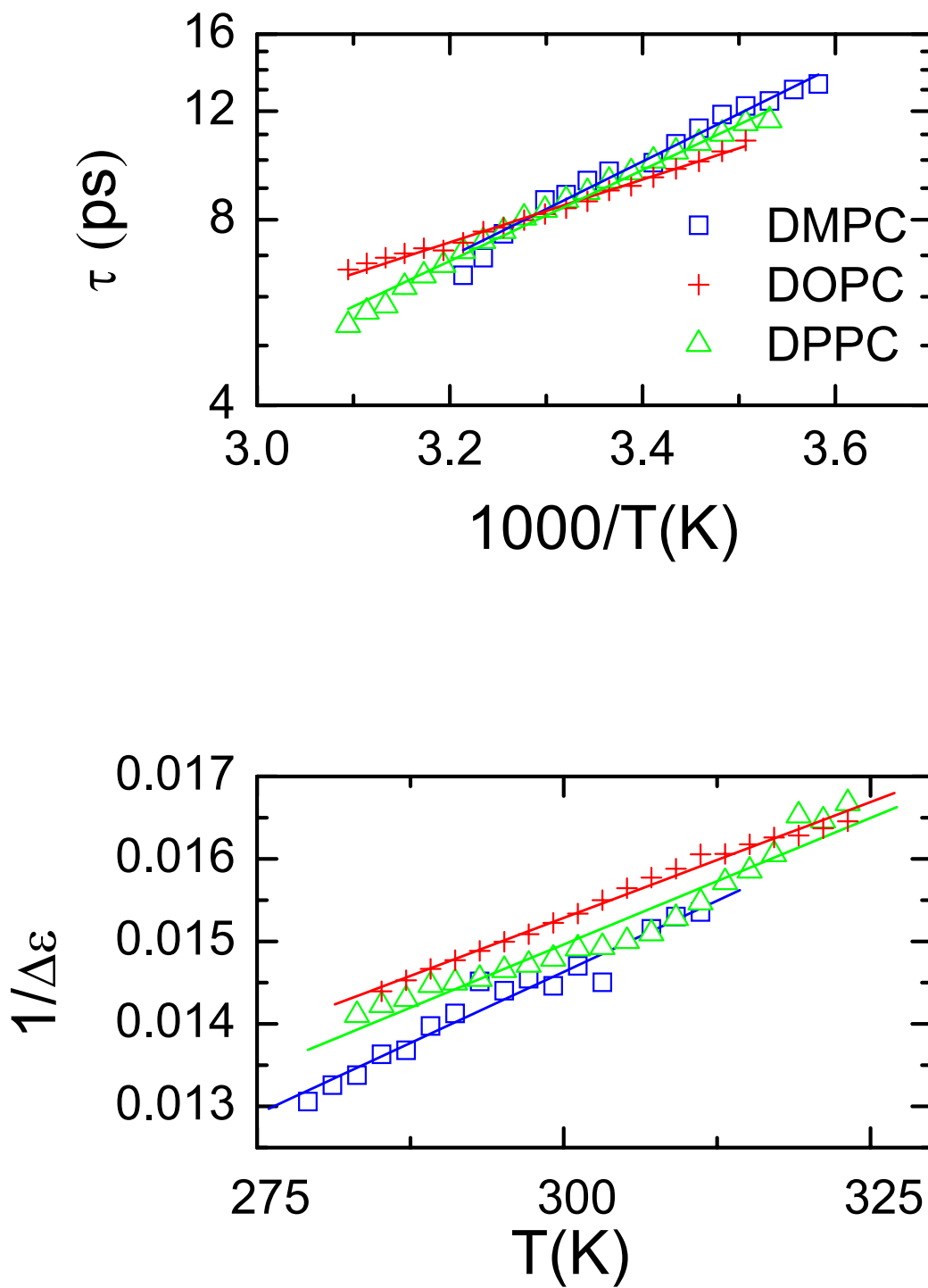


Abb. 2.27: Fitparameter Phospholipidsuspensionen

2.5 Dielektrische Messungen an Blut

An Blut werden bereits seit fast 100 Jahren Wechselstromexperimente durchgeführt und für sehr verschiedene Proben Leitfähigkeiten und Permittivitäten vermessen. Wie in unserer Literaturstudie deutlich zu sehen ist, wurden sehr viele Experimente bei niedrigeren Frequenzen, im Audio- oder Radio-Frequenzbereich durchgeführt. Dort dominieren aber DC-Leitfähigkeit, Maxwell-Wagner-Effekte und blockierende Elektroden. Erst jenseits von 100 MHz können intrinsische Leitfähigkeits- und Relaxationsphänomene in Blut beobachtet werden.

Im Rahmen unserer Experimente wurde die Temperaturabhängigkeit der dielektrischen Eigenschaften von Vollblut (nicht geronnenes Blut, das noch alle korpuskulären Bestandteile, also Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten und Plasma enthält) und von roten Blutzellen (Erythrozyten) in unterschiedlicher Konzentration untersucht. Die entnommenen Blutproben erhielten wir vom Zentralklinikum Augsburg. Zur Gewinnung der Erythrozytensuspensionen wurden zuerst etwa 2-3 ml Vollblut mit einer isotonischen Kochsalzlösung verdünnt und anschließend mit 600 · g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands und eventuell einem weiteren Waschvorgang mit Salzpuffer wurden die Hämatokritwerte (Hkt) der Erythrozytensuspensionen auf die Konzentrationen Hkt 90%, Hkt 60% und Hkt 30% eingestellt.

Für Blut und Suspensionen von Blutzellen in isotonischer Kochsalzlösung wurde der Frequenzbereich von 100 MHz bis 40 GHz und Temperaturen zwischen 24 °C und 50 °C vermessen. Wieder werden ϵ' , ϵ'' und σ' in bekannter Weise dargestellt. Abbildung 2.28 zeigt die Messungen an Vollblut, die Abbildungen 2.29 bis 2.31 zeigen die dielektrischen Eigenschaften roter Blutzellen in unterschiedlichen Konzentrationen (Abbildung 2.29: Hkt 30%; Abbildung 2.30: Hkt 60% und Abbildung 2.31: Hkt 90%). Schließlich werden in Abbildung 2.32 die Messungen an Blut und an Blutzellen unterschiedlicher Konzentration bei einer Temperatur von 37 °C miteinander verglichen.

Phänomenologisch findet man wiederum ein ganz ähnliches Verhalten, wie es bisher in den zurückliegenden Abbildungen dokumentiert wurde: Eine starke dipolare Relaxation wird zu niedrigeren Frequenzen von einer signifikanten DC-Leitfähigkeit begleitet. Die Relaxation zeigt eine deutliche Verschiebung mit steigender Temperatur, d. h. das Maximum des Verlustpeaks in ϵ'' und die Relaxationsstufe in ϵ' befinden sich bei steigender Temperatur bei höheren Frequenzen. Die statische dielektrische Konstante liegt bei ca. 60 und ist damit ungewöhnlich niedrig, verglichen mit wässrigen Lösungen.

Bei allen untersuchten Proben liegt die Leitfähigkeit, die die Absorption bestimmt und die direkt in die SAR-Werte eingeht in der Größenordnung von 10 mS/cm. Die Leitfähigkeit ist leicht temperaturabhängig (sie steigt um einen Faktor zwei zwischen 24 °C und 50 °C) und zeigt einen signifikanten Anstieg, der gerade bei 1 GHz beginnt. Dieser Anstieg kommt natürlich von der wasserdominierten Relaxation. Trotzdem muss man zur Kenntnis nehmen, dass bei einer Erhöhung der Frequenz auf 10 GHz die Absorption fast um einen Faktor 10 steigen würde.

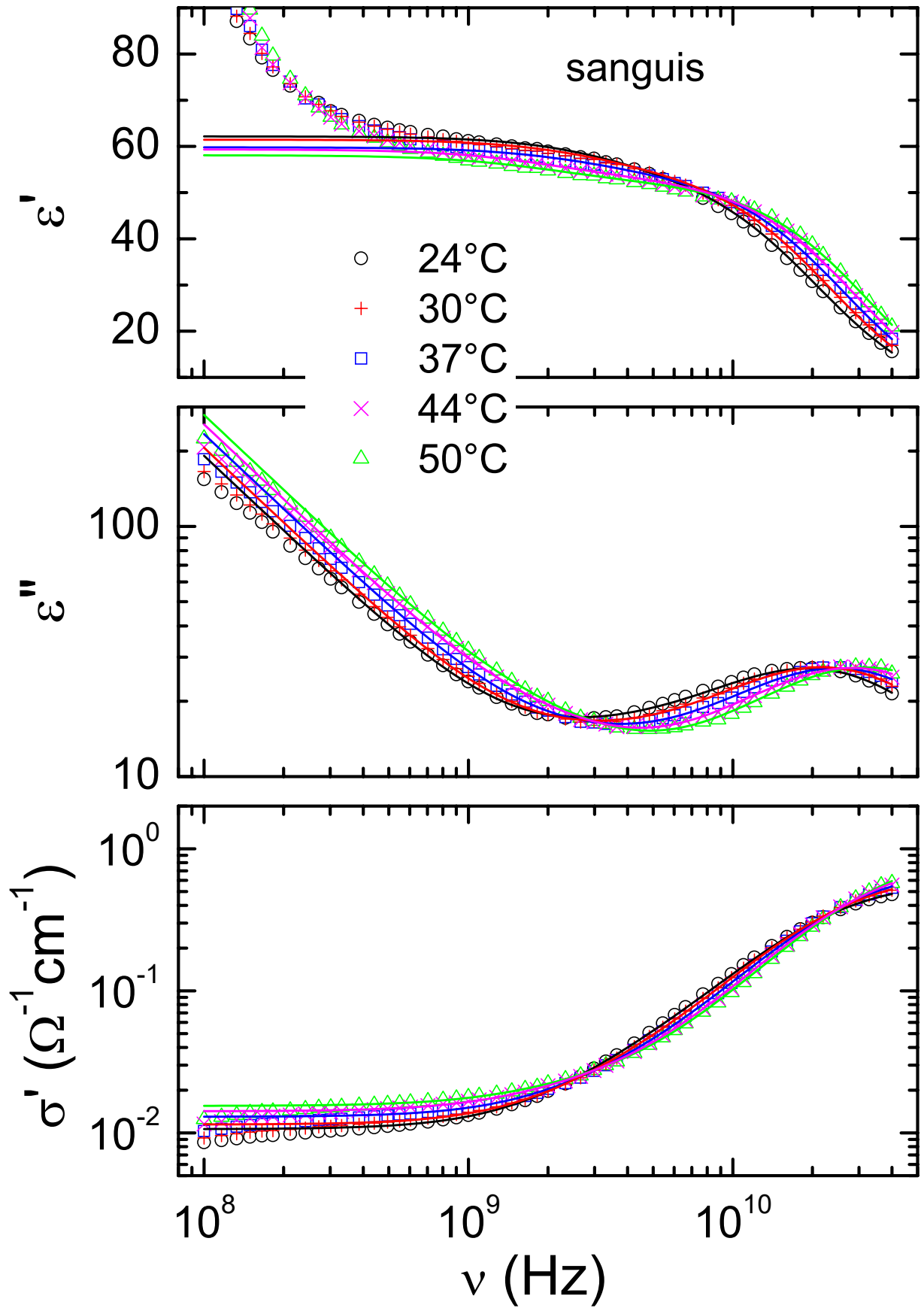


Abb. 2.28: Dielektrische Eigenschaften von entnommenem Vollblut

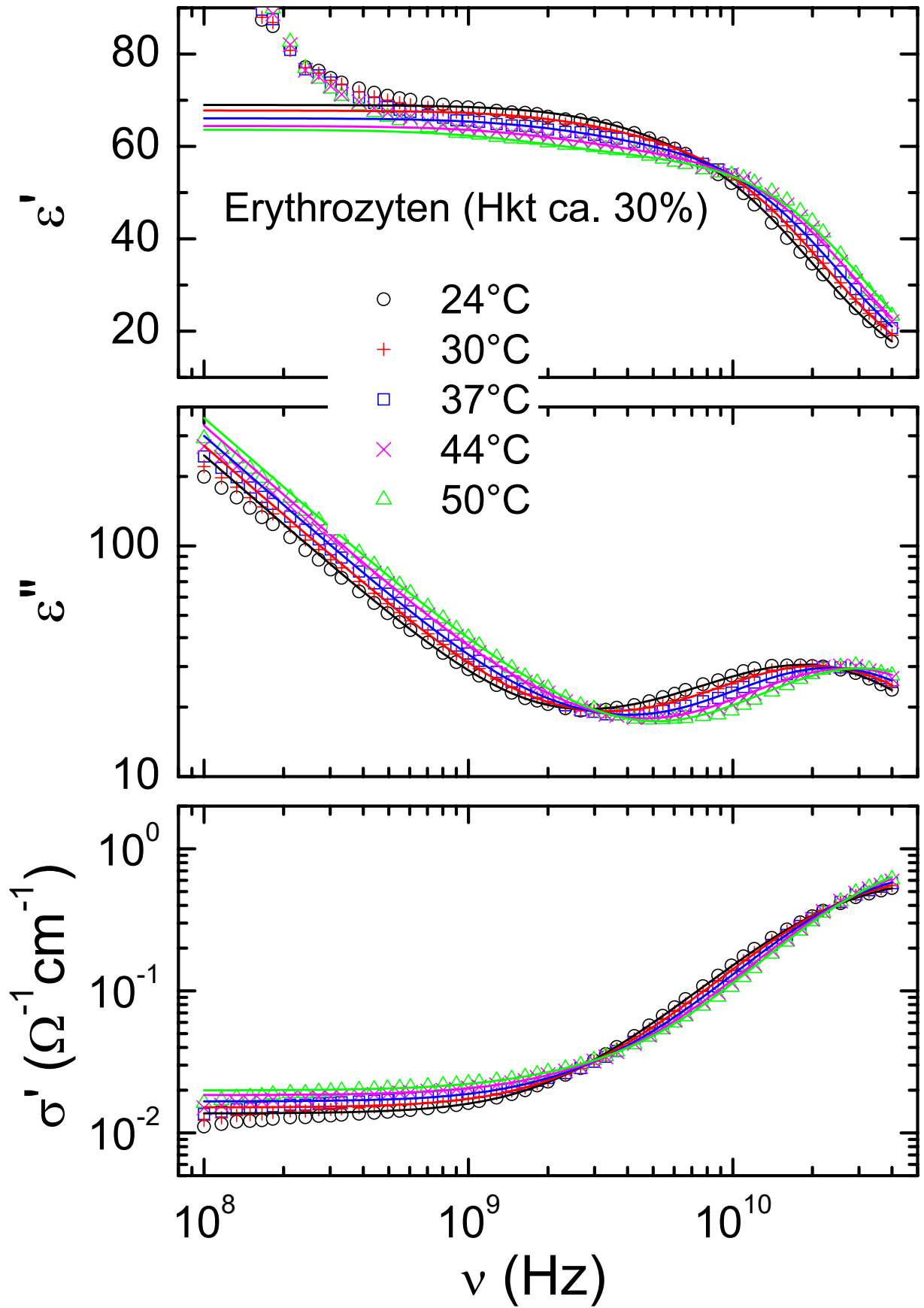


Abb. 2.29: Erythrozytensuspension niedriger Konzentration (Hkt ca. 30%)

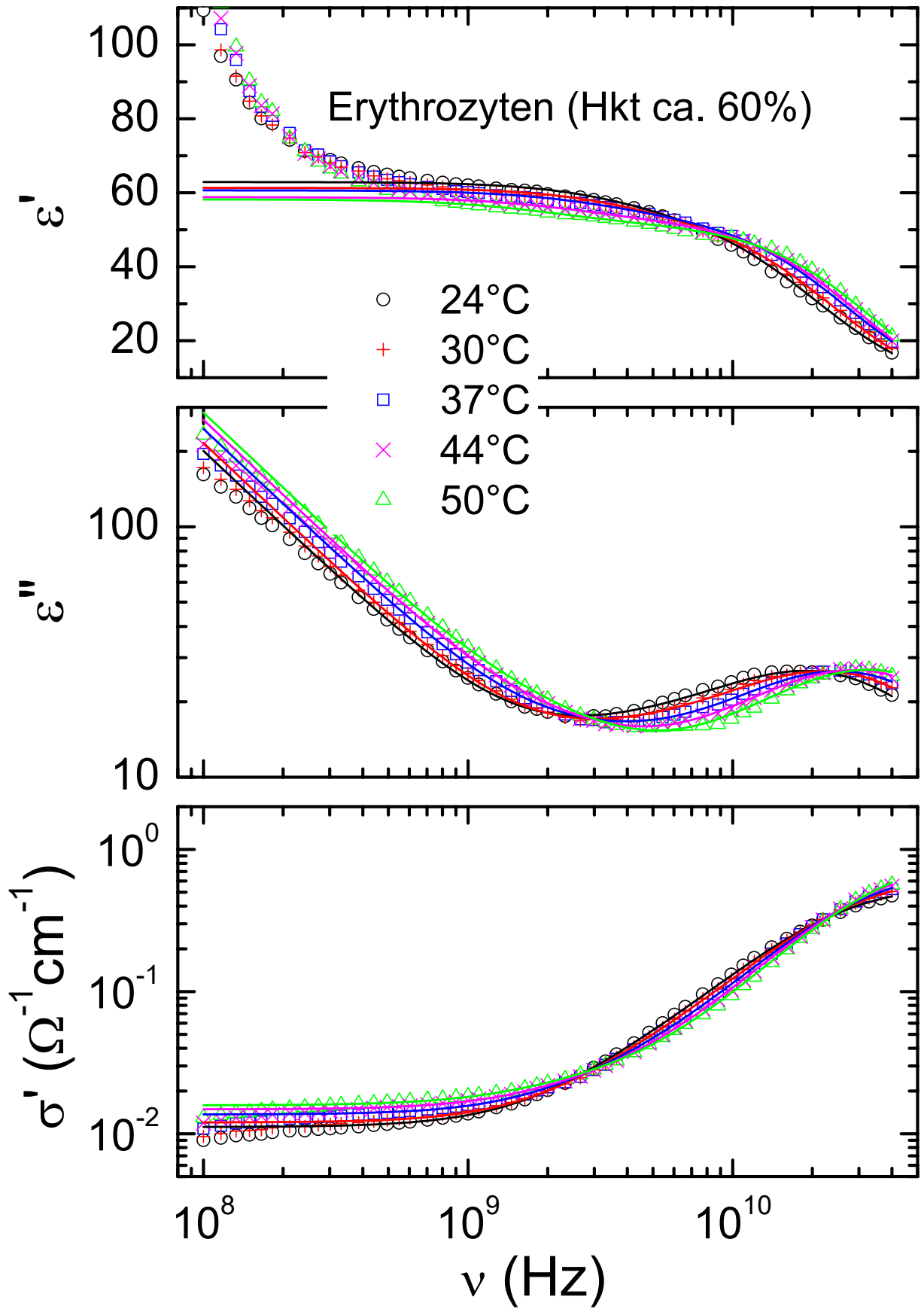


Abb. 2.30: Erythrozytensuspension mittlerer Konzentration (Hkt ca. 60%)

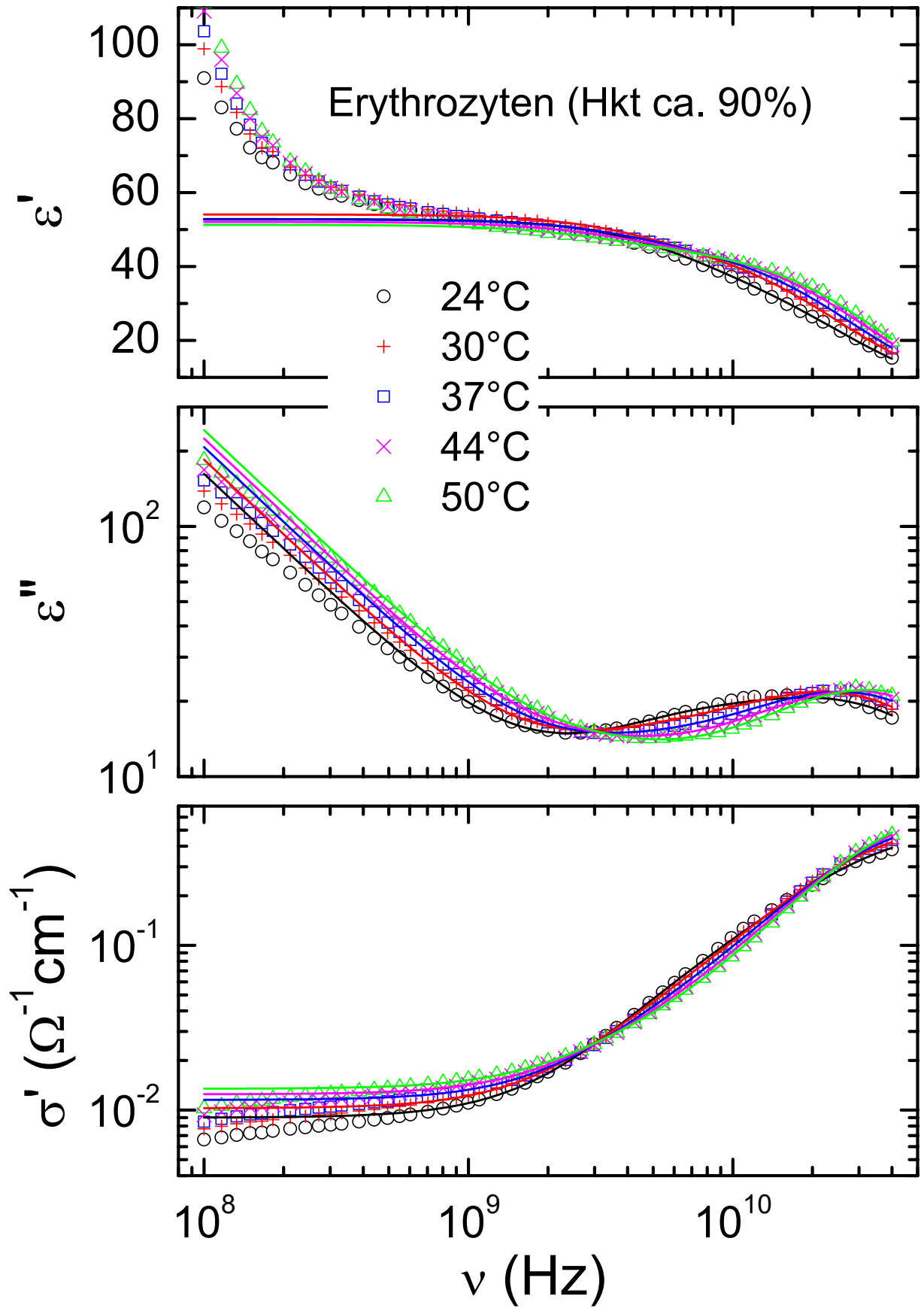


Abb. 2.31: Erythrozytensuspension hoher Konzentration (Hkt ca. 90%)

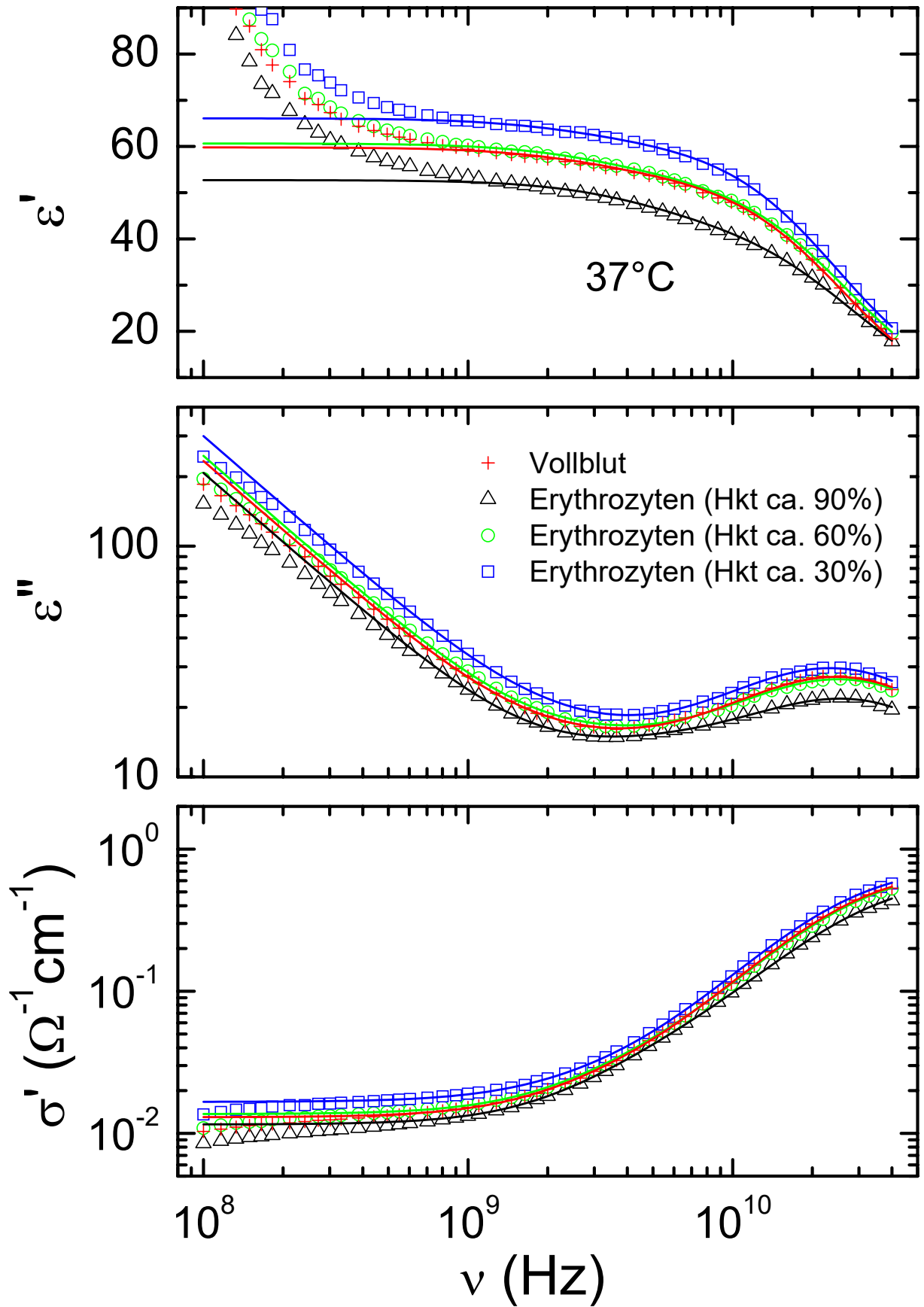


Abb. 2.32: Dielektrische Eigenschaften versch. Erythrozytensuspensionen bei 37°C

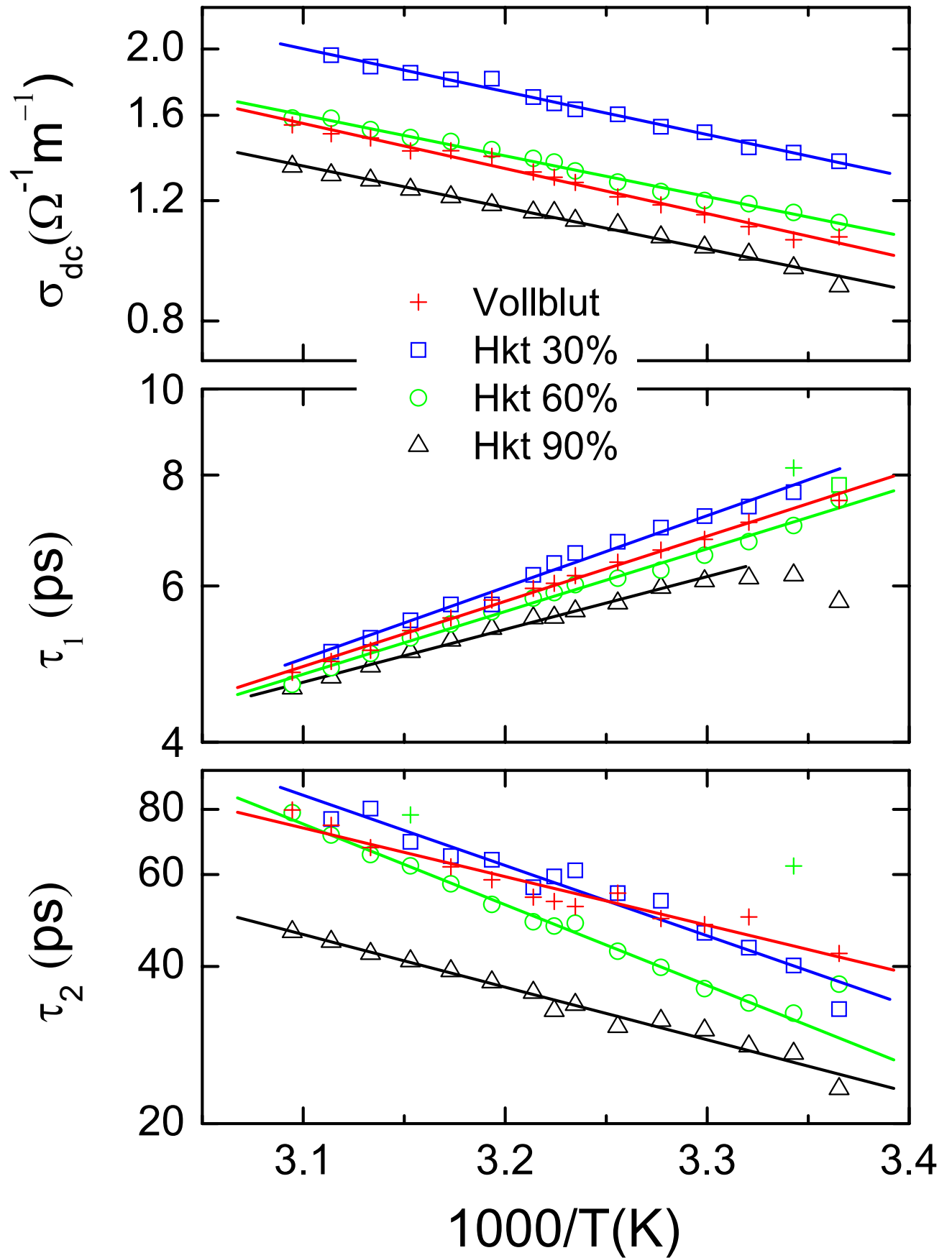


Abb. 2.33: Temperaturabhängigkeit der DC-Leitfähigkeit und der beiden mittleren Relaxationszeiten für Vollblut und die Erythrozytensuspensionen

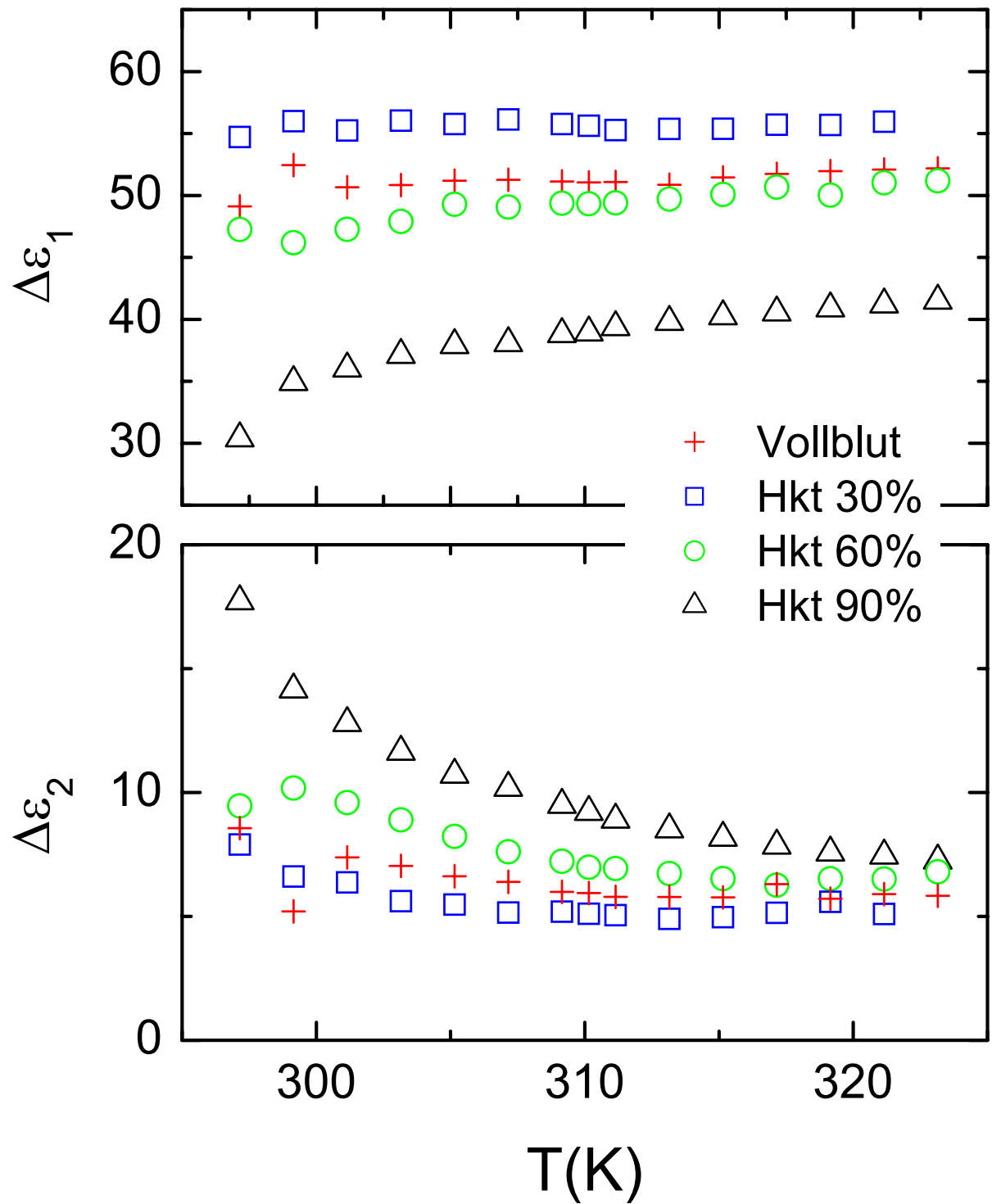


Abb. 2.34: Temperaturabhängigkeit der Relaxationsstärken für Vollblut und die Erythrozytensuspensionen

Aber äußerst überraschend findet man in allen diesen Blutproben und Erythrozytensuspensionen eine weitere dipolare Relaxation deren Verlustmaximum bei Körpertemperatur bei einer mittleren Relaxationszeit von ca. 53 ps auftritt (siehe Abbildung 2.33). Diese mittlere Relaxationszeit der Zusatzrelaxation von Blut entspricht ungefähr 3 GHz und liegt damit genau im relevanten Frequenzbereich der Mobilfunksysteme. Die Relaxation wurde in Vollblut und in den Erythrozytensuspensionen mit unterschiedlichen Hämatokritwerten gefunden. Allerdings gibt es keine klare Korrelation zwischen Relaxationsstärke und Hämatokritwert, sodass noch unklar ist, ob diese Relaxation mit dem Blutplasma oder den roten Blutkörperchen in Zusammenhang gebracht werden muss. Hier sind noch weitere systematische dielektrische Messungen als Funktion des Hämatokritwertes notwendig, um zu klaren Aussagen zu kommen. Alle dielektrischen Messungen, die in den Abbildungen 2.28 - 2.32 gezeigt werden, wurden gefittet (Linien in den Abbildungen 2.28 - 2.32). Modellannahmen waren DC-Leitfähigkeit, eine dipolare Relaxation zur Beschreibung der wasserähnlichen Relaxation und ein zusätzlicher Relaxationsmechanismus. Damit ergeben sich insgesamt 10 signifikanten Parametern (σ_0 , E_σ , τ_{01} , $E_{\tau1}$, τ_{02} , $E_{\tau2}$, C_1 , T_{C1} , C_2 , T_{C2}) für eine temperatur- und frequenzabhängige Charakterisierung einer Blutprobe mit definiertem Hämatokritwert.

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon_1}{[1 + (i\omega\tau_1)]^\beta} + \frac{\Delta\varepsilon_2}{1 + (i\omega\tau_2)} - i \frac{\sigma_{dc}}{\varepsilon_0\omega} \quad (2.8)$$

Man sieht in der dielektrischen Konstante bei niederen Frequenzen deutliche Abweichungen bei allen Messungen. Diese können durch AC-Leitfähigkeitsbeiträge, durch eine weitere dipolare Relaxation oder durch blockierende Elektroden erklärt werden. Um hier zu einem endgültigen Ergebnis zu gelangen, müssten die Messungen in den Niederfrequenzbereich ausgedehnt werden. Da aber diese Abweichungen für den relevanten Frequenzbereich dieser Untersuchungen nicht relevant sind, wurden sie nicht weiter analysiert.

Probe	σ_0	E_σ	τ_{01}	$E_{\tau1}$
Vollblut	1.7 S/cm	0.131 eV	25.9 fs	0.145 eV
Hkt 30%	1.8 S/cm	0.124 eV	15.8 fs	0.160 eV
Hkt 60%	1.1 S/cm	0.118 eV	30.8 fs	0.140 eV
Hkt 90%	1.0 S/cm	0.120 eV	67.0 fs	0.118 eV

Tab. 2.2: Vorfaktoren und Energiebarrieren der DC-Leitfähigkeit und der mittleren Relaxationszeit der wasserähnlichen Relaxation für die Blutsuspensionen

Die Ergebnisse der Fits sind in den Abbildungen 2.33 und 2.34 dargestellt. Abbildung 2.33 zeigt die Temperaturabhängigkeit der DC-Leitfähigkeit in einer Arrhenius-Darstellung (oberer Rahmen) und die Temperaturabhängigkeit der beiden Relaxationszeiten. DC-Leitfähigkeit und wasserähnliche Relaxation folgen einem thermisch aktivierten Verhalten. Vorfaktoren und Energiebarrieren sind in der Tabelle 2.2 festgehalten. Die Relaxationszeit der zweiten schwächeren Relaxation zeigt eine sehr ungewöhnliche Temperaturabhängigkeit. Diese Relaxation wird mit zunehmender Temperatur langsamer. Der Grund dafür ist völlig unklar. Diese Relaxation wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Weiterführende Experimente müssen zur Aufklärung der Natur dieses ungewöhnlichen Relaxations-

prozesses beitragen. Zur endgültigen Klärung der Natur dieser Zusatzrelaxation sollte ein noch größerer Temperaturbereich untersucht werden und vielleicht sind auch Untersuchungen in der gefrorenen Phase von Vollblut (unterhalb von 0° C) sehr aufschlussreich. Lokale Relaxationsprozesse können sehr oft in den „Eisphasen“ weiter erhalten bleiben, mit oft nur geringfügigen Änderungen von Energiebarriere und mittlerer Relaxationszeit. Diese Messungen konnten im Rahmen dieser Untersuchungen nicht mehr durchgeführt werden. Allerdings dokumentieren wir in Abbildung 2.35, dass diese Zusatzrelaxation tatsächlich existiert. In den Abbildungen 2.28 bis 2.32 wurden die dielektrischen Spektren immer mit einer Zusatzrelaxation gefittet. Die Fitergebnisse sind sehr gut. Wird die Zusatzrelaxation weggelassen findet man im Frequenzbereich zwischen ca. 1 GHz und 8 GHz keine überzeugende Übereinstimmung von Fit und experimentellen Daten. In Abbildung 2.35 wird dieser Vergleich der Fitergebnisse mit und ohne Verwendung einer Zusatzrelaxation noch einmal verdeutlicht.

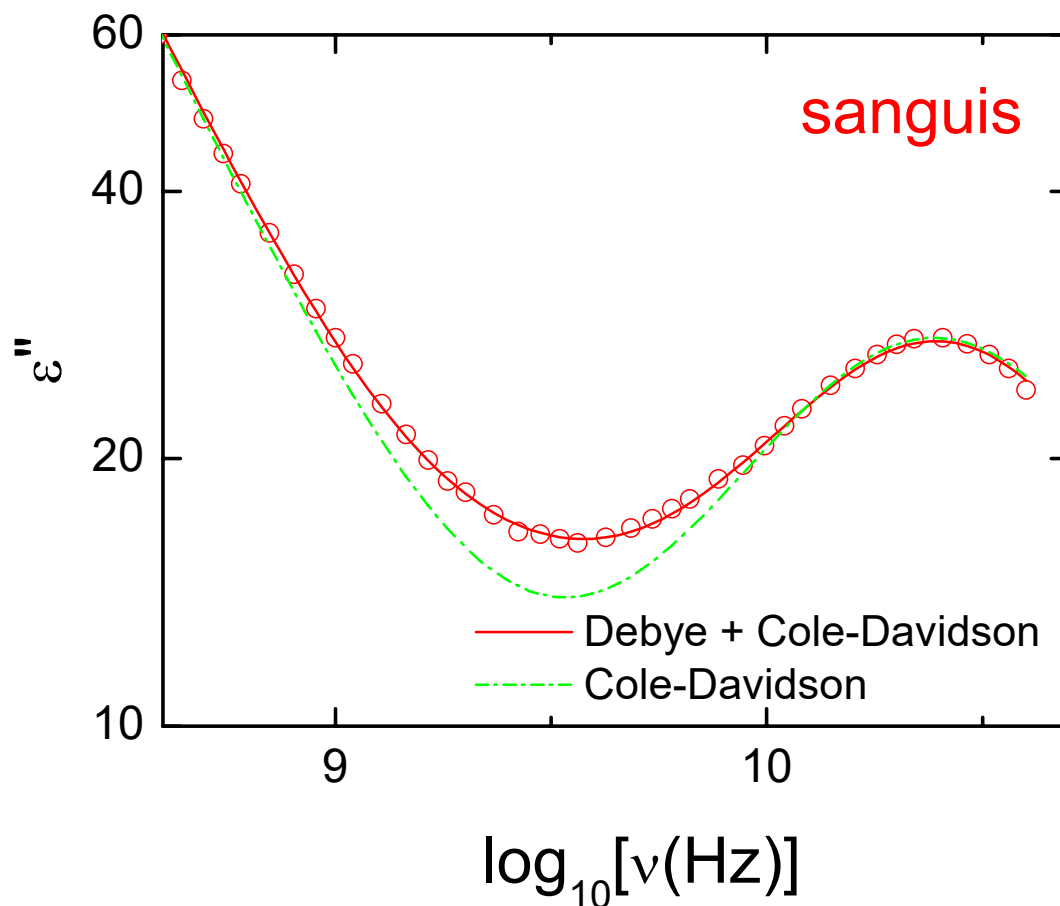


Abb. 2.35: Vergleich der Fits mit einer Cole-Davidson-Relaxation ($\beta = 0.9$) bzw. mit einer Cole-Davidson-Relaxation und einer zusätzlichen Debye-Relaxation

Abbildung 2.35 zeigt den Imaginärteil der dielektrischen Konstante von Vollblut bei 37° C für Frequenzen zwischen 400 MHz und 40 GHz. Die durchgezogene rote Linie entspricht dem Fit mit einer zusätzlichen Debye-Relaxation. Die experimentellen Daten werden im gesamten Frequenzbereich sehr gut beschrieben. Die gestrichelte grüne Linie zeigt den besten Fit, der möglich ist, wenn im untersuchten Frequenzbereich neben den Leitfähigkeitsprozessen, die für niedrigere Frequenzen

dominieren, nur die wasserähnliche Relaxation benutzt wird. Man findet im Frequenzbereich von 2 – 4 GHz signifikante Abweichungen der experimentellen Daten von der Modellbeschreibung. Dies dokumentiert, dass in Blut in diesem Frequenzbereich tatsächlich eine Zusatzrelaxation existiert. Diese trägt zur Gesamtaborption elektromagnetischer Strahlung bei 2 GHz ca. 20 % bei.

Vergleicht man diese Messungen mit der Literatur (s. a. Loidl *et al.* 2006), so wird z. B. in der Arbeit von Schwan (1983) für Messungen an Blut und seinen Bestandteilen eine δ -Relaxation erwähnt. Diese befindet sich allerdings bei deutlich tieferen Frequenzen bei ca. 200 MHz und wird entweder inneren Schwingungen polarer Seitengruppen von Proteinen oder gebundenem Wasser zugeordnet. In beiden Fällen würde man thermisch aktiviertes Verhalten erwarten. Der in unseren Messungen gefundene Zusatzprozess liegt eine Frequenzdekade höher und verhält sich nicht thermisch aktiviert. Wir glauben daher nicht, dass er mit diesem δ -Prozess gleichgesetzt werden kann.

Die Temperaturabhängigkeiten der Relaxationsstärken sind in der Abbildung 2.34 dargestellt. In dem untersuchten Temperaturintervall sind die Relaxationsstärken fast konstant und liegen zwischen 33 und 55 für die hochfrequente Relaxation bei 20 GHz und zwischen 5 und 20 für die niederfrequente Relaxation. Nur die Zellsuspensionen mit den hohen Hämatokritwerten (Hkt 90%) zeigen eine signifikante Temperaturabhängigkeit der Relaxationsstärken.

Nur die niederfrequente Relaxation in der Erythrozytensuspension mit einem Hämatokritwert von 90 % zeigt ein Curie-Weiss ähnliches Verhalten. Insgesamt ist sehr ungewöhnlich, dass die Relaxationsstärke der wasserähnlichen Relaxation nur so schwach temperaturabhängig ist. Dies steht in krassem Gegensatz zum Verhalten der Modellmembranen (siehe Abbildung 2.27).

2.6 Dielektrische Messungen an verschiedenen Zelltypen

Neben der dielektrischen Spektroskopie an menschlichem Blut und roten Blutkörperchen wurden in diesem Projekt auch dielektrische Messungen an vier verschiedenen Körperzelltypen durchgeführt, zwei Typen menschlicher Hautzellen (Keratinocyten und Melanomzellen), menschlichen Bindegewebezellen (Fibroblasten) sowie Nervenzellen einer Ratte (PC 12). Die Kultivierung und Präparation der verschiedenen Zelllinien erfolgt in einem speziell ausgestatteten Biolabor der Arbeitsgruppe Experimentalphysik I (Abb. 2.36).

Die eingesetzten Körperzelltypen werden in einem MEM Medium (PAA) unter Zugabe von 10 % FCS (fetal calf serum) und 1 % Penizillin/Streptomycin (Biochrom) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für ca. 5 – 10 Tage inkubiert bis sie auf dem Boden der Kulturflasche nahezu 100 % konfluent gewachsen sind. Anhand der Größe der Kulturflasche kann so die Anzahl der Zellen im Medium bestimmt werden. Zur Entnahme wird zunächst das Nährmedium abgesaugt und der Zellrasen einmal mit PBS-Lösung gewaschen (PBS-Puffer (Phosphate Buffered Saline), 8,0 g NaCl, 0,2 g KH₂PO₄, 1,2 g Na₂HPO₄ · 7 H₂O, 0,2 g KCl, aufgefüllt auf 1000 ml Aquabidest., anschließend pH-Wert auf 7,4 eingestellt). Dann wird Trypsinlösung auf die Zellen gegeben. Die proteolytische Wirkung des Enzyms wird genutzt, um die adhären wachsenden Neuronen von der Kulturflasche abzulösen. Anschließend werden die Zellen erneut mit PBS-Puffer gewaschen und danach zentrifugiert, um das Medium vollständig mit Puffer zu ersetzen. Der Niederschlag wird in PBS-Puffer, in PBS⁺⁺ (zusätzlich CaCl₂ sowie MgCl₂), in Mannitol-Puffer oder in FCS freiem MEM Medium resuspendiert und zur Messung in 1,5 ml *ependorf*-Reaktionsgefäße gefüllt.

Um die für die dielektrische Spektroskopie benötigten Konzentrationen zu erhalten, werden mehrere große Kulturflaschen kombiniert, so dass Konzentrationen bis zu 250 Millionen Zellen pro ml erreicht werden können. Die spezifischen Protokolle zur Kultivierung und Präparation der einzelnen Zelllinien werden in Abschnitt II. 7 ausführlich beschrieben.

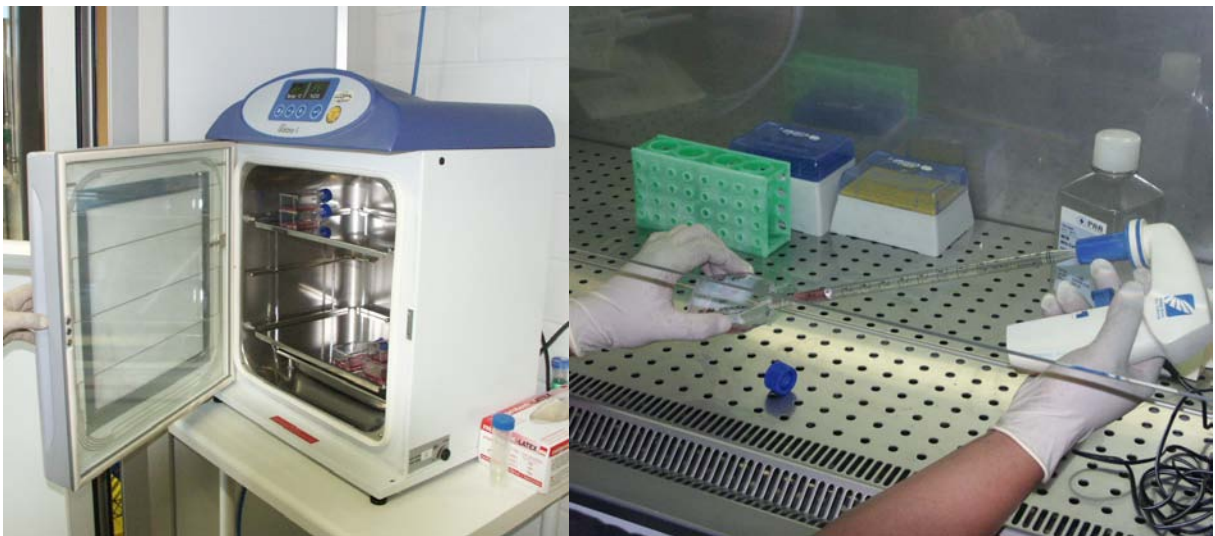


Abb. 2.36: Inkubator (links) und Sterilbank (rechts)

Nach der Zellpräparation muss zunächst der Zustand der gewonnenen Zellen überprüft werden, um sicher zu gehen, dass für die Messungen der dielektrischen Spektroskopie gesunde und lebende Zellen zum Einsatz kommen. Während bei den patch clamp Experimenten die Brauchbarkeit der Zellen nach dem Aufbringen auf den patch Chip jeweils durch ein biochemisches Experiment an der verwendeten Zelle überprüft wird, kommt bei den dielektrischen Messungen ein in der Arbeitsgruppe Biophysik EP I bestens etabliertes Fluoreszenzmikroskop zum Einsatz, welches es erlaubt Fluoreszenzintensität lokal (innerhalb der Zelle) zuzuordnen. Bestimmte zellpermeable Fluoreszenzfarbstoffe haben die Eigenschaft erst nach der Spaltung durch so genannte Esterasen ihre Fluoreszenz zu entfalten. Ist die Zelle tot, so verschwindet die Aktivität der Esterasen und damit die Fluoreszenz. Dies gibt uns die Möglichkeit bei den Messungen der dielektrischen Spektroskopie eine Qualitätskontrolle der verwendeten Proben durchzuführen und die Konzentration der Zellen anzugeben, die als gesund, intakt und lebend identifiziert wurden.

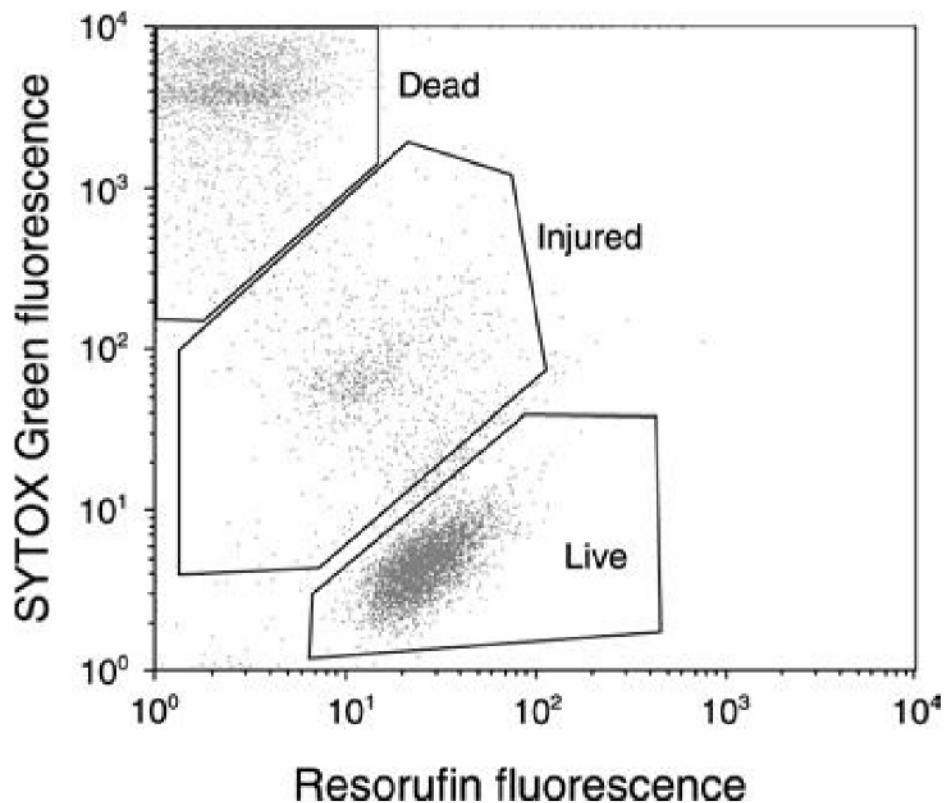


Abb. 2.37: Die Punktauftragung von SYTOX[®] Green Fluoreszenz gegen die Resorufin Fluoreszenz zeigt die Verteilung von lebenden, verletzten und toten Zellbeständen (Molecular Probes[®] invitrogen detection technologies).

Zur Zellfärbung wird bei unseren Experimenten das LIVE/DEAD[®] Cell Vitality Assay Kit von Molecular Probes[®] invitrogen detection technologies verwendet. Das LIVE/DEAD[®] Kit ermöglicht eine einfache, zweifarbige Fluoreszenzuntersuchung, die stoffwechselaktive Zellen von verletzten und von toten Zellen unterscheidet. Die Fluoreszenzuntersuchung basiert auf dem Abbau von C₁₂-Resazurin zu rot-fluoreszierendem C₁₂-Resorufin in den stoffwechselaktiven Zellen und der Aufnahme

des nicht die Zellwand durchdringenden, grün-fluoreszierenden Nukleinsäurefarbstoffs, SYTOX[®] Green Dye, in Zellen mit geschwächten Plasmamembranen (normalerweise stark apoptotische und nekrotische Zellen). Wie Abbildung 2.37 zeigt, strahlen tote Zellen größtenteils grüne Fluoreszenz aus, wohingegen die gesunden, stoffwechselaktiven Zellen hauptsächlich rote Fluoreszenz emittieren. Die verletzten Zellen haben niedrigere Stoffwechselaktivität und infolgedessen eine verringerte rote Fluoreszenzemission; da sie jedoch intakte Membranen besitzen, akkumulieren verletzte Zellen wenig SYTOX[®] Green Dye und emittieren folglich sehr wenig grüne Fluoreszenz.

Die Zellen werden mit einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet unter Verwendung von passenden Filtern für Fluorescein (FITC) und Tetramethylrhodamine (TRITC). Die Gesamtzahl der Zellen teilt sich hierbei in zwei Gruppen auf: lebende Zellen mit einem niedrigen Niveau der grünen und einem hohen Grad der orangen Fluoreszenz sowie nekrotische Zellen mit einem hohen Grad der grünen Fluoreszenz und einem niedrigen Niveau der orangen Fluoreszenz (Abbildung 2.37).

Nichtfluoreszierendes Resazurin, das durch lebensfähige Zellen zu rot-fluoreszierendem Resorufin abgebaut werden kann, wird verbreitet eingesetzt, um die Stoffwechselaktivität vieler unterschiedlicher Zelltypen festzustellen, von Bakterien bis zu höheren Eukaryonten (Reinheimer und Demkow 1990, Visser *et al.* 1990, White *et al.* 1996). Resazurin ist ungiftig und haltbar in Kulturmedien, was eine kontinuierliche Überwachung sich vermehrender Zellen (Zhi-Jun *et al.* 1997) erlaubt. Das LIVE/DEAD[®] Kit enthält eine lipophile Version des Resazurins, C₁₂-Resazurin, das bei lebenden Zellen durchlässiger ist und nach Abbau zu C₁₂-Resorufin besser als das nicht lipophile Resorufin akkumuliert wird. Diese Eigenschaften ergeben hellere Signale und bessere Nachweisgrenzen.

Die Abbildungen 2.38 bis 2.42 zeigen denselben Bildausschnitt einer Melanomzellenprobe als Phasenkontrastbild (Abbildung 2.38 und 2.39) und zum Vergleich als Fluoreszenzaufnahme mit Filtern für Tetramethylrhodamine (TRITC, Abbildung 2.41) und Fluorescein (FITC, Abbildung 2.42). Wie in Abbildung 2.41 gut zu erkennen ist, emittiert der Großteil der Zellen rote Fluoreszenz. Diese Zellen zeigen somit Stoffwechselaktivität und verfügen über eine intakte Zellmembran. Abbildung 2.42 zeigt hingegen die wenigen toten Zellen mit einem hohen Grad an grüner Fluoreszenz an, die in Abbildung 2.39 mit roten Kreisen gekennzeichnet wurden.

Abbildung 2.40 und 2.43 zeigen beispielhaft einen Vergleich zweier Fluoreszenzaufnahmen mit TRITC (Abbildung 2.40) und FITC (Abbildung 2.43) an einer Zellprobe von PC 12 Neuronen. In Abbildung 2.40 ist nur ein minimales Niveau diffuser roter Fluoreszenz festzustellen, während Abbildung 2.43 einen hohen Grad grüner Fluoreszenz zeigt. Diese Zellen zeigen also keine Stoffwechselaktivität mehr und haben eine verletzte Zellmembran.

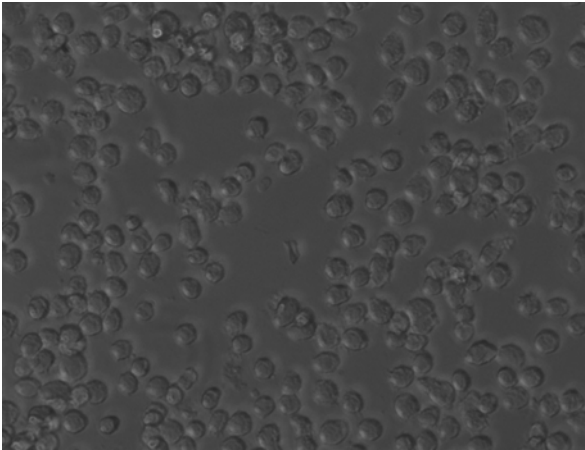


Abb. 2.38: Phasenkontrastaufnahme von Melanomzellen

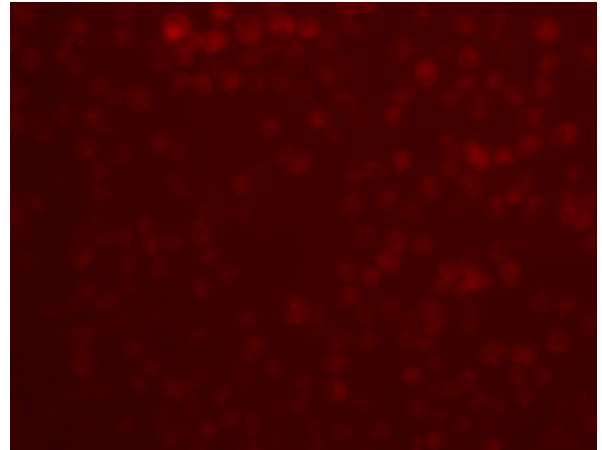


Abb. 2.41: Fluoreszenzaufnahme mit Filter für Tetramethylrhodamine

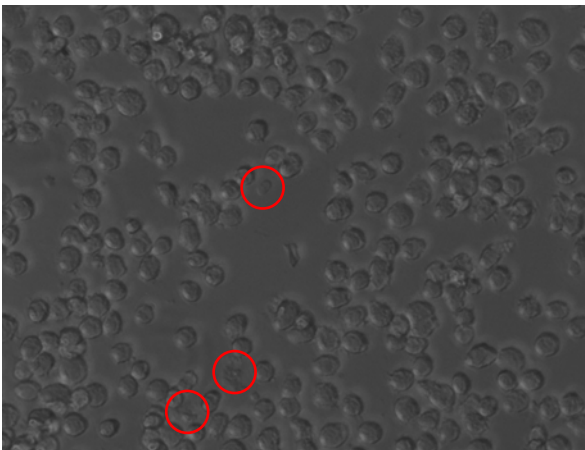


Abb. 2.39: Phasenkontrastaufnahme von Melanomzellen

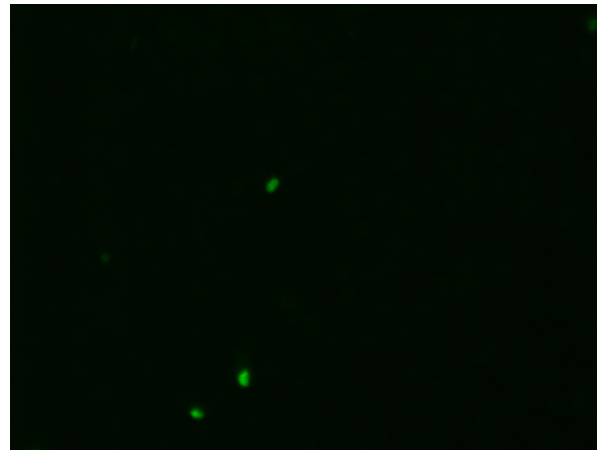


Abb. 2.42: Fluoreszenzaufnahme mit Filter für Fluorescein

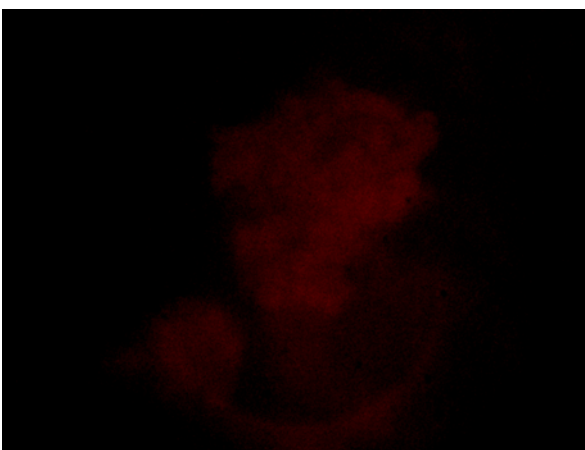


Abb. 2.40: Fluoreszenzaufnahme (TRITC) von PC 12 Neuronen

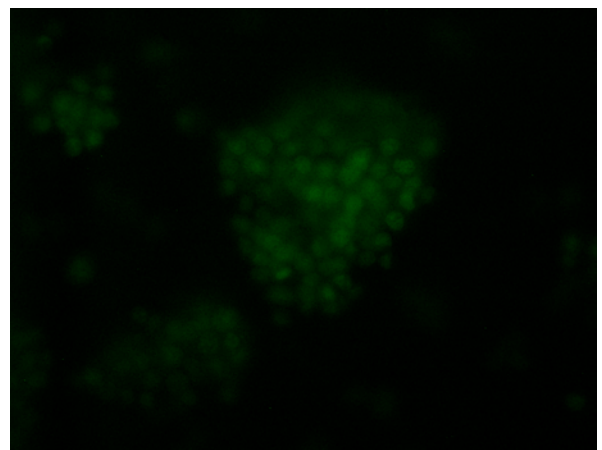


Abb. 2.43: Fluoreszenzaufnahme (FITC) von PC 12 Neuronen

In den folgenden Unterkapiteln 2.6.1 bis 2.6.3 werden die wesentlichen Ergebnisse der dielektrischen Spektroskopie an Suspensionen vier verschiedener Körperzelltypen vorgestellt. Alle Daten werden unter Benutzung einer asymmetrisch verbreiterten Cole-Davidson-Relaxationsfunktion und unter Berücksichtigung eines DC-Leitfähigkeitsterms gefittet (Gleichung 2.1).

Die wesentlichen Parameter die sich aus dieser frequenzabhängigen Analyse ergeben, nämlich die Temperaturabhängigkeit der DC-Leitfähigkeit σ_{dc} und der mittleren Relaxationsrate τ sowie die Temperaturabhängigkeit der dielektrischen Stärke $\Delta\epsilon$ werden in übersichtlichen Schaubildern zusammengefasst und mit den Gleichungen 2.3, 2.4 und 2.6 durch ein thermisch aktiviertes Verhalten mit Vorfaktor und Energiebarriere bzw. durch ein Curie-Weiss ähnliches Gesetz beschrieben. Damit ergeben sich die 6 signifikanten Parameter (τ_0 , E_τ , σ_0 , E_σ , C , T_C), die in den Tabellen 2.3 bis 2.11 zusammengefasst werden. Diese Parametersätze erlauben für spezielle Zelltypen in Suspension eine eindeutige Berechnung von dielektrischer Konstante und von Leitfähigkeit als Funktion von Frequenz und Temperatur.

2.6.1 Dielektrische Messungen an Nervenzellen

Die Neuronen Vorläuferzellen wurden aus einem Nebennierentumor des Sympathischen Nervensystems einer Ratte (PC 12) isoliert. PC 12 Zellen dienen als Modellsystem zur Untersuchung neuronaler Differenzierung und Entwicklung. Die Fasern des Sympathischen Nervensystems reichen vom Rückenmark zu den einzelnen Körperbereichen, um Aktivitäten wie Pupillenerweiterung, Lidschlag, Sekretion der Schweißdrüsen und Blutdruck durch Aufweiten der Blutgefäße in großen Muskeln oder Einengen von Blutgefäßen zu regulieren.

Das Sympathische Nervensystem gibt auch Informationen von den Organen zurück an das autonome Nervensystem. Wo elektrische Impulse durch eine chemische Synapse von einem Neuron zum anderen geschickt werden, ist ein neuronales Netz notwendig. Nach Zugabe eines Neuronenwachstumsfaktors beginnen die PC 12 Zellen in einen sympathischen Neuronen ähnlichen Phänotyp zu differenzieren.

Die Kultivierung von Neuronen ist erfahrungsgemäß schwer und erfordert aufgrund des langsamen Zellwachstums der Neuronen einen hohen Zeitaufwand. Daher wurden zunächst Messungen mit relativ kleinen Konzentrationen von etwa 1 Million Zellen pro ml Pufferlösung durchgeführt.

Abbildung 2.44 zeigt eine Auswahl der Messungen an den Nervenzellen im PBS-Puffer, die zwischen 24 °C und 50 °C in Temperaturschritten von 2 °C durchgeführt wurden. Dargestellt sind jeweils die dielektrischen Eigenschaften ϵ' , ϵ'' und σ' über der Frequenz im Bereich von 100 MHz bis 40 GHz. Die Relaxation der Wassermoleküle, deren Mittelfrequenz in diesem Temperaturbereich zwischen 15 GHz und 30 GHz liegt, wird unterhalb von etwa 4 GHz durch die hohe DC-Leitfähigkeit überlagert. Die statische dielektrische Konstante wird aufgrund der niedrigen Zellkonzentration nur geringfügig unter das Niveau reinen Wassers gesenkt. Die Abweichungen in ϵ' vom statischen Grenzwert können durch Effekte blockierender Elektroden erklärt werden.

Um mögliche resonante Absorptionsprozesse unterhalb der Wasserrelaxation, die durch die hohe DC-Leitfähigkeit überlagert würden, besser detektieren zu können, wurde in einer weiteren Messreihe der PBS-Puffer durch eine Mannitol-Lösung gleicher Osmolarität ersetzt. Durch Zugabe des nichtmembrangängigen, osmotisch wirksamen Zuckeralkohols Mannitol werden die Zellmembranen stabilisiert und die Ionenkonzentration kann im Vergleich zum PBS-Puffer deutlich gesenkt werden. Lediglich zum Einstellen des konstanten pH-Werts ist eine geringe Ionenkonzentration nötig.

Abbildung 2.45 zeigt das Spektrum der komplexen dielektrischen Konstanten der Nervenzellen im Mannitol-Puffer im Temperaturbereich zwischen 24 °C und 50 °C. In Abbildung 2.46 ist ein direkter Vergleich zwischen den dielektrischen Spektren der PC 12 Neuronen im PBS-Puffer und im Mannitol-Puffer bei 37 °C dargestellt. Bemerkenswert ist die um einen Faktor 10 niedrigere DC-Leitfähigkeit im Mannitol-Puffer, die durch, die im Vergleich zum PBS-Puffer, niedrigere Ionenkonzentration erreicht wurde. Der direkte Vergleich der Spektren zeigt wie durch die deutlich geringere DC-Leitfähigkeit auch die Effekte blockierender Elektroden unterdrückt werden.

Abbildung 2.47 schließlich zeigt die Messungen an einer Neuronensuspension mit sehr hoher Konzentration von etwa 100 Millionen Zellen pro ml Pufferlösung im Temperaturbereich zwischen 24 °C und 50 °C. Bei den Messungen an den PC 12 Zellen wurde nur die wasser-ähnliche Relaxation des Lösungsmittels detektiert. Es fanden sich keine klaren Anzeichen für zusätzliche Relaxationsphänomene, wie z. B. bei Vollblut und den Messungen an Erythrozyten.

Die Frequenz- und Temperaturabhängigkeit von Real- und Imaginärteil der dielektrischen Konstanten und vom Realteil der dynamischen Leitfähigkeit lassen sich sehr gut im Rahmen unseres Standardmodells beschreiben: Ein Term der die DC-Leitfähigkeit, die zu niederen Frequenzen die Spektren dominiert sowie eine Cole-Davidson Relaxation mit leicht temperaturabhängiger Asymmetrie. Der Asymmetrie-Parameter lag bei allen Fits zwischen ca. 0.94 (tiefe Temperaturen) und 1.0 (hohe Temperaturen). Die Abweichung vom reinen Debye-Fall scheint signifikant und die Fits werden bei Zulassung von Asymmetrie deutlich besser. Bei den höchsten Temperaturen, die im Rahmen dieses Projektes untersucht wurden, finden wir kleine aber doch signifikante Abweichungen, die wir bislang nicht erklären können. Am besten sieht man diese in den Messungen an den PC 12 Neuronen im Mannitol-Puffer, da hier die Leitfähigkeit weitgehend unterdrückt ist. Hier sieht man bei den Messungen bei 50° C und bei ca. 8 GHz in allen Messgrößen Abweichungen zwischen Messung und Fit. Unter Umständen deutet auch diese Abweichung vom üblichen Cole-Davidson Verhalten auf eine zweite Relaxation. Allerdings gelang uns in diesem Falle keine überzeugende alternative Beschreibung, wie sie uns im Vollblut gelang und in Abbildung 2.35 dokumentiert ist.

Die wesentlichen Fitparameter unserer Analyse sind in Abbildung 2.48 zusammengestellt. Im oberen Rahmen zeigen wir die Temperaturabhängigkeit der DC-Leitfähigkeit und der mittleren Relaxationszeit in den unterschiedlichen Zellsuspensionen in einer Arrhenius-Auftragung. Der untere Rahmen zeigt die inverse dielektrische Suszeptibilität als Funktion der Temperatur. Offensichtlich hängt die DC-Leitfähigkeit wesentlich von der Pufferlösung ab und ist schwach temperaturabhängig: Die Leitfähigkeit ist im PBS-Puffer um ca. eine Dekade höher, verglichen mit der Mannitol-Lösung. Die Relaxationszeiten zeigen ein ähnliches thermisch aktiviertes Verhalten. Die dielektrische Suszeptibilität der wasserähnlichen Relaxation ist in Mannitol stärker unterdrückt oder abgeschirmt (höhere Werte von $1/\Delta\epsilon$). Die Temperaturabhängigkeit ist schwach und kann durch ein Curie-Weiss Gesetz approximiert werden (durchgezogene Linien im unteren Rahmen der Abbildung 2.48). Das thermisch aktivierte Verhalten der Gleichstrom-Leitfähigkeit und der mittleren Relaxationszeiten haben wir durch Arrheniusgesetze angepasst (durchgezogene Linien im oberen Rahmen der Abbildung 2.48). Die relevanten Modell-Parameter, die aus diesen Fits resultieren sind in der Tabelle 2.3 (Vorfaktoren σ_0 und Energiebarrieren E_σ der DC-Leitfähigkeit), Tabelle 2.4 (Vorfaktoren τ_0 und Energiebarrieren E_τ der mittleren Relaxationszeiten) und Tabelle 2.5 („Curie-Weiss“-Temperatur und „Curie-Konstante“ zusammengefasst).

Die Vorfaktoren der DC-Leitfähigkeit σ_0 liegen bei 0.94 S/cm für Neuronen im Mannitol-Puffer und bei 2.44 S/cm für 1 Mio./ml bzw. bei 6.29 S/cm für 100 Mio./ml Neuronen in PBS-Puffer. Die Energiebarrieren E_σ , die die Gleichstromleitfähigkeit bestimmen sind für alle PC 12 Neuronensuspensionen ähnlich und liegen bei 0.172 eV (Mannitol), 0.128 eV (1 Mio./ml PBS) und 0.152 eV (100 Mio./ml PBS). Die

Energiebarrieren sind typische Werte, wie man sie auch in wässrigen Elektrolytlösungen findet.

Probe	σ_0	E_σ
Neuronen 1 Mannitol	0.94 S/cm	0.172 eV
Neuronen 1 PBS	2.44 S/cm	0.128 eV
Neuronen 100 PBS	6.29 S/cm	0.152 eV

Tab. 2.3: Vorfaktor σ_0 und Energiebarriere E_σ der DC-Leitfähigkeit für die Neuronensuspensionen

Das thermisch aktivierte Verhalten der mittleren Relaxationszeiten lässt sich zufrieden stellend mit Vorfaktoren τ_0 von 12.6 fs (Mannitol), 18.9 fs (1 Mio./ml PBS) und 38.0 fs (100 Mio./ml PBS), sowie mit den Energiebarrieren von 0.167 eV (Mannitol), 0.157 eV (1 Mio./ml PBS) und 0.139 eV (100 Mio./ml PBS) beschreiben. Bei den Messungen im PBS Puffer sieht man, dass die Konzentration der Zellen, das Relaxationsverhalten signifikant bestimmt. In der Lösung mit der höheren Neuronenkonzentration ist die Energiebarriere deutlich geringer, der Vorfaktor aber signifikant erhöht.

Probe	τ_0	E_τ
Neuronen 1 Mannitol	12.6 fs	0.167 eV
Neuronen 1 PBS	18.9 fs	0.157 eV
Neuronen 100 PBS	38.0 fs	0.139 eV

Tab. 2.4: Vorfaktor τ_0 und Energiebarriere E_τ der mittleren Relaxationszeiten der wasserähnlichen Relaxation für die Neuronensuspensionen

Curie-Konstante und Curie-Weiss-Temperatur sind in Tabelle 2.5 dokumentiert. Die Curie-Temperatur ist ein Maß für die dipolare Wechselwirkung in der Lösung, die Curie-Konstante ist ein Maß für das Dipolmoment. Die Curie-Weiss-Temperatur hängt extrem stark von der Lösung ab (63 K in Mannitol, verglichen mit 150 K im PBS-Puffer) und deutlich geringer aber immer noch signifikant von der Neuronenkonzentration (150 K bei 1 Mio./ml Neuronen verglichen mit 162 K bei 100 Mio./ml Neuronen). Die Curie-Konstante liegt zwischen $17.7 \cdot 10^3$ K im Mannitolpuffer und $11.1 \cdot 10^3$ K bei 100 Mio./ml Neuronen im PBS-Puffer. Diese Werte zeigen, wie abhängig von der Pufferlösung und von der Neuronenkonzentration die wasserähnliche Relaxation abgeschirmt und geschwächt wird.

Probe	T_C	C
Neuronen 1 Mannitol	63.5 K	$17.7 \cdot 10^3$ K
Neuronen 1 PBS	150.2 K	$12.3 \cdot 10^3$ K
Neuronen 100 PBS	162.1 K	$11.1 \cdot 10^3$ K

Tab. 2.5: Curie-Weiss-Temperatur T_C und Curie-Konstante C für die Neuronensuspensionen

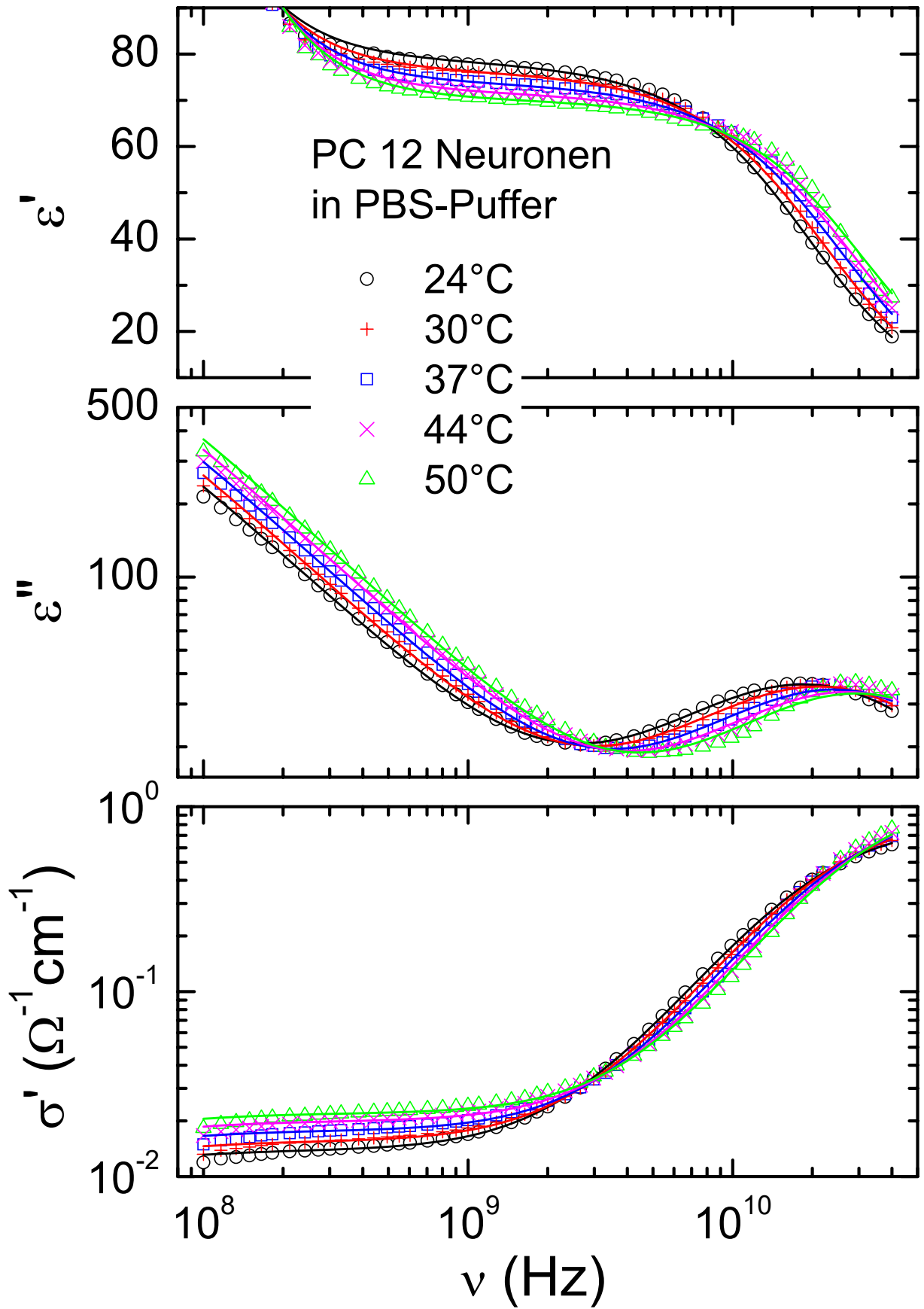


Abb. 2.44: Dielektrische Eigenschaften von Nervenzellen (ca. 1 Mio./ml) in PBS-Puffer

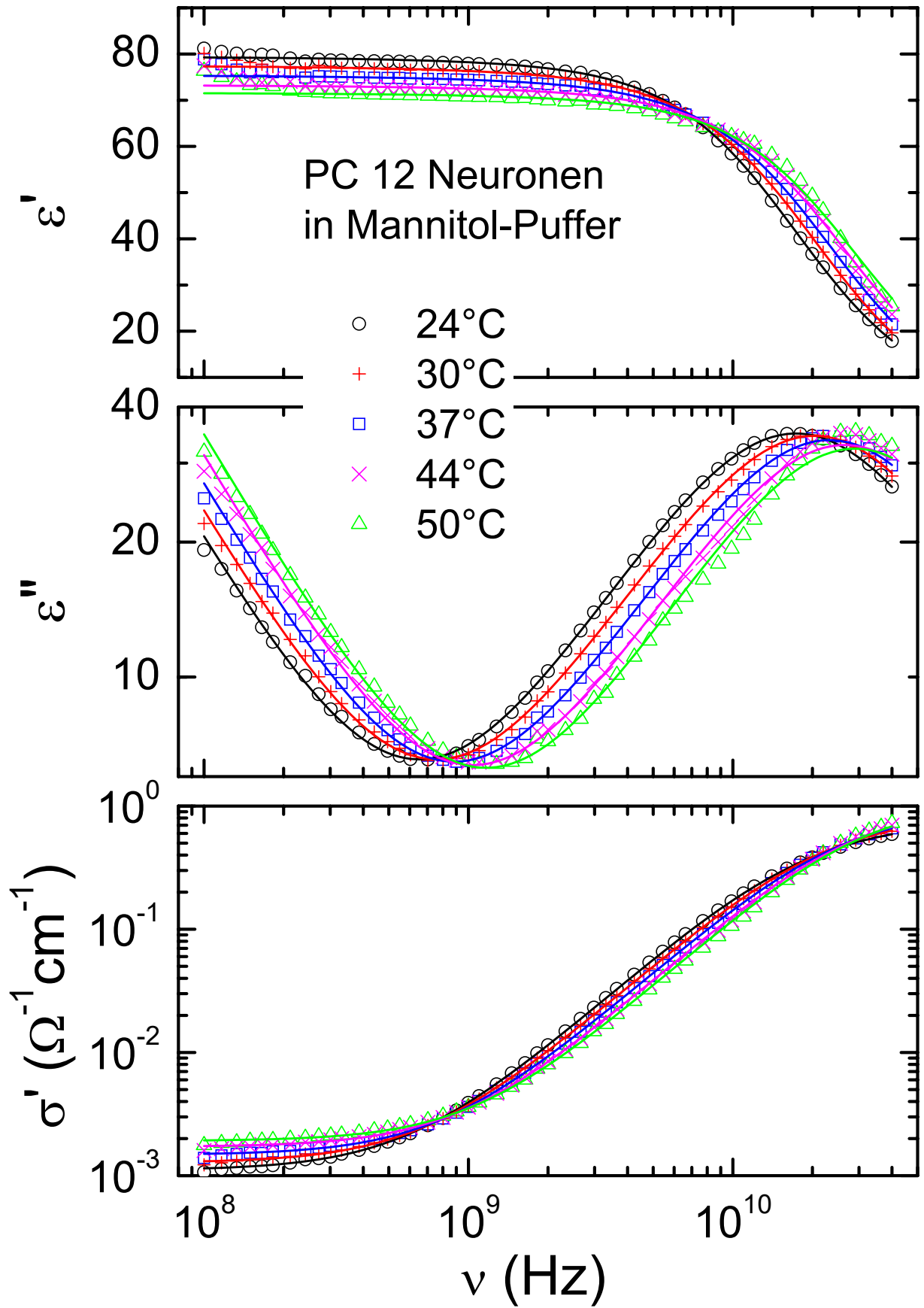


Abb. 2.45: Dielektrische Eigenschaften von Nervenzellen (ca. 1 Mio./ml) in Mannitol

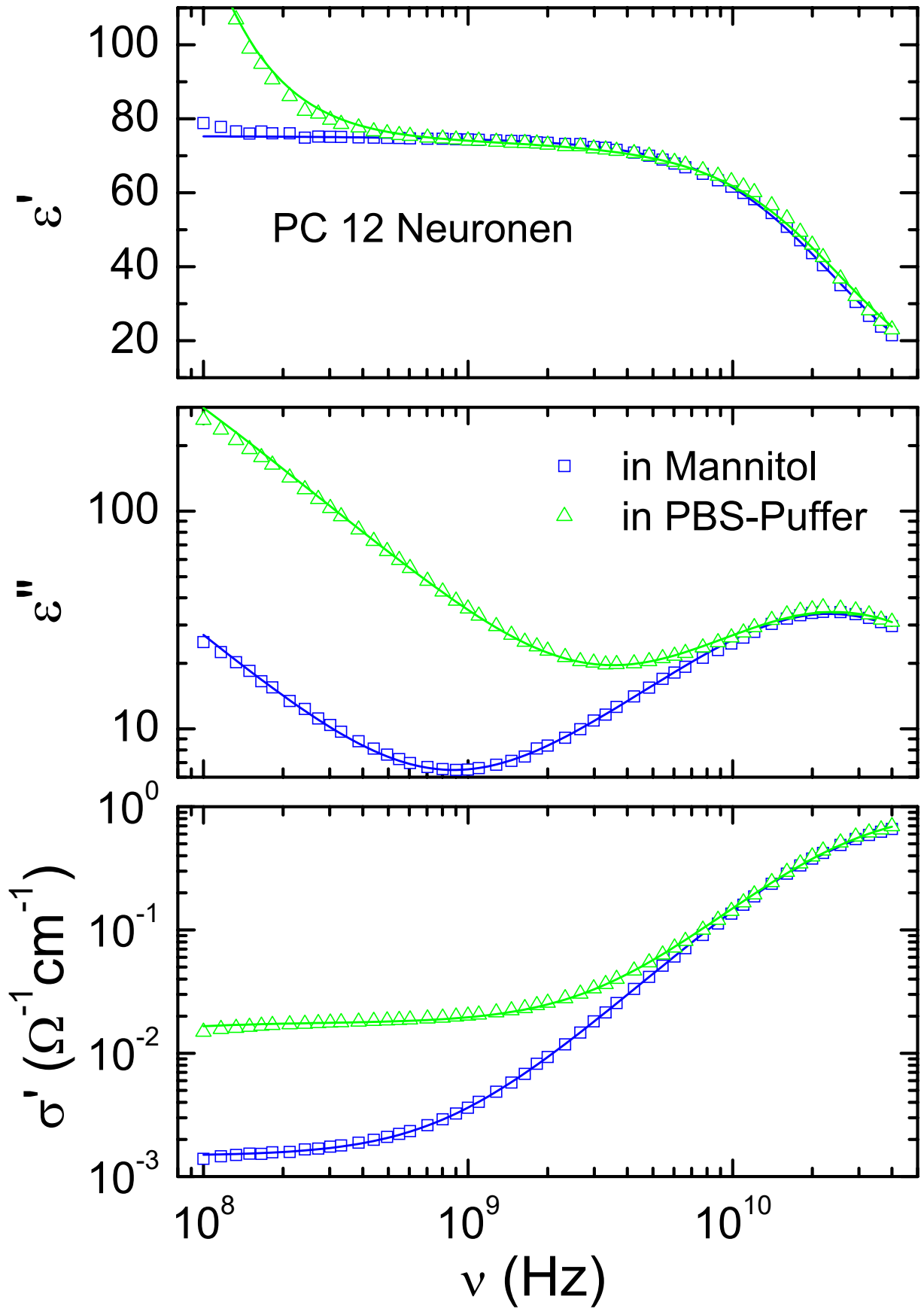


Abb. 2.46: Dielektrische Eigenschaften von Nervenzellen (ca. 1 Mio./ml) bei 37°C

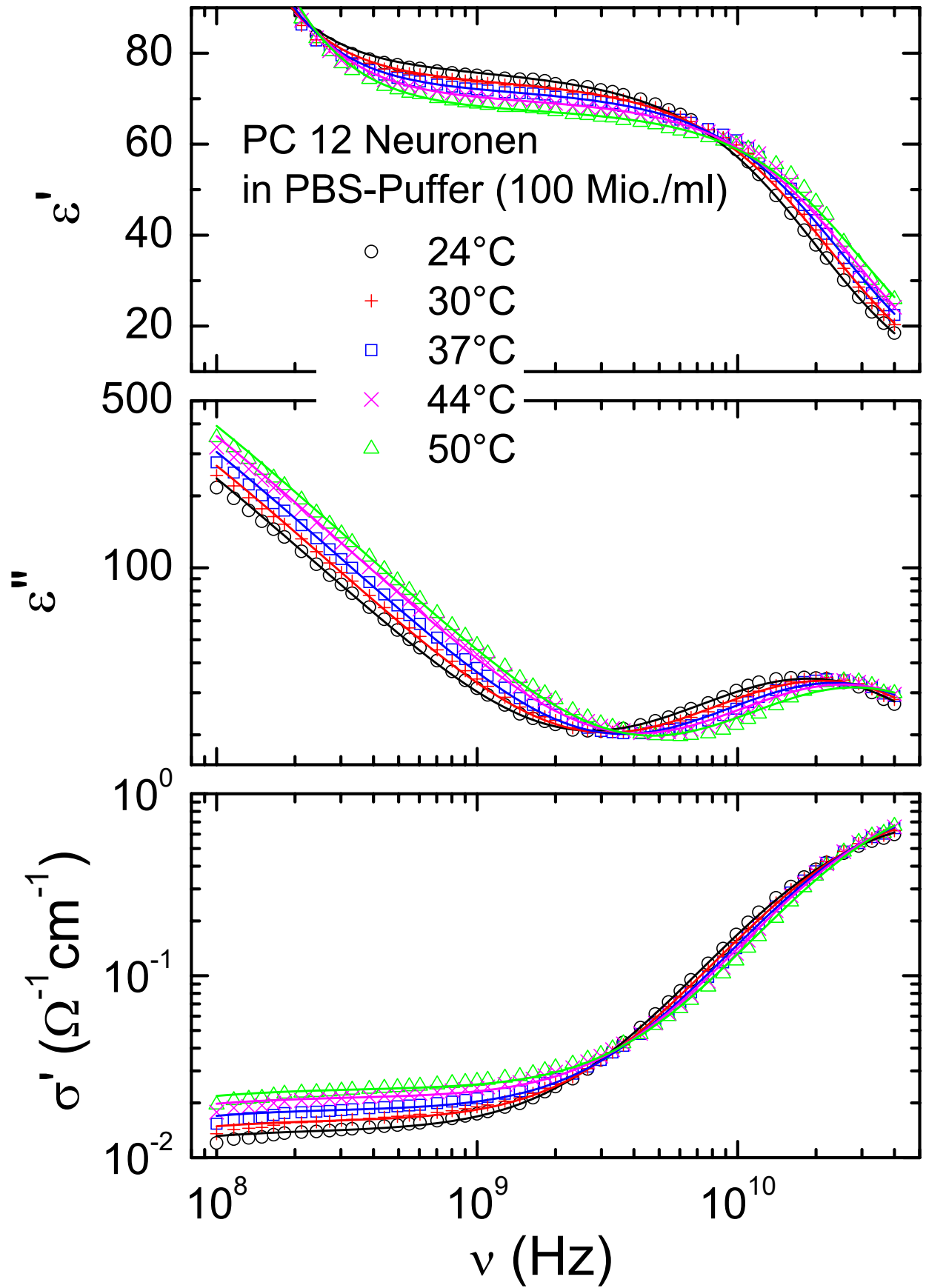


Abb. 2.47: Dielektrische Eigenschaften von Nervenzellen (ca. 100 Mio./ml) in PBS-Puffer

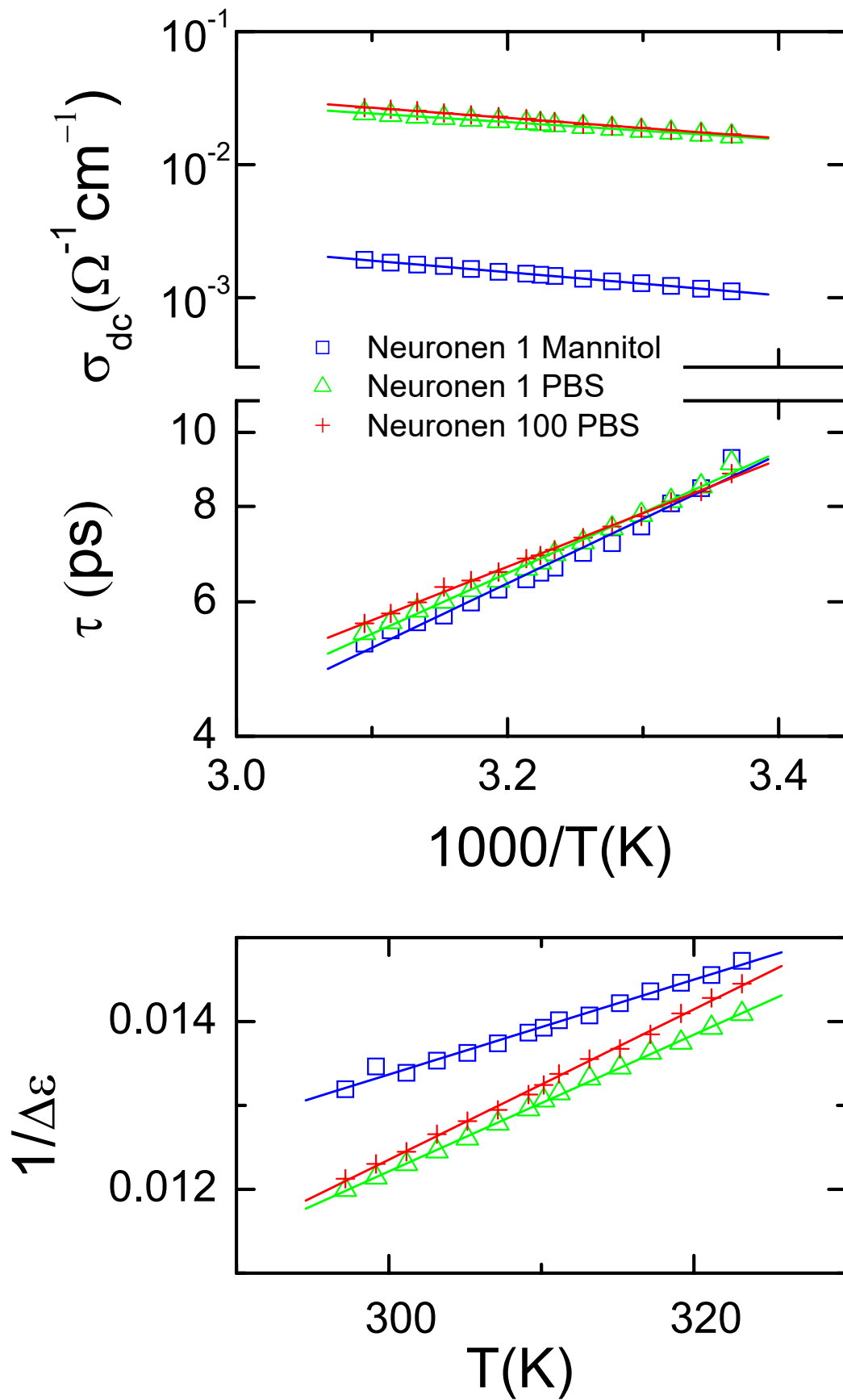


Abb. 2.48: Fitparameter Nervenzellen

2.6.2 Dielektrische Messungen an Fibroblasten

Fibroblasten sind diejenigen Zelltypen, die hauptsächlich das Bindegewebe bei Menschen und anderen Lebewesen bilden. Sie unterscheiden sich morphologisch je nach ihrer Position und Aufgabe. Fibroblasten sondern Vorläufer aller Bestandteile ab, die die extrazelluläre Matrix und die Bindegewebsfasern bilden. Fibroblasten sind also für die Bildung der Hauptstruktur des Organismus verantwortlich. Die für die dielektrische Spektroskopie verwendete Zelllinie der humanen Fibroblasten wird auch bei den Permeabilitätsmessungen eingesetzt und wird im Abschnitt II. 7 näher beschrieben.

Von den menschlichen Fibroblasten wurden insgesamt vier Konzentrationen mit dielektrischer Spektroskopie vermessen, drei Konzentrationen im Mannitol-Puffer und eine sehr hohe Konzentration mit etwa 240 Millionen Zellen pro ml Pufferlösung in PBS⁺⁺. Wie im Arbeitsprogramm festgelegt wurde zwischen 24 °C und 50 °C in Temperaturschritten von 2 °C gemessen mit besonderer Berücksichtigung des Bereichs um 37 °C. In jeder Abbildung ist der Realteil der dielektrischen Konstante (ϵ' : oberer Bildrahmen), der Imaginärteil der dielektrischen Konstante (ϵ'' : mittlerer Bildrahmen) und der Realteil der Leitfähigkeit (σ' : unterer Bildrahmen) dargestellt. ϵ' ist halblogarithmisch gegen die Frequenz aufgetragen, ϵ'' und σ' werden aus Gründen einer prägnanteren Darstellung doppeltlogarithmisch gezeigt.

Die Abbildungen 2.49 bis 2.53 zeigen die Messungen an den verschiedenen Konzentrationen menschlicher Fibroblasten für den Frequenzbereich von 100 MHz bis 40 GHz. Die Bilder dokumentieren Messungen an Konzentrationen von etwa 10 Millionen Zellen pro ml Pufferlösung (Abbildung 2.49), von etwa 50 Millionen Zellen (Abbildung 2.50) und von etwa 80 Millionen Zellen pro ml (Abbildung 2.51) im Mannitol-Puffer. In Abbildung 2.52 ist ein Vergleich der dielektrischen Eigenschaften der unterschiedlichen Konzentrationen im Mannitol-Puffer bei 37 °C dargestellt.

Fibroblasten unterschiedlicher Konzentration in Mannitol-Puffer verhalten sich sehr ähnlich. Allerdings nimmt mit steigender Zellkonzentration die DC-Leitfähigkeit geringfügig ab. Es gibt keine eindeutigen Anzeichen einer Zusatz-Relaxation und die Daten können zufriedenstellend mit DC-Leitfähigkeit und einer wasser-ähnlichen Relaxation beschrieben werden. Die durchgezogenen Linien in Abbildung 2.50 und 2.51 wurden mit einer Cole-Davidson Verteilung und zusätzlichen Leitfähigkeitsprozessen gefittet. Ähnlich wie bei Elektrolytlösungen verschiebt sich das Maximum der Absorption im dielektrischen Verlust mit steigender Temperatur zu höheren Frequenzen und die DC-Leitfähigkeit nimmt zu. Schließlich zeigen wir in Abbildung 2.53 eine sehr hohe Konzentration von Fibroblasten (240 Millionen Zellen pro ml Pufferlösung) in einer PBS⁺⁺-Pufferlösung. In diesem Falle nimmt die DC-Leitfähigkeit so stark zu, dass die Absorption bei Frequenzen von 1 GHz bereits vollständig durch Leitfähigkeitsprozesse bestimmt wird.

Nimmt man die Modellbeschreibung etwas genauer unter die Lupe, so stellt man fest, dass die Modell-Fits die experimentellen Daten bei tiefen und mittleren Temperaturen sehr gut beschreiben. Dies sieht man besonders gut in Abbildung 2.52, in der die Messungen an Fibroblasten unterschiedlicher Konzentration bei Körpertemperatur verglichen werden. Allerdings gibt es doch deutliche Abweichungen der Modellbeschreibung von den experimentellen Daten bei höheren Temperaturen. Bei allen Messungen an Fibroblasten findet man bei 50° C

deutliche Unterschiede zwischen Theorie und Experiment. Die Messpunkte des dielektrischen Verlustes bei 50° C liegen bei allen Messungen bei ca. 10 GHz deutlich unterhalb der theoretischen Kurve, während die Messpunkte der Dielektrizitätskonstante in diesem Bereich oberhalb der theoretischen Beschreibung liegen (siehe z. B. die 50° C Daten in Abbildung 2.53). Um hier zu verlässlichen Aussagen zu gelangen, müssten die Messungen zu höheren Frequenzen ausgedehnt werden.

Probe	σ_0	E_σ
Fibroblasten 10 Mannitol	2.0 S/cm	0.163 eV
Fibroblasten 50 Mannitol	67.6 S/cm	0.287 eV
Fibroblasten 80 Mannitol	21.4 S/cm	0.264 eV
Fibroblasten 240 PBS++	2.0 S/cm	0.123 eV

Tab. 2.6: Vorfaktor σ_0 und Energiebarriere E_σ der DC-Leitfähigkeit für die Fibroblastensuspensionen

Die direkten Fit-Parameter, nämlich die DC-Leitfähigkeit und die mittlere Relaxationszeit sind im oberen Bild von Abbildung 2.54 in einer Arrhenius-Darstellung aufgetragen. Beide Größen zeigen fast ideale exponentielle Temperaturabhängigkeiten (durchgezogene Linien in diesen Abbildungen). Die wesentlichen Fit-Parameter, nämlich die Vorfaktoren σ_0 und die Energiebarriere der Leitfähigkeit E_σ sowie die inverse Versuchsfrequenz τ_0 und die Energiebarriere E_τ , die die mittlere Relaxationszeit bestimmen, sind in den Tabellen 2.6 und 2.7 angegeben. Die Vorfaktoren σ_0 zeigen eine enorme Bandbreite von ca. 2.0 S/cm in der Suspension mit 10 Mio. Fibroblasten pro ml, bis zu 67.6 S/cm in der Lösung mit 50 Mio. Fibroblasten je ml. Warum die Vorfaktoren eine derartig starke Konzentrationsabhängigkeit zeigen und warum man ein Maximum bei mittleren Konzentrationen findet ist unklar und müsste in weiterführenden Experimenten geklärt werden. Die Energiebarrieren zeigen einen ähnlichen Trend, die Schwankungsbreite ist aber nicht so extrem.

Probe	τ_0	E_τ
Fibroblasten 10 Mannitol	29.8 fs	0.144 eV
Fibroblasten 50 Mannitol	45.4 fs	0.134 eV
Fibroblasten 80 Mannitol	39.1 fs	0.138 eV
Fibroblasten 240 PBS++	28.0 fs	0.147 eV

Tab. 2.7: Vorfaktor τ_0 und Energiebarriere E_τ der mittleren Relaxationszeiten der wasserähnlichen Relaxation für die Fibroblastensuspensionen

Die Vorfaktoren des thermisch aktivierten Verhaltens der mittleren Relaxationszeiten liegen zwischen 28.0 fs und 45.4 fs, in einem Bereich der typisch ist für die wasserähnliche Relaxation in Zellsuspensionen. Die Energiebarrieren streuen um 140 meV, Werte, die auch für Elektrolytlösungen charakteristisch sind.

Schließlich zeigt der untere Rahmen von Abbildung 2.54 die Dipolstärke der Relaxation von Fibroblasten unterschiedlicher Konzentration in Mannitol und von 240 Mio. Fibroblasten pro ml in PBS⁺⁺-Puffer. Alle experimentellen Daten lassen sich innerhalb der experimentellen Ungenauigkeiten mit einem Curie-Weiss-Gesetz

beschreiben (durchgezogene Linien). Die Fitparameter sind in Tabellen 2.8 angegeben. Die Curie-Weiss-Konstanten liegen zwischen 48 K für die 80 Mio. Fibroblasten/ml in Mannitol und 148 K für 240 Mio. Fibroblasten im PBS⁺⁺-Puffer. Der hohe Wert der Curie-Weiss-Temperatur lässt sich für die sehr hohe Konzentration aufgrund der erwarteten starken dipolaren Wechselwirkung erklären. Allerdings findet man im Mannitol-Puffer keine systematische Konzentrationsabhängigkeit. Die Curie-Konstante liegt für alle untersuchten Mannitol Lösungen bei ca. 17500 K, ist aber im PBS⁺⁺-Puffer deutlich geringer und liegt bei ca. 12000 K.

Probe	T_C	C
Fibroblasten 10 Mannitol	59.0 K	$18.0 \cdot 10^3$ K
Fibroblasten 50 Mannitol	76.2 K	$16.9 \cdot 10^3$ K
Fibroblasten 80 Mannitol	47.7 K	$18.7 \cdot 10^3$ K
Fibroblasten 240 PBS ⁺⁺	148.2 K	$12.0 \cdot 10^3$ K

Tab. 2.8: Curie-Weiss-Temperatur T_C und Curie-Konstante C für die Fibroblastensuspensionen

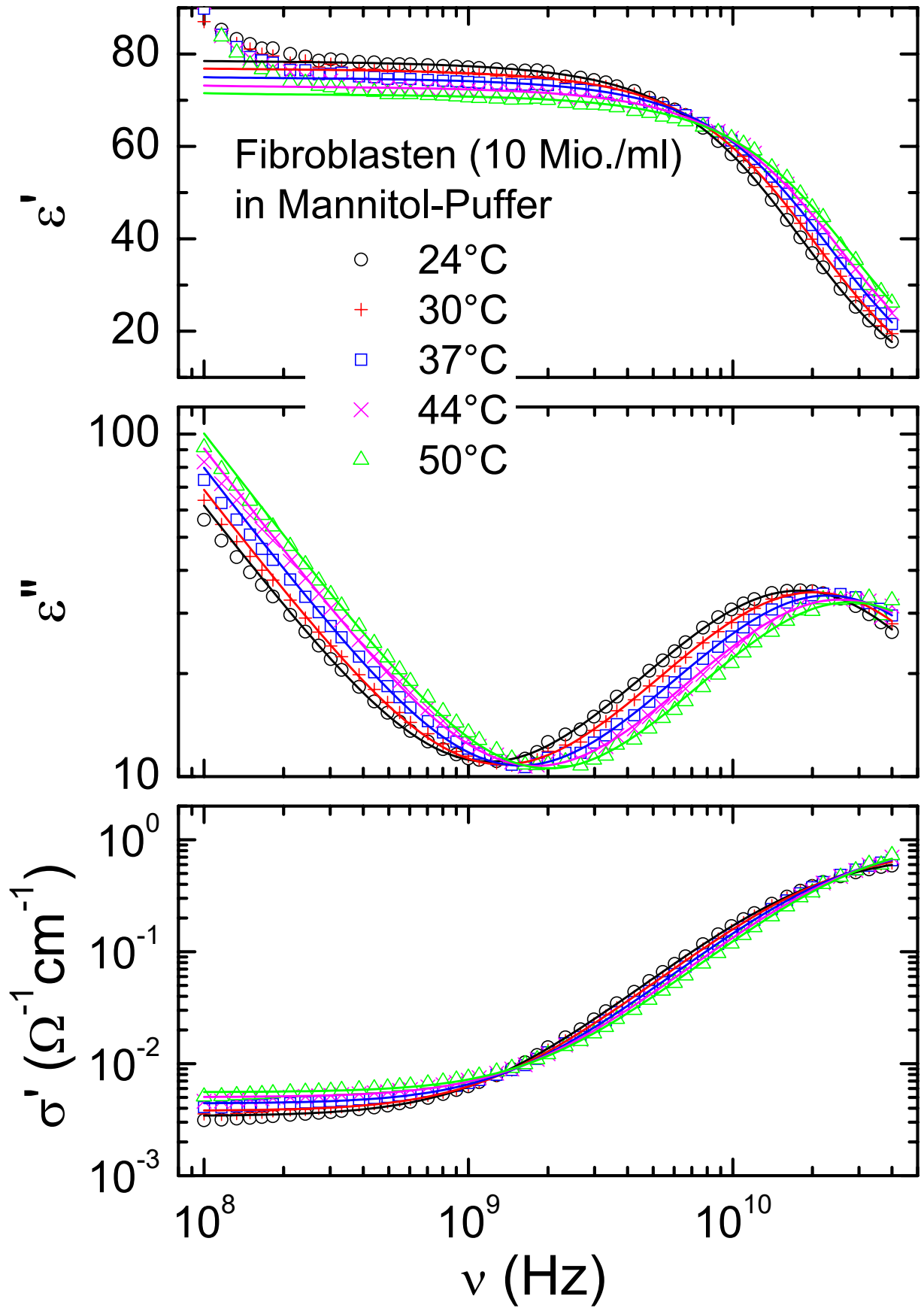


Abb. 2.49: Dielektrische Eigenschaften von Fibroblasten (ca. 10 Mio./ml) in Mannitol-Puffer

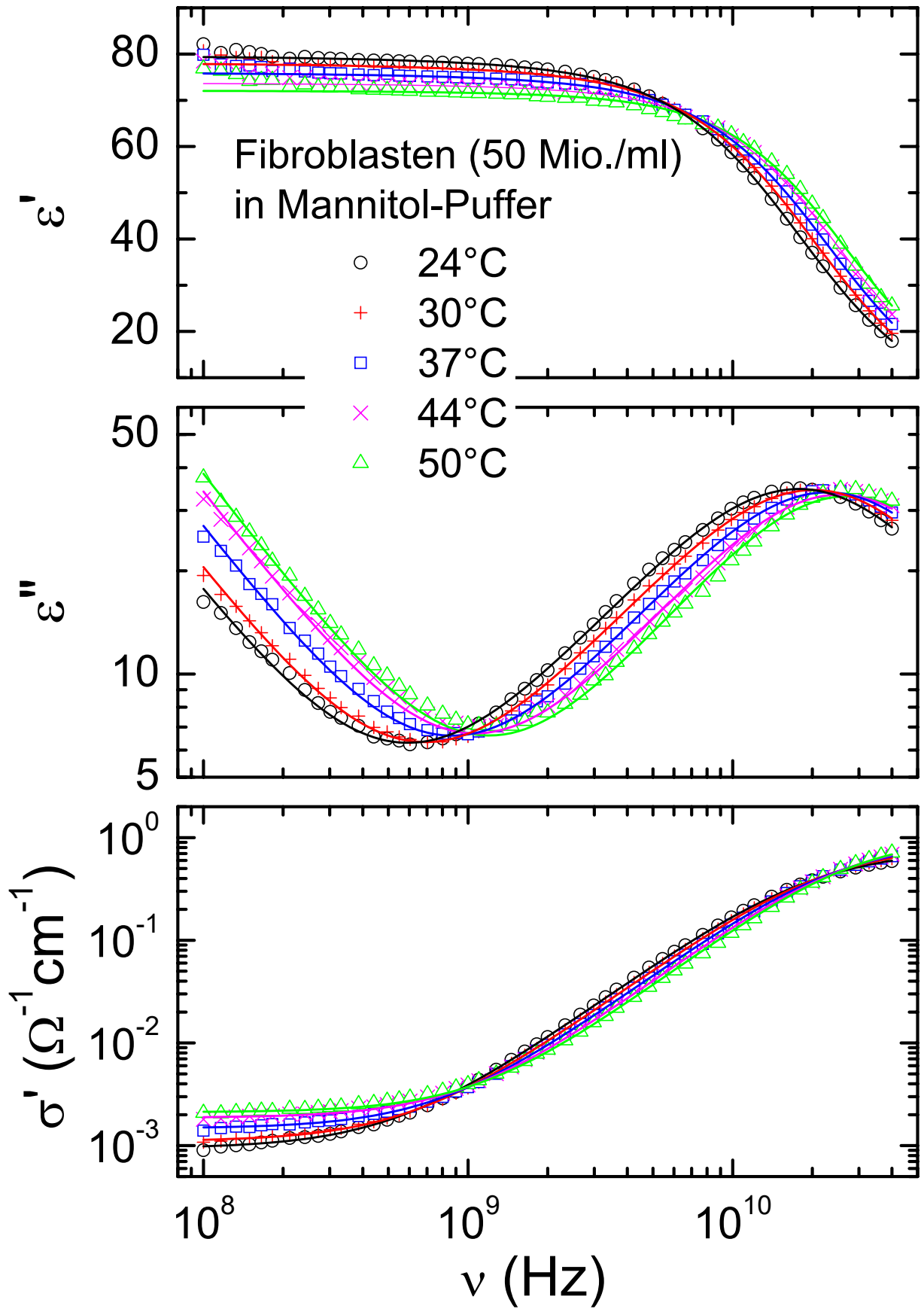


Abb. 2.50: Dielektrische Eigenschaften von Fibroblasten (ca. 50 Mio./ml) in Mannitol-Puffer

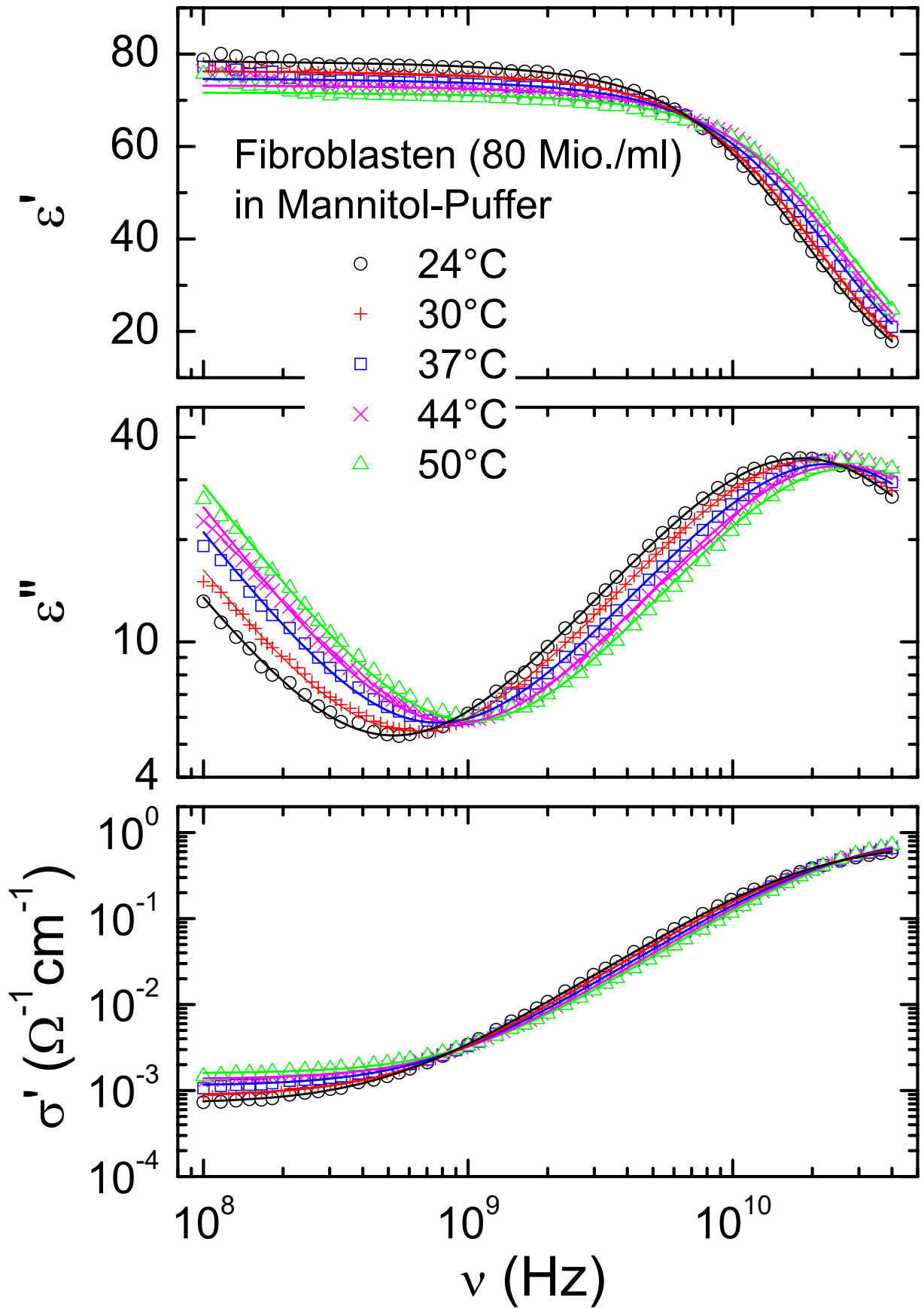


Abb. 2.51: Dielektrische Eigenschaften von Fibroblasten (ca. 80 Mio./ml) in Mannitol-Puffer

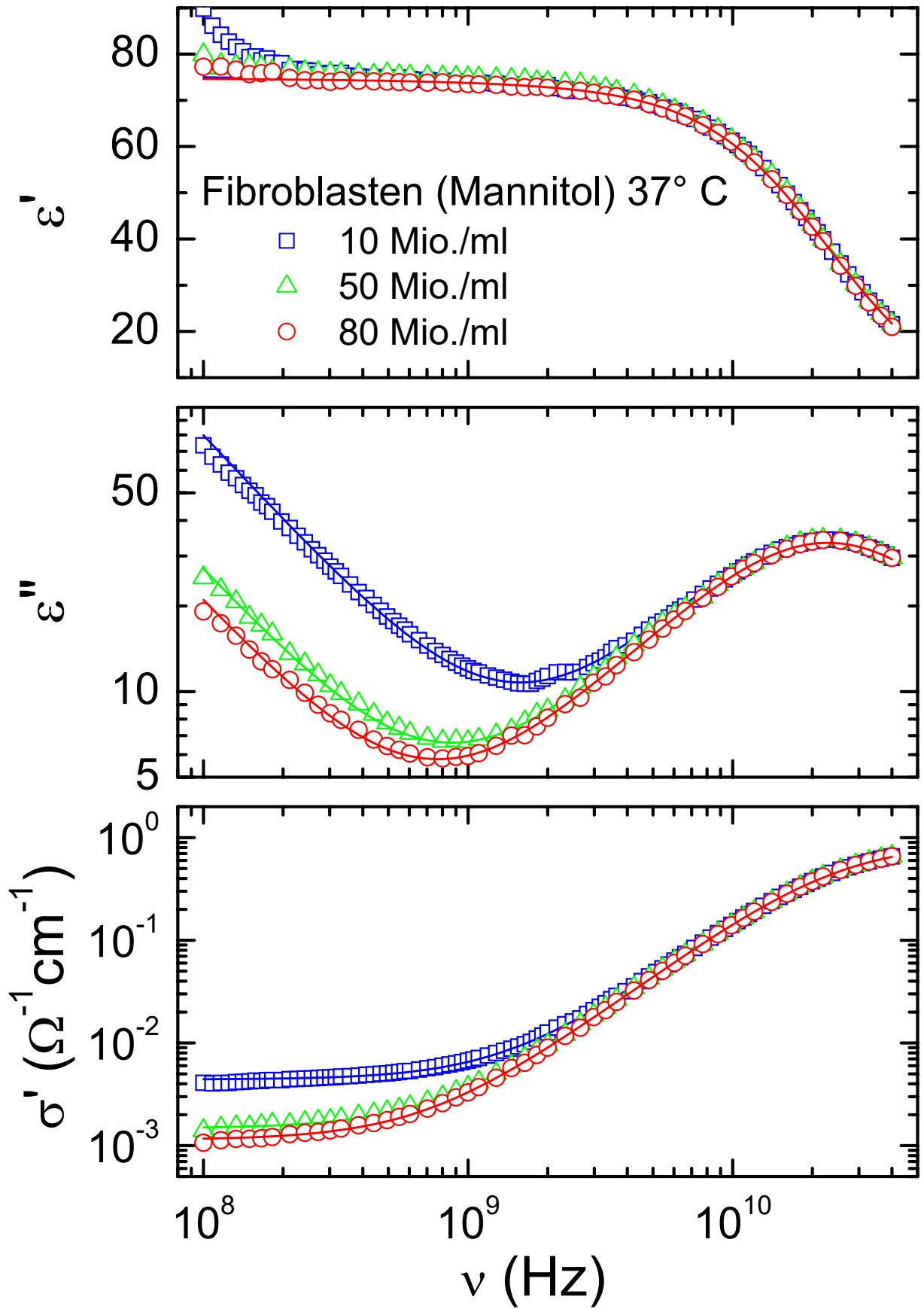


Abb. 2.52: Dielektrische Eigenschaften versch. Fibroblastensuspensionen bei 37° C

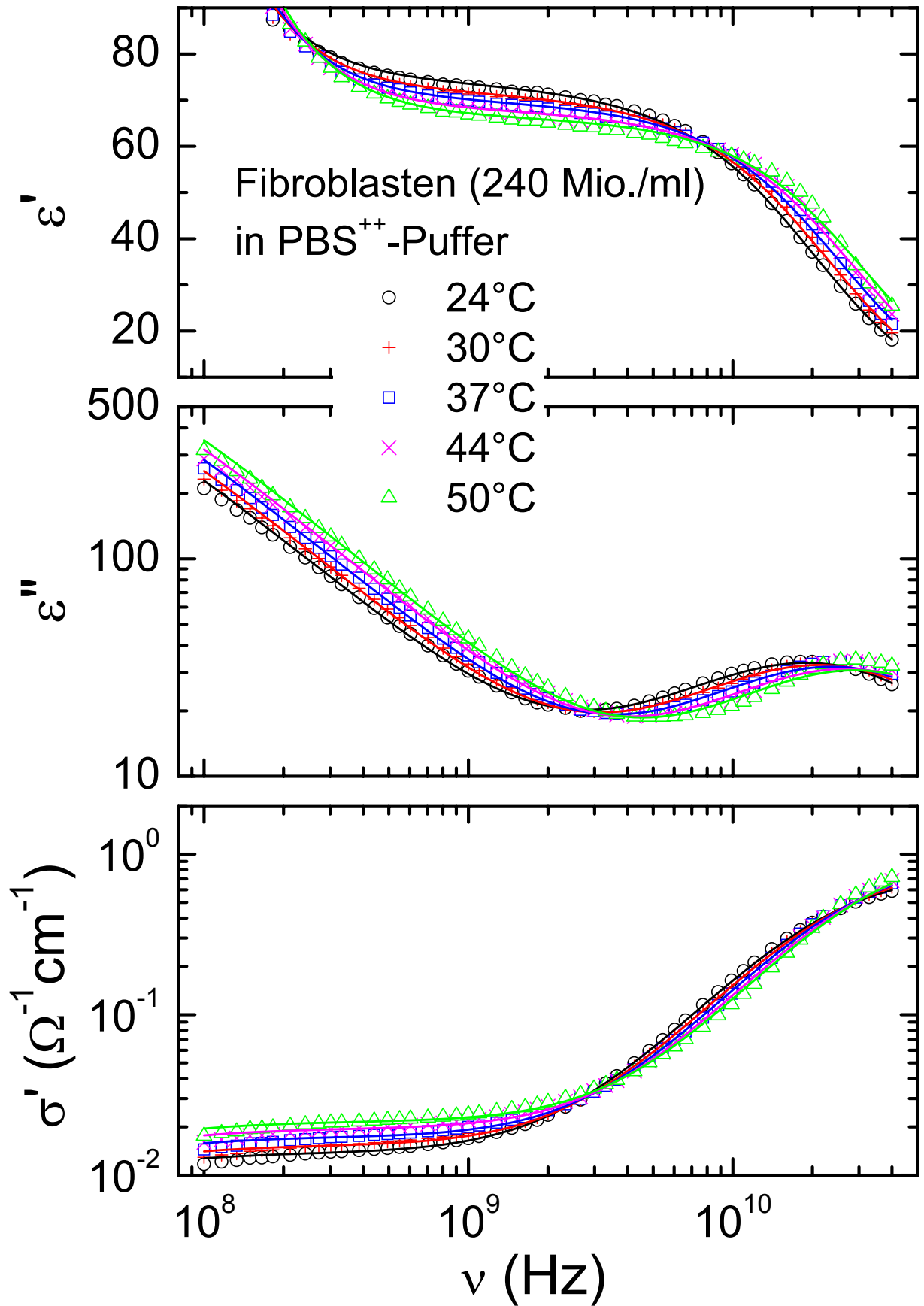


Abb. 2.53: Dielektrische Eigenschaften von Fibroblasten (ca. 240 Mio./ml) in PBS⁺⁺-Puffer

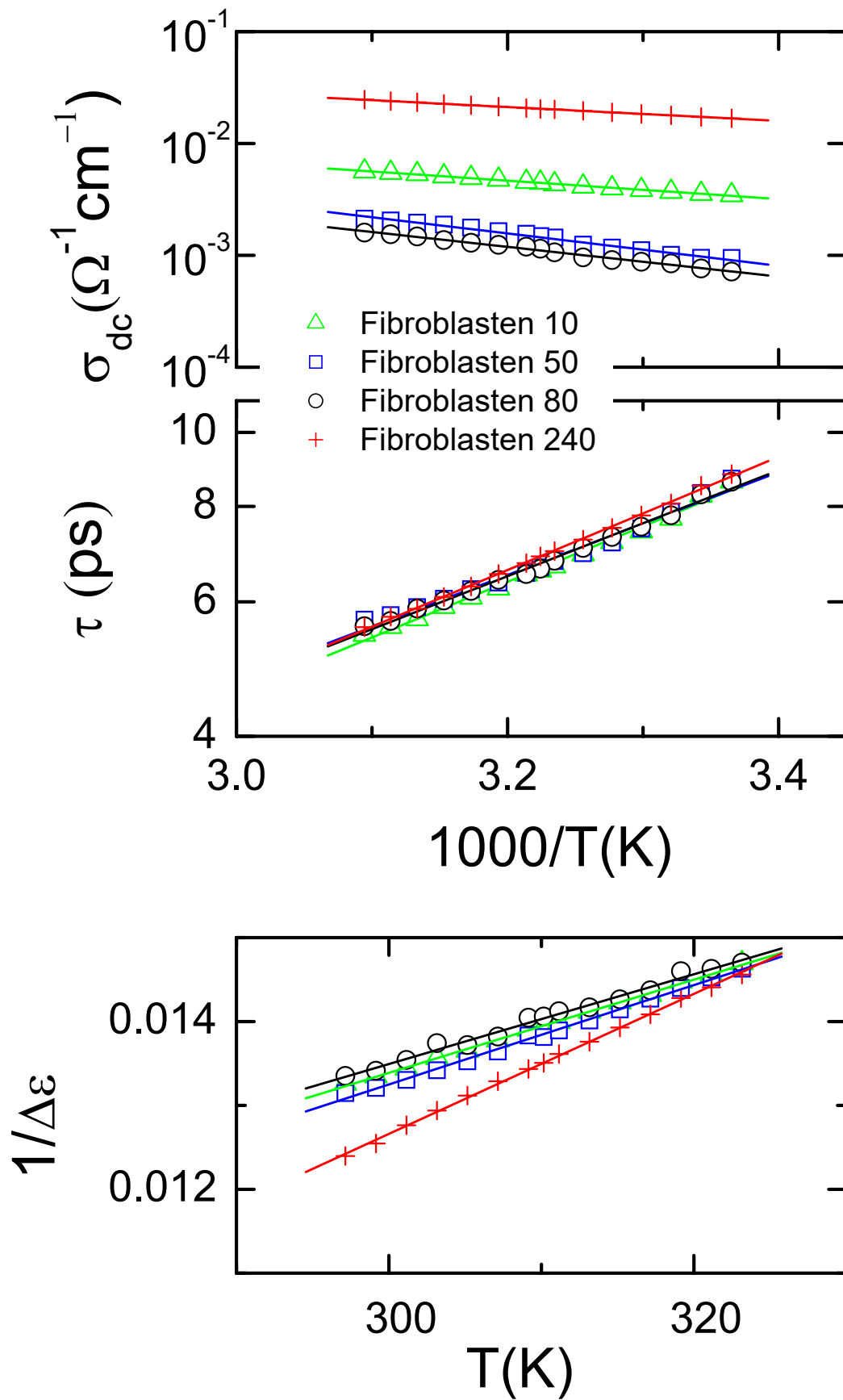


Abb. 2.54: Fitparameter Fibroblasten

2.6.3 Dielektrische Messungen an Keratinozyten und Melanomzellen (A7)

Im folgenden Abschnitt werden die dielektrischen Eigenschaften zweier Typen menschlicher Hautzellen dargestellt, Melanomzellen (Typ A7) und Keratinozyten. Die Haut ist flächenmäßig das größte (je nach Körperumfang und Körpergröße 1,5 bis 2 m²) und mit einem Gewicht von 3 bis zu 10 kg das schwerste Organ des Menschen. Anhand ihres Aufbaus kann man sie in 3 Schichten unterteilen, die Subcutis, die Dermis und die Epidermis.

Die Epidermis ist die äußerste Schicht der Haut und lässt sich wiederum in verschiedene Schichten einteilen (Abbildung 2.55). Über 90 % der Zellen sind Keratinozyten, die in der Epidermis in unterschiedlichen Differenzierungsstadien vorliegen. Alle Keratinozyten gehen aus einem Stammzellsystem in der Basalzellschicht (*Stratum basale*) hervor, das an der Grenze zwischen Epidermis und Dermis lokalisiert ist. Keratinozyten, die in die Differenzierungsphase eintreten und das *Stratum basale* verlassen, durchwandern in apikaler Richtung die Epidermis, wobei sie von nachkommenden Zellen nach oben geschoben werden. Dabei durchlaufen sie mehrere Differenzierungsstadien und verändern Form und geometrische Ausrichtung, bis sie im *Stratum corneum* eine Schicht aus abgeflachten, toten „Hornzellen“ (Korneozyten) bilden.

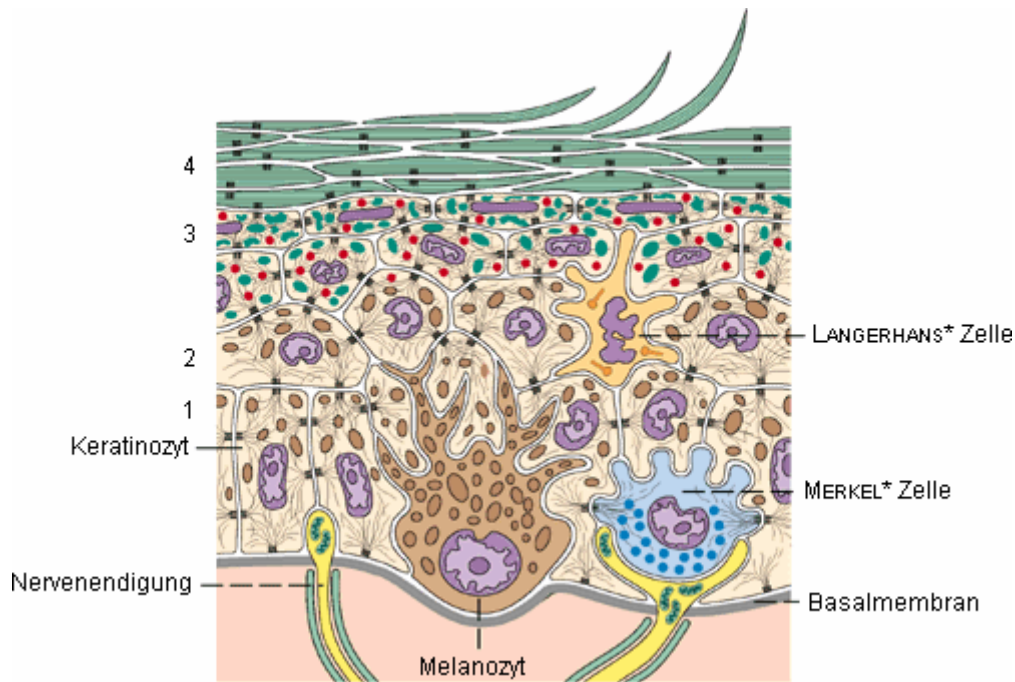


Abb. 2.55: Schematische Darstellung der Epidermis: 1. *Stratum basale*, 2. *Stratum spinosum*, 3. *Stratum granulosum*, 4. *Stratum corneum* (Roche 1999)

Melanomzellen sind mutierte Melanozyten, die wiederum für die Pigmentierung der Haut verantwortlich sind. Melanozyten liegen ebenfalls in der Basalzellschicht der Epidermis vor, wo sie in einem lebenslangen festen Verhältnis von ca. 1:5 mit den basalen Keratinozyten vorkommen. Das Wachstum der Melanozyten und das Zahlenverhältnis wird von den Keratinozyten kontrolliert. Die Melanozyten synthetisieren Melanin und geben dieses in Form von sogenannten Melanosomen an die umgebenden Keratinozyten ab. Melanin stellt einen wichtigen Schutz der Haut gegenüber UV-Strahlung dar. Wechselwirkungen der parakrinen Wachstumsfaktoren

(kurzreichweitige Zell-Zell-Kommunikation) und Zell-Zell-Adhäsionsmoleküle sind die bestimmenden Faktoren für die Entwicklung der Melanozyten. Wenn diese Steuerfaktoren gestört werden, können die Melanozyten anfangen, unkontrolliert zu wuchern und einen Tumor, das sogenannte Melanom bilden. Bestrahlung mit UV-Licht innerhalb des B-Spektrums (290 – 320 nm), die in DNA-Brüchen resultiert, ist ein möglicher Grund für die Umwandlung der Melanozyten und die Bildung eines Tumors. UV-Licht erhöht DNA-Instabilität, hemmt Antioxidantien und unterdrückt das Immunsystem.

Eine detaillierte Beschreibung der eingesetzten Hautzelllinien findet sich in Abschnitt II. 7. Bei den menschlichen Hautzellen wurde eine Konzentration von Keratinozyten und insgesamt drei Konzentrationen von Melanomzellen in unterschiedlichen Pufferlösungen mit dielektrischer Spektroskopie untersucht.

Abbildung 2.56 zeigt die Messungen an den Keratinozyten im PBS⁺⁺-Puffer mit einer Konzentration von etwa 100 Millionen Zellen pro ml Pufferlösung. In den Abbildungen 2.57 bis 2.59 sind die Messergebnisse an den Melanomzellen in den unterschiedlichen Pufferlösungen dargestellt. Die Bilder dokumentieren Messungen an Melanomzellen im Mannitol-Puffer mit einer Konzentrationen von etwa 175 Millionen Zellen pro ml Pufferlösung (Abbildung 2.57), im PBS⁺⁺-Puffer mit einer Konzentrationen von etwa 200 Millionen Zellen pro ml Pufferlösung (Abbildung 2.58) und in FCS freiem MEM Medium mit einer Konzentrationen von etwa 225 Millionen Zellen pro ml (Abbildung 2.59). In Abbildung 2.60 schließlich ist ein Vergleich der dielektrischen Eigenschaften aller gemessenen Hautzellen bei 37 °C dargestellt.

In jeder Abbildung ist für den Frequenzbereich von 100 MHz bis 40 GHz und Temperaturen zwischen 24 °C und 50 °C der Realteil der dielektrischen Konstante (ϵ' : oberer Bildrahmen), der Imaginärteil der dielektrischen Konstante (ϵ'' : mittlerer Bildrahmen) und der Realteil der Leitfähigkeit (σ' : unterer Bildrahmen) dargestellt. ϵ' ist halblogarithmisch gegen die Frequenz aufgetragen, ϵ'' und σ' werden doppeltlogarithmisch gezeigt.

Keratinozyten und Melanomzellen im PBS-Puffer zeigen in der dielektrischen Antwort auf elektromagnetische Felder sehr ähnliches Verhalten. Im dielektrischen Verlust findet man eine wasser-ähnliche Relaxation bei 20 GHz und für Frequenzen unterhalb von 1 GHz dominierende DC-Leitfähigkeit. Der Verlust, der wesentlich durch die Relaxation der Wassermoleküle im Verbund mit den Zellen erklärt werden kann, ist im Vergleich zu reinem Wasser signifikant unterdrückt; ein experimenteller Befund, den man auch von den Elektrolytlösungen her kennt. Mit steigender Temperatur werden die Leitfähigkeitsprozesse stärker, das Verlustmaximum schiebt zu höheren Frequenzen. Es gibt keine eindeutigen Hinweise auf zusätzliche Relaxationsprozesse oder auf resonantes Verhalten. Zumindest erreichten wir bei den Hautzellsuspensionen keine überzeugende alternative Beschreibung, wie sie uns im Falle der unterschiedlichen Blutzellsuspensionen gelang.

Die Ergebnisse der dielektrischen Spektroskopie an den Hautzellen in unterschiedlichen Pufferlösungen, wie sie in den Abbildungen 2.56 bis 2.60 dargestellt sind, wurden mit unserer Standardanalyse, nämlich mit DC-Leitfähigkeit und einer wasserähnliche Relaxation, die durch eine Cole-Davidson Verteilung beschrieben wird, gefittet. Bei tieferen Temperaturen (< 40° C) beschreibt diese Analyse die gemessenen Spektren innerhalb der Fehlergrenzen. Signifikante

Abweichungen findet man wieder bei höheren Temperaturen: So können z. B. die Daten bei 50° C in allen Pufferlösungen nicht exakt beschrieben werden. Offensichtlich ändert sich die Verteilung der Relaxationszeiten, so dass die Relaxation bei 20 GHz nicht exakt wiedergegeben wird. Im Verlustspektrum liegen die Modellkurven deutlich oberhalb der experimentell ermittelten Werte, im Realteil unterschätzt das Modell die gemessenen dielektrischen Konstanten.

Probe	σ_0	E_σ
Keratinozyten 100 PBS++	4.1 S/cm	0.140 eV
Melanomzellen 175 Mannitol	1.7 S/cm	0.136 eV
Melanomzellen 200 PBS++	5.3 S/cm	0.146 eV
Melanomzellen 225 MEM Medium	7.7 S/cm	0.156 eV

Tab. 2.9: Vorfaktor σ_0 und Energiebarriere E_σ der DC-Leitfähigkeit für die Hautzell-suspensionen

Die wesentlichen Parameter die sich aus dieser Analyse ergeben, nämlich die Temperaturabhängigkeit der DC-Leitfähigkeit und der mittleren Relaxationsrate sowie die Temperaturabhängigkeit der dielektrischen Stärke sind in Abbildung 2.61 gezeigt. Im oberen Teil der Abbildung werden die DC-Leitfähigkeit und die mittlere Relaxationsrate in einer Arrhenius-Darstellung gezeigt. Beide Größen können durch rein thermisch aktivierte Prozesse beschrieben werden. Die Parameter zur Beschreibung der Temperaturabhängigkeit der Leitfähigkeit sind in Tabelle 2.9 und zur Beschreibung der T-Abhängigkeit der mittleren Relaxationsraten in Tabelle 2.10 angegeben. Die Energiebarriere E_σ , die die Leitfähigkeit bestimmt, liegt für Melanomzellen in MEM Medium bei 156 meV, für alle anderen Zellsuspensionen zwischen 136 meV und 146 meV. Der Vorfaktor der Leitfähigkeit liegt zwischen 1.7 und 7.7 S/cm.

Probe	τ_0	E_τ
Keratinozyten 100 PBS++	32.9 fs	0.143 eV
Melanomzellen 175 Mannitol	23.3 fs	0.154 eV
Melanomzellen 200 PBS++	32.9 fs	0.143 eV
Melanomzellen 225 MEM Medium	57.5 fs	0.128 eV

Tab. 2.10: Vorfaktor τ_0 und Energiebarriere E_τ der mittleren Relaxationszeiten der wasserähnlichen Relaxation für die Hautzellsuspensionen

Die Parameter, die die mittleren Relaxationszeiten beeinflussen, E_τ und τ_0 liegen zwischen 128 meV und 154 meV. Sie sind identisch für Keratinozyten und Melanomzellen in PBS++. Die Werte der Melanomzellen in Mannitol-Puffer und in MEM Medium sind deutlich unterschiedlich.

Eine sehr interessante Feststellung betrifft die Energiebarrieren, die Leitfähigkeit und mittlere Relaxationszeit betreffen: Die Hautzellen in unterschiedlichen Pufferlösungen zeigen für Relaxationsphänomene und Diffusionsphänomene der Leitfähigkeit sehr ähnliche Energiebarrieren (~ 0.14 eV). Das heißt, dass die Leitfähigkeit durch dieselben Barrieren gehindert wird, die auch die dipolare Relaxation bestimmen. Für die Energiebarrieren der Melanomzellen im MEM Medium gilt diese Aussage nicht: Hier liegt die Energiebarriere der Diffusion bei 156 meV, deutlich über der

Energiebarriere, die die Dipolrelaxation bestimmt (128 meV). Offensichtlich laufen in dieser Pufferlösung diese Prozesse über sehr verschiedene Kanäle.

Für die Hautzellsuspensionen liegt T_C in der Größenordnung von 160 K, die Curie-Konstante bei $11.6 \cdot 10^3$ K. Die Ausnahme bilden wieder die Melanomzellen in MEM Medium mit deutlich verringerter Wechselwirkungsenergie T_C und deutlich erhöhter Curie-Konstante.

Probe	T_C	C
Keratinozyten 100 PBS++	155.9 K	$11.6 \cdot 10^3$ K
Melanomzellen 175 Mannitol	164.8 K	$11.5 \cdot 10^3$ K
Melanomzellen 200 PBS++	155.7 K	$11.7 \cdot 10^3$ K
Melanomzellen 225 MEM Medium	127.5 K	$13.7 \cdot 10^3$ K

Tab. 2.11: Curie-Weiss-Temperatur T_C und Curie-Konstante C für die Hautzellsuspensionen

Schließlich zeigen wir in den Abbildungen 2.62 und 2.63 die Ergebnisse der dielektrischen Spektroskopie für alle Zellen in Suspensionen im direkten Vergleich. Dabei präsentieren wir in Abbildung 2.62 alle Ergebnisse im gesamten Frequenzbereich von 100 MHz bis zu 40 GHz. Die Abbildung 2.63 zeigt die gleichen Ergebnisse, allerdings in dem eingeschränkten Frequenzbereich von 400 MHz bis 10 GHz, also in dem Bereich, der für den Mobilfunk von besonderer Bedeutung ist. Die Abbildungen zeigen, dass die dielektrischen Größen im Bereich der wasserähnlichen Relaxation sehr ähnlich sind. Signifikante Unterschiede ergeben sich im Bereich der DC-Leitfähigkeit. Je nach Lösungsmittel oder Pufferlösung können sich hier Unterschiede im dielektrischen Verlust oder in der Leitfähigkeit ergeben, die bei 1 GHz durchaus eine Faktor 10 ausmachen können. Diese Unterschiede rühren aber eher vom Lösungsmittel oder von der Pufferlösung her und werden kaum durch den untersuchten Zelltypus beeinflusst.

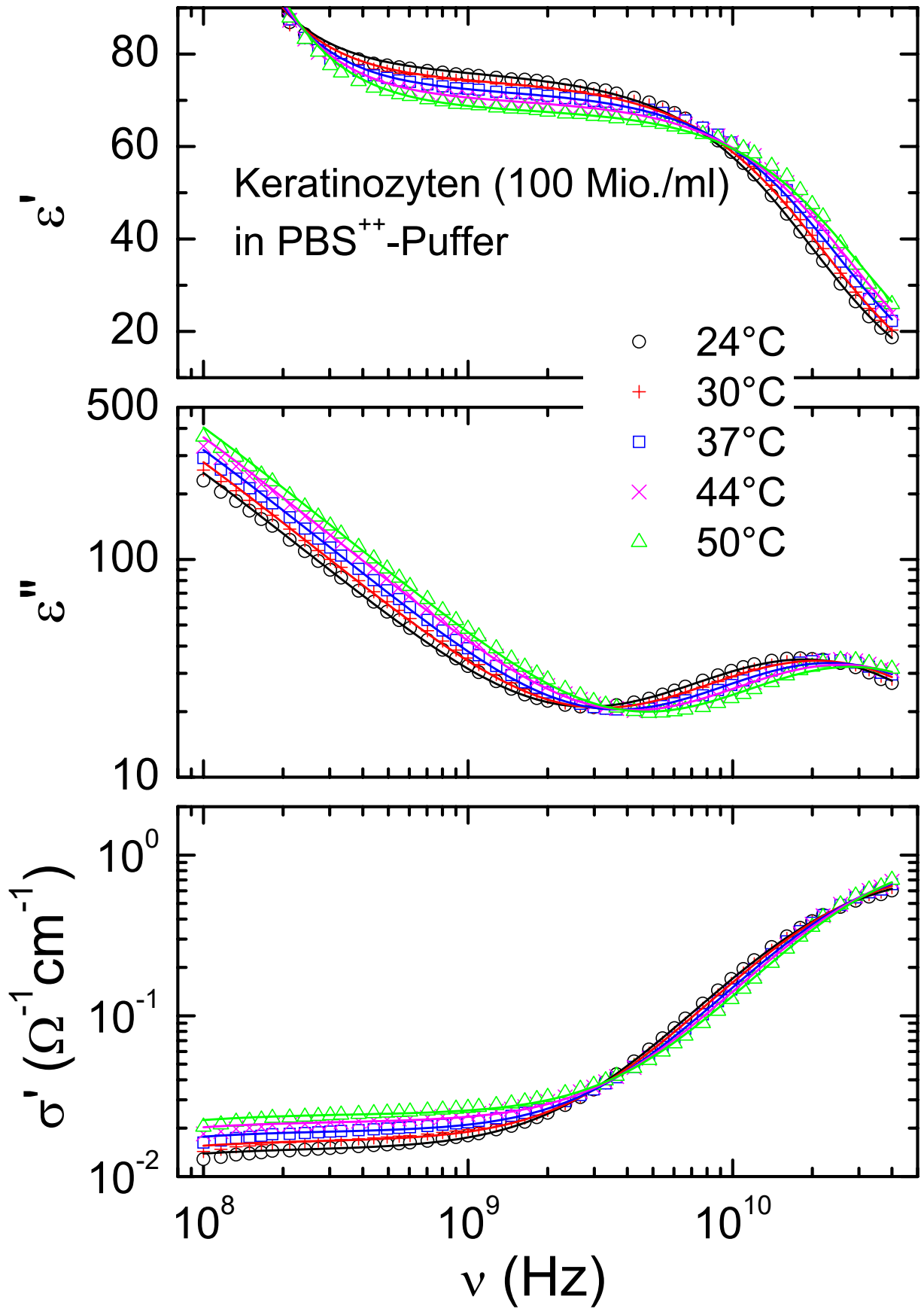


Abb. 2.56: Dielektrische Eigenschaften von Keratinozyten (ca. 100 Mio./ml) in PBS⁺⁺-Puffer

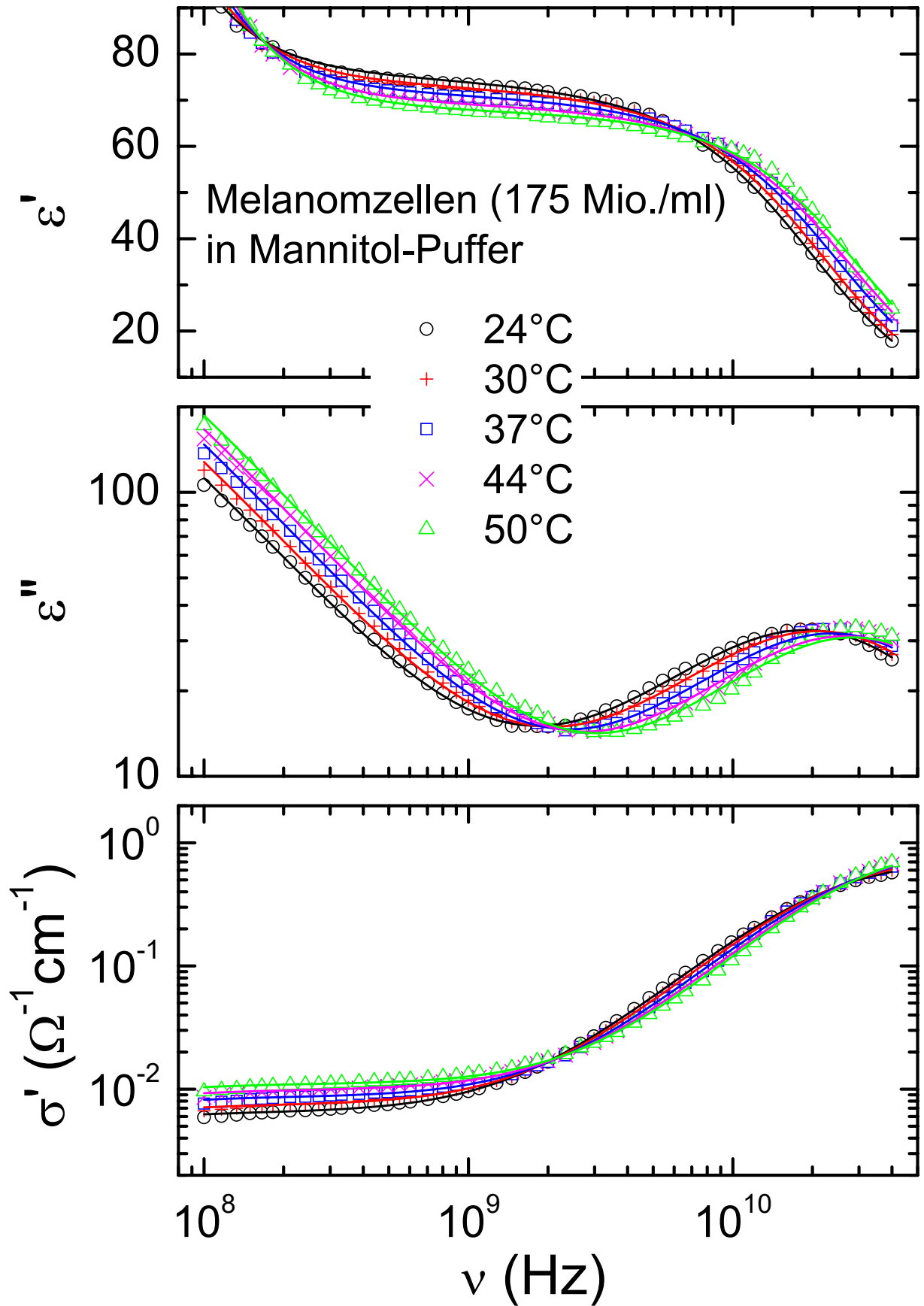


Abb. 2.57: Dielektrische Eigenschaften von Melanomzellen (ca. 175 Mio./ml) in Mannitol-Puffer

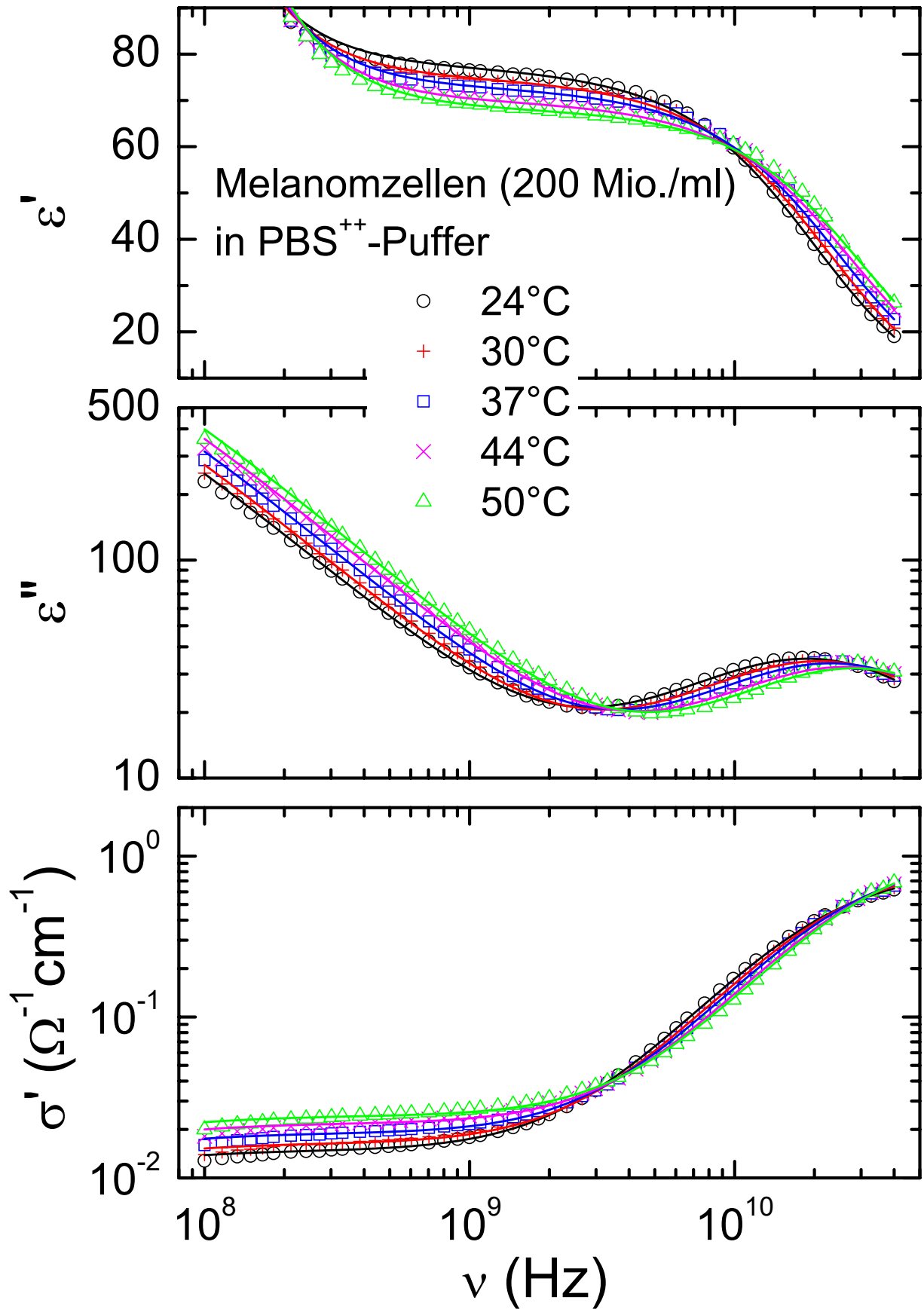


Abb. 2.58: Dielektrische Eigenschaften von Melanomzellen (ca. 200 Mio./ml) in PBS⁺⁺-Puffer

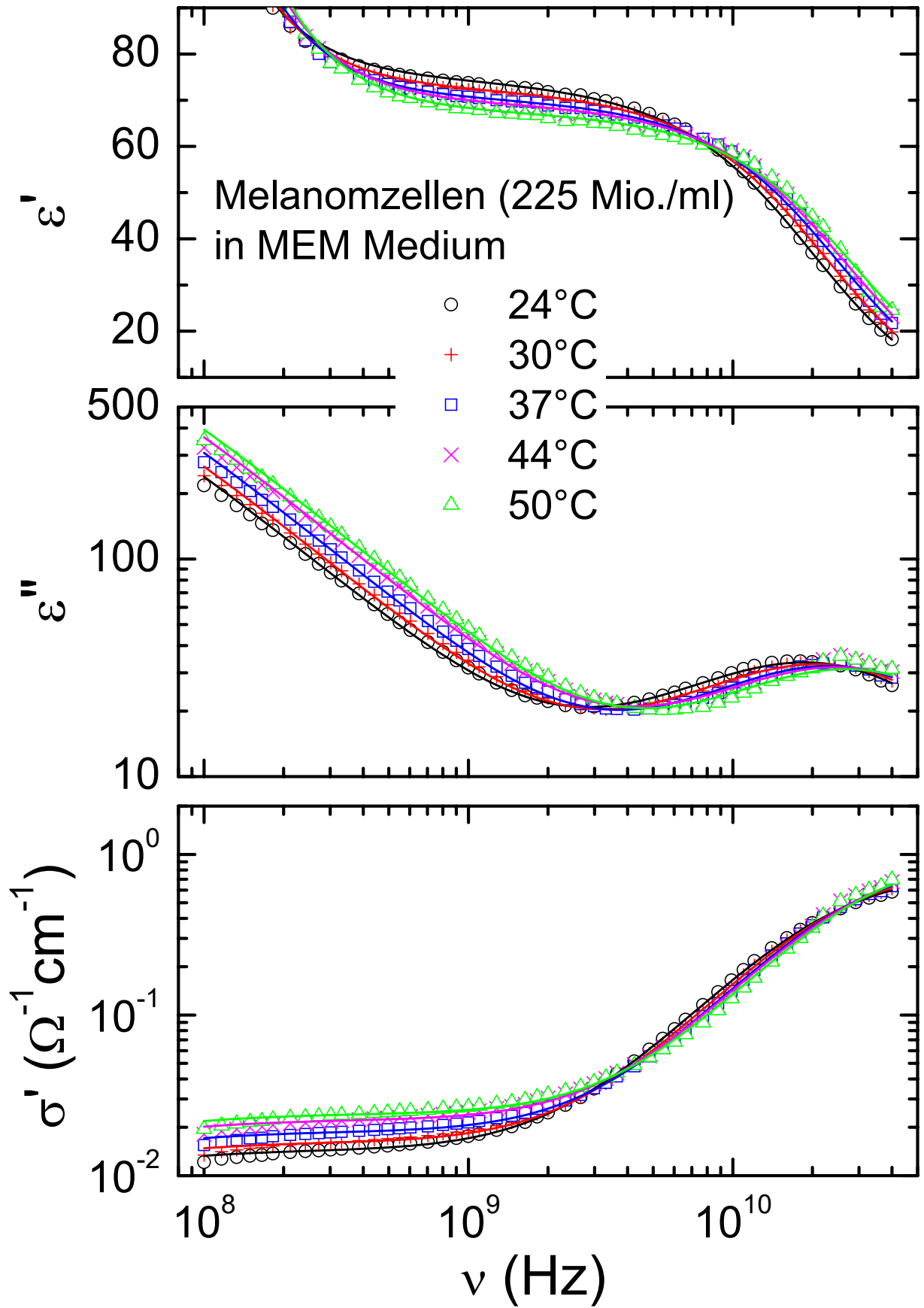


Abb. 2.59: Dielektrische Eigenschaften von Melanomzellen (ca. 225 Mio./ml) in MEM Medium

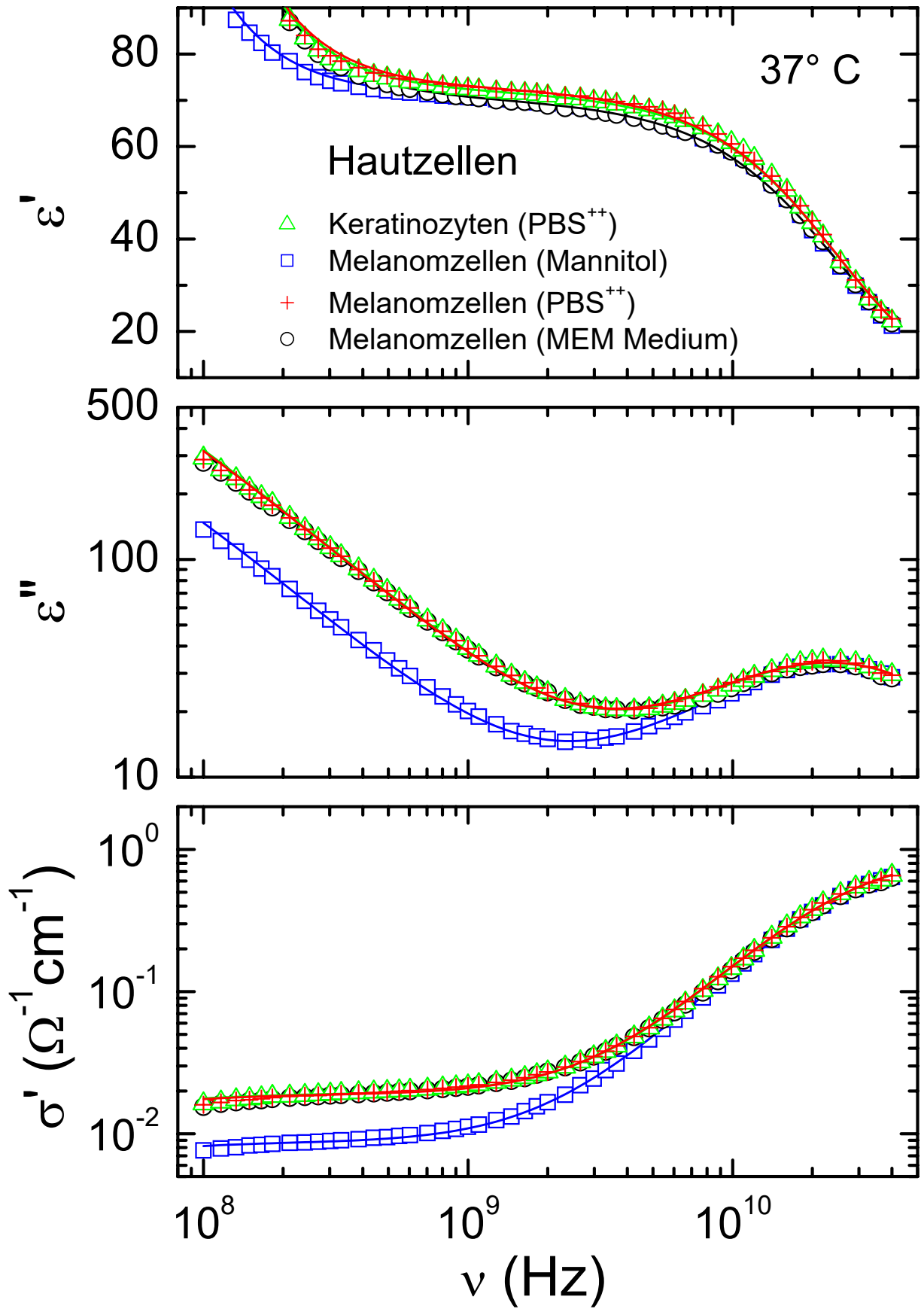


Abb. 2.60: Dielektrische Eigenschaften von Hautzellen bei 37° C

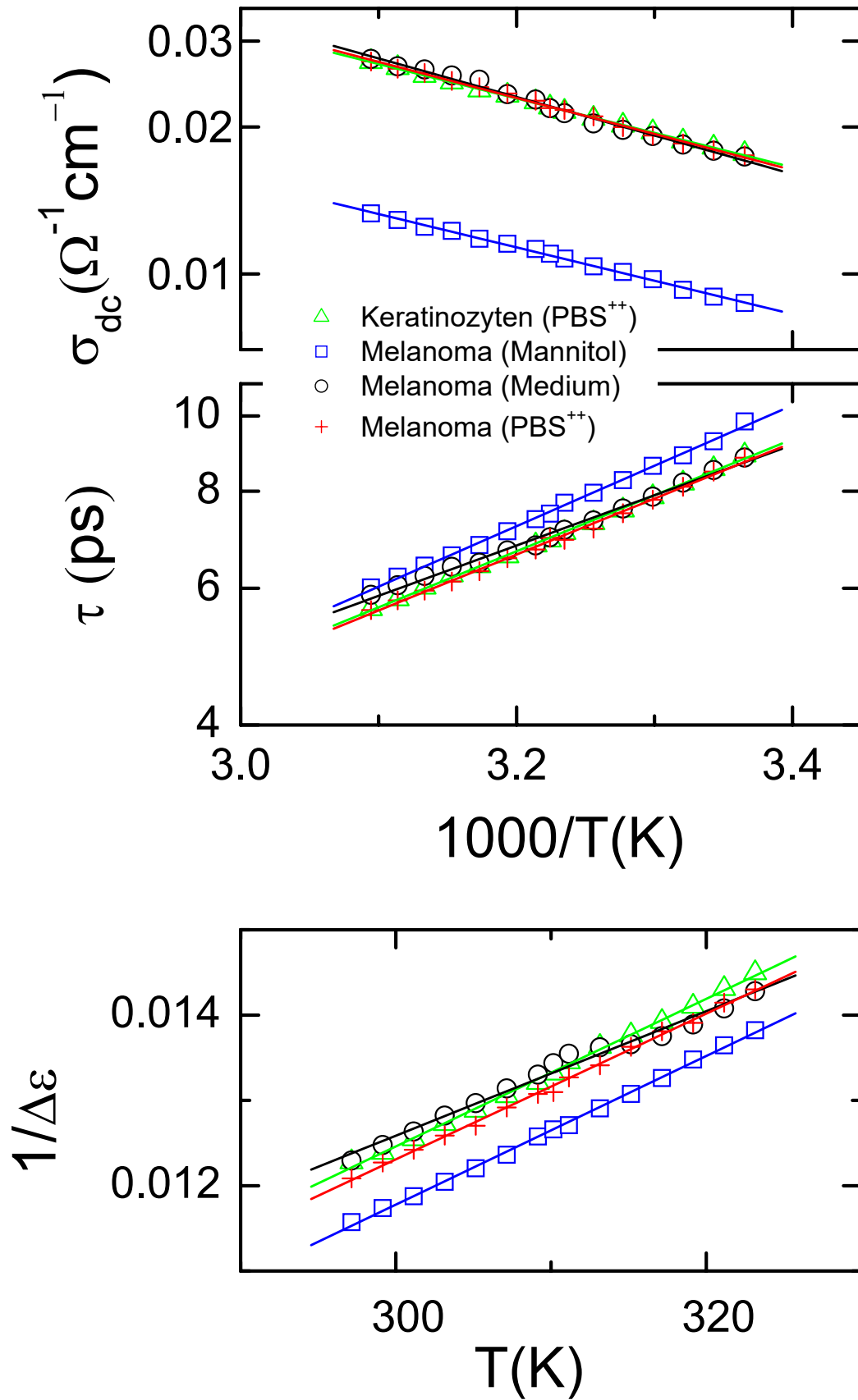


Abb. 2.61: Fitparameter Hautzellen

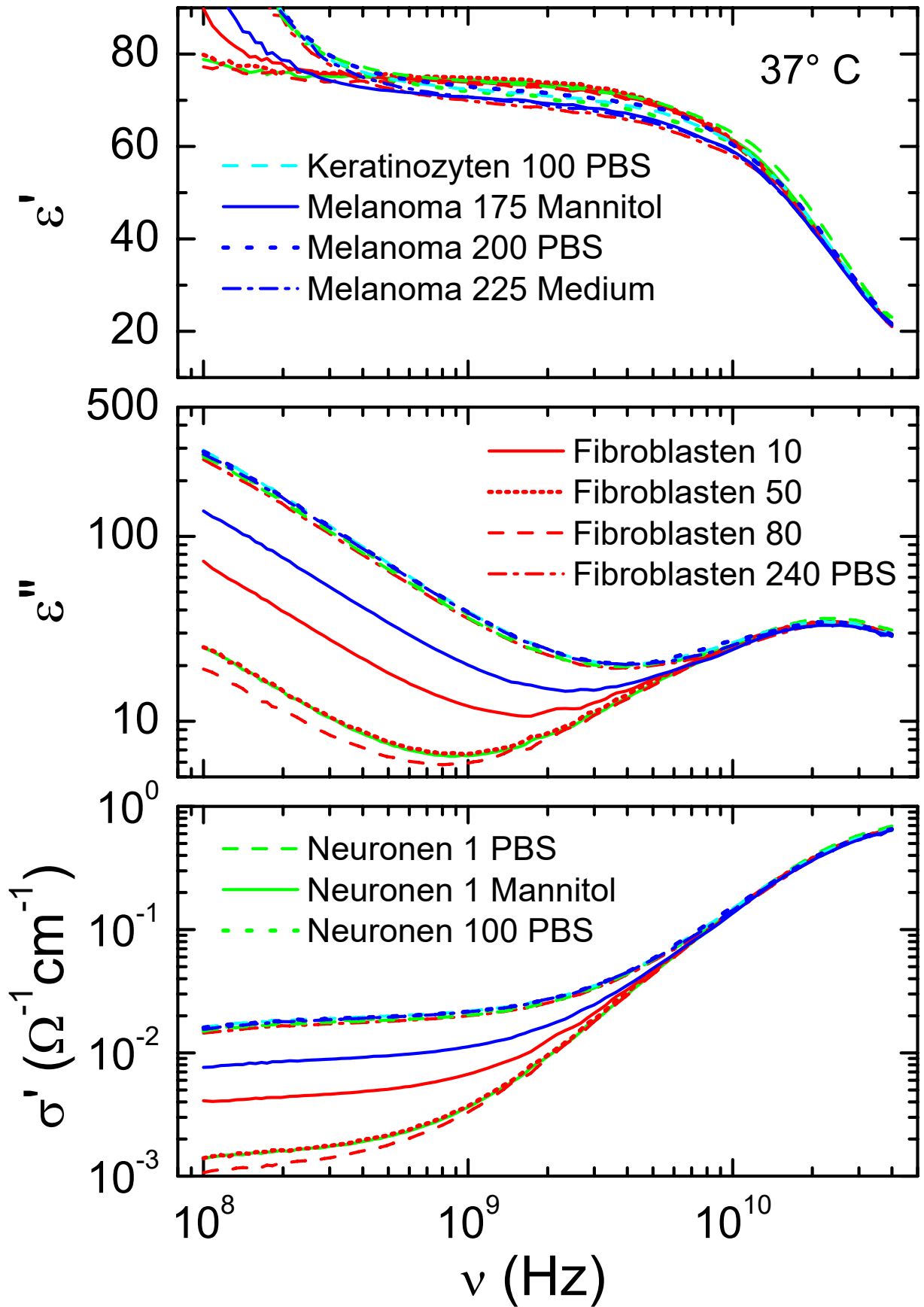


Abb. 2.62: Dielektrische Eigenschaften der untersuchten Zellen bei 37° C im Vergleich

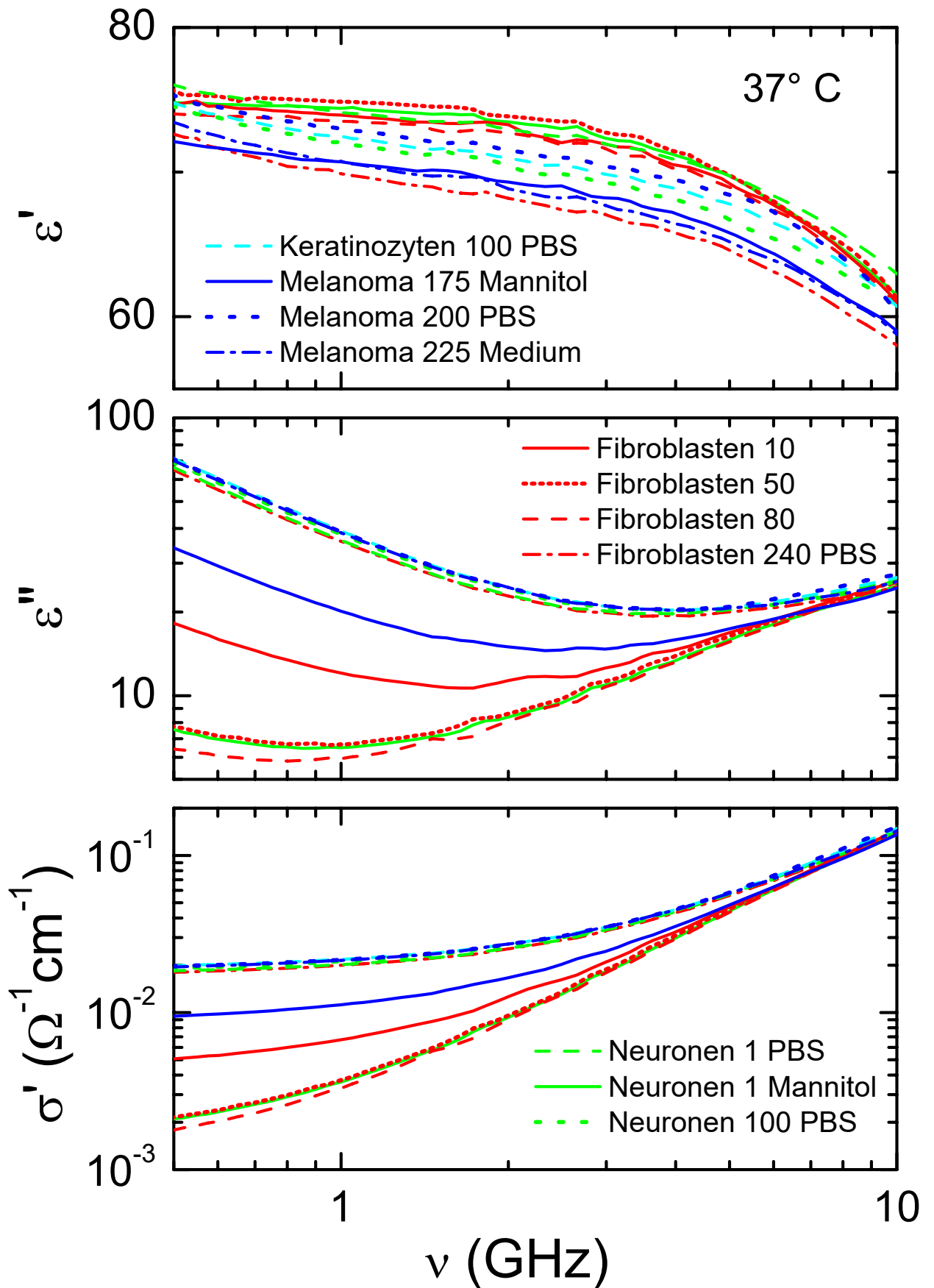


Abb. 2.63: Dielektrische Eigenschaften der untersuchten Zellen bei 37° C im Vergleich

3 Elektrische Feldverteilung, makroskopische und lokale Felder und nicht-lineare Effekte

3.1 Lokale Felder

Bei der Herleitung makroskopischer dielektrischer Eigenschaften beruft man sich auf die makroskopischen Maxwell-Gleichungen. Trotzdem ist es wichtig, auch das mikroskopische Feld in seiner Wirkung auf jede Subzelle eines Systems zu betrachten. Auf atomarer Längenskala ist die Ladungsdichte eines jeden Isolators eine rasch veränderliche Funktion des Ortes und auf derselben Längenskala ändern sich auch das elektrische Feld und das elektrostatische Potential. Es ist deshalb notwendig, sich immer dieses Unterschieds zwischen mikroskopischen und makroskopischen Größen bewusst zu sein. Hier einige grundsätzliche Vorbemerkungen, die die Problematik beleuchten sollen.

Das elektrische Feld E ist definiert als Kraft, die auf eine Ladung wirkt, $E = F/q$, und ist in unseren Betrachtungen die wesentliche Größe. Das elektrische Feld kann durch Flusslinien bestimmter Dichte symbolisiert werden. In einem Dielektrikum mit endlicher relativer (dimensionsloser) dielektrischer Konstante ε definiert man die dielektrische Verschiebung D

$$D = \varepsilon_0 \varepsilon E = \varepsilon_0 E + P \quad (3.1)$$

wobei P die dielektrische Polarisierung definiert und ε_0 die Dielektrizitätskonstante des Vakuums angibt. Um makroskopische Elektrostatik anwenden zu können, muss die Polarisationsdichte P auf das makroskopische elektrische Feld zurückgeführt werden. Es ist wichtig zu sehen, dass P und D nur Hilfsgrößen sind. Im Vakuum ist $P = 0$, und $D = \varepsilon_0 E$. In homogenen Materialien mit $\varepsilon > 1$ laufen die Linien der dielektrischen Verschiebung ungehindert durch das Material, die elektrischen Feldlinien E sind um das Verhältnis $E = E_a/\varepsilon$ reduziert, wenn E_a das von außen angelegte Feld ist. Im Material werden die elektrischen Feldlinien formal durch die makroskopische Polarisierung ergänzt (siehe Gleichung 3.1). Dies zeigt, dass die dielektrische Verschiebung nur von den freien Ladungen abhängt, P hängt von den induzierten Ladungen ab und E hängt von allen anwesenden Ladungen ab.

Für eine mikroskopische Analyse benötigt man nun die Kenntnis aller anwesenden Ladungen

$$E = \frac{1}{V} \int E(r) d^3r \quad (3.2)$$

Wobei das Integral über einen definierten mikroskopischen Bereich geht. Dies zeigt warum es so schwierig ist das lokale mikroskopische Feld zu berechnen. Da Atome, die Quellen dielektrischer Polarisierung, mikroskopische Ausdehnung haben, werden ihre Auslenkungen vom jeweiligen am Ort herrschenden mikroskopischen Feld bestimmt. Man bezeichnet dieses Feld als das lokale oder effektive Feld E_{lok} . In der Physik dielektrischer Festkörper wurde dieses Problem über fast ein Jahrhundert behandelt. Resümierend kann man zeigen, dass das lokale elektrische Feld E_{lok} gegeben ist durch:

$$E_{lok} = E_a + E_1 + E_2 + E_3 \quad (3.3)$$

Hier ist E_a das von außen angelegte elektrische Feld, E_1 ist das Entelektrisierungs- oder Depolarisationsfeld

$$E_1 = -\gamma \frac{P}{\varepsilon} = -E_a \frac{\varepsilon - \varepsilon_a}{\varepsilon_a} \quad (3.4)$$

Wobei γ der Entelektrisierungsfaktor und ε_a die Dielektrizitätskonstante des Außenraumes ist. E_2 ergibt sich aus einer Integration über die Felder aller Ladungen der Fernordnung. E_2 wurde frühzeitig von Lorentz berechnet und er fand unter der Annahme eines isotropen Mediums

$$E_2 = \frac{P}{3\varepsilon_a} \quad (3.5)$$

Schließlich repräsentiert E_3 die Summe aller Felder von Ladungen in der direkten Umgebung des Aufpunktes (Nahordnung).

Für elektrische Felder innerhalb eines Hohlraumes in einem homogenen polaren Dielektrikum findet man unter vereinfachenden Symmetrieannahmen

$$E_{lok} = \frac{3E_a}{2\varepsilon + 1} \quad (3.6)$$

wobei E_a wieder das uniforme homogene äußere Feld ist.

Wir finden also als wesentliches Ergebnis dieser Abschätzungen, dass im Dielektrikum mit der Dielektrizitätskonstante ε die Feldlinien natürlich von allen Ladungen des Dielektrikums stammen und daher durch Einwirkung der Polarisierungseffekte der Dipole des Dielektrikums um E_a/ε reduziert erscheinen. Dieses reduzierte Feld bestimmt auch vollständig die Energiedichte. In einer wässrigen Zellsuspension im GHz-Frequenzbereich wird also das äußere Feld durch die Polarisationswirkung der Wassermoleküle um ungefähr $E_a/80$ reduziert und nur dieses reduzierte Feld wirkt auf die Zellen in der Suspension.

Diese Herleitungen basieren aber auf makroskopischen Gesetzen der Elektrostatik. Es ist unklar inwieweit diese Gesetzmäßigkeiten in mikroskopische Dimensionen skalierbar sind. Gleichung 3.6 liefert zwei wesentliche Ergebnisse, die bislang nicht wirklich überprüft wurden:

- i) das Hohlraumfeld ist unabhängig von der Größe des Hohlraums, also prinzipiell auch auf Zelldimensionen anwendbar und
- ii) das Dielektrikum ist unendlich polarisierbar, d. h. das innere Feld der Dipole kann im Idealfall einer sehr großen dielektrischen Konstante das Hohlraumfeld vollständig abschirmen. In einer aktuellen Arbeit von Martin und Matyushov (2007) wird genau diesen Fragen nachgegangen.

Die Autoren bemühen sich mit modernen Monte Carlo Methoden die Aussagen von Gleichung 3.6 für mikroskopische Skalen zu überprüfen. Die Autoren finden, dass das Hohlraumfeld bis in den Nanometer-Bereich definiert werden kann, also für Zellen sicherlich noch angewendet werden darf. Sie finden aber, dass bei mikroskopischer Betrachtung Gleichung 3.6 durch

$$\frac{E_{lok}}{E_a} = \frac{7(\varepsilon + 1)^2 + 8\varepsilon}{12\varepsilon(2\varepsilon + 1)} \quad (3.7)$$

ersetzt werden muss.

Diese Gleichung zeigt, dass für sehr große ε ($\varepsilon \gg 1$) das externe Feld nur mit einem Faktor $7/24 \sim 0.3$ abgeschwächt wird. Aufgrund dieser neuen theoretischen Arbeiten können wir abschätzen, dass das äußere Feld in Zellsuspensionen ($\varepsilon > 60$) um ca. $2/3$ abgeschwächt wird. Nur dieses Feld, nämlich $E_a/3$ wirkt auf die Zellen. Im GHz-Bereich stimmt dies umso mehr, als Ladungsumlagerungen in diesem Frequenzbereich keine Rolle mehr spielen, wie unsere Experimente eindrucksvoll dokumentieren.

Leider ist in biologischen Systemen die Berechnung oder Abschätzung der lokalen Felder noch schwieriger. Über die Behandlung dielektrischer Phänomene in inhomogenen Systemen haben wir ausführlich in unserer Bestandsaufnahme berichtet. In heterogenen Stoffen gibt es in fast allen Fälle Ladungsanhäufung an Grenzflächen mit zugehöriger starker Grenzflächenpolarisation. Dies führt zu sehr komplexen Feldverteilungen. Auch diese Maxwell-Wagner-artigen Phänomene wurden in der Bestandsaufnahme ausführlich beschrieben. Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass die unterschiedlichen Medien stark frequenzabhängige dielektrische Eigenschaften zeigen, was die Berechnung fast unlösbar scheinen lässt. In der Literatur gibt es große Anstrengungen die Feldverteilung und Energieabsorption in Zellen zu berechnen. Einen guten Überblick über den gegenwärtigen Stand dieser Bemühungen findet man bei Simeonova und Gimsa (2006).

Auf der Basis unserer Messungen kann man sagen, dass alle Maxwell-Wagner-Relaxationen, die durch Ladungsanhäufung an Grenzflächen entstehen, wesentlich zum dielektrischen Verlust bei sehr niederen Frequenzen (kHz Frequenzbereich) beitragen. Bei hohen Frequenzen im GHz-Bereich spielen derartige inhomogene Ladungsverteilungen keine Rolle. Die Absorptionsprozesse im Mobilfunkfrequenzbereich werden daher von Feldinhomogenitäten nicht beeinflusst. Im Abschnitt III dieses Berichts im Rahmen der theoretischen Modellierung wurde das Membranpotential als Funktion der Frequenz modelliert. Man findet ein induziertes Membranpotential in der Größenordnung einiger mV im Falle eines äußeren Wechselfeldes von einigen 100 V/cm. Im Falle eines Wechselfeldes findet man im unteren GHz-Bereich ein maximal induziertes Membranpotential. Tatsächlich hebt sich dieses Potential jedoch kaum ab und ist nur um einige ppm größer als der konstante Untergrund des Membranpotentials. Nach den theoretischen Berechnungen liegen diese Feldstärkenerhöhungen unterhalb der Spannungsfuktuationen, die durch thermische Effekte erwartet werden.

3.2 Makroskopische Feldverteilung bei den Messungen an biologischen Suspensionen

Unsere dielektrischen Messungen erfolgten unter Verwendung der Open Ended Coaxial Methode, wie sie ausführlich zu Beginn des Kapitels 2 dieses Berichtes beschrieben wurde. Der Messkopf, der einer offenen Koaxialleitung entspricht, wird direkt in die Flüssigkeit eingetaucht und die Reflexion der elektromagnetischen Welle mit einem Netzwerkanalysator vermessen. Der Netzwerkanalysator kann mit Leistungen zwischen -27 dBm und 20 dBm betrieben werden, wodurch dann direkt am Ausgang der Koaxialleitung in Luft ein maximales elektrisches Feld E_a zwischen 16 V/m und 3.6 kV/m herrscht.

Nun müssen zwei wichtige Punkte beachtet werden. Einerseits finden die Messungen an Zellen natürlich in wässriger Lösung statt. Das heißt aber, dass die Felder innerhalb der Elektrolytlösung bekannt sein müssen.

Noch einmal zur Erinnerung: Die spezifische Absorptionsrate (SAR) ist definiert als

$$SAR = \sigma \frac{E^2}{\rho} \quad (3.8)$$

Wobei σ die Leitfähigkeit und ρ die Massendichte darstellen.

Natürlich werden biologische Effekte durch innere Felder und nicht durch äußere Felder verursacht. Deswegen ist es notwendig in einem ersten Schritt die lokalen inneren Felder zu kennen oder zumindest abzuschätzen. Wir haben in Abschnitt I 3.1 gezeigt, dass die äußeren Felder E_a in Zellsuspensionen, die durch eine große dielektrische Konstante charakterisiert sind, auf $E_a/3$ abgeschwächt werden.

Wir nehmen also an, dass Lösungen und Suspensionen durch einen homogenen Hintergrund mit mittlerer dielektrischer Konstante beschreibbar sind. Unter dieser Annahme werden lokale Ladungsdichteschwankungen und insbesondere Grenzflächeneffekte vernachlässigt. Allerdings entspricht die Situation der Messungen mit wohl definierten externen Feldern, die auf ein inhomogenes Medium treffen, in der Mehrzahl der Fälle auch der realen Strahlenexposition von Menschen in elektromagnetischen Feldern. Auch in diesen Fällen befinden sich empfindliche Zellen, Zellverbände oder Organe eingebettet in Gewebe oder Suspensionen. Erwähnt werden sollte auch, dass Maxwell-Wagner Relaxationen, die von inhomogenen Feldverteilungen oder Grenzflächeneffekten herrühren für Frequenzen größer ca. 100 MHz im Allgemeinen keine Rolle mehr spielen.

Diese Ergebnisse und Annahmen stehen in sehr guter Übereinstimmung mit der theoretischen Modellbildung, wie sie im Teil III dargelegt wird. Dort wird gezeigt, dass die Dynamik des Membranpotentials in den Frequenzbereichen des Mobilfunks vernachlässigt werden kann.

Eine weitere Schwierigkeit besteht nun darin, dass in unserem Messaufbau die Feldverteilung nur direkt am Ende der Messleitung bekannt ist und mit zunehmendem Abstand vom Messkopf die elektrischen Felder abgeschwächt werden.

In einem ersten Schritt bemühen wir uns um eine Abschätzung der lateralen Feldverteilung direkt am offenen Ausgang der Messleitung. Die im Rahmen dieser

Untersuchungen benutzten Messleitungen haben einen aktiven Gesamtdurchmesser von ca. 2 mm, mit einer Innenleitung vom ca. 0.5 mm (siehe Abb. 2.0). Die Feldverteilung mit derartigem Aufbau und bei „open-ended“ Messungen wird in der Literatur ausführlich behandelt (siehe z. B. Anderson *et al.* 1986, Gajda und Stuchly 1983 oder Stuchly und Stuchly 1980). Die laterale Feldverteilung wird besonders von Anderson *et al.* (1986) behandelt. Das Maximum der elektrischen Feld-Intensität herrscht demnach direkt um den Innenleiter. In einem Standard-Experiment bei einer Leistung von -17 dBm wären das ca. 48 V/m. Dieses Feld fällt zum Rand der Leitung hin ab. Die totale Feldverteilung hängt natürlich auch von der Entfernung der Begrenzungswände des Messvolumens ab (Anderson *et al.* 1986). Die effektiven Feldverteilungen können nur durch numerische Simulation für konkrete Messaufbauten berechnet werden. Die relativen Feldverteilungen in unserem Messaufbau wurden durch finite-Elemente-Methoden simuliert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 3.1 bis 3.6 dargestellt. Dabei wurde angenommen, dass das Ende der Koaxialleitung, wie im realen Messaufbau, direkt in die Elektrolytlösung eingebracht wurde. Die Feldverteilungen für Messungen bei 1 GHz (Abbildung 3.1) und bei 2 GHz (Abbildung 3.2) werden gezeigt. Die Feldverteilungen werden für ein kugelförmiges isotropes Volumen mit einem Radius von 5 mm berechnet, wobei der Außenbereich als ideal absorbierend angenommen wurde. Die Abbildungen 3.3 - 3.6 zeigen dieselben Ergebnisse als Konturplot mit Farbkodierung der elektrischen Feldstärke. Die Abbildungen dokumentieren, wie in den oben angeführten Arbeiten berechnet, dass die Feld-Intensität direkt an der Innenleitung maximal ist und zum Rand abfällt. Natürlich nimmt die Intensität auch in z-Richtung ab.

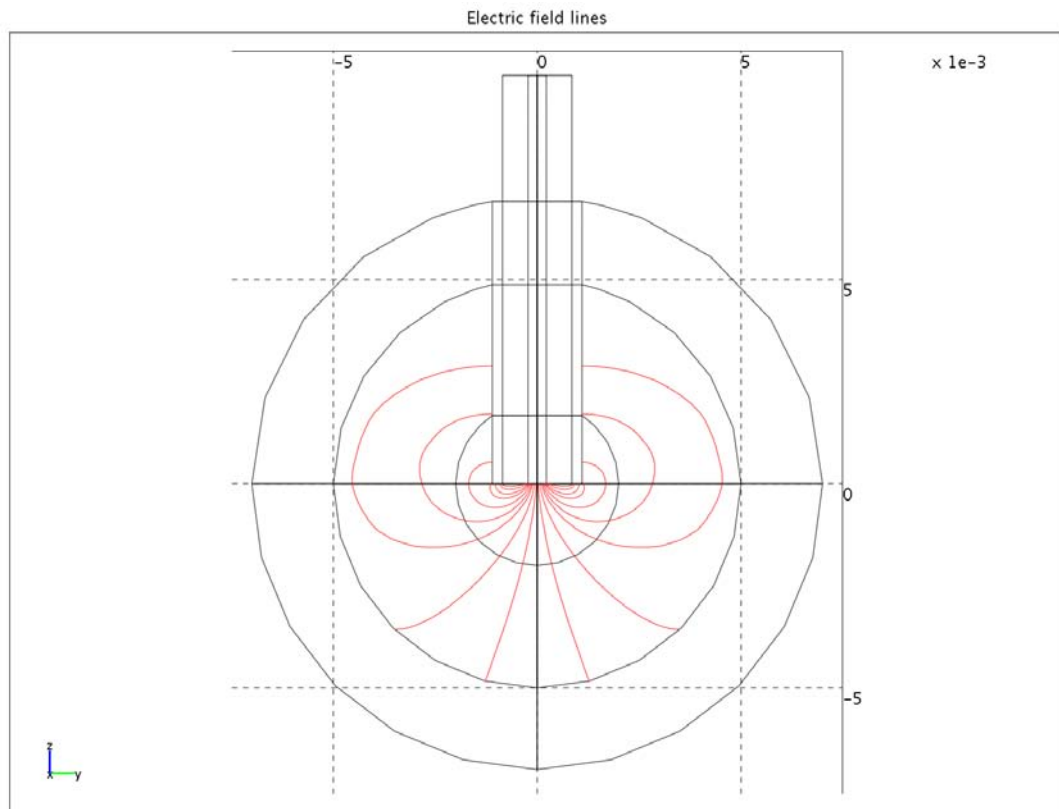


Abb. 3.1: Feldlinien Slim Form Probe 1 GHz

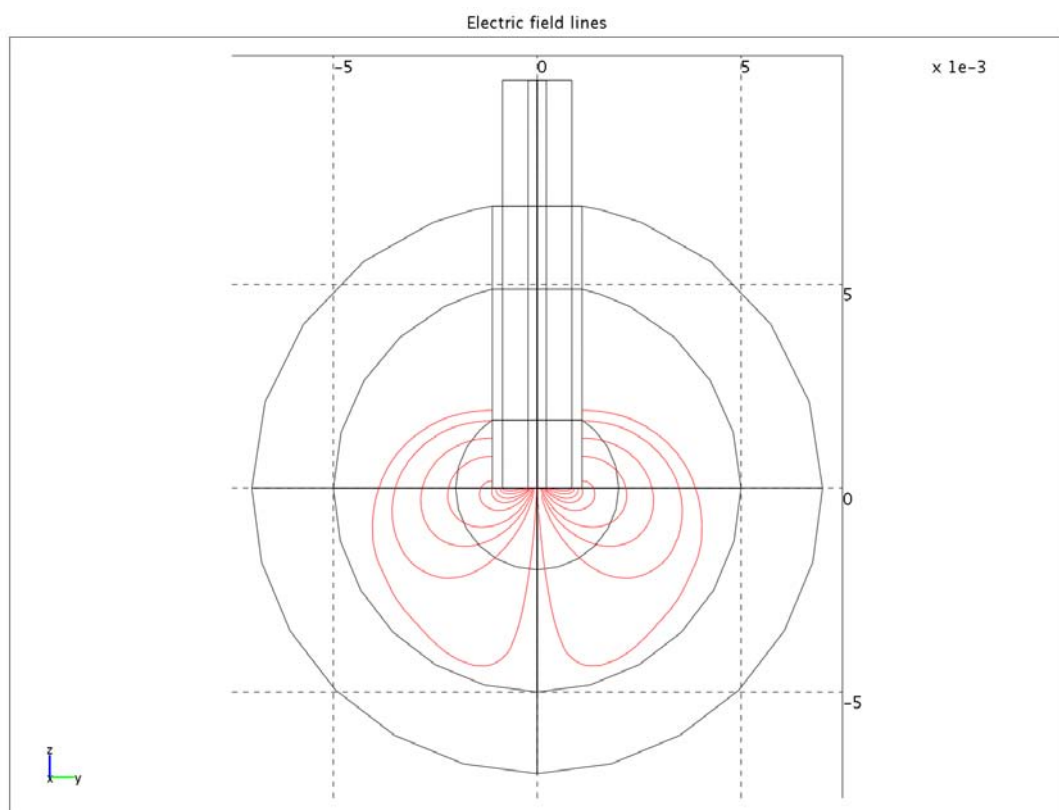


Abb. 3.2: Feldlinien Slim Form Probe 2 GHz

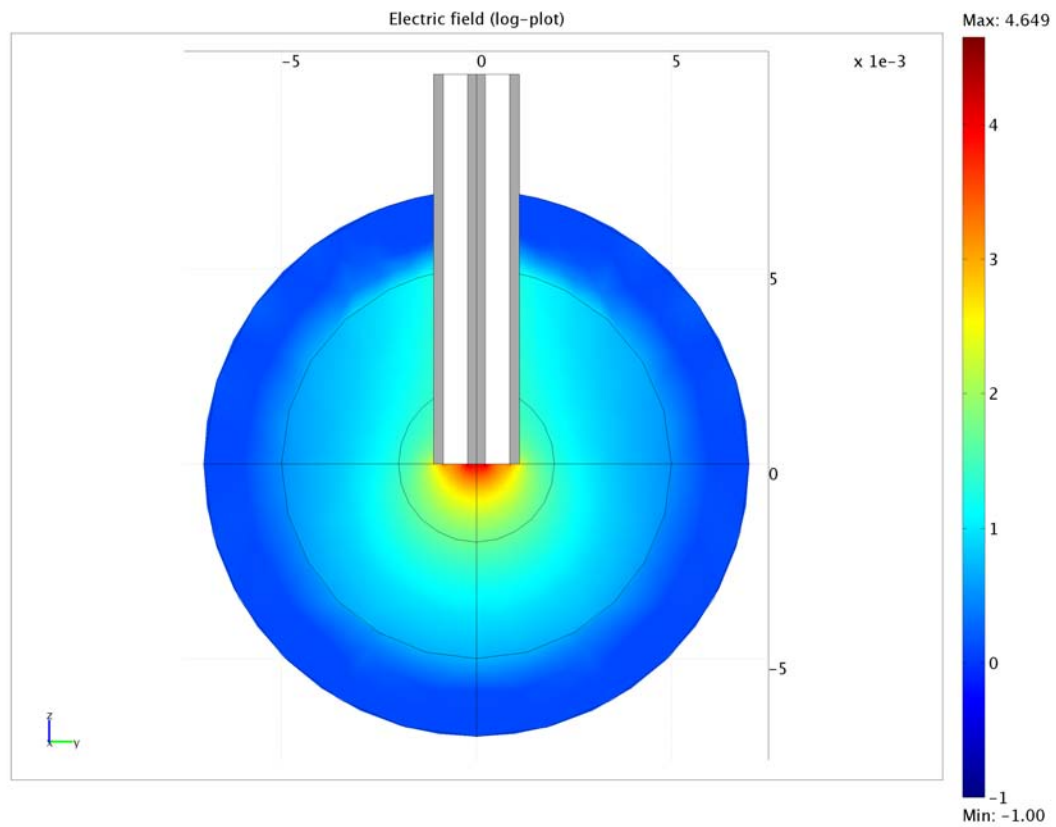


Abb. 3.3: Feldverteilung Slim Form Probe 1 GHz

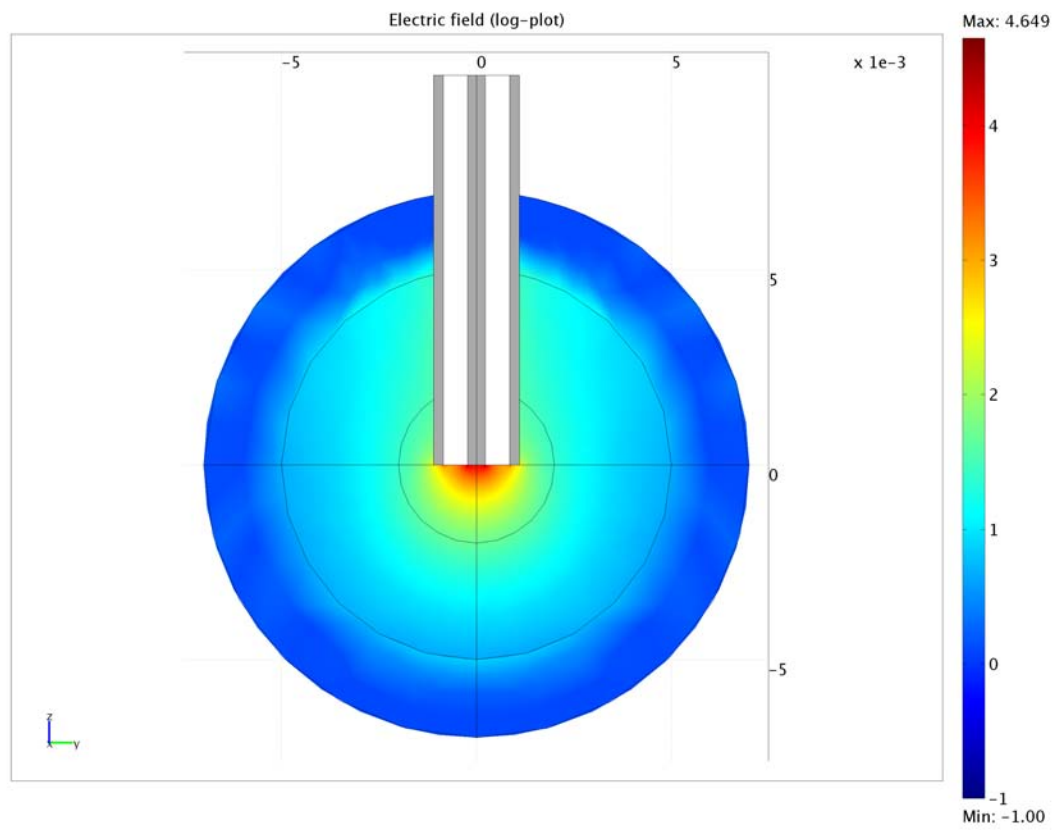


Abb. 3.4: Feldverteilung Slim Form Probe 2 GHz

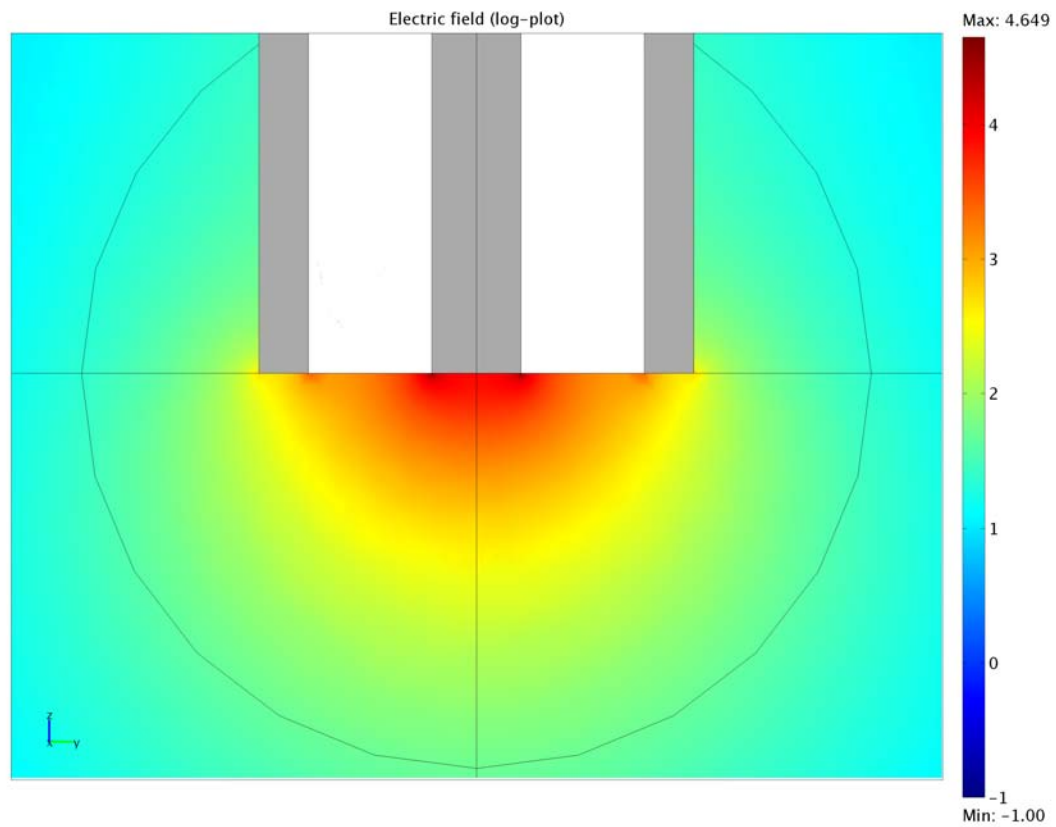


Abb. 3.5: Feldverteilung Slim Form Probe 1 GHz (Detailansicht)

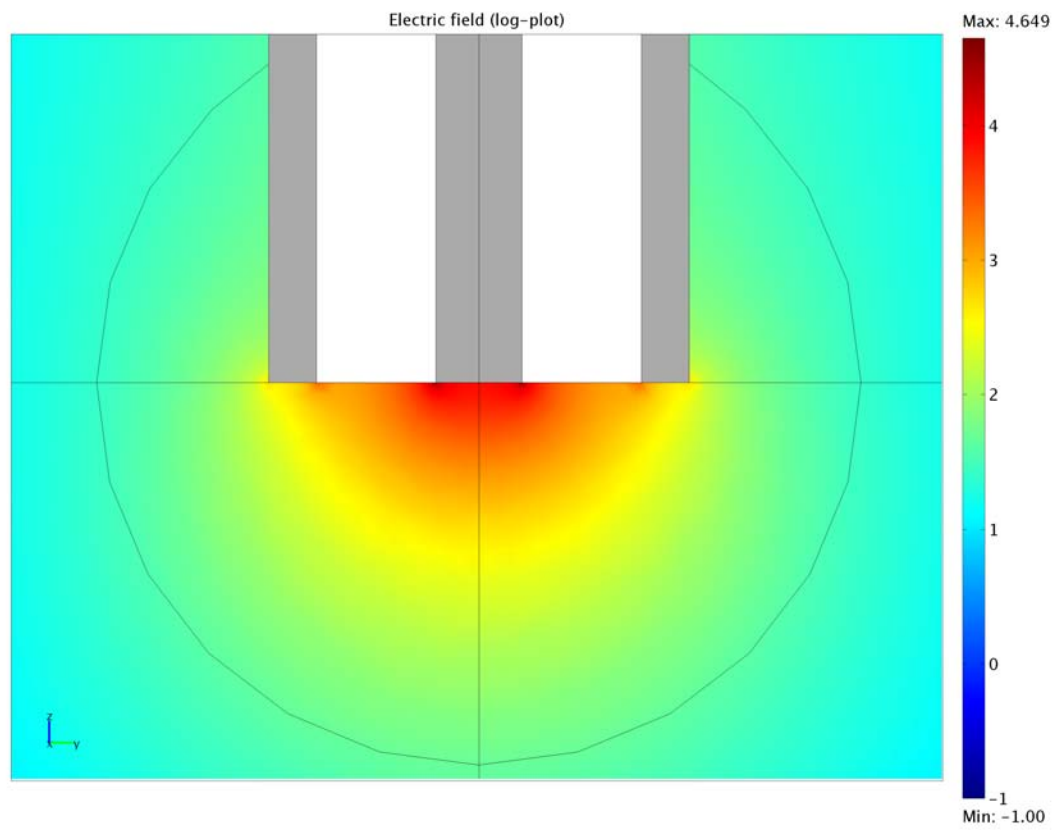


Abb. 3.6: Feldverteilung Slim Form Probe 2 GHz (Detailansicht)

3.3 Dielektrische Messungen bei unterschiedlichen elektrischen Feldstärken

Die bisher gezeigten temperaturabhängigen dielektrischen Messungen an Wasser, Elektrolyten, Blut und verschiedenen Zellsuspension wurden am Netzwerkanalysator mit definierter gleich bleibender Anregungsamplitude (Leistung am Netzwerkanalysator von -17 dBm) durchgeführt, die die höchste Genauigkeit und Güte für die durchgeführten Messungen sicherstellt.

Die Abbildungen 3.7 bis 3.14 zeigen nun feldabhängige Messungen bei 37° C in einem großen Bereich elektrischer Feldstärken. Die Leistung am Netzwerkanalysator wurde zwischen Werten von -27 dBm und 3 dBm variiert. Dies entspricht maximalen Messfeldern am Ende der Open Ended Coaxial Line von ca. 16 V/m bis 0.5 kV/m. Die Messungen wurden an Vollblut (Abbildungen 3.7), an Nervenzellen in PBS-Puffer (Abbildungen 3.8), an Fibroblasten in Mannitol-Puffer (Abbildungen 3.9), an Fibroblasten in PBS-Puffer (Abbildungen 3.10), an Keratinozyten in PBS-Puffer (Abbildungen 3.11), an Melanomzellen in Mannitol-Puffer (Abbildungen 3.12), in PBS-Puffer (Abbildungen 3.13) und an Melanomzellen in MEM Medium (Abbildungen 3.14) durchgeführt. Bei allen Feldstärken zeigt die dielektrische Antwort das typische Verhalten wasserähnlicher Relaxationen mit Leitfähigkeit, die bei niederen Frequenzen dominiert. Für den untersuchten Frequenzbereich konnten innerhalb der experimentellen Ungenauigkeit keine nicht-linearen feldstärkeabhängigen Effekte gefunden werden.

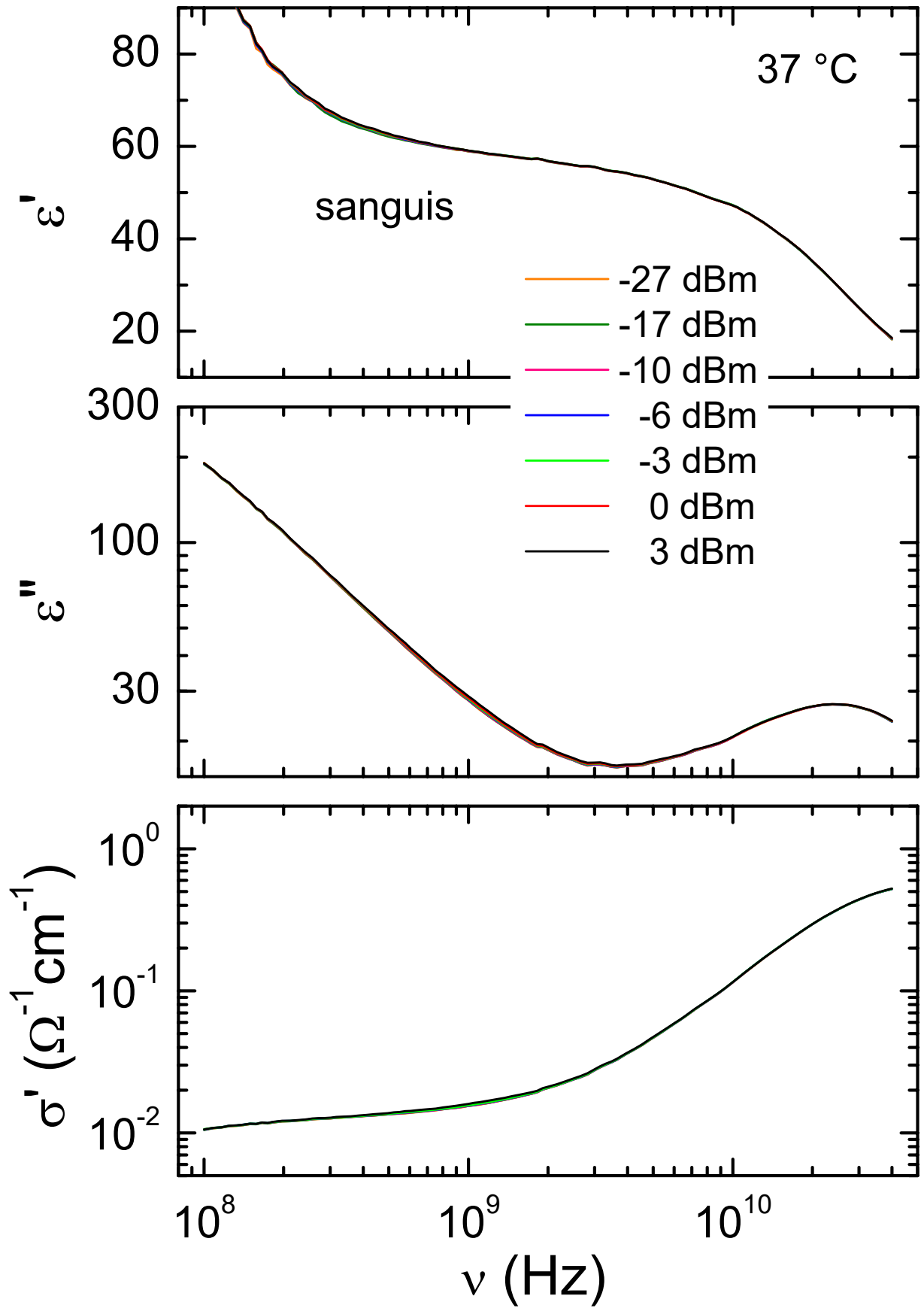


Abb. 3.7: Feldabhängige Messungen an entnommenem Vollblut

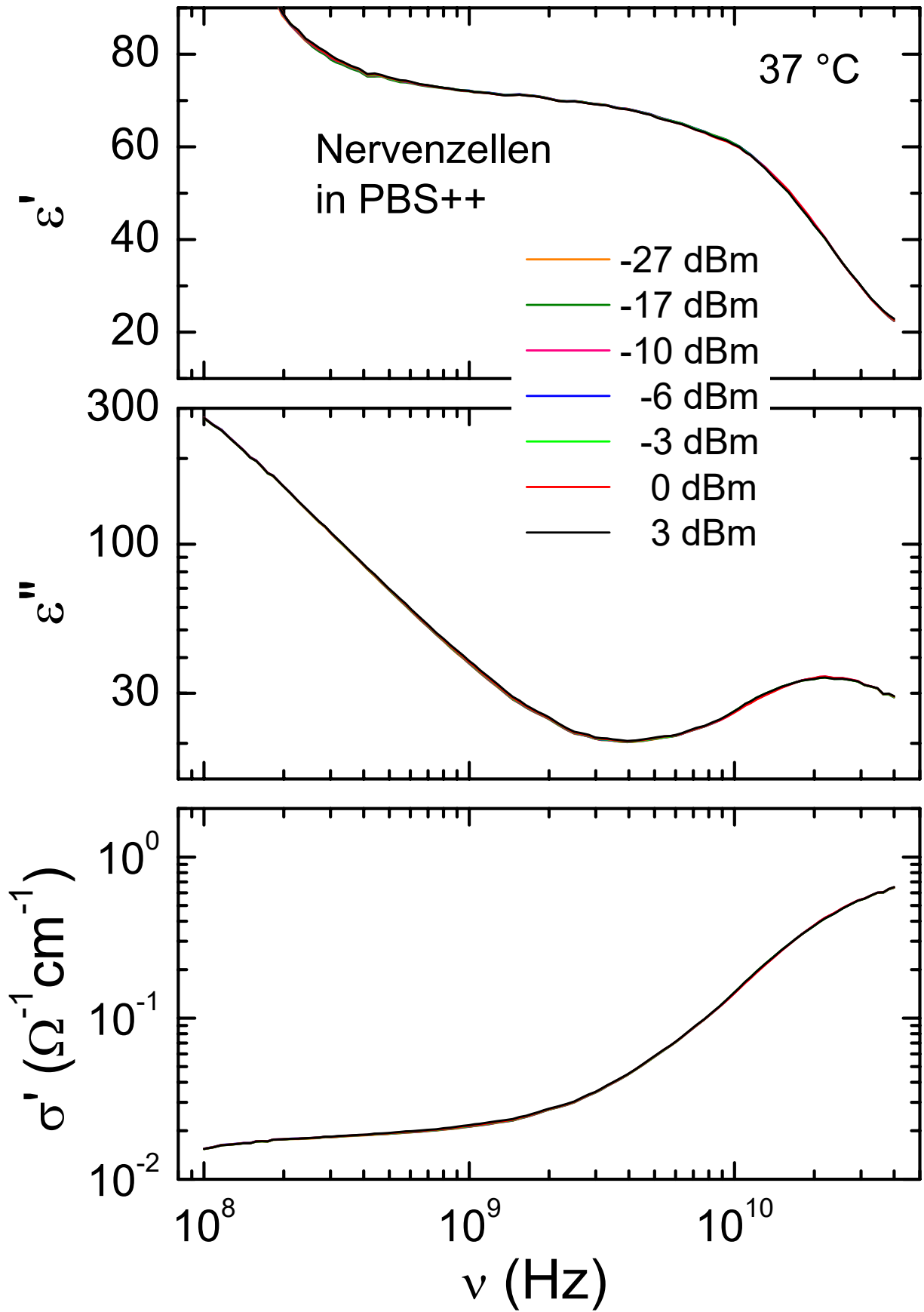


Abb. 3.8: Feldabhängige Messungen an Nervenzellen in PBS++ (100 Mio./ml)

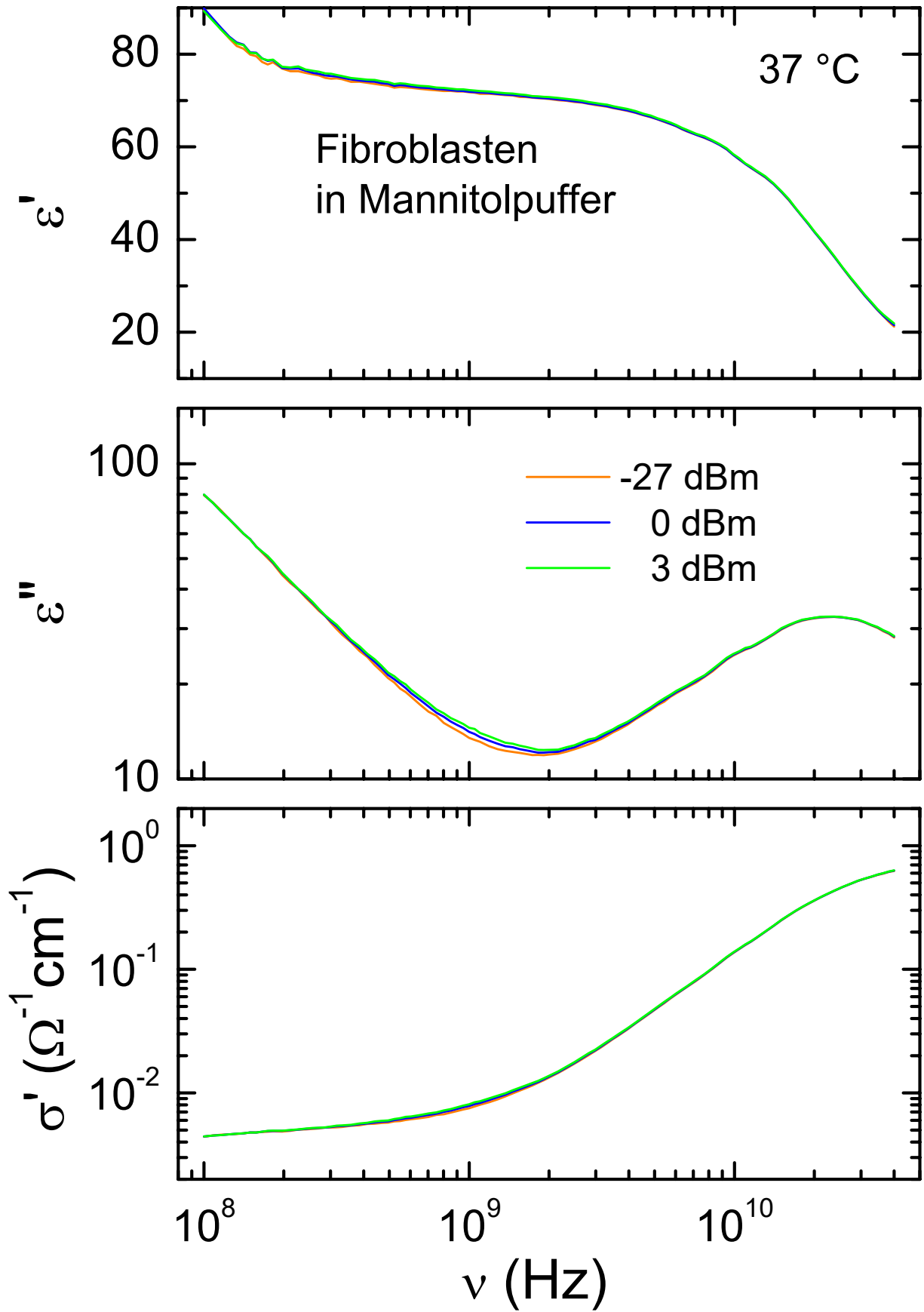


Abb. 3.9: Feldabhängige Messungen an Fibroblasten in Mannitolpuffer (200 Mio./ml)

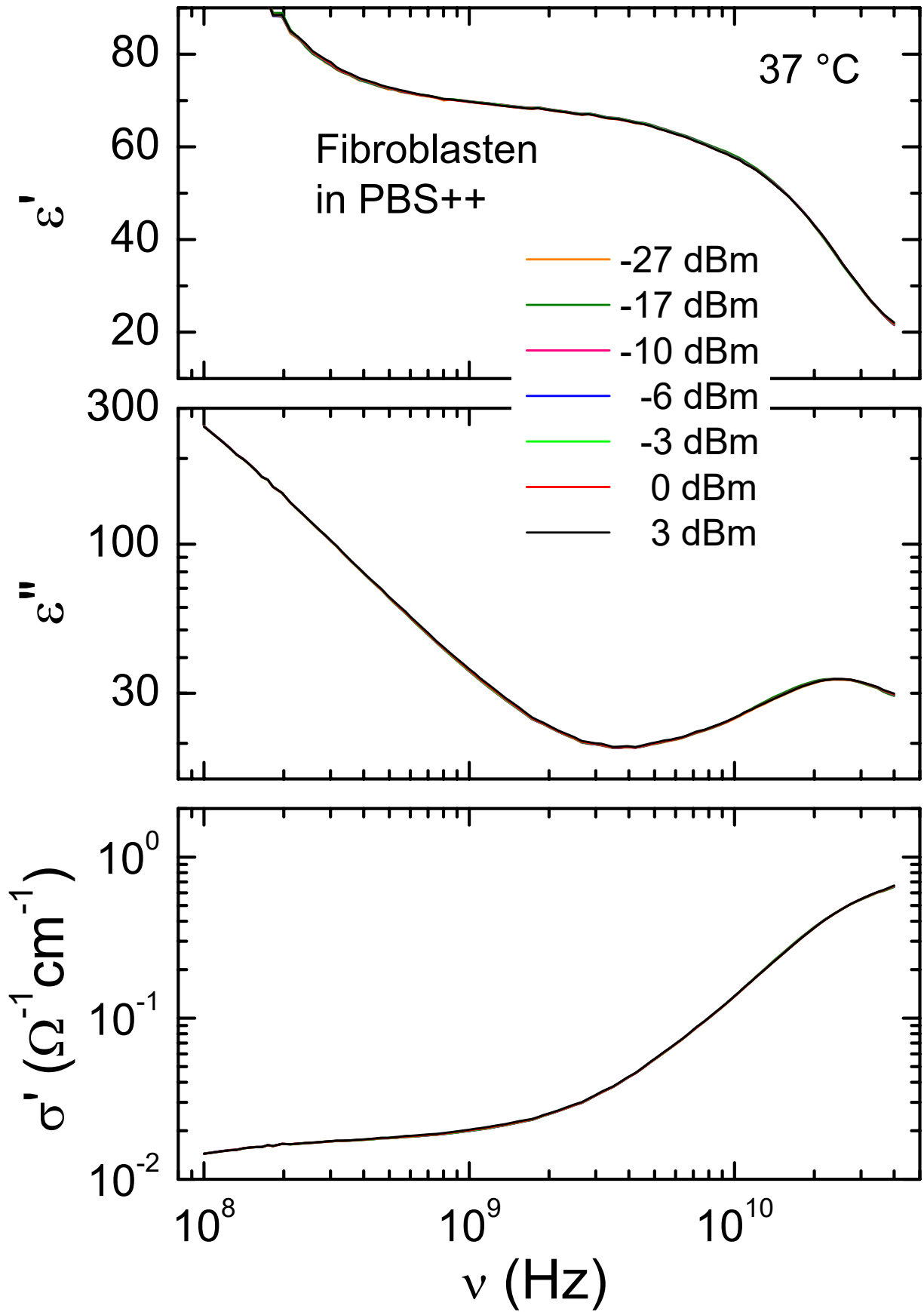


Abb. 3.10: Feldabhängige Messungen an Fibroblasten in PBS++ (240 Mio./ml)

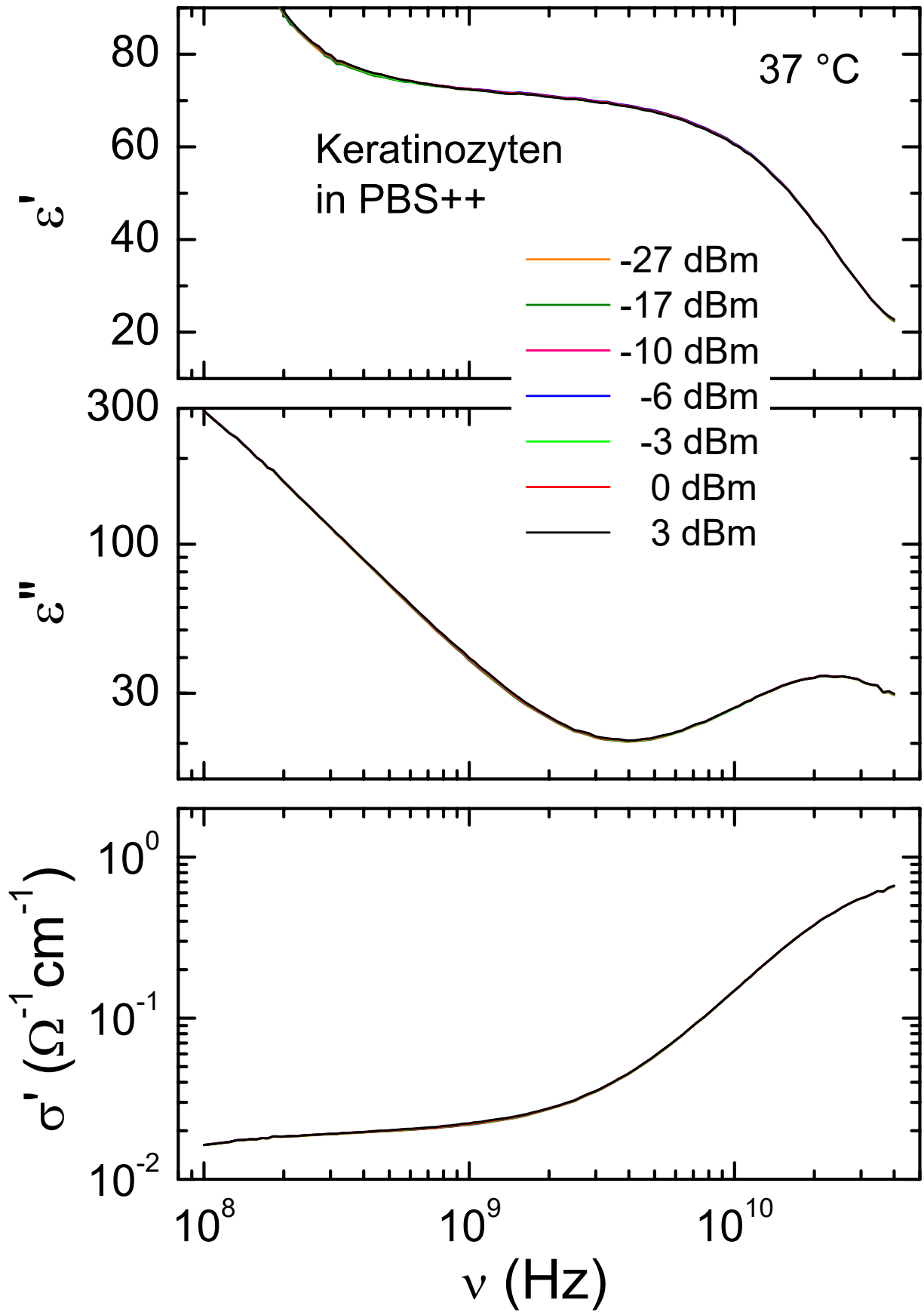


Abb. 3.11: Feldabhängige Messungen an Keratinozyten in PBS++ (100 Mio./ml)

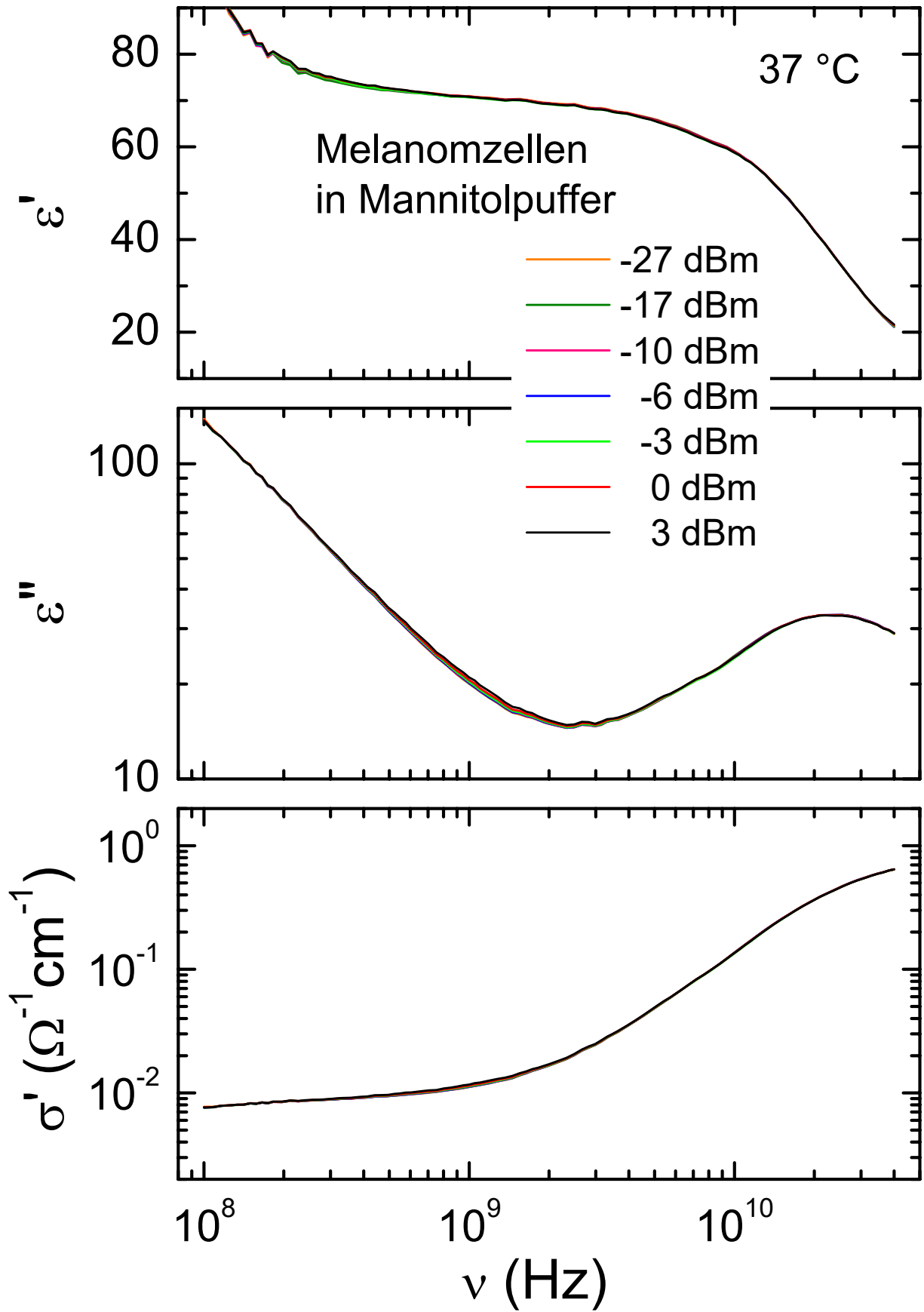


Abb. 3.12: Feldabhängige Messungen an Melanomzellen in Mannitolpuffer (175 Mio./ml)

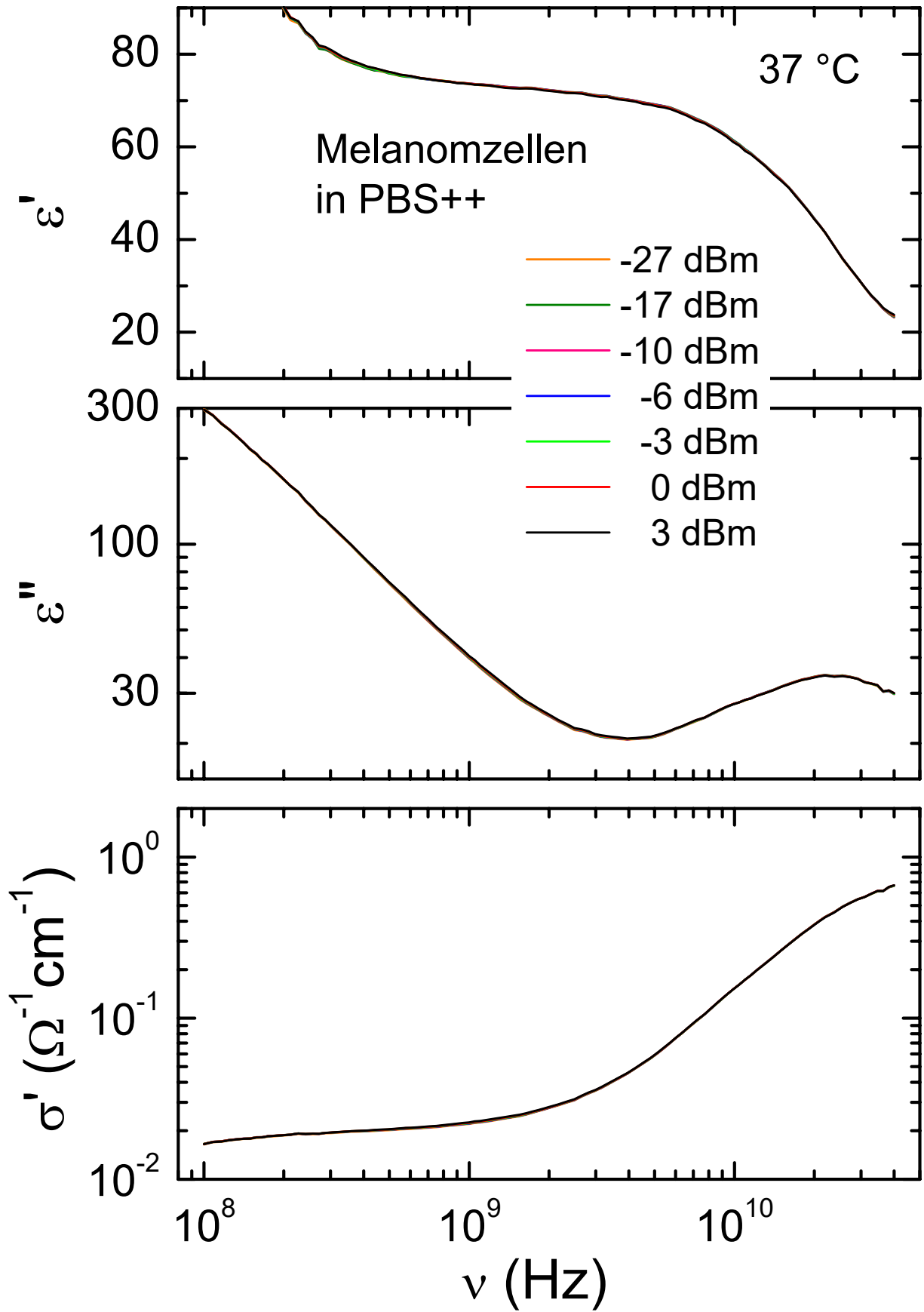


Abb. 3.13: Feldabhängige Messungen an Melanomzellen in PBS++ (200 Mio./ml)

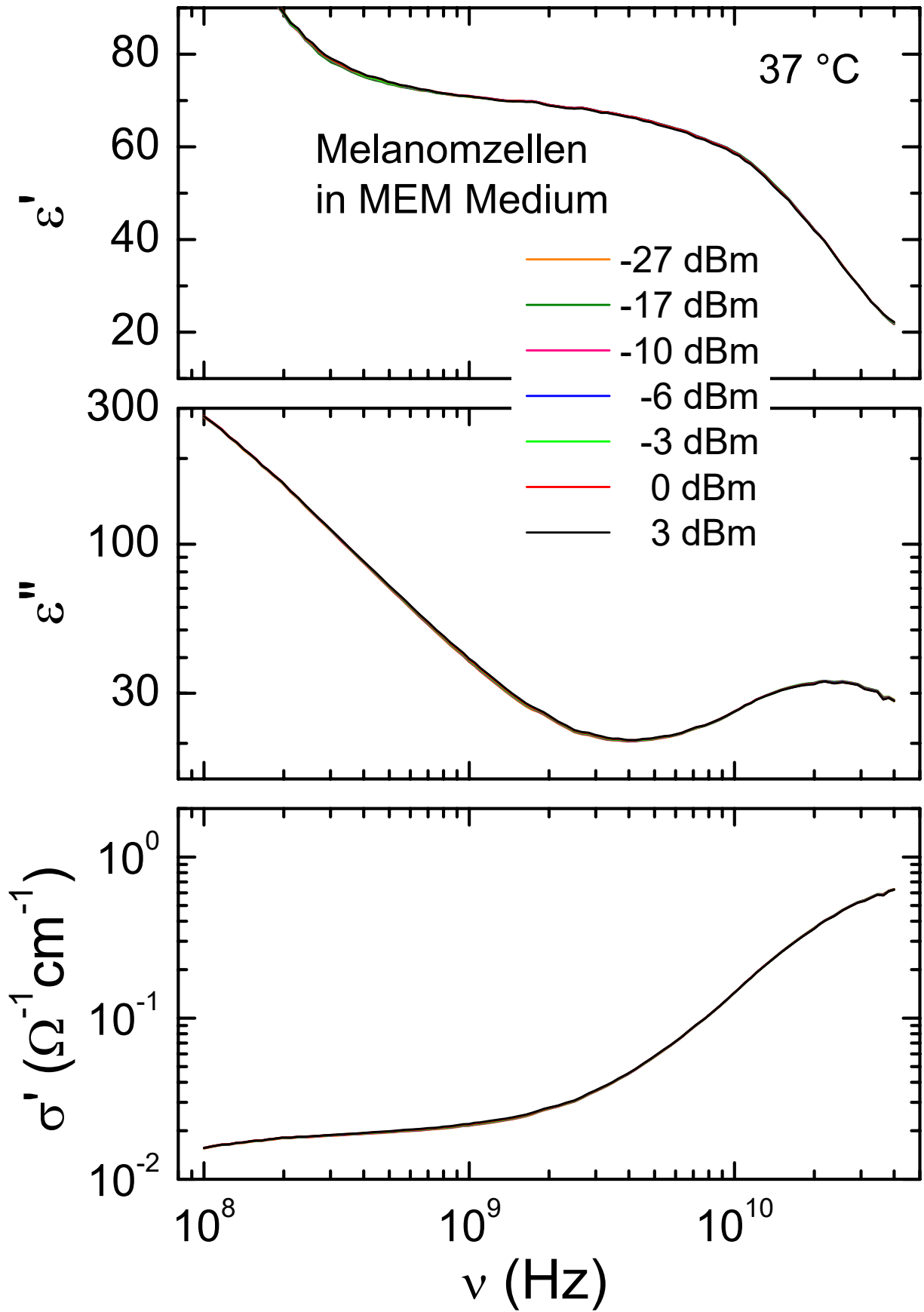


Abb. 3.14: Feldabhängige Messungen an Melanomzellen in MEM Medium (225 Mio./ml)

4 Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse der dielektrischen Spektroskopie

Projektteil I befasst sich mit breitbandiger dielektrischer Spektroskopie an Zellsuspensionen. Ziel war es durch detaillierte Analyse der Temperatur- und Frequenzabhängigkeit von Real- und Imaginärteil der dielektrischen Konstante Aussagen über Absorptionsphänomene auch auf Zellniveau zu gewinnen. Dazu ist es notwendig das dielektrische Spektrum der Suspensionen und wässrigen Lösungen sehr genau zu kennen, um mögliche Zusatzeffekte analysieren zu können.

Die wesentlichen Ergebnisse dieses Projektteils seien hier kurz zusammengefasst:

1. Das Medium mit der höchsten Absorption elektromagnetischer Strahlung bei Frequenzen oberhalb ca. 20 GHz ist sicherlich reines Wasser. Hier liegt die Hauptrelaxation der Wassermoleküle. Diese Relaxation wird in Zellsuspensionen abgeschwächt. Im Mobilfunkfrequenzbereich steigt aber die Absorption aufgrund von Leitfähigkeitsprozessen. In einem ersten Schritt haben wir unsere eigenen, im Rahmen dieses Projektes gewonnen Daten und die in der Literatur existierenden Wasserdaten umfassend analysiert. Diese Analyse ist deutlich besser und aussagekräftiger als die bisher publizierten Ergebnisse. Betrachtet man das dielektrische Spektrum von Wasser von MHz bis THz so liefert die Annahme einer Relaxation bei 723 GHz, zusätzlich zur dominierenden Wasser-Relaxation bei ca. 19 GHz, die beste Übereinstimmung zwischen Modellierung und Experiment (Abbildung 1.8). Es kann eine etwas schlechtere Übereinstimmung erzielt werden, wenn man zur Beschreibung der Wasser-Relaxation eine asymmetrische Cole-Davidson Funktion mit Mittenfrequenz bei 17.7 GHz benutzt (Abbildung 1.7). Die leichte Verschiebung der mittleren inversen Relaxationszeit kommt durch die Benutzung einer asymmetrischen Verteilung von Relaxationszeiten zustande. Für die Analyse der Daten an wässrigen Lösungen und Zellsuspensionen beschränkten wir uns auf die Annahme einer asymmetrischen wasserähnlichen Relaxation, da in diesem Fall die Zahl der Parameter kleiner ist. Für alle untersuchten Zellsuspensionen gilt, dass von 100 MHz bis 40 GHz Leitfähigkeitsprozesse und Wasserrelaxation die dielektrischen Eigenschaften zufrieden stellend beschreiben. Bei Blut finden sich Anzeichen einer schachen Zusatzrelaxation.
2. Wir legen in diesem Bericht in Abschnitt 2.1 eine ausführliche Charakterisierung der Temperatur- und Frequenzabhängigkeit von NaCl- und KCl-Elektrolyt-Lösungen vor. Die hochpräzisen und systematischen Messungen, die in dieser Detailtreue noch nie publiziert wurden, sind in den Abbildungen 2.1 bis 2.11 dokumentiert. Die exakte Analyse der Daten erlaubt es uns die Relaxations- und Leitfähigkeitsphänomene in diesen Elektrolytlösungen auf temperatur- und konzentrationsabhängige mikroskopische Parameter zurückzuführen. Die Energiebarrieren gegen Diffusion gelöster Ionen und gegen Rotation von Wassermolekülen bestimmen dabei DC-Leitfähigkeit und mittlere Relaxationszeit. Die genaue Kenntnis dieser Parameter, die in Kapitel I 2.3 ausführlich beschrieben werden, ermöglicht es in einem Parameterraum von Frequenz, Temperatur und Konzentration den Realteil der dielektrischen Konstante und den

Realteil der dynamischen Leitfähigkeit exakt vorherzusagen. Beispiele für Vorhersagen sind in Abbildung 2.18 gezeigt. Die Kenntnis von maximal 14 mikroskopischen Parametern für eine spezifische Elektrolytlösung ersetzt die seiten- und oft bücherlange Auflistung von dielektrischen Konstanten und dielektrischem Verlust als Funktion von Konzentration, Temperatur oder Frequenz in Tabellenform. Die 14 freien Parameter dienen einer genauen Beschreibung der Frequenz-, Temperatur- und Konzentrationsabhängigkeit der DC-Leitfähigkeit und der wasserähnlichen Relaxation.

3. Nachdem wir durch das Studium der Elektrolytlösungen den Einfluss gelöster Ionen auf die wasserähnliche Relaxation und auf die DC-Leitfähigkeit analysiert hatten, wurden mit diesem Wissen biologische Systeme untersucht. Bei den Messungen an Modellmembranen, an Neuronen, an Fibroblasten, an Keratinozyten und an Melanomzellen unterschiedlicher Konzentration in unterschiedlichen Puffer-Lösungen fanden wir nur das Absorptionsverhalten wässriger Lösungen. Der Einfluss der unterschiedlichen Zelltypen offenbart sich in diesen Messungen nur durch leichte Änderungen der mittleren Relaxationszeiten und der dielektrischen Stärke der wasserähnlichen Relaxation. Die dielektrische Signatur all dieser Messungen ist sehr ähnlich. Betrachtet man den Realteil der Leitfähigkeit so findet man DC-Leitfähigkeit für Frequenzen unterhalb von 1 GHz. Die Leitfähigkeit hängt ab, von der Natur und der Konzentration der Zellen, aber insbesondere auch von der verwendeten Pufferlösung. Die Leitfähigkeit liegt für alle untersuchten Systeme zwischen 10^{-3} und $10^{-1} \Omega^{-1} \text{cm}^{-1}$. Oberhalb von ca. 2 GHz beginnt der Bereich der wasserähnlichen Relaxation und hier steigt die Leitfähigkeit annähernd quadratisch mit der Frequenz an. Der genaue Übergangsbereich hängt von Details der DC-Leitfähigkeit und der Stärke der Dipol-Relaxation ab. Dieser Übergangsbereich liegt genau in Bereich der derzeit benutzten Mobilfunk-Frequenzen. Aus dieser Analyse kann man sicherlich sagen, dass eine technische Entwicklung zu höheren Frequenzen aufgrund dieser Datenlage zu höhere Absorption führen würde. Wir können aber im Frequenzbereich oberhalb von 500 MHz in den hier untersuchten Zelltypen keine speziellen Relaxations- oder Resonanzphänomene nachweisen, die speziell auf Vorgänge in den Zellen zurückgeführt werden können. Diese Effekte sind nicht vorhanden oder zu klein, um im Vergleich mit der dominierenden wasserähnlichen Relaxation im Absorptionsverhalten detektiert werden zu können.
4. Eine Sonderstellung nehmen die Untersuchungen an Vollblut und an Erythrozytensuspensionen ein. Hier findet man in allen dielektrischen Spektren eine zusätzliche zweite Relaxation, die bei ca. 3 GHz liegt. Der mikroskopische Ursprung dieser Relaxation ist noch unklar. Das ungewöhnliche ist, dass sich die Zusatzrelaxation mit steigender Temperatur zu niederen Frequenzen verschiebt. Diese Relaxationsprozesse können also nicht in einem Schema thermisch aktivierter Prozesse beschrieben werden. Die Relaxationsstärke der Zusatzrelaxation ist klein verglichen mit der Stärke der wasser-ähnlichen Relaxation. Sie trägt daher signifikant nur im Bereich von ca. 700 MHz bis 8 GHz zur Leitfähigkeit oder zum dielektrischen Verlust bei. Der Einfluss dieser Relaxation ist in Abbildung 2.35 dokumentiert, in der wir die besten Fit-Versuche mit und ohne Einbeziehung dieser Relaxation vergleichen. Die Abbildung 2.35 zeigt, dass die Zusatzrelaxation nur etwa 20 % zur Gesamtaborption beiträgt. Trotzdem wären

hier weiter Untersuchungen durchaus angebracht. Breitbandige und temperaturabhängige Messungen an Suspensionen verschiedener wesentlicher Makromoleküle z. B. bestimmter Strukturproteine könnten helfen, den Ursprung dieser Zusatzrelaxation zu lokalisieren.

5. Auch alle dielektrischen Spektren an Zellsuspensionen, an Modell-Membranen und an Blut wurden vollständig parametrisiert. Die Parameter sind in den Tabellen 2.1 bis 2.11 zusammengefasst. Diese Parametrisierung erlaubt für spezielle Zelltypen in Suspension eine eindeutige Berechnung von dielektrischer Konstante und von Leitfähigkeit als Funktion von Frequenz und Temperatur.
6. Unsere Untersuchungen zeigen, dass im untersuchten Frequenzbereich und insbesondere im Bereich der Mobilfunkfrequenzen nur wasserähnliche Relaxationsprozesse oder Diffusionsprozesse, die zu Leitfähigkeit führen, eine signifikante Rolle spielen. Die Dynamik von Ladungsdoppelschichten, Ladungsanhäufungen an Grenzflächen oder Ladungsinhomogenitäten spielen bei den hohen Frequenzen keine Rolle und müssen nicht weiter berücksichtigt werden. Alle Maxwell-Wagner-ähnlichen Phänomene treten erst unterhalb von 100 MHz zum Vorschein und führen dort zu sehr hohen dielektrischen Konstanten und dielektrischen Verlusten.
7. Schließlich untersuchten wir an allen Zelltypen mögliche nicht-lineare Effekte in Abhängigkeit der externen Feldstärke. Hier können wir abschließend sagen, dass auch bei großer Variation der externen elektrischen Felder keine nicht-linearen Effekte detektiert werden konnten.

II Permeabilitätsmessungen an künstlichen Membranen und lebenden humanen Zellen

Nachdem im ersten Abschnitt dieses Abschlussberichts die dielektrischen Eigenschaften von in Suspension vorliegenden künstlichen Membranen und Zellen untersucht worden sind, soll in diesem Teil besonderes Augenmerk auf einzelne Proben gelegt werden. Untersucht wird die elektrische Permeabilität von künstlichen Membranen und lebenden humanen Zellen mittels des weit verbreiteten „patch clamp“ Verfahrens, das sich in der Vergangenheit als besonders geeignet zur Messung der Leitfähigkeit von Membranen herausgestellt hat und welches im Jahre 1991 mit dem Nobelpreis für Medizin gewürdigt worden ist (Sakmann und Neher, 1995). Die elektrischen Permeabilitätsmessungen werden sowohl ohne HF Einstrahlung als auch unter HF Einstrahlung in für das hier durchgeführte Projekt relevanten Frequenz- und Leistungsbereichen durchgeführt.

Dabei verwenden wir hier allerdings nicht das in den allermeisten Fällen angewandte Pipetten-Patch Clamp, sondern eine in jüngerer Vergangenheit entwickelte Methode, die auf einem planaren Chip beruht, in den ein kleines Loch geätzt worden ist, mit Hilfe dessen dann das patch clamp durchgeführt wird (Fertig *et al.* 2001). Das von uns verwendete System ist eine kommerzielle planare patch clamp Station der Firma Nanji[on, München.

Dabei wurden zunächst – um ein grundlegendes Verständnis für die wesentliche komplexeren Zellmembranen zu generieren – patch clamp Untersuchungen an künstlichen Modellmembranen durchgeführt, die zunächst thermodynamisch charakterisiert worden sind. Die Modellmembranen können sowohl in Form reiner Lipidmembranen als auch als mehrphasige Systeme ausgestaltet sein, die einen ersten Schritt in Richtung der ausgesprochen komplexen und hochgradig heterogenen Zellmembranen „echter“ lebender Zellen bedeuten. Die Untersuchung der künstlichen Membranen mit und ohne HF Einstrahlung soll erste Hinweise auf die mögliche Rolle der thermodynamischen Phase der Membran auf die Leitfähigkeit bzw. Permeabilität liefern, die dann als Verständnishilfe möglicherweise in lebenden Zellmembranen auftretenden HF induzierten Effekte dienen. Die untersuchten Modellmembranen und Zelllinien sind im Wesentlichen identisch mit denen in Teil I des Abschlussberichts in Kooperation der beiden beteiligten experimentellen Arbeitsgruppen in Suspension untersuchten Systemen. Da im ersten Teil des vorliegenden Abschlussberichts vornehmlich in wässriger Lösung, deren dielektrischer Response eine dominante Rolle ergab, gemessen worden ist, wurde dort nur kurz auf die detaillierte Beschreibung der Membranen und Zelltypen eingegangen. In diesem zweiten Teil wird dies nachgeholt, da bei Einzelzellmessungen die Rolle der Zelle selbst bei den Permeabilitätsmessungen gegenüber den Suspensionsmessungen wichtiger wird.

Der zweite Teil des hier vorliegenden Abschlussberichts gliedert sich demnach in folgende Unterpunkte:

- Präparation und Charakterisierung künstlicher Membranen und humaner Zelllinien für Einzelproben-Untersuchungen
- Black Lipid Membran Aufbau mit HF Einstrahlung
- Thermodynamische Charakterisierung der künstlichen Membranen
- Untersuchungen zur Permeabilität künstlicher Membranen mit und ohne HF Einstrahlung in so genannter Black Lipid Membrane Technik
- Darstellung der verwendeten patch clamp Anlage mit HF Einkopplung
- Elektrische Permeabilitätsmessungen an humanen Zellen mit und ohne HF Einstrahlung.

1 Präparation und Charakterisierung künstlicher Membranen und humaner Zelllinien für die Messung der elektrischen Permeabilität sowie der dielektrischen Eigenschaften

Die Präparation der in diesem Abschlussbericht untersuchten Modellmembranen und humanen Zelllinien wurde in der Arbeitsgruppe Experimentalphysik I (EPI) durchgeführt. Die so erhaltenen Proben wurden dann bzgl. ihrer dielektrischen Eigenschaften von der Arbeitsgruppe Experimentalphysik V (EPV) und bzgl. ihrer Permeabilität von der Arbeitsgruppe EPI untersucht.

1.1 Herstellung und Charakterisierung künstlicher Membranen

Die Permeabilitätsmessungen an künstlichen Membranen wurden mittels der so genannten Black Lipid Membrane (BLM) Technik in einer speziell für diesen Zweck hergestellten Messkammer mit der Möglichkeit einer HF Einstrahlung durchgeführt.

Abbildung II.2.1 zeigt den prinzipiellen Aufbau dieser Messkammer, die aus zwei zunächst über ein kleines Loch ($d = 100 \mu\text{m}$) in einer Teflon-Barriere verbundenen Kompartements besteht. Die Badtemperatur beider Kompartements wird über einen Temperaturcontroller (Lakeshore) und ein Heizelement konstant auf einem gewünschten Wert gehalten bzw. kann in definierter Weise variiert werden. Beide

Kompartments werden zu Beginn der Präparation zunächst bis knapp unterhalb des Lochs mit Elektrolyt gefüllt (Abb. II.1.1). Auf den beiden separaten Oberflächen der nun mit Elektrolyt gefüllten Kompartements wird das in Chloroform gelöste Lipid gespreitet. Nach dem Verdampfen des Lösungsmittels bildet sich auf der Elektrolytoberfläche ein monomolekularer Film des entsprechenden Lipids oder Lipidgemisches. Nun wird der Film relativ zum Verbindungsloch auf und ab bewegt, indem die Flüssigkeitssäule in den Kompartements erhöht bzw. erniedrigt wird (Montal-Müller-Verfahren (Montal und Müller 1972)). Das Verbindungsloch welches sich in dem Teflonrahmen befindet, wird bei dieser Auf- und Abbewegung von einem dünnen Membranfilm überzogen. Der Vorgang der Membranbildung wird während dessen über eine Messung des elektrischen Widerstands zwischen beiden Kompartements beobachtet. Bildet sich ein geschlossener Membranfilm über dem Teflonloch, so steigt dieser Widerstand zunächst auf mehrere 100 MOhm an bevor er nach vollständiger Relaxation der Membran weiter auf mehrere 10 bis 100 GOhm ansteigt und diesen Wert dann beibehält. Die künstliche Membran überspannt jetzt komplett das Loch in der Teflonbarriere und steht für eine Permeabilitätsmessung zur Verfügung.

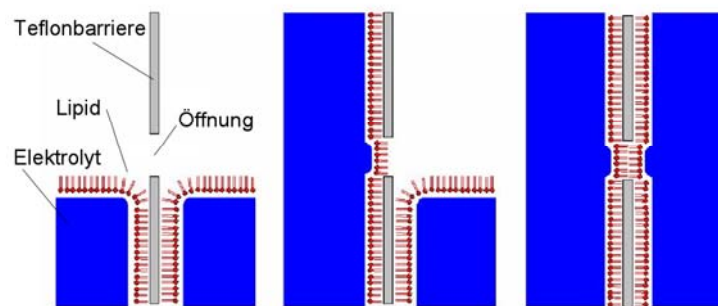


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Montal-Müller-Verfahrens zur Überspannung der Messöffnung mit einer Lipid Membran.

2 Vorrichtung zur Permeabilitätsmessung an künstlichen Membranen

Diese Messung wird mittels eines kommerziellen Patch Clamp Verstärkers (Cornerstone, Dagan, USA) durchgeführt. Dieser gibt PC-gesteuert eine bestimmte Klemmspannung vor und misst dann rauscharm und hoch empfindlich den sich ergebenden Strom (meist im pA Bereich) zwischen beiden Kompartements. Unter der Annahme einer kompletten Bedeckung des Verbindungslochs durch die Membran ist dieser Strom dann der Strom durch die Membran, über die auch der allergrößte Teil der angelegten Klemmspannung abfällt. Der „Zuleitungswiderstand“, der sich aus einer Serienschaltung aus den Kontaktwiderständen Elektrode-Elektrolyt sowie des Elektrolytwiderstandes selbst ergibt, kann jetzt bei sauberer Präparation der Membran und eines hohen „seal“ Widerstandes zwischen Membran und Teflonbarriere vernachlässigt werden.

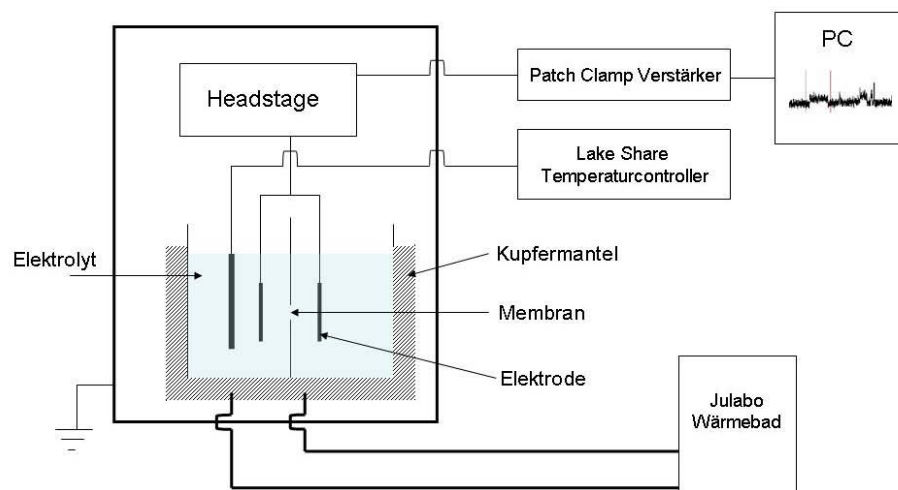


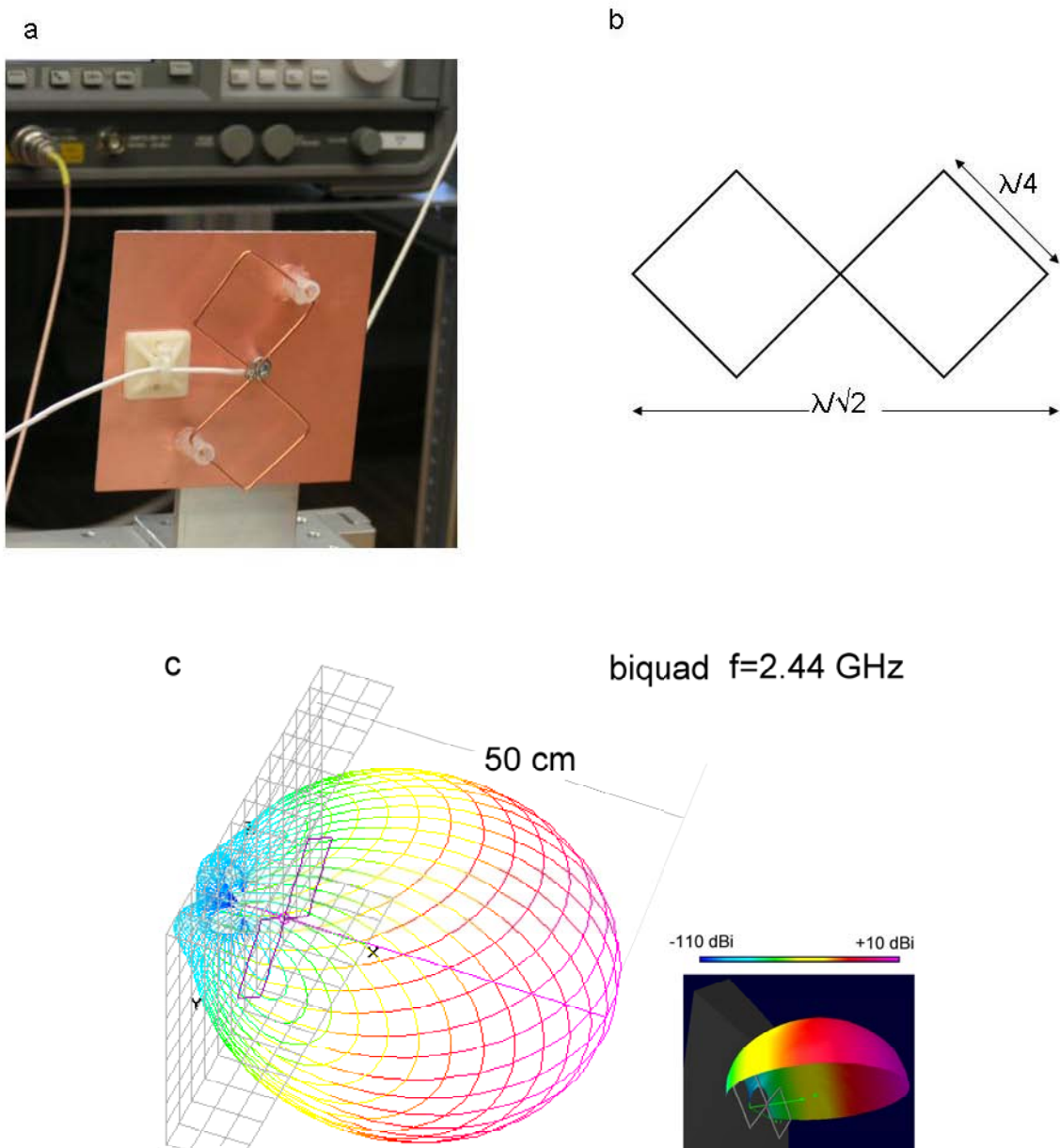
Abb. 2.1: Schematischer Aufbau der Messkammer für die BLM Messungen der Membranpermeabilität. Die beiden Kompartements der Messkammer werden durch eine Teflonbarriere voneinander getrennt, in der sich ein kleines Loch befindet. Über dieses Loch wird eine Membran gespannt, deren Widerstand bzw. Leitfähigkeit dann durch eine Widerstands- bzw. Leitfähigkeitsmessung zwischen den beiden Elektroden bestimmt werden kann. Im vorliegenden Fall wurde eine konstante Klemmspannung zwischen beide Elektroden angelegt und ein der Leitfähigkeit der Membran proportionaler Strom mittels eines hoch empfindlichen patch clamp Verstärkers gemessen.

Diese Messkammer ist komplett in einem geschirmten Gehäuse untergebracht, in dem auch eine Antennenvorrichtung zur Einstrahlung hochfrequenter Wechselfelder in die Messkammer montiert ist. Nach einigen Vorversuchen mit verschiedenen Geometrien, die z.T. in unserem Zwischenbericht dokumentiert worden sind, haben wir uns für eine „Bi-Quad“ Antennenform (manchmal auch ihrer Form wegen als „bowtie“ oder „Brillen“-Antenne bezeichnet) entschieden. Bei Verwendung einer Reflektorplatte zeigt diese Antennenform eine nach vorne gerichtete, linear polarisierte Abstrahlungscharakteristik.

Die Abmessungen und der reale Aufbau der Antennen werden durch die untersuchten Frequenzbänder bestimmt. In der folgenden Tabelle sind diese aufgelistet:

	D-Netz	E-Netz	UMTS	WLAN / WiMAX
f in MHz	900	1800	2100	2400
Wellenlänge in cm	33	16,7	14	12,5

Tab.: 2.1: Frequenzen und entsprechende Wellenlängen für die betrachteten Bänder. Die Antennen wurden dementsprechend gemäß Abbildung II.2.2.b dimensioniert.



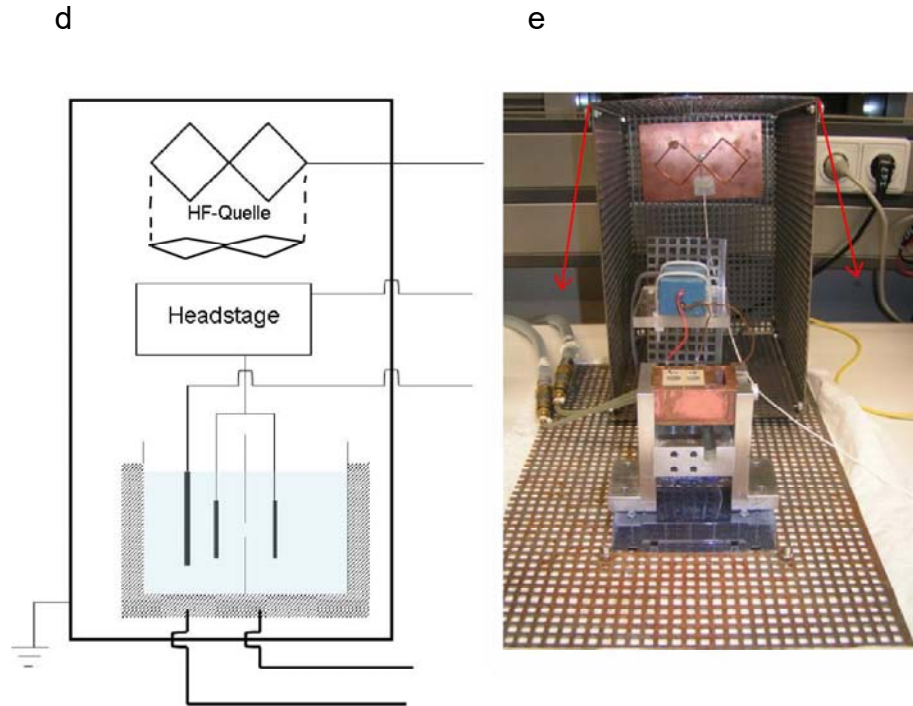


Abb. 2.2: (a) Detailaufnahme einer der verwendeten biquad Antennen (mit Reflektorplatte). (b) Bemessung der Antenne. Der Abstand der Antenne vom Reflektor beträgt $h = \lambda/8$. (c) Mittels des Programmpakets 4NEC2 simulierte Abstrahlung der verwendeten Antenne. Der Gewinn für die gezeigte Antenne beträgt etwa 8 dB. (d) Schematische Darstellung der Montage der Antenne oberhalb der Messkammer. (e) Foto der Messkammer und der montierten Antenne zur HF Einstrahlung in einem (aufgeklappten) Abschirmgehäuse. Nach Schließen des Gehäuses befindet sich die Antenne senkrecht oberhalb der Messkammer, wobei sie so orientiert ist, dass die Membran direkt unterhalb des Symmetriezentrums der Antenne liegt, deren Polarisationssebene senkrecht zur Membran ausgerichtet ist.

Allgemein kann die Abstrahlung von Antennen über die Leistungsflussdichte S quantifiziert werden. Hierbei gilt

$$S = E \times H = E^2 / Z = P G / 4 \pi r^2$$

Dabei bedeutet E die elektrische Feldstärke, H die magnetische Feldstärke, $Z = 377 \Omega$ den Wellenwiderstand des Vakuums, P die eingespeiste Leistung, G den Gewinn der Antenne und r den betrachteten Abstand von der Antenne. Der Gewinn G (bezogen auf einen isotropen Kugelstrahler) hängt von der Geometrie der Antenne ab. Für die hier verwendete Antennenform ergeben sich Gewinne zwischen etwa 6 dB und 11 dB. Bei der in den Abbildungen dargestellten Antenne wurde er in Freistrahlmessungen in Luft (s. Zwischenbericht) rechnerisch zu $G = 7.8$ dB ermittelt.

Da Feldstärkenmessungen in der aktuellen Messkammer, wie sie durch die patch clamp Anlage dargestellt ist, nur mit Hilfe von sehr kleinen mikrostrukturierten Detektoren möglich wären, die ihrerseits wieder einen Einfluss auf die Feldverteilung selbst haben könnten, wurden sie zunächst an einem im Vergleich zur patch clamp Kammer, ‚makroskopischen‘ Modell untersucht. Dabei wurden die Antennen in der

Nähe eines Glasgefäßes montiert und die Feldstärke in absoluten Einheiten als Funktion des Abstandes von der Antenne mittels einer Diode und einem Feldstärkemessgeräts quantitativ bestimmt. Ein Vergleich dieser Messungen mit einer Simulation unter Zuhilfenahme des Programmpakets 4NEC2 diene dazu, die Gültigkeit unserer Simulationsmethoden auch für den mikroskopischen Fall nachzuweisen. Zur quantitativen Bestimmung der Feldverteilung in einem mikroskopischen Aufbau kann dann auf diese Ergebnisse zurückgegriffen werden.

Obwohl die Abstrahlcharakteristik der Antennenart demnach sehr genau bekannt ist, und Messung und Simulation i.A. sehr gut übereinstimmen, war es uns im Rahmen unseres Projekts dennoch NICHT möglich, quantitative Aussagen über die tatsächlich im Bereich der über das Messloch gespannten Membran erreichten elektrischen Feldstärken in der Messzelle zu erzielen.

Der Grund dafür ist eine Feldverzerrung im Bereich der Messkammer, deren genaue Form und Größe wir im Gegensatz zu den in Abschnitt I.3.2. und II.6. vorgestellten genauen Feldverteilungen nur abschätzen können. Wie im Zwischenbericht ausführlich erläutert, konnten wir zwar den im Angebot spezifizierten Frequenzbereich durch den Einsatz vier verschiedener Antennen (D-Netz 900 MHz, E-Netz 1800 MHz, UMTS 2100 MHz, WLAN 2400 MHz) abdecken, jedoch gelang es uns trotz diverser Skalierungsversuche mit größeren Antennen NICHT, genaue und belastbare Angaben über die erreichten SAR Werte zu machen. Dazu kommt noch, dass besonders für die Antennen im D-, E- und UTMS Bereich die Membran sich auf Grund der baulichen Gegebenheiten im Nahfeld der Antennen befindet.

Nehmen wir jedoch an, dass im freien Raum im Abstand $d = 10$ cm vom Zentrum der Antenne ($f = 2.4$ GHz, Gewinn entlang der Achse $G = 7.8$ dB) bei einer eingespeisten Leistung von $P = +33$ dBm (2000 mW an $Z = 50 \Omega$) eine Feldstärke von $E = 190$ V/m vorliegt, und durch die Messkammer am Ort der Membran eine Feldabschwächung von etwa $1/10$ eintritt, so könnte man für die von uns durchgeführten Messungen (s.u.) im Maximalfall eine elektrische Feldstärke von ca. 20 V/m am Ort der Membran annehmen.

3 Thermodynamische Charakterisierung der künstlichen Membranen mittels Mikrokolorimetrie

Die von uns untersuchten künstlichen Membransysteme wie auch viele andere weisen eine Reihe ausgeprägter Phasenübergänge im Bereich der Raumtemperatur auf. Auch für die Zellmembranen echter biologischer Zellen treten solche Phasenübergänge auf, die jedoch wegen des hier deutlich komplexeren Aufbaus und der Heterogenität der Zellmembranen nicht in dieser Klarheit thermodynamisch charakterisiert werden können. Dennoch ist die Kenntnis über die Rolle der Phase einer Membran für Leitfähigkeits- bzw. Permeabilitätsmessungen ein wichtiger Parameter, der nicht vernachlässigt werden darf.

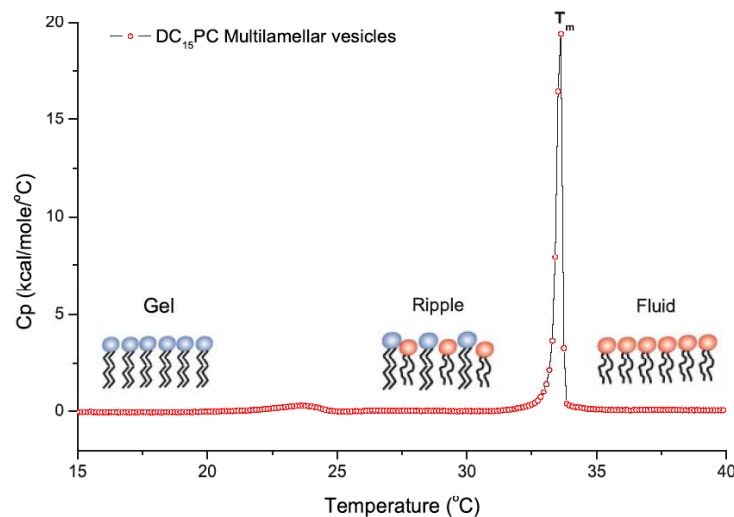


Abb. 3.1: Wärmekapazität von multilaminaren DC15PC Vesikeln als Funktion der Temperatur. Deutlich sind zwei mit Phasenumwandlungen verknüpften Strukturen bei $T = 33^\circ\text{C}$ und $T = 24^\circ\text{C}$ zu erkennen. Im Inset sind schematisch die verantwortlichen Phasen dargestellt.

Ein übliches und hoch empfindliches Verfahren zur thermodynamischen Charakterisierung der Membranen und deren Phasen als Funktion der Temperatur, aber auch anderer Parameter ist die so genannte Mikrokolorimetrie. Hier wird die spezifische Wärmekapazität einer kleinen Stoffmenge z.B. in wässriger Lösung gegenüber der reinen Wassers gemessen. Die Differenz der Wärmekapazitäten ergibt dann die Wärmekapazität der Probe. In der folgenden Abbildung wird schematisch der Aufbau und die Funktion eines Differenziellen Kalorimeters (engl. Differential Scanning Calorimeter, DSC) gezeigt, mit Hilfe dessen die hier vorgestellten Untersuchungen durchgeführt worden sind.

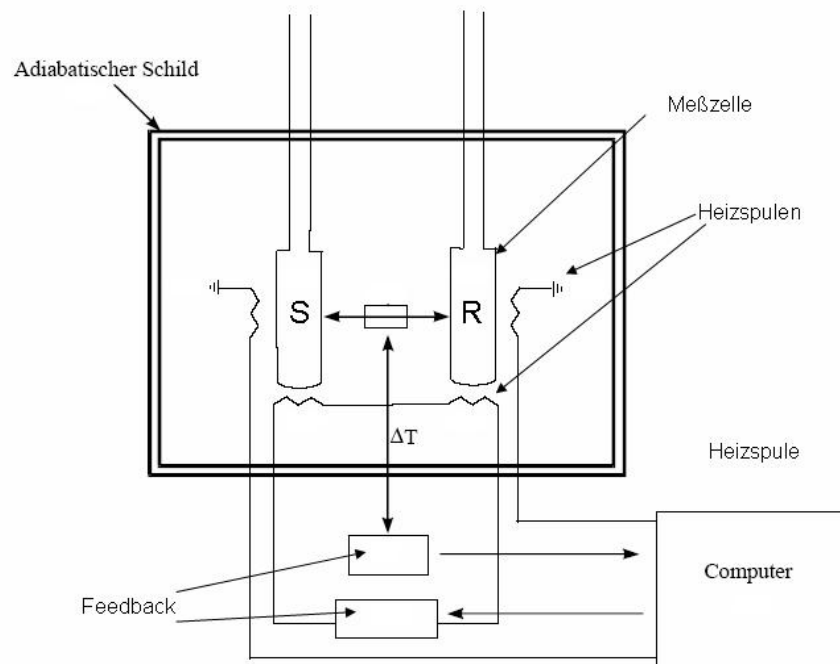


Abb. 3.2: Schematischer Aufbau der DSC. Die gemessene Temperaturdifferenz dient als Feedback und reguliert die differentielle Leistungszufuhr in die beiden Messzellen (Sample und Referenz). Kalorische Umwandlungen können somit exakt bestimmt werden.

Im Bild II.3.3 sind die Wärmekapazitätsprofile für die verschiedenen, im vorliegenden Projekt verwendeten Lipidmembransysteme dargestellt. Man sieht in allen Messungen eine deutliche kalorische Umwandlung, welche auf eine Phasenumwandlung erster Ordnung von einem geordneten in einen ungeordneten Zustand hinweist. Da auch biologische Membranen in diesen Phasen vorliegen, ist eine solche Untersuchung ausgesprochen wichtig, wurde aber bisher im Zusammenhang mit Leitfähigkeitsmessungen praktisch nicht durchgeführt.

Die Abbildungen II.3.3. zeigen hierbei den Einfluss der Kohlenwasserstoffkettenlänge bzw. der Sättigung der Ketten auf die Phasenübergangs-Temperatur T_m . Exemplarisch ist dies für DPPC ($C = 16$) mit $T_m = 41^\circ \text{C}$, DMPC ($C = 14$) mit $T_m = 24^\circ \text{C}$ und Mischungen aus DPPC/DOPC (95/5) und DMPC/D15PC (1/1) illustriert. DMPC zeigt mit einer Kettenlänge von 14 C-Atomen eine Umwandlung bei 24°C während DPPC mit 16 C-Atomen die Hauptumwandlung bei 41°C aufweist. Eine Mischung (1/1) aus DMPC und D15PC ($C = 15$, $T_m = 33^\circ \text{C}$) verhält sich als ideale Mischung und zeigt dann eine Umwandlung bei $T_m = 28^\circ \text{C}$ und einem verbreiterten Peak. Lipide mit einer oder mehreren ungesättigten Bindungen in der Kette, wie DOPC ($C = 18$, $T_m = -22^\circ \text{C}$) weisen bei gleicher Kettenlänge eine wesentlich niedriger Umwandlungstemperatur auf. Durch Zumischung bereits kleiner Mengen dieser Lipide lassen sich somit bereits große Veränderungen im Wärmekapazitätsprofil erreichen, wie in Abb. II.3.3. c gezeigt. Damit lassen sich durch Mischung von Lipiden mit verschiedenen Umwandlungstemperaturen

Umwandlungen bei nahezu jeder Temperatur konstruieren. Die Umwandlungstemperatur sowie der Verlauf der Wärmekapazität sind dabei vollständig durch die freien Schmelz-Enthalpien sowie die Wechselwirkungen im System beschrieben und widerspruchsfrei durch Computersimulationen (Monte Carlo) zu simulieren (Sugar *et al.* 1999). Die physikalischen Eigenschaften dieser Systeme lassen sich als eindeutige Funktionen der Wärmekapazität angeben (Grabitz *et al.* 2002, Heimbürg 1998). Da sich für größer werdende Kettenlängenunterschiede die Mischung aber nicht mehr als ideale Mischung verhält, können sich komplexe Wärmekapazitätsprofile ergeben, die dennoch die oben beschriebenen Eigenschaften haben.

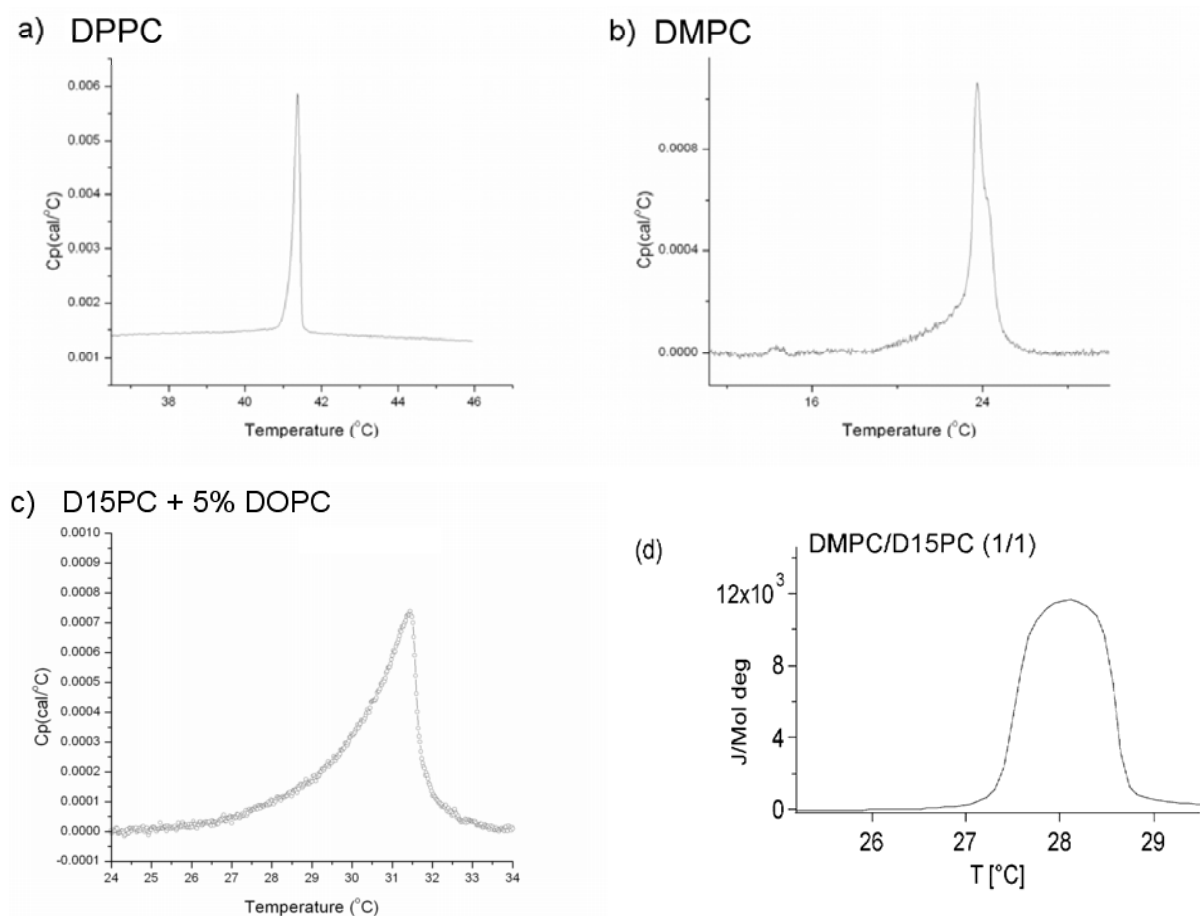


Abb. 3.3: Typische Wärmekapazitätsprofile der vier verwendeten Membransysteme. a) DPPC, b) DMPC und das der biologischen Membran am ähnlichsten D15PC/DOPC im Verhältnis 95/5, (d) DMPC/D15PC (1/1). Man beachte hier die andere Temperaturskala, die die Messkurve scheinbar nicht so scharf erscheinen lässt, wie die in (a) bis (c) gezeigten Messkurven.

4 Permeabilität künstlicher Membranen ohne HF Einstrahlung

Um den Einfluss elektrischer Strahlung auf das Schaltverhalten von Proteinen von dem auf die Membran unterscheiden zu können, und die drei verwendeten Membransysteme elektrisch zu charakterisieren, wurden innerhalb der in Kap. II.2. vorgestellten Messkammer zunächst Permeabilitätsmessungen ohne HF Einstrahlung bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt.

Diese lagen jeweils deutlich oberhalb der Phasenumwandlungstemperatur (also in der fluiden Phase), im Koexistenzbereich zwischen fluiden und gelförmiger Phase und in der Gelphase deutlich unterhalb der Umwandlungstemperatur. Die Strom-Zeitspuren wurden im Allgemeinen über einen Zeitraum von drei Minuten aufgenommen, der besseren Übersichtlichkeit halber werden in den folgenden Abbildungen nur zeitliche Ausschnitte von der Größenordnung einer Sekunde gezeigt.

In Abb. II.4.1. ist exemplarisch die Strom/Zeitspur einer DPPC-Membran bei $T = 20^\circ \text{C}$ (also in der Gelphase) aufgetragen. Wie erwartet, beobachten wir bei den meisten untersuchten Membranen einen zeitlich konstanten Strom (konstante Leitfähigkeit), die Membran verhält sich also wie ein Isolator. Derselbe Befund ergibt sich für DMPC und das Lipidgemisch D15PC/DOPC unterhalb ihres Schmelzpunktes (nicht dargestellt).

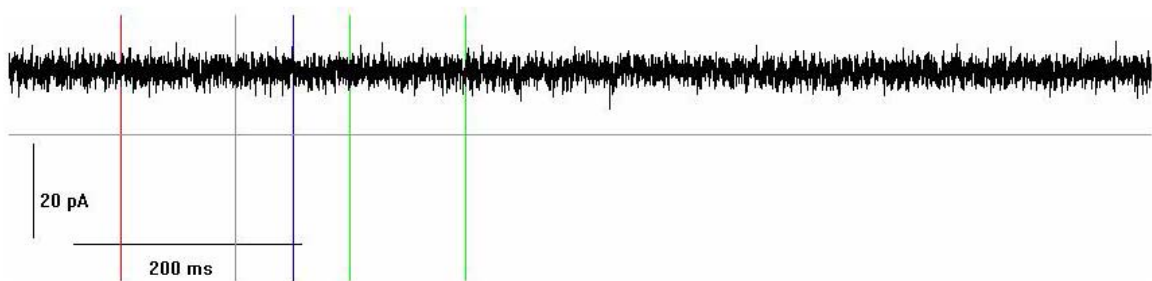


Abb. 4.1: Stromspur einer DPPC Membran in der geordneten (Gel-) Phase bei $T = 20^\circ \text{C}$. Es wird außerhalb der Messgenauigkeit keine zeitliche Veränderung der Leitfähigkeit beobachtet. Die Klemmenspannung beträgt $U = 90 \text{ mV}$.

Da im Verlauf der hier dokumentierten Untersuchungen eine große Zahl solcher Stromspuren aufgenommen wurden, werden im folgendem exemplarisch die Ergebnisse des best geeigneten Systems D15PC/DOPC (95/5) aufgeführt und auf Unterschiede zu den anderen untersuchten Systemen explizit hingewiesen. Die gesammelten Daten für Temperaturen nahe der bzw. oberhalb der Umwandlungstemperatur werden in Abb. II.4.8 und II.4.9. in Form einer statistischen Auswertung dargestellt.

Im nächsten Bild (Abb. II.4.2.) ist die I-t-Spur einer D15PC/DOPC Membran in der fluiden Phase ($T = 38^\circ \text{C}$, also oberhalb der Umwandlungstemperatur) aufgetragen. Im Gegensatz zu der in Abb. II.4.1. dargestellten Spur in der Gelphase beobachtet man deutlich das Auftreten diskreter Leitfähigkeitsereignisse, die statistisch verteilt

zu bestimmten Zeiten auftauchen. Denselben Befund stellen wir in den folgenden Abbildungen – wiederum exemplarisch - für das System DMPC/D15PC und D15PC/DOPC dar.



Abb. 4.2: Stromspuren (I-t) von D15PC/DOPC bei $T = 38^{\circ} \text{C}$ in der fluiden Phase. Es treten Stromspitzen im Bereich von ca. 10 - 20 pA auf. Die Klemmenspannung beträgt $U = 90 \text{ mV}$.



Abb. 4.3: Ausschnitt einer Stromspur von D15PC/DOPC bei $T = 40^{\circ} \text{C}$ in der fluiden Phase. Wiederum treten – wenngleich auch seltener als bei $T = 38^{\circ} \text{C}$ - Stromspitzen im Bereich von ca. 10 – 20 pA auf. Die Klemmenspannung beträgt hier $U = 100 \text{ mV}$.

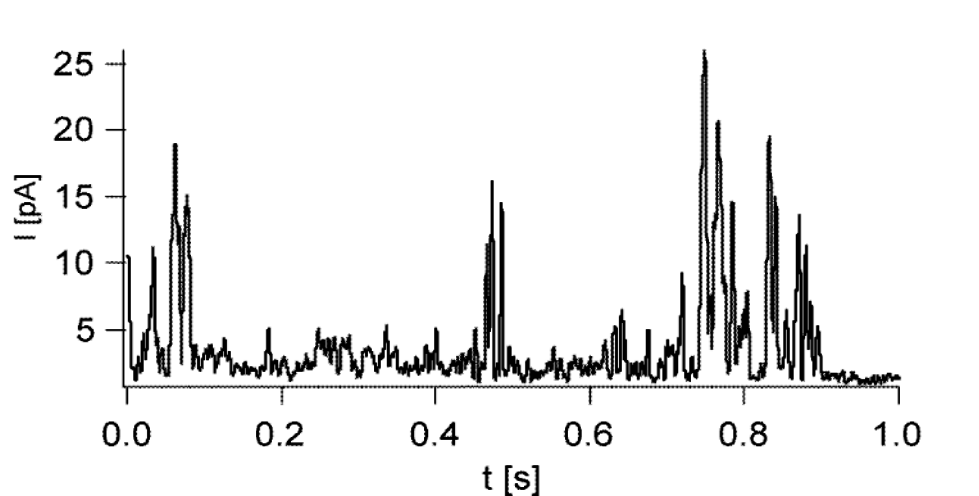


Abb. 4.4: Strom-Zeit-Spur (I-t) von DMPC/D15PC Membranen bei $T = 32^{\circ} \text{C}$, ebenfalls in der fluiden Phase. Auch hier beobachten wir zeitlich statistisch verteilte Stromspitzen von bis zu 25 pA Amplitude. Die Klemmenspannung beträgt $U = 450 \text{ mV}$.

Untersucht man die zeitabhängige Leitfähigkeit der Membranen bei Temperaturen, die innerhalb des Koexistenzbereichs zwischen gelförmiger und fluider Phase liegen, so ergeben sich für alle untersuchten Membranen deutliche Stromsprünge, die bei konstanter Klemmenspannung zwischen mindestens zwei definierten Stromwerten (Leitfähigkeiten) hin- und herschalten. Typische Öffnungszeiten liegen dabei im Bereich einiger Millisekunden bis zu 100 msec. Exemplarisch stellen wir einige solcher Messungen für zwei verschiedene Membransysteme in den folgenden Abbildungen dar:

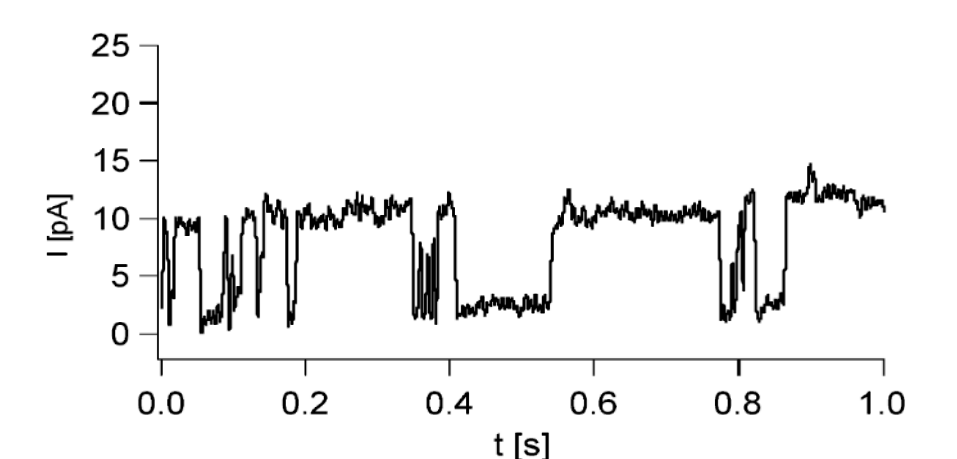


Abb. 4.5: Ausschnitte eines über insgesamt $\Delta t = 180$ sec aufgenommenen Strom-Zeitverlauf einer DMPC/D15PC (1/1) Membran. Die Membran befindet sich mit $T = 28^\circ \text{C}$ in der **Koexistenz-Phase** zwischen Gel und Fluid. Die Klemmspannung betrug $U = 600$ mV.

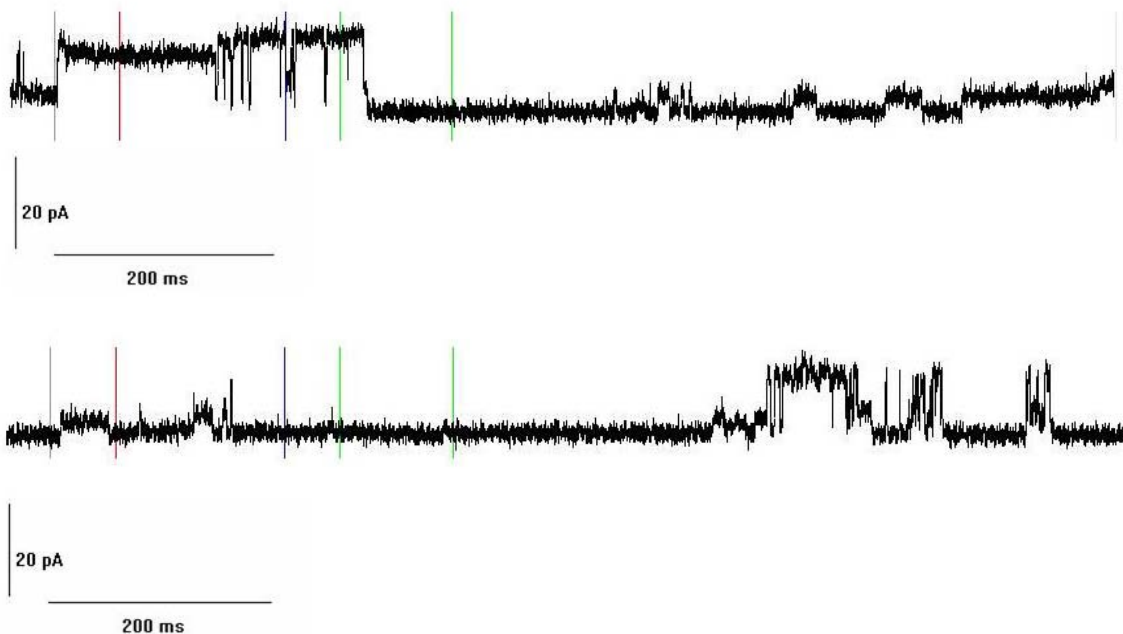


Abb. 4.6: Ausschnitte aus über insgesamt $\Delta t = 3$ Minuten aufgenommenen Stromspuren (I-t) von D15PC/DOPC bei: 30°C (oben) und 33°C (unten) in der **Koexistenzphase** zwischen Gel und Fluid. Klemmspannung wiederum $U = 100$ mV.

Um den Mechanismus der beobachteten Stromoszillationen näher zu beleuchten, werden im Folgenden Leitfähigkeitsmessungen an D15PC/DOPC bei verschiedenen angelegten Klemmspannungen U dargestellt. Die Membran befindet sich dabei in der fluiden Phase. Es fällt auf, dass die beobachteten Leitfähigkeits-„Oszillationen“ erst oberhalb einer bestimmten Schwellenspannung auftreten.

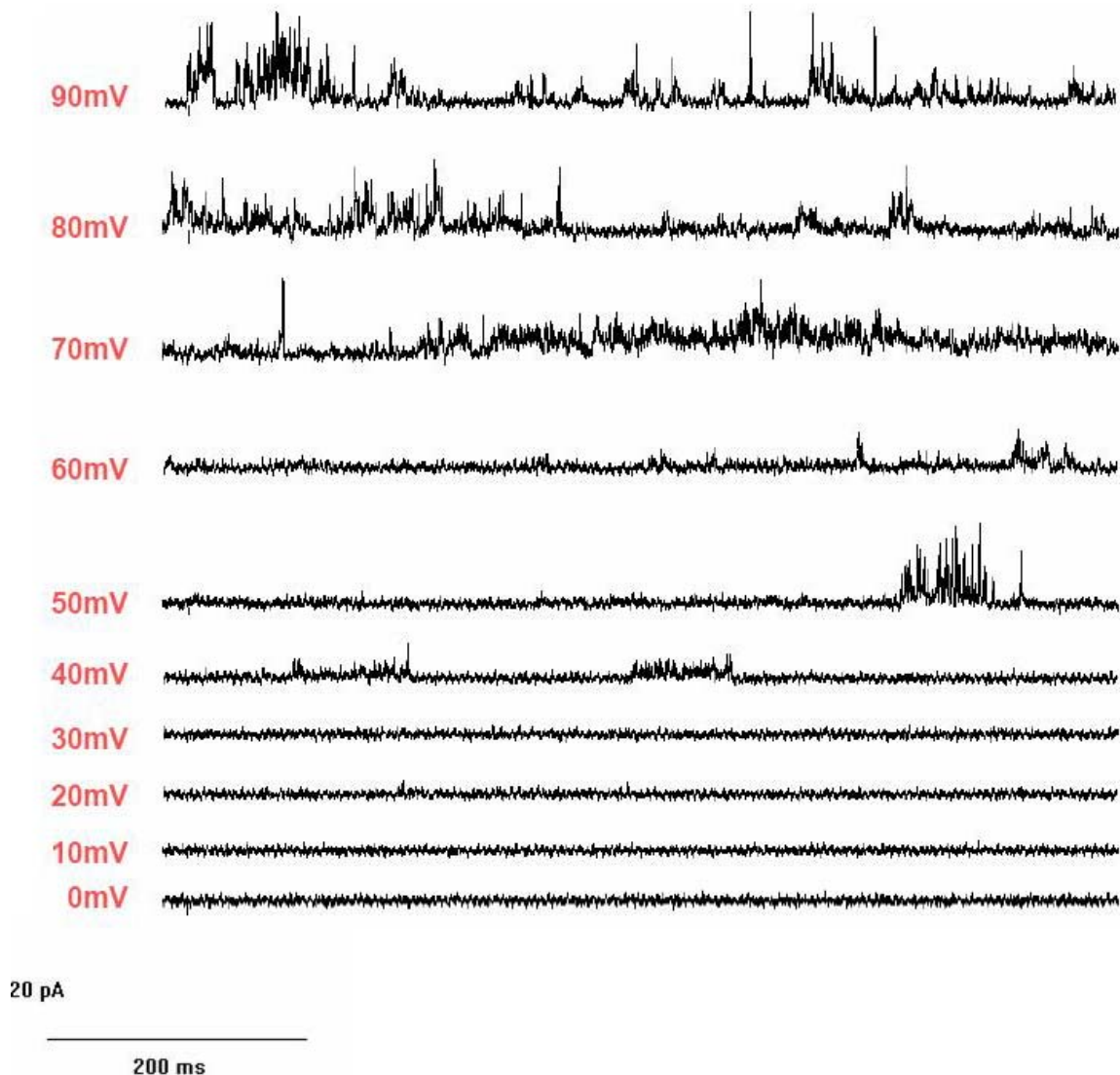


Abb. 4.7: Zeitliche Ausschnitte aus Stromspuren (I-t) von D15PC/DOPC bei verschiedenen angelegten Klemmspannungen. Die Membran befindet sich bei $T = 39^\circ \text{C}$ in der fluiden Phase.

Wie bereits im Zwischenbericht dargestellt, legen unsere Untersuchungen der Permeabilität künstlicher Membranen nahe, dass es sich bei den auftretenden Stromspitzen und Leitfähigkeitsoszillationen um Effekte der Elektroporation handelt. Hier werden oberhalb einer bestimmten Klemmspannung kleine Poren in der Membran geöffnet, die dann die beiden mit Elektrolyt gefüllten Kompartimente der Messzelle verbinden. Dabei scheint das System innerhalb der Koexistenzphase zwischen Gel und Fluid eine besondere Porengröße zu bevorzugen, deren

Leitfähigkeit sich in der beobachteten „Quantisierung“ der Leitfähigkeiten manifestiert. Bemerkenswert ist hierbei, dass ähnliche „quantisierte“ Stromfluktuationen auch an PTFE Filtern (Lev *et al.* 1993) mit nanoskopischen Poren und sogar bei „patch clamp“ Messungen an Gummimembranen beobachtet werden konnten! (Sachs und Qin 1993). Dies lässt darauf schließen, dass der dort zu Grunde liegende Mechanismus allein in der Größenordnung der Poren zu suchen ist, die sich in der gleichen Größenordnung der Poren in Membranen befindet. Die Tatsache, dass Leitfähigkeitsoszillationen während einer Messung durchaus mindestens zwei, aber wohl definierte Werte aufweisen, könnte damit zusammen hängen, dass sich während der Messung nicht nur eine einzige, sondern zwei oder mehrere Poren öffnen, deren Leitwerte sich dann addieren. Zurzeit ist der genaue Mechanismus der Leitfähigkeits-„Quantisierung“ jedoch noch nicht verstanden.

Überraschend ist dabei die Tatsache, dass sowohl die beobachteten Öffnungszeiten als auch die Größenordnungen der Stromoszillationen denen aus der Biologie bekannten Größenordnungen in Leitfähigkeit und Öffnungszeit (pS, msec) bei patch clamp Messungen entsprechen. Dies zeigt die große Bedeutung der hier durchgeführten Messungen, da die Interpretation von am lebenden System gewonnenen Daten somit leicht auf falsche Ursachen zurückgeführt werden könnten.

Im Folgenden werden die in Kapitel II.4. gewonnenen Daten in Form einer statistischen Auswertung am Beispiel DMPC/D15PC und die Messungen aus den Abbildungen II.4.4. und II.4.5. für zwei verschiedene Temperaturen zusammengefasst. In Abb. II.4.8. stellen wir die Häufigkeitsverteilung der gemessenen Leitfähigkeiten (gemessener Strom / Klemmenspannung) für die fluide Phase ($T = 32^\circ \text{C}$) und für den Koexistenzbereich ($T = 28^\circ \text{C}$) dar. Es wurden hier die den Abbildungen II.4.4. und II.4.5. entsprechenden Strom-Zeitspuren über das gesamte Messintervall ($\Delta t = 3 \text{ min.}$) ausgewertet.

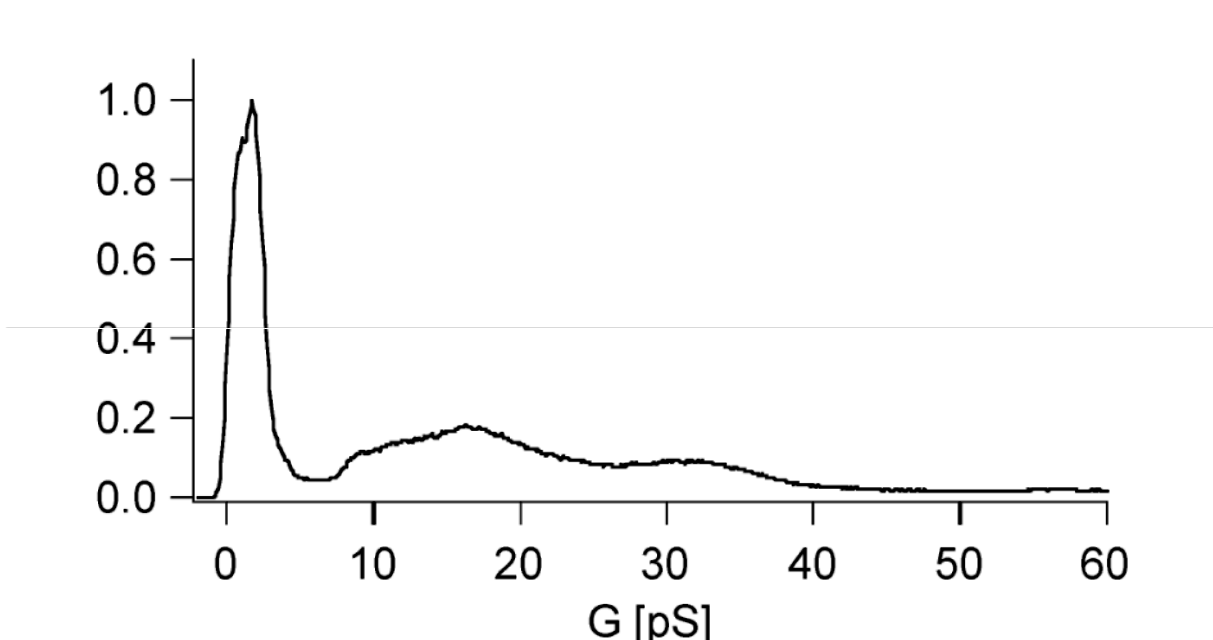


Abb. 4.8: Normierte Häufigkeitsverteilung der in Abb. II.4.4. als Ausschnitt dargestellten Leitwerte $G = I/U$ für eine DMPC/D15PC Membranen bei $T = 32^\circ \text{C}$, in der fluiden Phase.

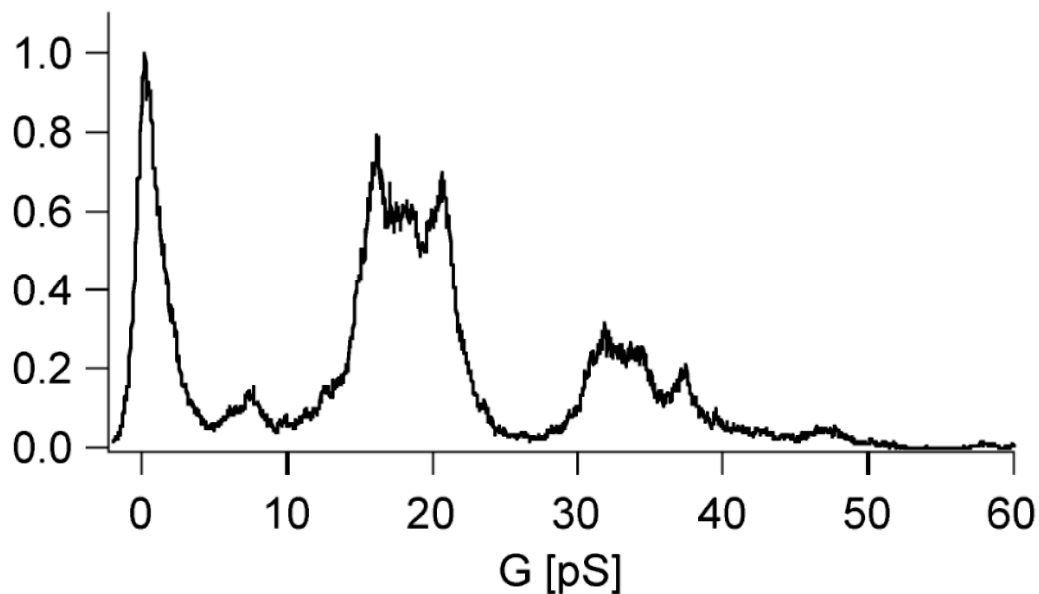


Abb. 4.9: Normierte Häufigkeitsverteilung der in Abb. II.4.5 als Ausschnitt dargestellten Leitwerte $G = I/U$ für eine DMPC/D15PC Membranen bei $T = 28^\circ \text{C}$, in der Koexistenzbereich zwischen Gel und Fluid. Hier sind deutlich die „quantisierten“ Leitwerte zu erkennen, die wir auf eine bevorzugte Porengröße während der Messung zurückführen. Das Auftreten auch negativer Leitwerte erklärt sich durch die Art der Histogrammbildung, die auch bisweilen während der drei Minuten Messzeit auftretende Rauschevents mit negativen Strömen erfasst.

Deutlich zu erkennen ist in den beiden vorhergehenden Abbildungen, dass trotz des Fehlens von Ionenkanälen in den künstlichen Membranen eine zeitlich variable Leitfähigkeit auftreten kann, die typischen Strom-Zeitspuren bei patch clamp Messungen sehr stark ähneln. Insbesondere im Bereich der Phasenumwandlung bzw. im Koexistenzbereich zwischen Gel- und Fluidphase treten diskrete Leitfähigkeitsereignisse auf, die wir auf eine elektrisch induzierte Porenbildung in den Membranen zurückführen. Dabei zeigen statistische Auswertungen, dass bestimmte Porengrößen bevorzugt auftreten. Der physikalische Grund dafür ist zurzeit nicht bekannt und wird gegenwärtig intensiv untersucht.

Weiteren Einblick in das Öffnungsverhalten oberhalb einer gewissen Schwellspannung liefert die so genannte I-U Kennlinie, bei der der Strom durch die Membran nach Anlegen einer konstanten Klemmenspannung über eine gewisse Zeit (hier $\Delta t = 400 \text{ msec}$) als Funktion eben dieser Spannung aufgetragen wird. In Abb. II.4.10 (a) sind einige auf diese Weise ermittelte Ableitungen dargestellt. 150 msec vor Ende des Spannungspulses wird dann nach Erreichen einer Sättigung der Strom über $\Delta t = 100 \text{ msec}$ gemittelt. In Abb. II.4.10. (b) zeigen wir diese Auswertung in Form einer U-I Kennlinie. Hierbei bedeutet jeder Datenpunkt das Ergebnis der beschriebenen Mittelung einer in (a) dargestellten Ableitung.

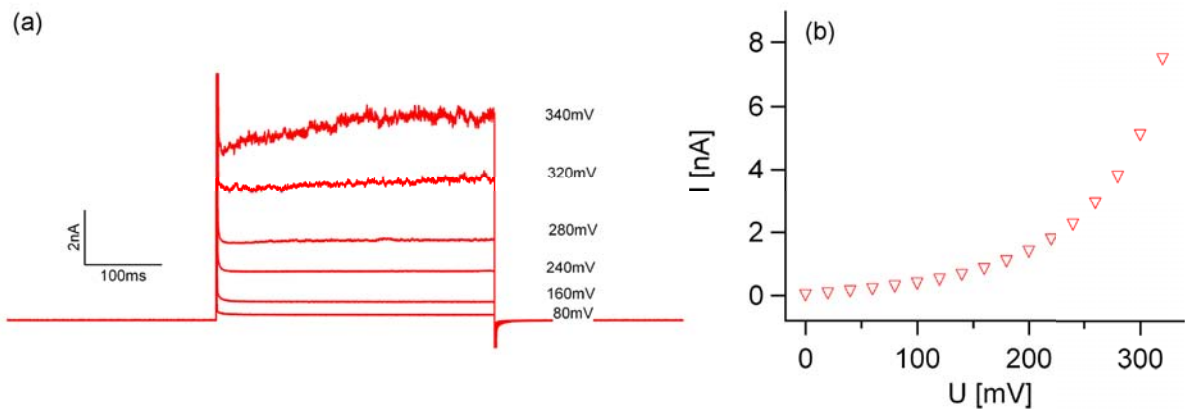


Abb. 4.10: (a) Stromantwort einer D15PC/DMPC (1/1) Membran auf 400 msec lange Klemmenspannungspulse. (b) Über 100 msec gemittelter Strom der Ableitungen aus (a), die Mittelung wurde 150 msec vor Beendigung des Klemmenspannungspulses begonnen. Die Membran befand sich während der Messung bei $T = 32^\circ \text{C}$ in der fluiden Phase.

Vergleich man diese U-I Kennlinie mit den in Abb. II.4.7. gemessenen Stromspuren an einer D15PC/DOPC Membran (9/1), so erkennt man eine im Vergleich zu Abb. II.4.10. andere Schwellspannung, oberhalb derer Öffnungsereignisse auftreten. Diese Schwellspannung hängt stark von der Präparation der Membranen und dem sich dadurch einstellenden Membranwiderstand für kleine Klemmenspannungen ab, der wiederum von Präparation zu Präparation streut. Eine belastbare funktionale Abhängigkeit kann jedoch hierfür nicht angegeben werden.

Der oben bereits angesprochene Zusammenhang zwischen der Leitfähigkeit künstlicher Membranen und deren thermodynamischem Verhalten ist sehr schön auch in der Abbildung II.4.11. zu erkennen. Hier wurde in (a) der über eine Sekunde gemittelte Strom durch eine D15PC/DOPC Membran zusammen mit deren Wärmekapazitätsprofil als Funktion der Temperatur aufgezeichnet.

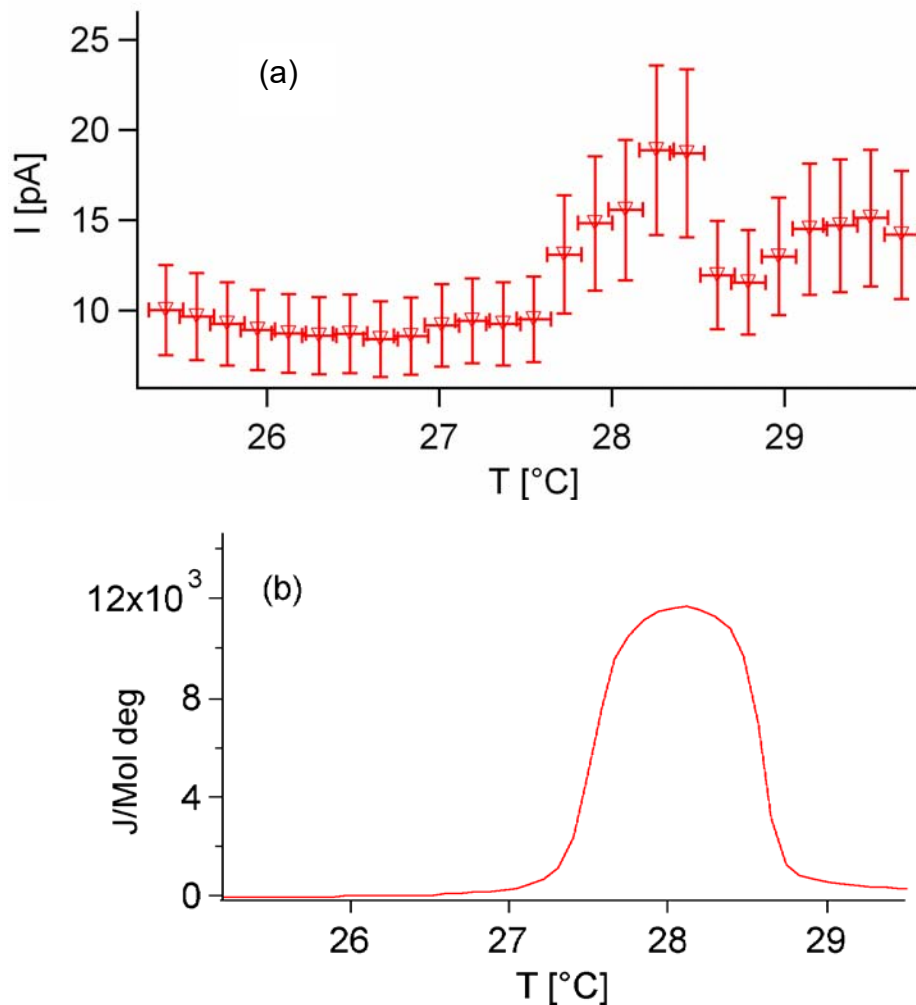


Abb. 4.11: Stromfluss durch die Membran, berechnet aus dem über eine Sekunde gemittelten Strom von DMPC/D15PC (1/1) als Funktion der Temperatur. Zum Vergleich das Wärmekapazitätsprofil desselben Lipidgemisches. Deutlich ist zu erkennen, dass die Membran insbesondere im Bereich der Koexistenz zwischen geordneter und ungeordneter Phase leitfähig wird.

Analysiert man neben den durch die Membran fließenden Strömen, die wir auf eine (Elektro-) Poration der Membran zurückführen, auch noch die Öffnungszeiten dieser Poren, so erkennt man deutlich, dass diese ebenfalls im Bereich der Koexistenz, also um die Phasenumwandlungstemperatur herum, deutlich zunehmen. In Abb. II.4.12. tragen wir die Häufigkeit dieser Öffnungszeiten in Histogrammform für zwei verschiedene Temperaturen (a: Fluide Phase, $T = 33^\circ \text{C}$. b: Koexistenz, $T = 28^\circ \text{C}$) auf.

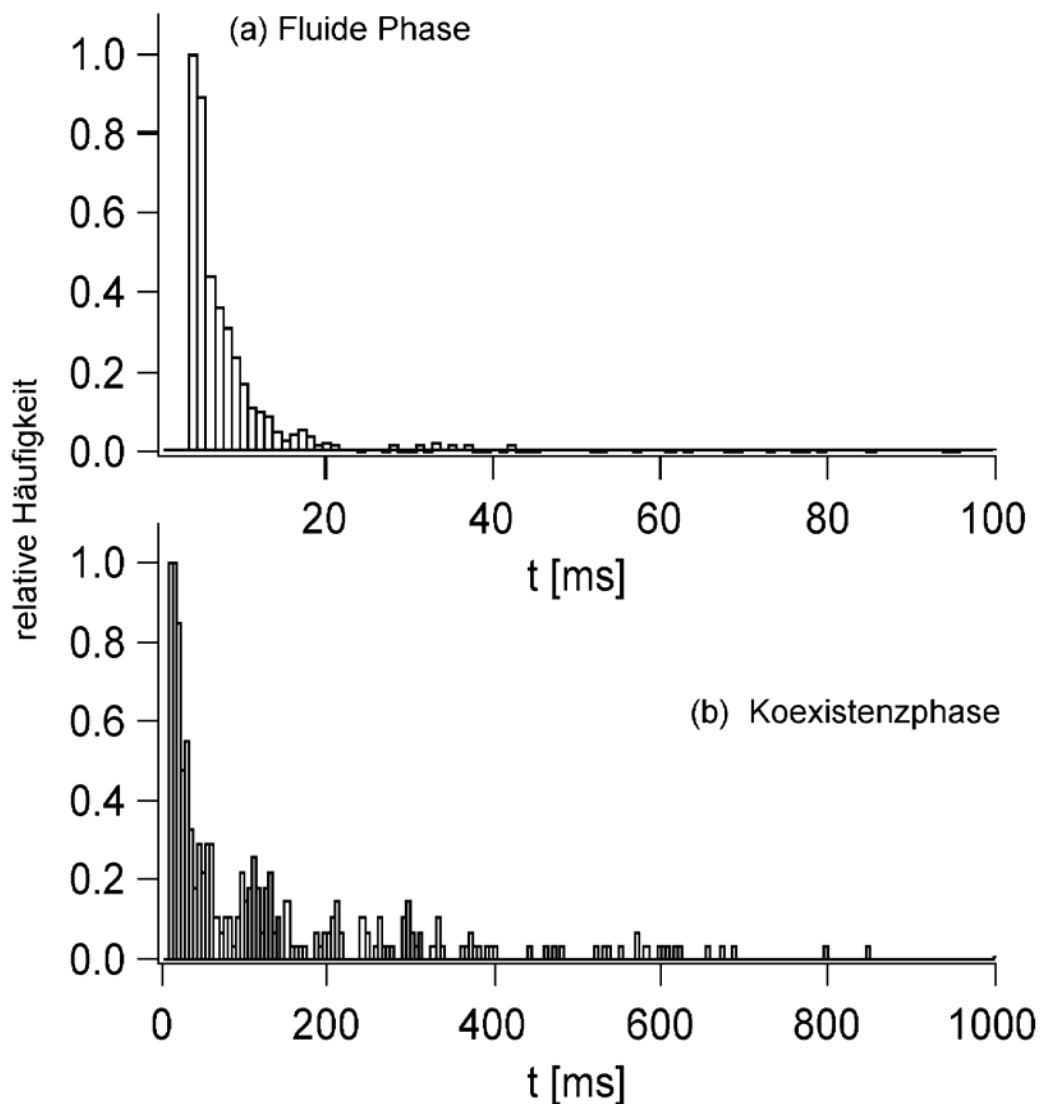


Abb. 4.12: Relative Häufigkeiten der über einen Zeitraum von 3 Minuten gemessenen Stromfluktuationen (vgl. Abb. II.4.4., II.4.5. und II.4.6.) für eine DMPC/D15PC Membran. In (a) sind die Öffnungszeiten für die fluide Phase ($T=32^{\circ}\text{C}$) dargestellt, in (b) zeigen wir die relativen Häufigkeiten der Öffnungszeiten im Bereich der Koexistenz ($T = 28^{\circ}\text{C}$). Man beobachtet hier (b) eine Zunahme der Öffnungszeiten um etwa einen Faktor 10 im Vergleich zu (a).

Die Ergebnisse der in den Abbildung II.4.11. und II.4.12. dargestellten Messungen legen die Vermutung nahe, dass sowohl die Stromamplituden $\langle I \rangle$ als auch die Öffnungs- bzw. typischer Relaxationszeiten τ der gemessenen Wärmekapazität c_p als Funktion der Temperatur folgen, bzw. eine ähnliche Temperaturabhängigkeit aufweisen. Nehmen wir der Einfachheit halber an, dass sie einander proportional sind (was hier eine starke Vereinfachung bedeutet, aber in erster Näherung sicherlich Gültigkeit besitzt),

$$c_p \sim \langle I \rangle \sim \tau$$

so bestätigen unsere Ergebnisse eine kürzlich publizierte Arbeit von Grabit *et al.* (2002) auf mikroskopischer Ebene.

Gehen wir weiter modellhaft davon aus, dass die entstehenden Fluktuationen in der Fläche umso länger benötigen, je größer die eingeschlossenen Areale werden, so können wir einen Zusammenhang zwischen Wärmekapazität und Relaxationszeit motivieren. Für Fluktuationen der Fläche A wiederum gilt (Einstein 1910):

$$\langle \partial A^2 \rangle = -Ak_B T \kappa_T \quad (2)$$

d.h. die Fluktuationen sind proportional der Kompressibilität κ . Deswegen erwartet man für ein Maximum in κ auch ein Maximum in den Flächenfluktuationen und damit in der Relaxationszeit. Bekannt ist, dass Kompressibilität κ und Wärmekapazität c_p in der Nähe der Phasenumwandlung proportional sind (Heimburg 1998). Daraus ergibt sich die Proportionalität zwischen Wärmekapazität und Relaxationszeit und damit die starke Zunahme der Öffnungszeiten während der Phasenumwandlung, so wie wir sie sowohl auf mikroskopischer Ebene als auch in den dielektrischen Messungen der AG Loidl gefunden haben.

Ferner nehmen in der Phasenumwandlung auf Grund der Domänenstruktur die Längen der Grenzlinie zwischen den beiden Phasen stark zu (Cruzio-Hansson *et al.* 1989). Dies ist mit einer Erhöhung der Defektrate korreliert und lässt somit auch eine Erhöhung in der Permeabilität erwarten, indem Ionen an den Phasenrändern (Defekten) durch die isolierende Membran permeieren. Dies ist konsistent mit der oben gemachten Annahme eines proportionalen Zusammenhangs zwischen diesen Größen.

Die „Quantisierung“ der Stromereignisse jedoch kann bisher nicht zufrieden stellend erklärt werden. Stützt man sich allein auf geometrische Überlegungen, so kommen bestimmte Porengrößen offenbar häufiger vor, als andere. Vermutet wird ein enger Zusammenhang zur Wasserstruktur an der Membran/Wasser-Grenzfläche.

5 Permeabilitätsmessungen an künstlichen Membranen unter HF Einstrahlung

Nachdem in den vorigen Kapiteln die von uns hergestellten künstlichen Membranen hinsichtlich ihrer elektrischen und thermodynamischen Eigenschaften charakterisiert worden sind, wurden sie in der im Kapitel II.2. beschriebenen Messzelle einer hochfrequenten Wechselspannung ausgesetzt. Dabei verwendeten wir die ebenfalls in Kapitel II.2. beschriebene Antennenanordnung. Es soll bereits an dieser Stelle festgestellt werden, dass im Rahmen unserer Messgenauigkeit *keinerlei* Einfluss einer HF-Bestrahlung auf die Membranen für sämtliche untersuchte Frequenzen (900 MHz, 1800 MHz, 2400 MHz) und Leistungen (-10 dBm bis +18 dBm) beobachtet werden konnten. Für noch höhere Leistungen konnten keine aussagekräftigen Messungen mehr gemacht werden, da hier trotz der Schirmung ein Übersprechen der Hochfrequenz auf die Messleitungen bzw. Messelektronik die Membran-Leitfähigkeitsmessungen überlagerten.

In Abb. II.5.1. zeigen wir stellvertretend für eine Vielzahl von Messungen bei verschiedenen Frequenzen eine typische Stromspur, die bei $f = 900$ MHz und $P = +18$ dBm an einer DMPC/D15PC Membran in der fluiden Phase ($T = 32^\circ \text{C}$) durchgeführt worden ist. Auf die Darstellung anderer Messungen bei den anderen Frequenzen und Leistungen wird hier verzichtet, da die Messungen im Wesentlichen dieselben Ergebnisse brachten, wie die ausführlich im vorigen Kapitel diskutierten.

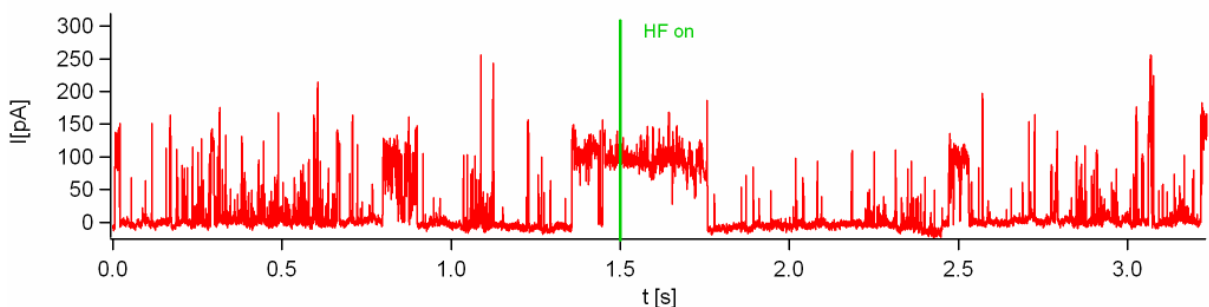


Abb. 5.1: Stromspur einer künstlichen Membran, die für Zeiten jenseits der grünen Marke bei $f = 900$ MHz und $P = +18$ dBm an einer DMPC/D15PC Mischung in der fluiden Phase ($T = 32^\circ \text{C}$) durchgeführt worden ist. Deutlich sind die oben beschriebenen Stromfluktuationen zu erkennen, deren typische Amplituden und Öffnungszeiten sich auch nach dem Einschalten der HF nicht ändern.

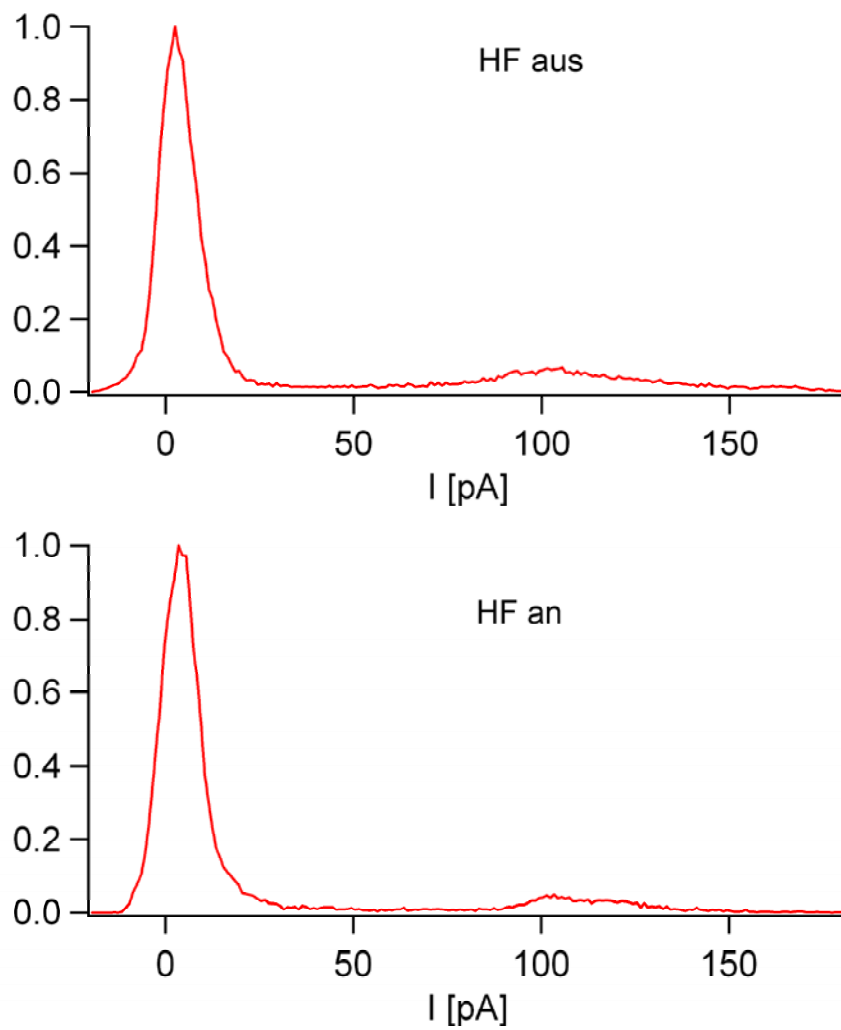


Abb. 5.2: Amplitudenhistogramme der in Abb. II.5.1. gezeigten Messung vor und nach dem Einschalten einer HF ($f = 900$ MHz, $P = +18$ dBm). Im Rahmen unserer Messgenauigkeit ist keinerlei Einfluss der HF auf die Membranleitfähigkeit zu erkennen.

6 Aufbau und Charakterisierung der patch clamp Anlage mit HF Einstrahlung

Im Fokus stand hier die Untersuchung von Ionenströmen mit Hilfe der patch-clamp Technik unter Einstrahlung verschiedener Hochfrequenz-Signale. Hierzu wurde neben einigen (erfolglosen bzw. unbefriedigenden) Versuchen insbesondere die Einstrahlgeometrie betreffend, schließlich ein planarer Aufbau mit koaxialer Hochfrequenz Einstrahlung gewählt. Die Versuche zur Freistrahleinkopplung mit Antennen (vgl. Kap II.2.) lieferten keine verlässlichen Daten zur elektrischen Feldverteilung und –stärke im Bereich der patch clamp Zelle. Versuche mit einer Mikrostreifenleitung (vgl. auch Loidl *et al.* 2007) ergaben, dass die in unserem Hause verwendeten Technologien nicht optimal kompatibel zu den Anforderungen der hier durchgeführten Arbeiten sind. Durch die lithografische Definition der Mikrostreifenleitung wird die patch clamp Öffnung in den von uns verwendeten planaren Chips nicht reproduzierbar und stark in Mitleidenschaft gezogen. Die im Zwischenbericht erwähnten Untersuchungen zur HF Einstrahlung mittels akustischer Oberflächenwellen lassen ebenfalls nur sehr bedingt Rückschlüsse auf die elektrischen Feldstärken zu.

Aus diesen Gründen haben wir uns schließlich für die Durchführung auf eine der im Berichtsteil I (Dielektrische Untersuchungen) ähnliche Art der HF Einstrahlung konzentriert, wobei die hochfrequenten Wechselfelder **mittels einer Koaxialanordnung** definiert an den Ort der patch clamp Probe und der untersuchten Zellen gebracht werden können.

In Abbildung II.6.1 ist der prinzipielle Aufbau der planaren Patch Clamp Anlage mit HF Quelle dargestellt. Im Gegensatz zur konventionellen patch clamp Technik, bei der eine Mikropipette mittels eines Mikromanipulators unter Beobachtung im Mikroskop langsam an die Zelle herangeführt wird (Sakmann & Neher 1995), wird im Aufbau nach Fertig *et al.* (Fertig *et al.* 2001) die Pipette durch einen planaren Chip, in den ein ca. 1 μm großes Loch präpariert wurde, ersetzt. Die eingesetzten Pikoampere-Messverstärker sind im Prinzip identisch zu denen bei der klassischen Patch Clamp Technik verwendeten.

In einer der von uns durchgeführten dielektrischen Spektroskopie ähnlichen Geometrie wird das hochfrequente Wechselfeld jetzt durch ein Koaxialkabel mit offenem Ende appliziert (Stuchly und Stuchly 1980). Dieser Ansatz erlaubt vor allem eine flexible Anordnung der Komponenten, leichte Zugänglichkeit zum Medium sowie die Möglichkeit, die hochfrequente Strahlung mit großer Frequenz- und Amplitudendynamik einzustrahlen. Die Hochfrequenz wird über einen HF-Generator der Firma Agilent (Modell 83650B) in die Apparatur eingekoppelt, der Generator wiederum kann mit Hilfe eines PC kontrolliert werden. Ein Modulator erzeugt zunächst ein mit 20 Hz modulierte HF-Signal, welches als Referenz für eine phasenempfindliche vektorielle Lock-In Messung dient. Der Patch-Clamp Verstärker gibt vom PC gesteuert verschiedene konstante Klemmspannungen vor und misst den entsprechenden Strom im Pikoamperebereich (Voltage Clamp Anordnung). Der resultierende Strom wird zunächst vom Patch-Clamp Verstärker amplifiziert und dann

zum einen direkt („Rohsignal“) und zum anderen über den Lock-In verstärkt vom PC aufgezeichnet. Eine empfindliche Rohsignal-Aufzeichnung erlaubt neben periodisch modulierten Signalformen (Lock In Messung) auch andere Modulationsformen, wie sie zum Beispiel in der Mobiltelefonie Einsatz finden.

Das Ende des Koaxialkabels (Einstrahlquelle) befindet sich in den hier vorgestellten Messungen ca. 100 μm oberhalb der „geclampten“ Zelle.

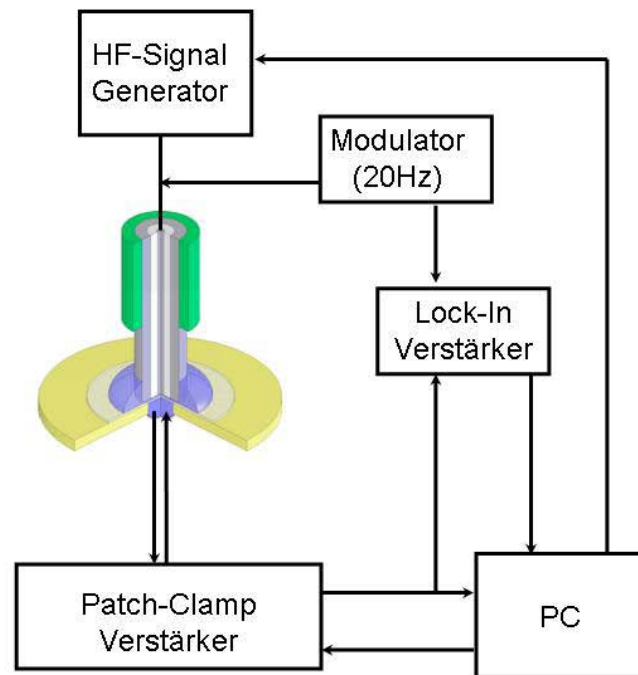


Abb. 6.1: Planarer patch clamp Aufbau mit HF-Einstrahlung. Mit Hilfe eines offenen Koaxialkabels ca. 100 μm oberhalb der Zelle können Frequenzen zwischen 900 MHz und 33 GHz eingestrahlt werden. Um ein verbessertes Signal/Rausch Verhältnis zu erlangen wird neben „Rohmessungen“ auch die Lock-In Technik eingesetzt.

In Abbildung II.6.2. ist die Antennenanordnung genauer beschrieben. Der Innen- und Außenleiter eines Koaxialkabels mit offenem Ende sind durch einen Teflonspaceer voneinander getrennt. Das Ende des Kabels befindet sich 100 μm oberhalb das „patch Loches“ (ca. 2 μm) welches in eine dünne Glasscheibe geätzt ist (Nanji[on, München). Die zu untersuchende Zelle wird im Elektrolyten schwimmend durch einen leichten Unterdruck auf dem „patch Loch“ immobilisiert. Der so genannte „giga seal“, der letztendlich möglicherweise auftretende Leckströme bestimmt, wird durch ein Zusammenspiel von Oberflächeneigenschaften des Glases und angelegtem Druck erreicht. Ein möglichst hoher parasitärer Widerstand („giga seal“) ist für eine erfolgreiche Messung unerlässlich (s. weiter unten).

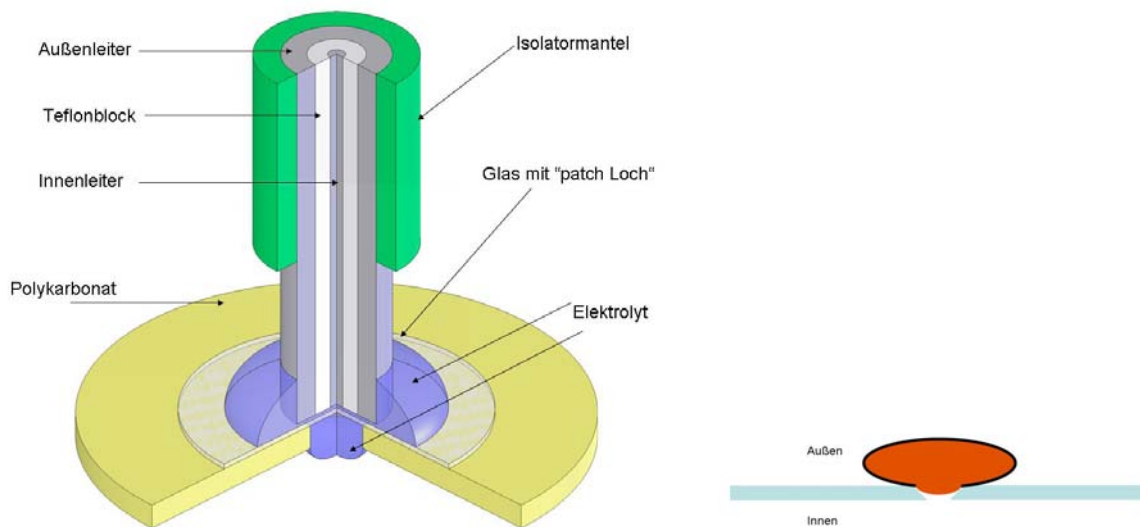


Abb. 6.2: Links: Antennendesign mittels am Ende offenen Koaxialkabel zur HF-Einstrahlung. Rechts: Zelle angesaugt auf der Apertur („patch Loch“). Die schwarze Umrandung soll die Plasmamembran symbolisieren. Diese ist am Loch (patch) geöffnet worden („whole cell“ Verfahren).

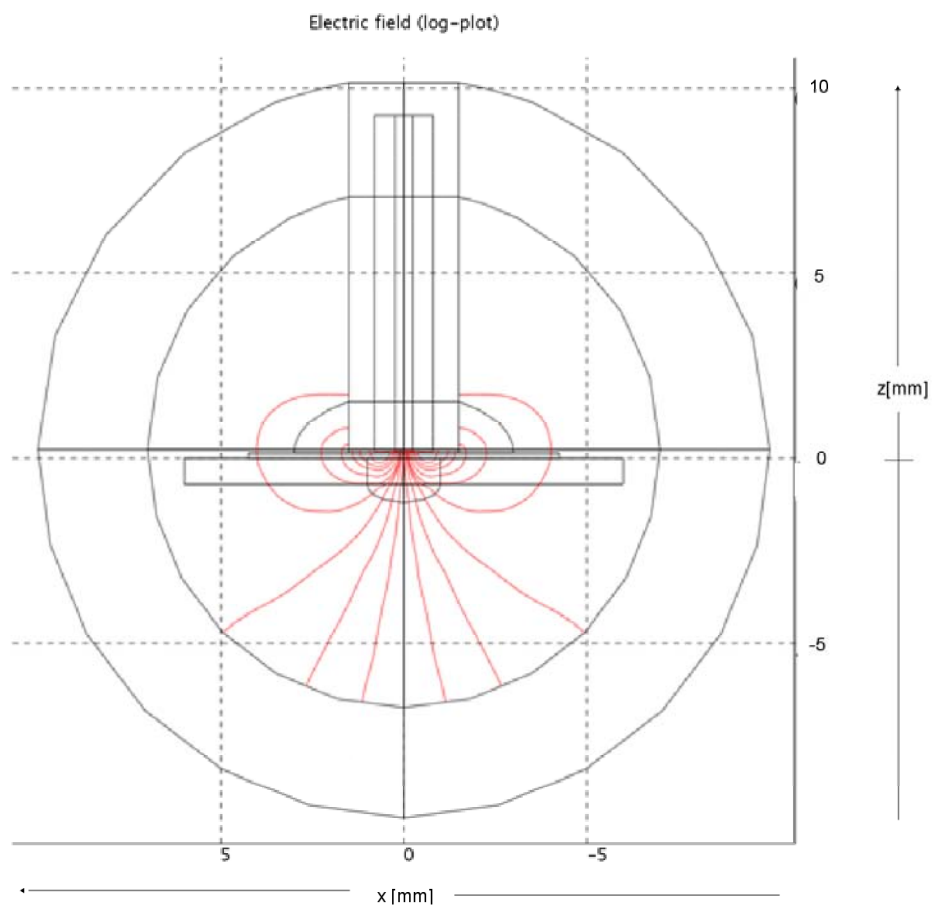


Abb. 6.3: Zur Berechnung verwendete Geometrie (FEM Modell) der an einem Ende offenen Koaxialleitung in unmittelbarer Nähe der patch clamp Messzelle.

Die letztendlich verwendete Koaxialanordnung zur Einstrahlung hochfrequenter Signale zeichnet sich durch kleine Baugröße, Flexibilität und relativ einfache theoretische Beschreibbarkeit aus. In Abbildung II.6.3. stellen wir das für die auf Finiten Elementen beruhende Simulation der Feldverteilung verwendete FEM Modell dar. Die an ihrem Ende offene Koaxialleitung (vgl. Abb. II.6.2.) wird geometrisch und dielektrisch korrekt parametrisiert. Zur Vereinfachung der Simulation der Feldverteilung im Nahfeld des offenen Endes wird eine virtuelle perfekt absorbierende Kugel in großem Abstand vom Kabelende und somit von der Messzelle eingeführt. Auf diese Weise können Effekte höherer Ordnung, wie Reflexionen, Interferenzen etc. in der Simulation unterdrückt werden.

In dieser und der folgenden Abbildung erkennt man neben der Koaxialleitung auch direkt darunter das Glassubstrat mit der patch clamp Öffnung sowie ein Polycarbonat-Probenhalter. Aufgrund ihrer Kleinheit im Vergleich zur Wellenlänge und anderen charakteristischen Größen des Systems wurde die patch clamp Öffnung in der Simulation hier zunächst selber *nicht* berücksichtigt. Dies wird allerdings später in einer etwas vereinfachten Simulation nachgeholt (vgl. Abb. II.6.6.). Die Probenkammer unterhalb der patch clamp Öffnung wurde – wie im Experiment auch – für die Simulation mit Wasser befüllt und in Form eines hängenden Tropfens mit konvexer Oberfläche modelliert. Der Rest der Messzelle ist im Experiment und der Simulation mit Luft befüllt.

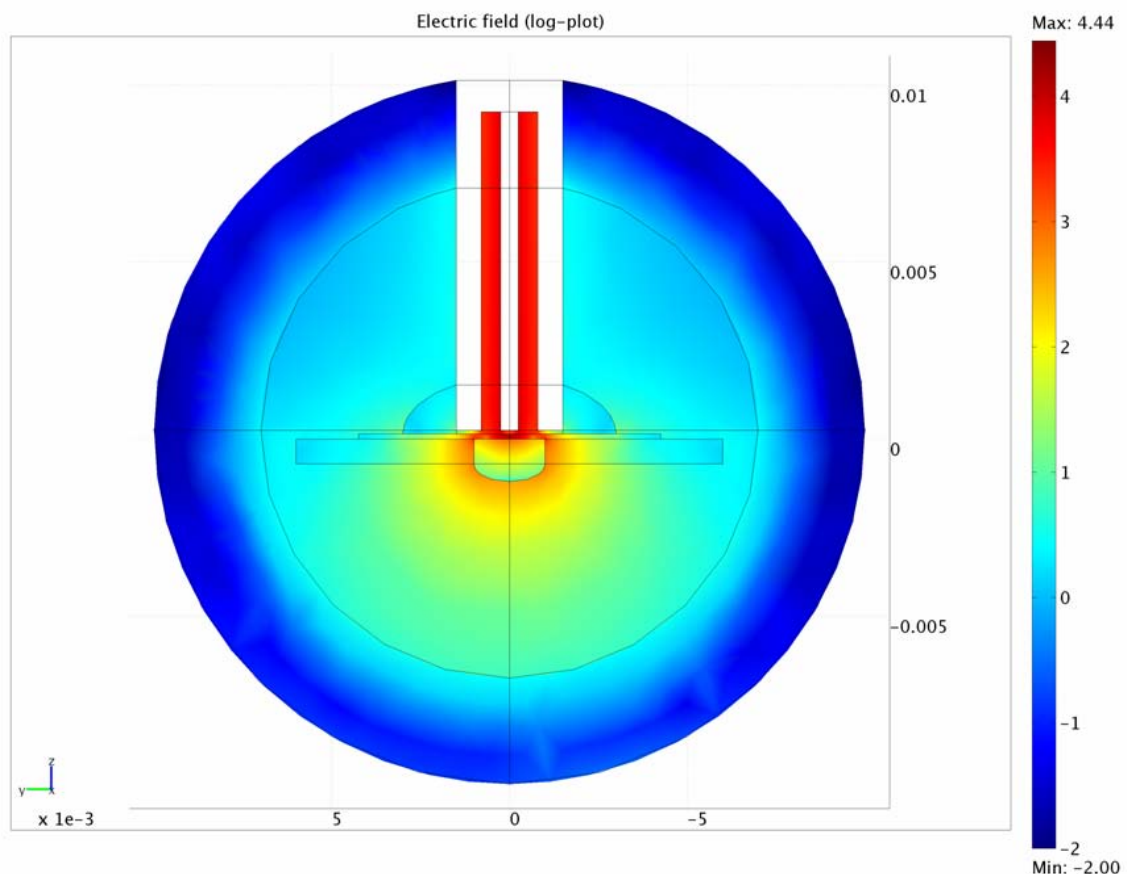


Abb. 6.4: Für die in Abb. II.6.2. und II.6.3. dargestellte Geometrie berechnete elektrische Feldstärke bei einer Eingangsleistung von $P_{in} = +12$ dBm und einer Frequenz von $f = 1$ GHz. Die Farbkodierung zeigt die Feldstärke in Einheiten $\log_{10}(E \text{ [V/m]})$.

Die zur Messung der Zellpotenziale innerhalb der Messzelle verwendeten und mit dem patch clamp Verstärker verbundenen Messleitungen wurden der Einfachheit halber in den hier beschriebenen Simulationen ebenfalls *nicht* berücksichtigt. Die Leitung auf der der Zelle zugewandten Seite liegt etwa 2 mm seitlich der Koaxialleitung, diejenige auf der der Zelle abgewandten Seite ist in Form einer etwa 2 mm großen Schleife direkt unterhalb des Chips und des patch Lochs im Elektrolyten angeordnet. Eine mögliche, Beeinflussung der Feldverteilung innerhalb der Kammer kann deshalb zwar nicht vollkommen ausgeschlossen werden, verzerrt das Feld im Bereich der untersuchten Zelle aber sicherlich nicht signifikant.

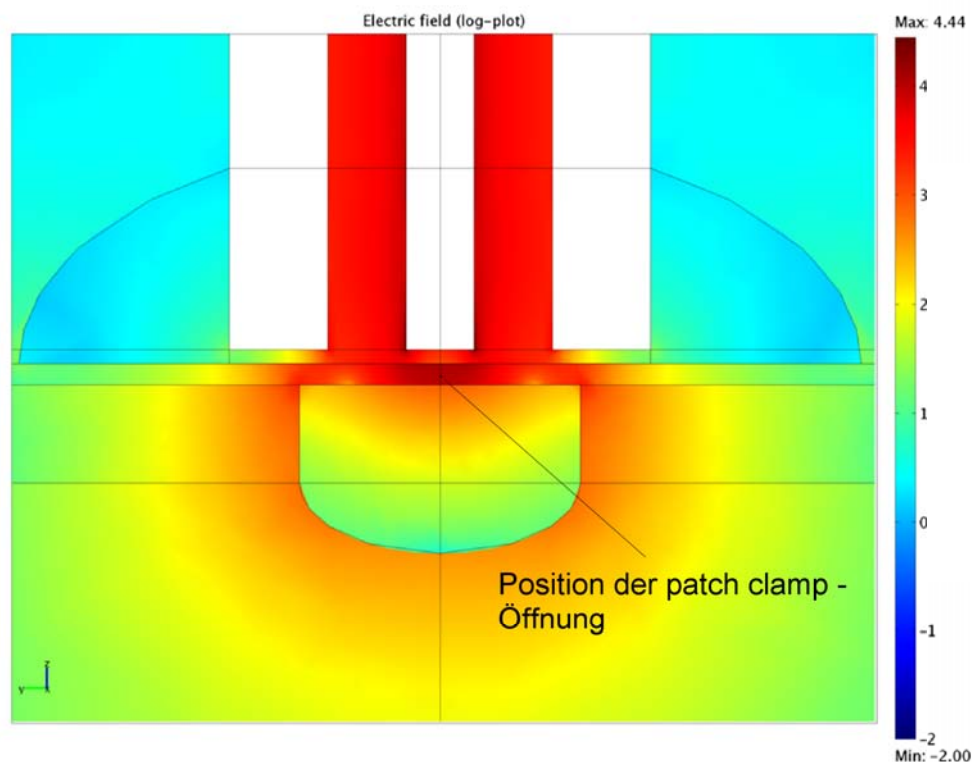


Abb. 6.5: Detail-Ansicht der Feldstärkenverteilung in unmittelbarer Nähe der patch clamp Öffnung mit der darauf befindlichen Zelle. Die biologische Zelle selbst wurde in der FEM Modellierung nicht explizit eingeführt. Dies ist wegen ihrer Kleinheit im Vergleich zur Wellenlänge etc. sicherlich ebenfalls gerechtfertigt. Die Farbkodierung zeigt die Feldstärke in Einheiten $\log_{10}(E \text{ [V/m]})$.

Wie in Abb. II.6.5. zu erkennen, ist die elektrische Feldstärke im Bereich der nur 2 Mikrometer großen patch clamp Öffnung (mit Pfeil markiert) und in einem etwa dem Durchmesser des Koaxialinnenleiters entsprechenden Volumen darum herum homogen und weist dort bei einer Eingangsleistung von $P_{in} = +12 \text{ dBm}$ eine Amplitude von ca. 1000 V/m auf.

Um auch die Feldverteilung und Feldstärke direkt an der Zelle studieren zu können, wurde ein in den Abbildungen II.6.6. dargestelltes Modell verwendet. Hier wurde die patch clamp Öffnung in einem Glassubstrat (unten), das von Wasser bedeckt ist (oben) mit einer kugelförmigen Zelle verschlossen, die dielektrisch durch eine

5 Mikrometer dicke, mit Wasser gefüllte Zellmembran modelliert worden ist. Deutlich ist die leichte Verzerrung des elektrischen Feldes im Bereich der Luft-Glas Grenzfläche sowie eine Konzentration innerhalb des patch clamp Kanals und – deutlich geringer ausgeprägt – innerhalb der Zelle zu beobachten.

Das homogene elektrische Feld in der Nähe des patch clamp Kanals wurde in dieser Simulation der Einfachheit halber durch einen außerhalb der Abbildung liegenden Parallelplattenkondensator simuliert.

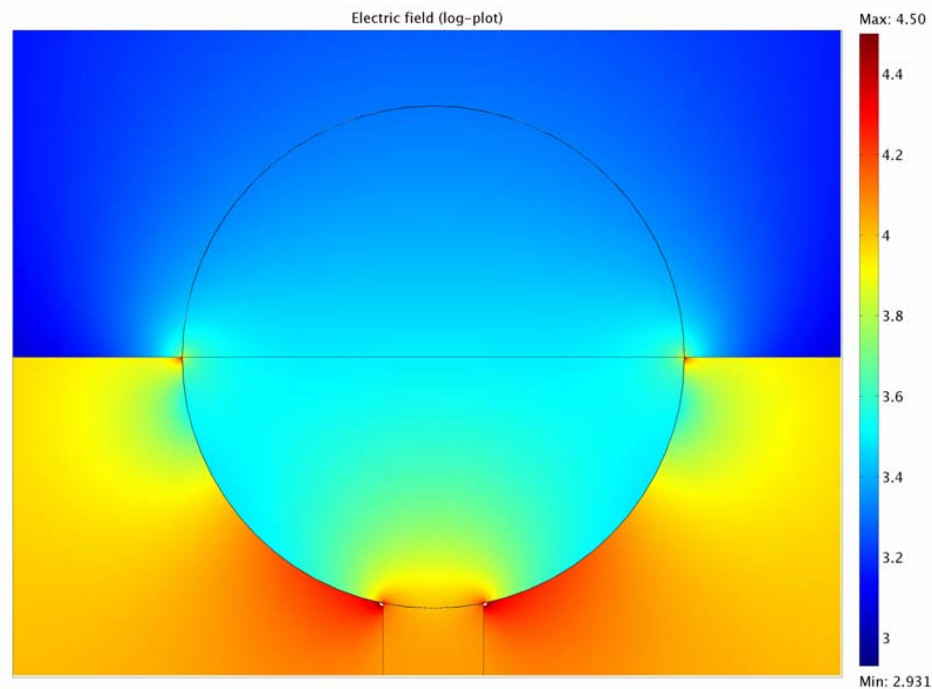


Abb. 6.6: Elektrische Feldstärke in der Nähe des patch clamp Loches für den verwendeten Aufbau. Die Farbkodierung zeigt die Feldstärke in Einheiten $\log_{10}(E \text{ [V/m]})$.

Betrachtet man die elektrische Feldstärke für diese hoch aufgelöste Simulation, so erkennt man das ebenfalls nicht überraschende Ergebnis einer höheren Feldstärke im Glas ($E_G \approx 12 \text{ kV/m}$) als im Wasser darüber ($E_W \approx 1.4 \text{ kV/m}$). Der im Zellinneren gefundene Feldstärkenverlauf liegt erwartungsgemäß zwischen diesen beiden Werten.

7 Patch clamp Messungen an humanen Zellen ohne HF Einstrahlung

Die patch clamp Technik wird seit ihrer Entdeckung von Neher und Sakmann (Neher und Sakmann 1976) als die Schlüsseltechnologie zur Untersuchung von Ionenkanälen verwendet. Mit ihrer Hilfe konnte nicht nur ein neues Modell für die Wirkung von Nervengiften entwickelt werden sondern auch der Einfluss genetischer Veränderungen auf die Kommunikation einzelner Zellen mit ihrer Umgebung festgestellt werden (Sakmann und Neher 1995).

Ionenströme im Pikoampere Bereich können präzise auf einer Zeitskala von Millisekunden bestimmt werden. Gerade auf Grund der etablierten Stellung dieser Technik für pharmakologische Tests äußerer Einflüsse auf z.B. Kaliumkanäle ist in den letzten Jahren die Nachfrage für automatisierte Patch Clamp Aufbauten stark gestiegen. Vor ihrer Einführung auf dem Markt müssen z.B. sämtliche Medikamente bzgl. Ihres Einflusses auf einen speziellen Kaliumkanal überprüft werden. Aus diesem Umstand wurden Chip basierende Systeme auf den Markt gebracht. Planare Aufbauten haben nicht nur den Vorteil, mehrere Patch-Clamp Anlagen parallel zu betreiben und keine teuren Mikromanipulatoren und Mikroskope mehr zu benötigen, sondern erlauben durch ihren offenen Aufbau die leichte Kombination mit anderen Technologien. Im speziellen die Kombination mit HF-Quellen ist mit der klassischen Methode nur schwer zu realisieren. Versuche wurden unternommen von Linz *et al.* (1999) sowie kürzlich von Liberti *et al.* (2007), Marchionni *et al.* (2006) und Platano (2007). Langfristig erscheint jedoch der planare Aufbau der flexiblere für solche Anwendungen zu sein.

Es wurde im vorliegenden Projekt speziell die Veränderungen von Ionenströmen als Response auf ein äußeres hochfrequentes Feld untersucht. Da dabei auch mit Temperatureffekten zu rechnen war, wurde auch der Einfluss der Temperatur untersucht. Aus molekularer Sicht ist es denkbar, dass neben den thermischen Effekten auf Grund der Wasserrelaxation bei 20 GHz das HF-Signal auch direkt den Schaltprozess des Kanals beeinflusst. Momentan ist die weit verbreitete Meinung zur Funktionsweise der so genannten spannungsabhängigen Ionenkanäle eine Konformationsänderung auf Grund eines äußeren elektrischen Feldes. Dabei besitzen Kanäle mindestens 3 Zustände: Aktiv (offen), geschlossen und inaktiv.

Beispielsweise bewegt sich beim so genannten „*ball and chain*“ Modell ein Dipol im elektrischen Feld und inaktiviert dadurch den Kanal (Armstrong 1992). Beim *Natriumkanal* konnte wiederum das Verbindungsstück zwischen dem dritten und vierten „repeat unit“ für die Inaktivierung im Feld verantwortlich gemacht werden. Im Falle von *Kaliumkanälen* hat das N-Terminal die Funktion des Inaktivierungs-Balles (N-Typ-Inaktivierung) wie mittels molekularbiologischer Methoden gezeigt werden konnte (Hoshi *et al.* 1990).

Obwohl die Inaktivierung beider Kanaltypen auf physiologischen Zeitskalen sehr schnell verläuft (~ msec) sollte Sie auf dem ersten Blick kaum hochfrequenten elektrischen Feldern folgen können. Allerdings ist es wahrscheinlich, wie auch aus spektroskopischen Untersuchungen bekannt, dass im Prozess vom aktiven in den

inaktiven Zustand mehrere intermediäre Zustände durchlaufen werden, die auf deutlich kürzeren Zeitskalen stattfinden könnten.

Vor allem die großen Dipolmomente kleiner Biomoleküle und Aminosäuresequenzen scheinen aus molekularbiologischer Sicht den Einfluss externer HF-Felder auf die Übergänge dieser intermediären Zustände zu bestimmen und so die augenscheinlichste Gefahr von Handystrahlung auf die Physiologie einzelner Zellen darzustellen. Dies wird u.a. durch den bereits nachgewiesenen Effekt von 40 MHz Feldern auf das Schaltverhalten von in Pflanzenzellen unterstrichen (Pickard und Barsoum 1981). Des Weiteren wurde in von Einzelkanalmessungen bis zu 900 MHz an Neuronen berichtet (Marchionni *et al.* 2006). Im Bereich von GHz jedoch sind uns keinerlei Messungen bekannt.

7.1 Präparation der Zellen

Es werden in diesem Bericht insgesamt vier verschiedene Zelllinien vorgestellt, deren Präparation und Kultivierung gänzlich am Lehrstuhl für Experimentalphysik I stattfand. Bei den Zelllinien handelt es sich um Melanomzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und Neuronen Vorläufer Zellen. Des Weiteren wurden speziell für die dielektrische Spektroskopie Blutproben verwendet. Melanomzellen dienen als Modell für schnell wachsende Zellen. Fibroblasten stellen einen der am weitest verbreiteten Zelltypen unseres Körpers dar. Keratinozyten sind Hautzellen und somit der stärksten Strahlung ausgeliefert. Bei allen Typen außer den PC 12 Zellen (Ratte) handelt es sich um humane Zellen.

Zelltyp und Zellkultur

Humane Melanomzellen Typ M2 Subklon A7:

Bei den verwendeten humanen Melanom Zellen handelt es sich um den amelanomischen Typ M2 Subklon A7. Der Typ M2 wurde ursprünglich hergestellt, um die Rolle des Aktin bindenden Proteins (ABP) für die Beweglichkeit der Zelle zu untersuchen. In der transfizierten Form M2/A7 ist das ABP wieder vorhanden. Die M2/A7 Linie ist eine besonders maligne Form der Melanomzelle und dient somit vor allem der Untersuchung von HF Einstrahlung auf besonders schnell wachsende Zellen. Auf Grund ihres schnellen Wachstums zeigen diese Zellen eine sehr hohe „Kanalaktivität“. Eventuelle Manipulationen des „gating“ Verhaltens durch externe Störungen sollten daher an diesen Zellen am empfindlichsten zu beobachten sein. Daher wurden sämtliche Messungen zunächst an diesen Zellen durchgeführt. Zeigen diese selbst unter starker Einstrahlung keinen messbaren Respons wird sich dies vermutlich für die anderen Zelltypen nicht ändern.

Die Zellen wurden nach Standardprotokollen kultiviert.: Die Zellen wachsen dabei in einer Atmosphäre von 5-10 % CO₂, da es sich um ein mit Bikarbonat/Carbonsäure gepuffertes System handelt, dessen pH unbedingt aufrecht erhalten werden muss.

Die Kappen der Kulturflaschen werden nur leicht angeschraubt um den Gasaustausch zu gewährleisten. Müssen die Zellen aus dem Inkubator entnommen werden, so ist die Verweildauer außerhalb möglichst kurz zu halten. Des weiteren ist im Inkubator stets für ausreichend Luftfeuchtigkeit (95 %) und einer konstanten Temperatur von 37° C zu sorgen. Die Zellen werden in T-25er oder T-50er (25 cm³ bzw. 50 cm³) Kulturflaschen (Falcon, Heidelberg, Deutschland) in „minimum essential medium“ (MEM) mit „Earle's Salzen“ angereichert, in nicht essentiellen Aminosäuren, Glutaminsäure und 10 % fetalem Kälberserum (Biochrom, Berlin, Germany) sowie 1 % Penizillin/Streptomycin (Biochrom, Deutschland) kultiviert und ca. 2 mal wöchentlich passagiert. Die polygonalen, flachen Zellen wachsen und adhären dann gut am Boden der Kulturflaschen. Ein nahezu konfluenter Zellrasen benötigt daher die Bindung des freien Ca²⁺ durch Ethylenediaminetetraazetsäure (EDTA) und anschließender Trypsinierung (0.025 % Trypsin) für die Passagierung.

Das Puffersystem, welches bei der Passagierung verwendet wurde, enthielt (mM): 0.67 EDTA, 137 NaCl, 2.7 KCl, 6.5 NaHPO₄, 1.5 KH₂PO₄; pH 7.4.

Nach dem Ablösen von Ihrer Oberfläche werden die Zellen zentrifugiert. Der Niederschlag wurde in FCS freiem MEM Medium resuspendiert.

Humane Fibroblasten (FJ-12)

Bei den verwendeten humanen Fibroblasten handelt es sich um solche des Typs FL-12. Fibroblasten gehören zu dem am häufigsten vorkommenden Zelltyp im menschlichen Körper und sind für den Aufbau unseres Bindegewebes verantwortlich. Sie produzieren neben Kollagen und Proteoglykanen (stark glykosilierte Proteine der extrazellulären Matrix) andere wesentliche Bestandteile unseres Bindegewebes. Fibroblasten sind also über unseren gesamten Körper verteilt und damit auch direkt der Handstrahlung ausgesetzt. Die Zellen wurden in einem RPMI-1640 Medium kultiviert. Dieses Medium wurde von Moore *et al.*, am Roswell Park Memorial Institute hergestellt. Auch dieses Medium enthält ein Bikarbonat Puffersystem mit angereicherten Vitaminen und Aminosäuren. Außerdem enthält es: 10 % FCS, 4 mM L-Glutamin und 1 % Penizillin/Streptomycin, Trypsin (0,05 % (v/v)), 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) und Fungizone.

Humane Keratinozyten (HaCat)

Die humane Zelllinie HaCaT stammt aus der Haut eines männlichen Patienten. Die Zellkultur wurde in 4fachem MEM (ein modifiziertes MEM Medium, welches die 4fache Menge von Aminosäuren und Vitaminen plus 15 % Wärme - inaktiviertes FCS enthält) durchgeführt. Nach der Trypsinierung mit 0,1% Trypsin/EDTA wurde die Zellsuspension zentrifugiert und gewaschen. Dabei wurde der Überstand mit einem Ca²⁺/Mg²⁺-freien PBS (Phosphate Buffer Saline) ersetzt (resuspendiert). Die Zellen wurden routinemäßig bei 37° C in feuchter CO₂ Atmosphäre kultiviert (95-100 % Feuchte und 5 % CO₂) und typischerweise 1/10 bis 1/20 passagiert. Alle verwendeten Medien enthielten Antibiotika (Penizillin, 100 U/ml; Streptomycin, 50 tag/ml).

Elektrophysiologische Präparation

Nach dem Resuspendieren der Zellen in 150 mM NaCl, 4,5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , 5 mM Glucose und 10 mM Hepes bei pH 7,4 (Sigma Aldrich) werden ca. 5-10 μl vorsichtig auf die Chip Oberseite getropft. Die Chipunterseite enthält die so genannten intrazellulär Lösung (10 mM NaCl, 10 mM KCl, 135 mM KF, 10 mM EGTA, 10 mM Hepes bei pH 7,2).

Unter Beobachtung des Widerstandes (seal) wird ein leichter Unterdruck angelegt um Zellen in Richtung der Chip Apertur („patch Loches“) zu saugen. Nun wird der Unterdruck vorsichtig solange in beide Richtungen verändert, bis der „giga seal“ erreicht ist.

7.2 Patch Clamp Messungen ohne HF

Im Folgenden werden einige repräsentative Messungen an drei verschiedenen Zelltypen vorgestellt, die im Rahmen des hier berichteten Projekts mit patch clamp untersucht worden sind. Alle Messungen fanden unter denselben experimentellen Bedingungen statt, die patch clamp Messungen wurden an einer kommerziellen Anlage (Nanji[on, München) durchgeführt.

Nach der Präparation der Zellen, dem Aufbringen auf den patch Chip und der Etablierung eines „giga seals“ wurde der Zustand der Zellen jeweils durch ein biochemisches Experiment überprüft, bei dem der Kanalstrom unter Zugabe eines Kalium-Kanalblockers beobachtet wurde. Fiel der gemessene Kanalstrom unter Zugabe des Blockers zunächst ab und erholte sich nach einem Waschschrift wieder, so wurden die Zellen als gesund, intakt und lebend identifiziert. Diese relativ einfache und schnelle Charakterisierung liefert erfahrungsgemäß ein gutes Indiz für die Brauchbarkeit der Zellen für das nachfolgende patch clamp Experiment.

7.2.1 Melanomzellen

Nach der Präparation der Zellen und dem Aufbringen auf den patch clamp setup (s. Abb. II.6.2.) muss die Zelle zunächst „geöffnet“ werden („whole cell“ Methode). Dieser Punkt ist erreicht, sobald man Strom durch nur *eine* Zellmembran misst (wie Abb. II.6.2. rechts schematisch skizziert). Dieser Zeitpunkt wird experimentell dadurch bestimmt, dass man zum einen die Kapazität über die Zelle in der patch clamp Anlage und parallel dazu den Widerstand über die Zelle misst. Sobald die auf der patch Öffnung liegende Membran aufreißt, beobachtet man eine deutliche Zunahme der Kapazität und eine deutliche Abnahme des Widerstands. In der folgenden Abbildung ist dieser Vorgang schematisch dargestellt.



Abb. 7.1: Nachweis der Zellöffnung durch Messung der Kapazität und des Widerstands über die Zelle. Sobald die der patch Öffnung näher liegende Zellmembran geöffnet ist, steigt die Kapazität stark an und der Widerstand sinkt.

Dann wird die Klemmspannung so lange erhöht, bis es zur Öffnung einzelner Kanäle kommt. Dabei wird – wie schon bei den Membranen gezeigt und diskutiert – die Klemmspannung über eine gewisse Zeit (typischerweise vier Sekunden) an die Kammer angelegt und die Stromantwort gemessen. Ein typischer Ablauf einer solchen Messung ist in Bild 6.1 dargestellt.

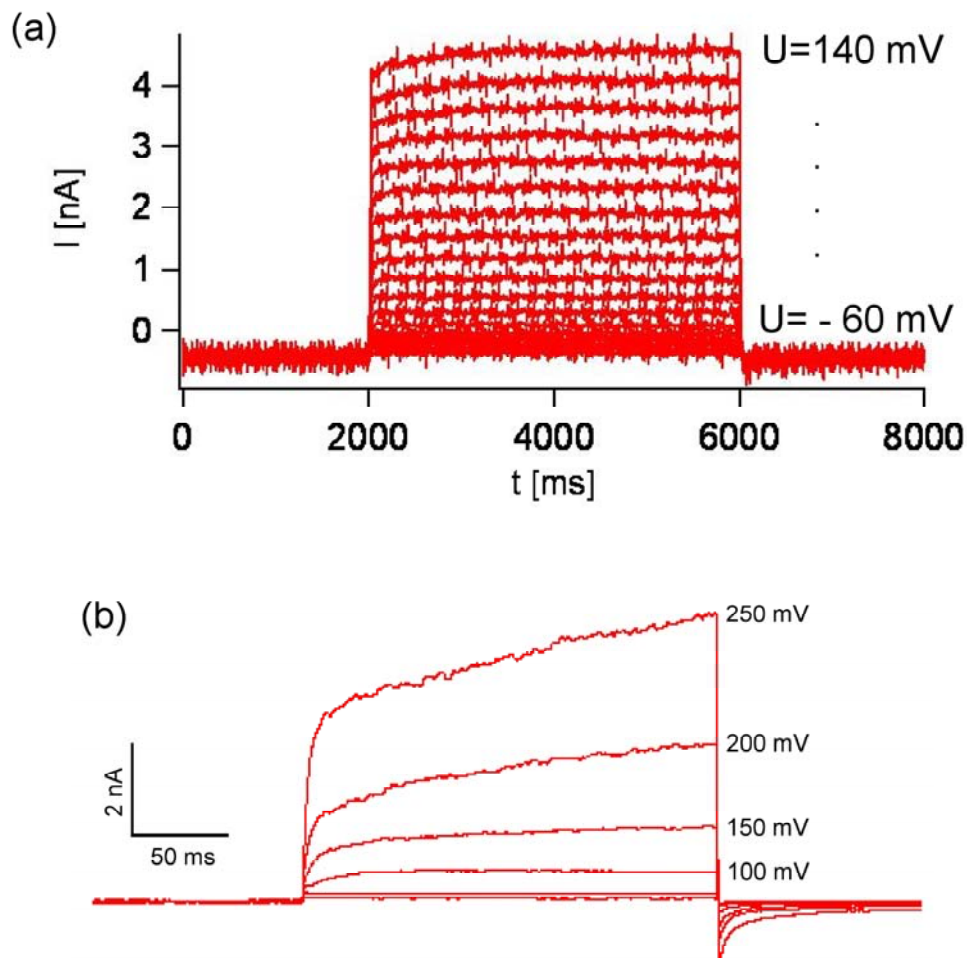


Abb. 7.2: (a) Typisches Spannungsklemm Experiment an Melanom Zellen über einen weiten Spannungsbereich: Die Spannung wird in dieser Abbildung von -60 mV bis $+140$ mV in 10 mV Schritten variiert und der dazu jeweils notwendig Kompensationsstrom gemessen. In (b) werden aus Gründen der Übersichtlichkeit und Auflösung nur einige Ableitungen aus einer anderen Messung gezeigt.

Wie schon bei den künstlichen Membranen diskutiert, kann außer durch das Auftreten von Einzelkanalereignissen das Öffnen von spannungsabhängigen Ionenkanälen auch in der Strom-Spannung Kennlinie abgelesen werden. Dies stellt aus statistischer Sicht die deutlich bessere Methode dar, da in der I-U Kennlinie verborgen bereits zahlreiche Einzelkanalereignisse liegen. In Abbildung II.7.3. ist die entsprechende Kurve dargestellt. Jeder Datenpunkt entspricht einer wie in Abbildung II.7.2. gezeigten Stromspur, gemessen über ca. 4 Sekunden und gemittelt über 100 msec, genauso wie bei den Membranen beschrieben. Für kleine Spannungen beobachtet man auch bei den Melanomzellen zunächst ein lineares Verhalten. Die hier auftretenden Ströme werden in der Literatur als Leckströme bezeichnet und repräsentieren die endliche Leitfähigkeit der Plasmamembran. Erhöht man die Spannung, steigt der Strom genauso wie bei den reinen Lipidmembranen linear an. Ab einer Spannung von ca. +50 mV jedoch ist – genau wie im Falle der künstlichen Membranen – eine Abweichung vom linearen Verhalten zu beobachten.

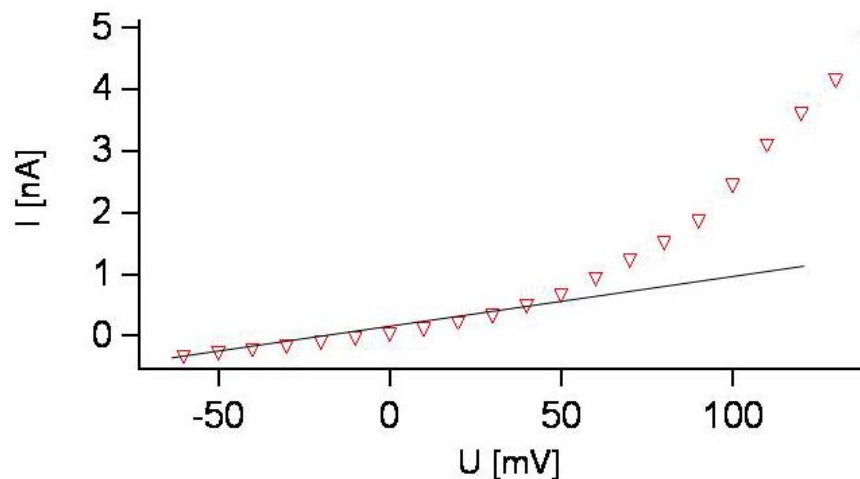


Abb. 7.3: Strom-Spannungsverlauf von Melanomzellen in der Spannungsklemme. Bei einer Klemmenspannung von ca. +50 mV tritt bei der hier gezeigten Messung ein starkes Abweichen vom linearen Verhalten auf, was einen deutlichen Hinweis auf das Öffnen spannungsabhängiger Ionenkanäle (im Falle von Melanomzellen Kaliumkanäle) darstellt.

Wirft man während des Experimentes einen näheren Blick auf die Strom-Zeit Spur (wie z.B. in Bild II.7.2.), so kann man dort das Auftreten einzelner Kanäle, gekennzeichnet durch die typischen Stromoszillationen beobachten. Erst dieser relativ hohe Spannungsbereich erlaubt überhaupt eine Messung des Einflusses von HF-Feldern auf Ionenkanäle, da zuvor sämtliche Kanäle noch im geschlossenen oder inaktiven Zustand sind.

7.2.2 Fibroblasten

Wie oben bei den Melanomzellen wurde auch bei den untersuchten Fibroblasten zunächst die Stromantwort auf die Spannungsklemme gemessen. In Abbildung II.7.4. sind wiederum der besseren Übersichtlichkeit und Auflösung wegen nur einige repräsentative Stromableitungen dargestellt.

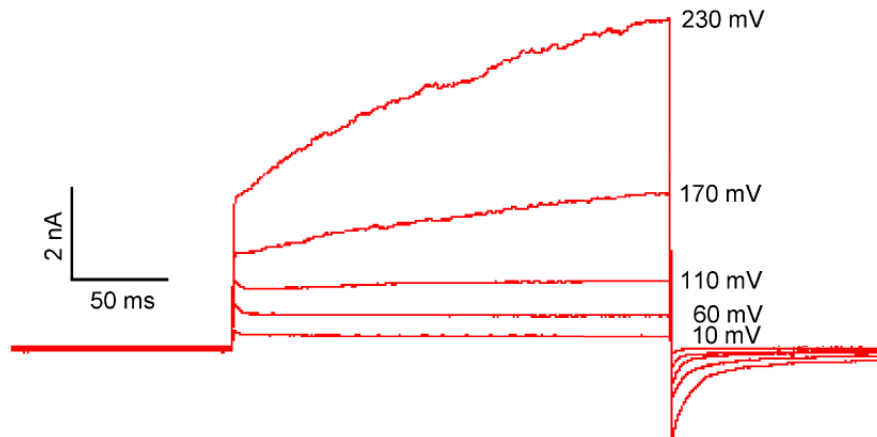


Abb. 7.4: Stromableitungen einer Messung an Fibroblasten ohne HF Einstrahlung. Auch hier werden wie schon bei den Melanomzellen (vgl. Abb. II.7.2.) der besseren Übersichtlichkeit und Auflösung wegen nur einige wenige Stromantworten gezeigt.

Analog zu der in Abb. II.7.3. dargestellten Messung wird in Abb. II.7.5. die entsprechende Kurve für Fibroblasten dargestellt. Jeder Datenpunkt entspricht wiederum einer über ca. 4 Sekunden gemessenen Stromspur, gemittelt über 100 msec gegen Ende des Spannungspulses. Erneut lässt sich bei ca. +50 mV eine starke Abweichung vom linearen Verhalten erkennen, die wie oben auf das Öffnen einzelner Ionenkanäle hinweist.

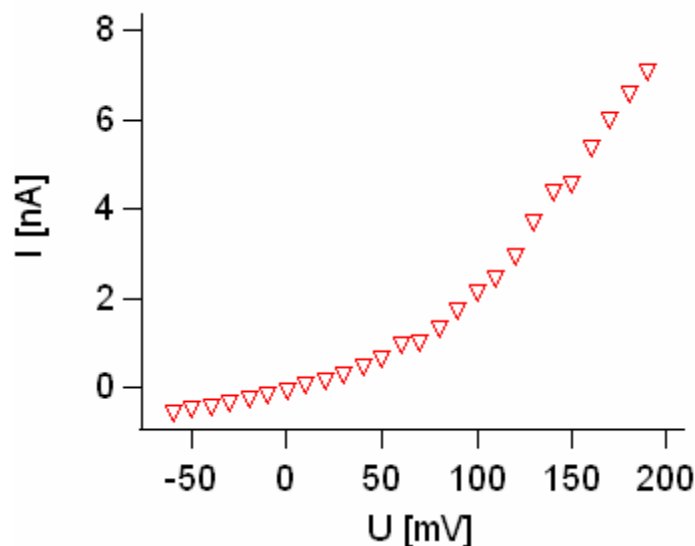


Abb. 7.5: Strom-Spannungsverlauf von Fibroblasten in der Spannungsklemme. Bei einer Klemmspannung von ca. +50 mV beobachtet man wiederum einen Übergang zu einer nichtlinearen Stromantwort, was einen deutlichen Hinweis auf das Öffnen spannungsabhängiger Ionenkanäle darstellt.

7.2.3 Keratinozyten

Keratinozyten sind Hautzellen der Oberhaut (Epidermis) die im Laufe ihrer Differenzierung bis zur Hautoberfläche wandern. Sie sind daher diejenigen Zellen welche möglicherweise am stärksten einer evtl. HF Bestrahlung ausgeliefert sind.

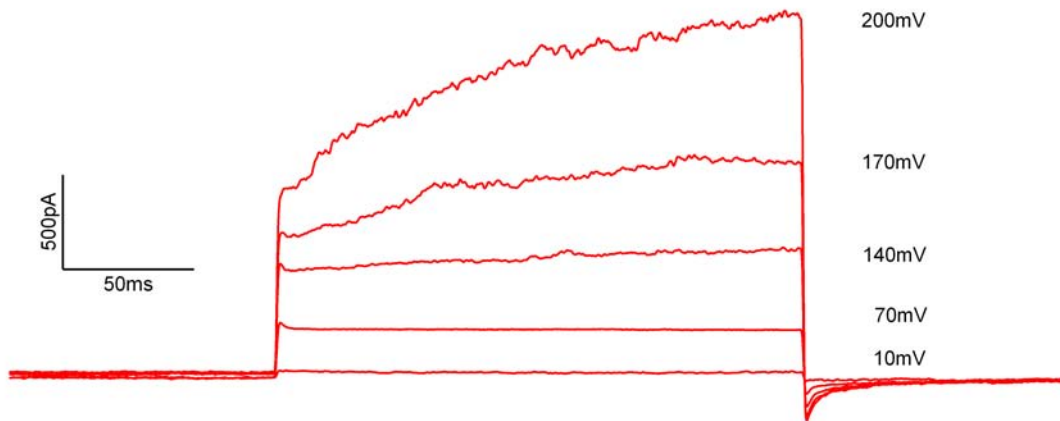


Abb. 7.6: Stromableitungen einer Messung an Keratinozyten ohne HF Einstrahlung. Auch hier werden wie schon bei den Melanomzellen (vgl. Abb. II.7.2.) und den Fibroblasten (vgl. Abb. II.7.4.) der besseren Übersichtlichkeit wegen nur einige wenige Stromantworten gezeigt. Bei dieser Messung erkennt man in den obersten drei Stromantworten deutliche Fluktuationen, die mit dem Öffnen einzelner Kanäle assoziiert werden können.

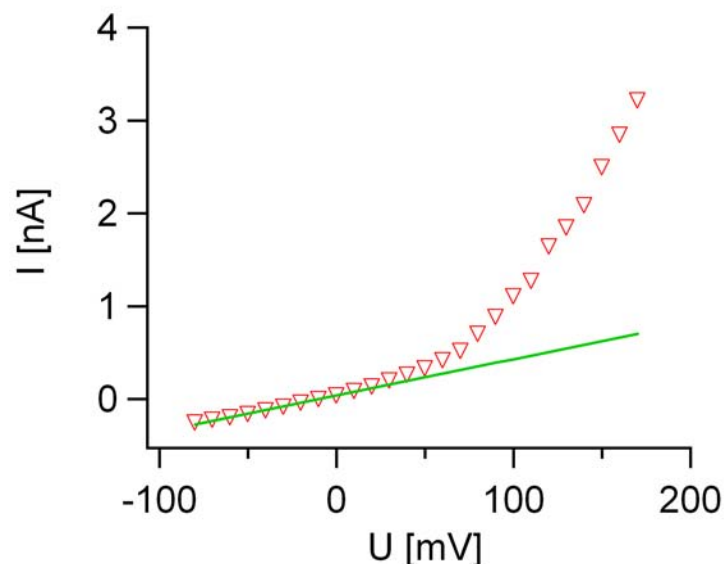


Abb. 7.7: Strom-Spannungsverlauf von Keratinozyten in der Spannungsklemme in analoger Weise wie für Melanomzellen und Fibroblasten gemessen. Auch hier beobachtet man ab ca. $U = 50$ mV ein Abweichung der Stromantwort vom linearen Verhalten und damit einen Hinweis auf das Öffnen spannungsabhängiger Ionenkanäle ab dieser Klemmenspannung.

8 Patch clamp Messungen an humanen Zellen mit HF Einstrahlung

In diesem Kapitel werden die elektrophysiologischen Messungen an den drei vorgestellten Zelltypen unter HF Einstrahlung vorgestellt. Lebende humane Zellen mit einem spannungsabhängigen Kaliumkanal wurden mit dem in Kapitel II.6 beschriebenen planaren patch clamp Aufbau untersucht. Nachdem „whole cell“ Bedingungen geschaffen wurden, wurden Blockexperimente und Spannungsrampen gefahren um den „Gesundheitszustand“ der Zelle zu verifizieren. Daraufhin wird ein HF-Signal unterschiedlicher Frequenz zugeschaltet. Die angegebenen SAR Werte wurden nach Gleichung 4.2, der in Abbildung II.6.6. dargestellten Feldverteilung und den im Teil der dielektrischen Spektroskopie gemessenen Werten der Leitfähigkeit berechnet. Dabei wurde auf Grund der inhomogenen Feldverteilung in der Zelle jeweils ein Feldstärkenintervall anstatt eines Mittelwertes angegeben.

8.1 Melanomzellen im HF-Feld

Nachdem die spannungsabhängigen Kaliumkanäle in menschlichen Melanomzellen charakterisiert waren, sollte im nächsten Schritt das Experiment bei verschiedener HF-Einstrahlung wiederholt werden.

Die Messungen wurden zum einen in Frequenzbereichen für verschiedenen elektrische Feldstärken durchgeführt, zum anderen wurde jeweils auch noch eine über einen erheblich weiteren Frequenzbereich angeschlossen, um evtl. den in den dielektrischen Messungen beobachteten Absorptionspeak bei etwa 22 GHz in einer patch clamp Messung nachweisen zu können.

In Abbildung II.8.1 ist der Strom im „whole cell“ Verfahren für eine Melanomzelle, die einer Strahlung von +18 dBm bei 900 MHz ausgesetzt ist, gezeigt. Nach Abb. II.6.6 befindet Sie sich dabei bei +12 dBm Eingangsleistung in einer Feldstärke zwischen 1.4 kV/m und 12 kV/m. In den Messungen zur dielektrischen Spektroskopie (Abb. I 2.58) finden wir, dass die Leitfähigkeit im Bereich von 900 MHz bis 2,4 GHz einen relativ konstanten Wert von $2 \cdot 10^{-2} [\Omega^{-1} \text{cm}^{-1}]$ annimmt. Daraus berechnen wir einen Wert $\text{SAR} = (15,6 \dots 1152) \cdot 10^3 \text{ W/kg}$ ($\overline{\text{SAR}} \approx 100 \cdot 10^3 \text{ W/kg}$) für die verschiedenen Feldstärken ($\rho \approx 10^3 \text{ kg/m}^3$). Bereits aus der Einzelmessung (8.1.a) wird deutlich, dass es zu keiner spontanen Veränderung in der Stromantwort kommt. Im integrierten Signal (8.1b) erkennt man zwar eine leichte Drift hin zu höheren Werten, diese zeigte jedoch keine Korrelation mit dem HF-Signal. Da selbst bei solch hohen SAR Werten (gegenwärtig typische SAR Werte im Mobilfunk liegen eher im Bereich von $\approx 1\text{-}2 \text{ W/kg}$) kein Einfluss auf die Stromantworten gefunden wurde, wurde auf Messungen bei kleineren Leistungen verzichtet. Bei noch höheren Leistungen kam es zu elektrischen („pick-up“) Störungen, die vermutlich eine Konsequenz der

Kopplung des HF-Signals an die headstage der patch-clamp Anlage darstellen. Diese Probleme konnten während der Projektlaufzeit nicht vollständig befriedigend gelöst werden. Da, wie unten gezeigt, die HF Einstrahlung selbst bereits zu einer Temperaturveränderung an der Messzelle führt, wurden zusätzlich einige feste Temperaturen der Messzelle untersucht.

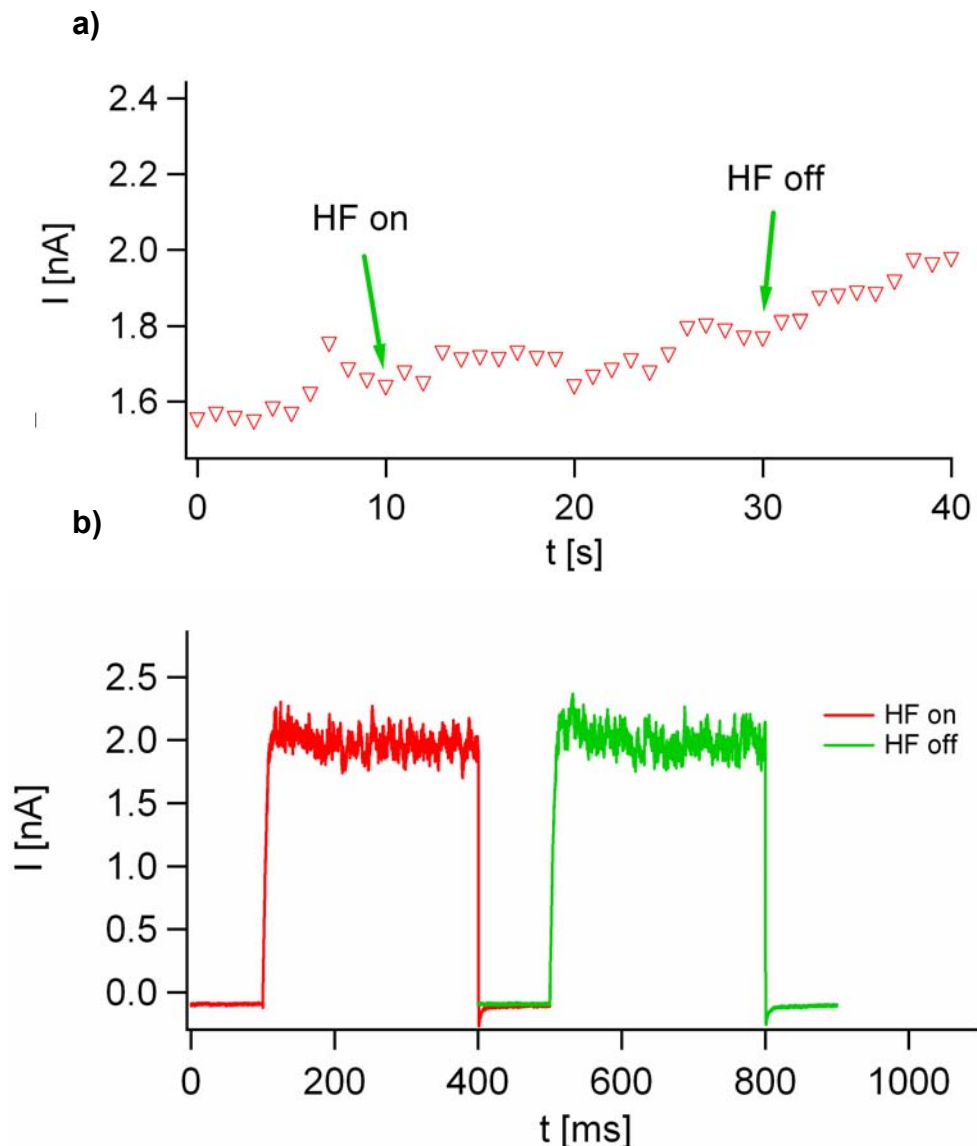


Abb. 8.1: Strom im „whole cell“ Verfahren für Melanomzellen (M2/A7) ($f = 900$ MHz, $P = 18$ dBm, $SAR = (15,6 \dots 1152) \cdot 10^3$ W/kg. In (a) sind die Mittelwerte des Stroms über jeweils 1 s in Ab- und Anwesenheit des HF Signals dargestellt. (b) Einzelmessung. Bei einer Klemmspannung von $U = 100$ mV wird der Strom wiederum in An- und Abwesenheit des HF Signals gemessen.

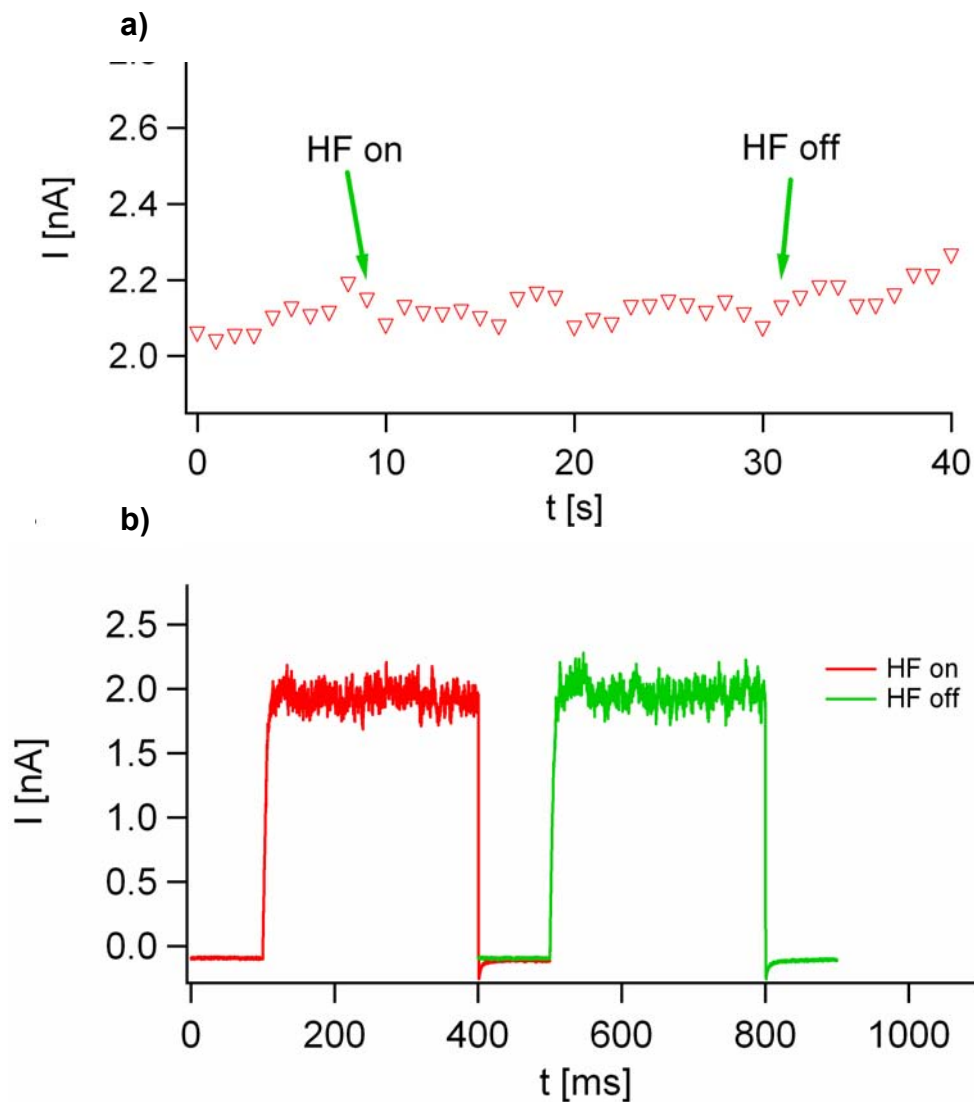


Abb. 8.2: Strom im „whole cell“ Verfahren für Melanomzellen (M2/A7) ($f = 1800$ MHz, $P = +16$ dBm, $SAR = (9,8 \dots 724) \cdot 10^3$ W/kg. In (a) sind die Mittelwerte des Stroms über jeweils 1 s in An- und Abwesenheit des HF Signals dargestellt. (b) Einzelmessung. Bei einer Klemmspannung von $U = 100$ mV wird der Strom wiederum in An- und Abwesenheit des HF Signals gemessen.

Ebenfalls wurden Messungen bei den Frequenzen 900, 1800, 2400 MHz sowie 22 GHz durchgeführt. In Abb. II.8.2 erkennt man, dass auch im Falle von 1800 MHz bei +16 dBm keine Auswirkungen auf die Stromantwort des Kaliumkanals zu beobachten sind. Das gleiche gilt für $f = 2400$ MHz (+14 dBm) in Abb. II.8.3. Dieses Verhalten ändert sich jedoch in Abb. II.8.4, in der die Stromantwort in Gegenwart eines elektromagnetischen Wechselfeldes von $f = 22$ GHz bei +12 dBm Leistung aufgetragen ist. Hier nimmt der Strom bzw. die Leitfähigkeit in Gegenwart des HF Signals um ca. 12 % zu. Legt man zu Grunde, dass sich Viskosität und Ionenbeweglichkeit einander umgekehrt proportional verhalten und nimmt die bekannte Abhängigkeit der Viskosität von der Temperatur ($\approx 2\%/^{\circ}\text{C}$), so erhalte

man unter den o.a. experimentellen Bedingungen aus der gemessenen Leitfähigkeitsänderung, die allein auf eine erhöhte Ionenbeweglichkeit zurückzuführen wäre, bereits einen Temperaturanstieg von ca. 6° C. Um zu verifizieren, dass der Anstieg der Leitfähigkeit im wesentlichen einen Temperatureffekt darstellt, wird im Folgenden anhand eines einfachen Modells rechnerisch überprüft.

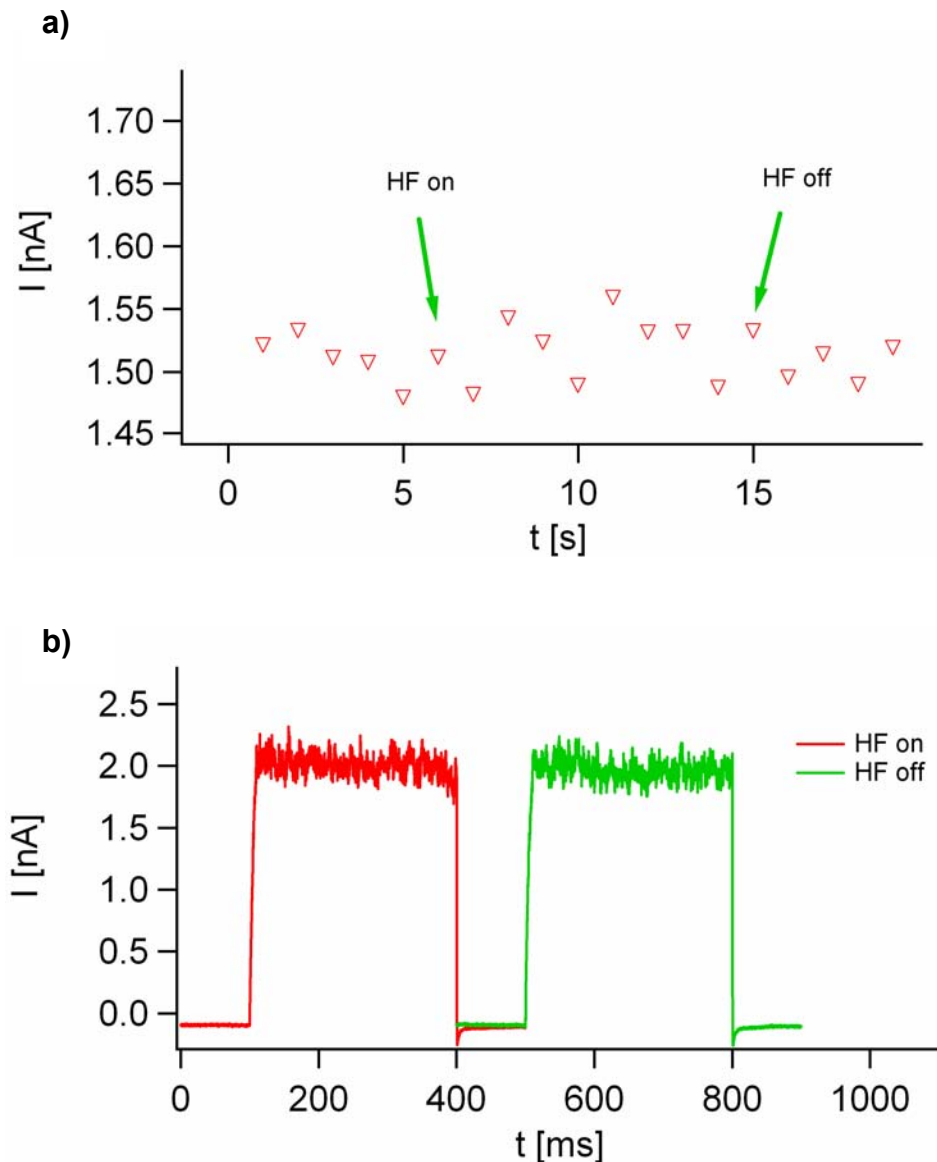
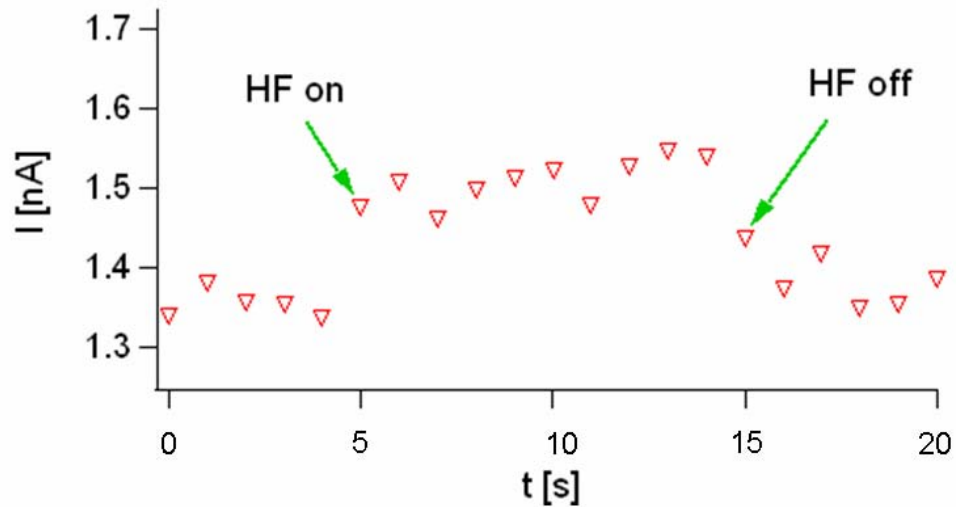


Abb. 8.3: Strom im „whole cell“ Verfahren für Melanomzellen (M2/A7) ($f = 2400$ MHz, $P = +16$ dBm, $SAR = (9,8 \dots 724) \cdot 10^3$ W/kg. In (a) sind die Mittelwerte des Stroms über jeweils 1s in Ab- und Anwesenheit des HF Signals dargestellt. (b) Einzelmessung. Bei einer Klemmspannung von $U = 100$ mV wird der Strom wiederum in An- und Abwesenheit des HF Signals gemessen.

a)



b)

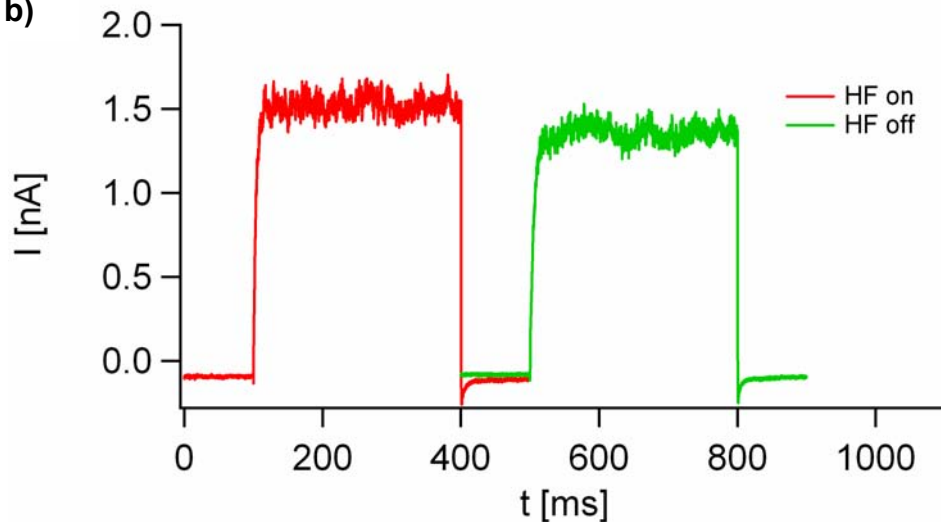


Abb. 8.4: Strom im „whole cell“ Verfahren für Melanomzellen (M2/A7) ($f = 22$ GHz, $P = +12$ dBm, $SAR = (3,9 \dots 288) \cdot 10^3$ W/kg. In (a) sind die Mittelwerte des Stroms über jeweils 1 s in Ab- und Anwesenheit des HF Signals dargestellt. (b) Einzelmessung. Bei einer Klemmspannung von $U = 100$ mV wird der Strom wiederum in Ab- und Anwesenheit des HF Signals gemessen.

Eine Temperaturerhöhung lässt über die damit verbundene Erhöhung der Ionenbeweglichkeit einen erhöhten Strom erwarten (Walden'sche Regel: $I \sim \Delta T$). Um dies zu überprüfen, wird versucht, die Temperaturerhöhung die bereits auf Grund der HF Einstrahlung entsteht, abzuschätzen. Auf Grundlage unserer Daten wird argumentiert werden, dass keine qualitativen Veränderungen auf Grund einer Temperaturerhöhung zu erwarten sind.

Nach Onsager folgen thermodynamische Kräfte (hier ein Temperaturgradient) und Flüsse (Temperaturänderung pro Zeit) einen linearen Zusammenhang. Darauf aufbauend kann folgende Differentialgleichung aufgestellt werden:

$$\frac{dT(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau}(T - T_{Bad}) + \frac{P_{Abs}}{\tilde{c}} \quad (8.1)$$

Dabei stellt T_{Bad} die Temperatur des Bades, P_{Abs} die durch HF Einstrahlung absorbierte Leistung, c die spezifische Wärmekapazität des Bades (im wesentlichen Wasser ($c \approx 4,19 \text{ kJ}/(\text{K} \cdot \text{kg})$)) und τ eine charakteristische Abklingzeit nach Abschalten des HF-Signals dar. Die Lösung dieser Gleichung ergibt:

$$T(t) = [T(0) - T_{Bad} - \Delta T_{Abs}] \exp(-t / \tau) + T_{Bad} + \Delta T_{Abs} \quad , \text{ wobei } \Delta T_{Abs} = \tau \frac{P_{Abs}}{\tilde{c}} \quad (8.2)$$

ΔT_{Abs} repräsentiert dabei die sich nach einer gegenüber τ großen Zeit der Einstrahlung ergebende Temperaturerhöhung. Eine Analyse (Fit) der „Anschaltkurven“ liefert eine charakteristische Zeit τ zwischen 90 und 105 ms ($\tau \approx 96 \text{ ms}$). Für den oben erwähnten SAR-Wert für Wasser ($SAR = 15,6 \cdot 10^3 \text{ W} / \text{kg}$) ergibt sich damit eine Temperaturerhöhung $\Delta T_{Abs} \approx 0,3^\circ \text{ C}$ für ein Einstrahlungszeit $t \gg \tau$. Unsere Einstrahlzeiten liegen typischerweise im Bereich von $\approx 250 \text{ ms}$, womit der exponentielle Anteil in Gleichung 8.2 bereits auf $\approx 0,08$ abgefallen ist und damit Korrekturen ΔT_{Abs} im Bereich von $\approx 0,01^\circ \text{ C}$ erwarten lässt, welche im Augenblick vernachlässigt werden. Es ist zu erwähnen, dass die so berechnete Temperaturerhöhung nur eine obere Abschätzung für $f = 1 \text{ GHz}$ darstellt und lediglich zeigt, dass HF induzierte Temperaturveränderungen bereits implizit im System enthalten sind. Wie die Absorption von Wasser wird also auch das hauptsächlich wässrige Wasser/Zell System eine Frequenzabhängigkeit zeigen. Im Falle reinen Wassers findet man, wie z.B. in Abb. I 1.9 gezeigt, ein Maximum der Absorption bei ca. 19 GHz. Die Anwesenheit von gebundenen oder oberflächennahen Wassers, wie es in biologischen Systemen der Fall ist, lässt eine leichte Erhöhung dieser Frequenz erwarten. Die dielektrischen Messungen an Elektrolyten und Melanomzellen in PBS++ Puffer (z.B. Abb. I 2.9 und Abb. I 2.58) zeigen bei $f = 22 \text{ GHz}$ eine Erhöhung von σ um etwa eine Größenordnung auf ca. $(1 \dots 3) \cdot 10^{-1} [\Omega^{-1} \text{ cm}^{-1}]$. Damit steigt die absorbierte Leistung und nach Gleichung 8.2 die Temperatur ebenfalls um ca. eine Größenordnung auf $\Delta T_{Abs} \approx 3 \text{ bis } 9^\circ \text{ C}$ an. Die allein aus der veränderten Ionenbeweglichkeit prognostizierte Temperaturerhöhung von 6° C liegt also genau in dem erwarteten Temperaturfenster, so dass die gemessenen patch clamp Ergebnisse mit hoher Wahrscheinlichkeit einzig auf Temperaturveränderungen zurückzuführen sind und keinen Raum für die Annahme von „gating“ Effekten der Ionenkanäle lassen.

Im folgende Kapitel werden ähnliche Experimente an Keratinozyten und Fibroblasten sowie Melanomzellen über einen weiteren Frequenzbereich gezeigt.

8.2 Keratinozyten, Fibroblasten und Melanomzellen im HF-Feld

Patch clamp Messungen an Keratinozyten, Fibroblasten wurden nur stichprobenweise durchgeführt und lieferten durchweg dieselben Ergebnisse wie die im letzten Kapitel gezeigten Messungen an den Melanomzellen. Es konnte bei den Stichproben auch hier keinerlei Abhängigkeit der Stromantwort von der eingestrahlten HF nachgewiesen werden. Es soll allerdings nicht unerwähnt bleiben, dass auch bei diesen beiden Zelltypen nur bis zu Leistungen von $P = +15$ dBm (Keratinozyten) und $P = +12$ dBm (Fibroblasten) gemessen werden konnte, da sich die verwendete patch clamp Apparatur bei höheren Leistungen sehr anfällig auf HF Einstrahlung zeigte. Leider konnten diese Probleme während der Projektlaufzeit nicht zufrieden stellend gelöst werden

Um die Bereiche zwischen den einzelnen Frequenzen (900, 1800, 2400 MHz bis zu 22 GHz) dennoch bei hohen Leistungen abzudecken und den Frequenzbereich auch noch zu erweitern, wurden Lock-In modulierte Frequenzsweeps zwischen 100 MHz und 33 GHz durchgeführt. Dies vereinfachte den Aufwand der Messungen enorm und erlaubte uns, unsere Messungen auf Keratinozyten und Fibroblasten auszudehnen.

Diese Messungen dienten vor allem dem Zweck, die aus der dielektrischen Spektroskopie sowie der im Kapitel II.8.1 beobachteten Wasserresonanz bei $f = 22$ GHz mit Hilfe der patch clamp Technik zu studieren und auf andere Zelltypen auszuweiten. Da unser Aufbau für diese hohen Frequenzen nicht kalibriert ist, sollen sie hier nur qualitativen Zwecken dienen und zeigen, dass die 22 GHz Resonanz auch in einem patch clamp Experiment nachzuweisen möglich ist.

In Abb. II.8.5 ist ein solches Experimenten dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass die Messungen trotz der Lock-In Technik von einem starken Rauschen überlagert sind. Die Ursache hierfür konnte nicht befriedigend beseitigt werden, liegt aber vermutlich in der Absorption des HF-Signals innerhalb des Aufbaus. Solch ein starkes Rauschen wirft selbstverständlich Zweifel bei der qualitativen Interpretation der Daten auf. Allerdings hebt sich der Anstieg der Leitfähigkeit im Bereich von 22 GHz deutlich vom restlichen Signal ab, so dass auch hier auf eine erhöhte Absorption auf Grund der Wasserresonanz geschlossen werden kann. Um jedoch vor allem über den unter Frequenzbereich (700 MHz ... 5 GHz) Aussagen treffen zu können, wurden ausschließlich relative Veränderungen betrachtet.

Für die Melanomzellmessung bei $T = 28^\circ \text{C}$ in Abb. II.8.6 wurden daher weitere sweeps im Bereich von 700 MHz ... 5 GHz durchgeführt. In Abb. II.8.7 ist deutlich zu erkennen, dass es sich bei den vielen Strukturen in der gemessenen Intensität um nicht reproduzierbares Rauschen handelt, weshalb wir diese, wie bereits oben angemerkt, auf HF Einstrahlung, „pick up“ und Rauscheffekte der empfindlichen Messapparatur zurückführen. Erhalten bleibt jedoch ein signifikantes Maximum im Bereich von 22 GHz wie im Abb. II.8.5. In Abb. II.8.8 ist die gleiche Messung bei 35°C gezeigt. Auch hier findet ein Anstieg der Intensität im Bereich um 22 GHz statt. Die aus der dielektrischen Spektroskopie erwartete Verschiebung der Resonanzfrequenz mit steigender Temperatur kann auf Grund der zu ungenauen Auflösung jedoch nicht überprüft werden. Aus demselben Grunde wurde auf ausführlichere Messungen zum Temperaturverhalten verzichtet.

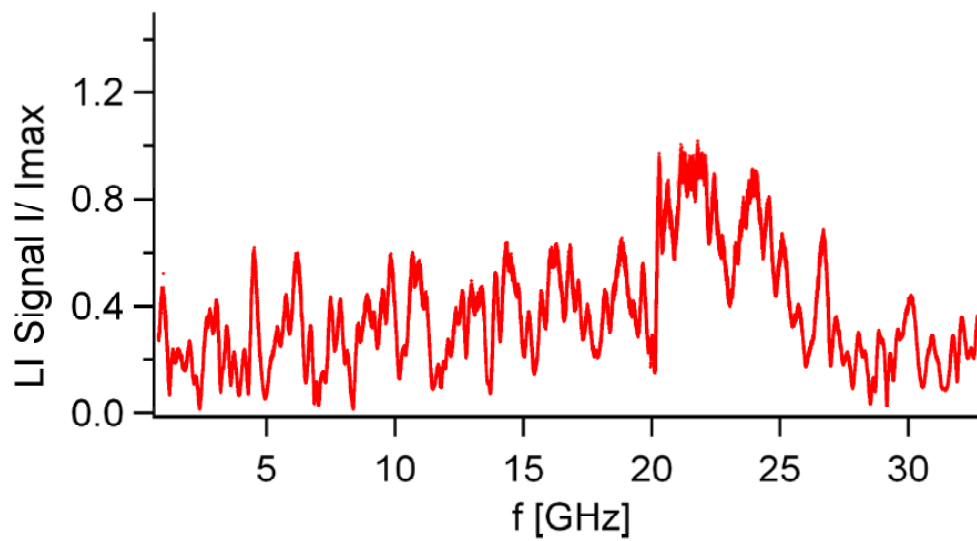


Abb. 8.5: Auf das Maximum normierter Lock In Plot eines Frequenzsweeps von 700 MHz – 33 GHz von Melanomzellen bei $T = 22^\circ \text{C}$. Im Bereich von 22 GHz ist ein Anstieg im Signal registrierbar (+18 dBm).

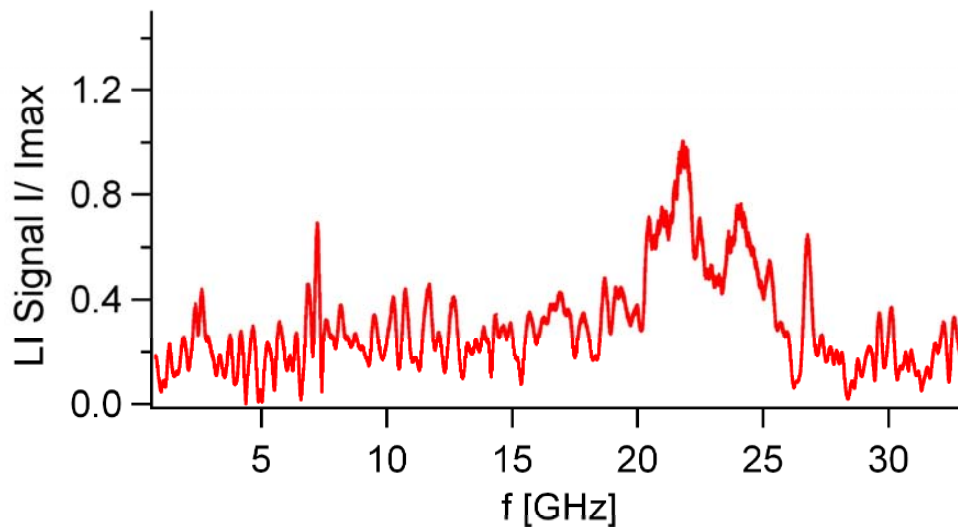


Abb. 8.6: Auf das Maximum normierter Lock In Plot eines Frequenzsweeps von 700 MHz – 33 GHz von Melanomzellen bei 28°C . Im Bereich von 22 GHz ist ein Anstieg im Signal registrierbar (+18 dBm).

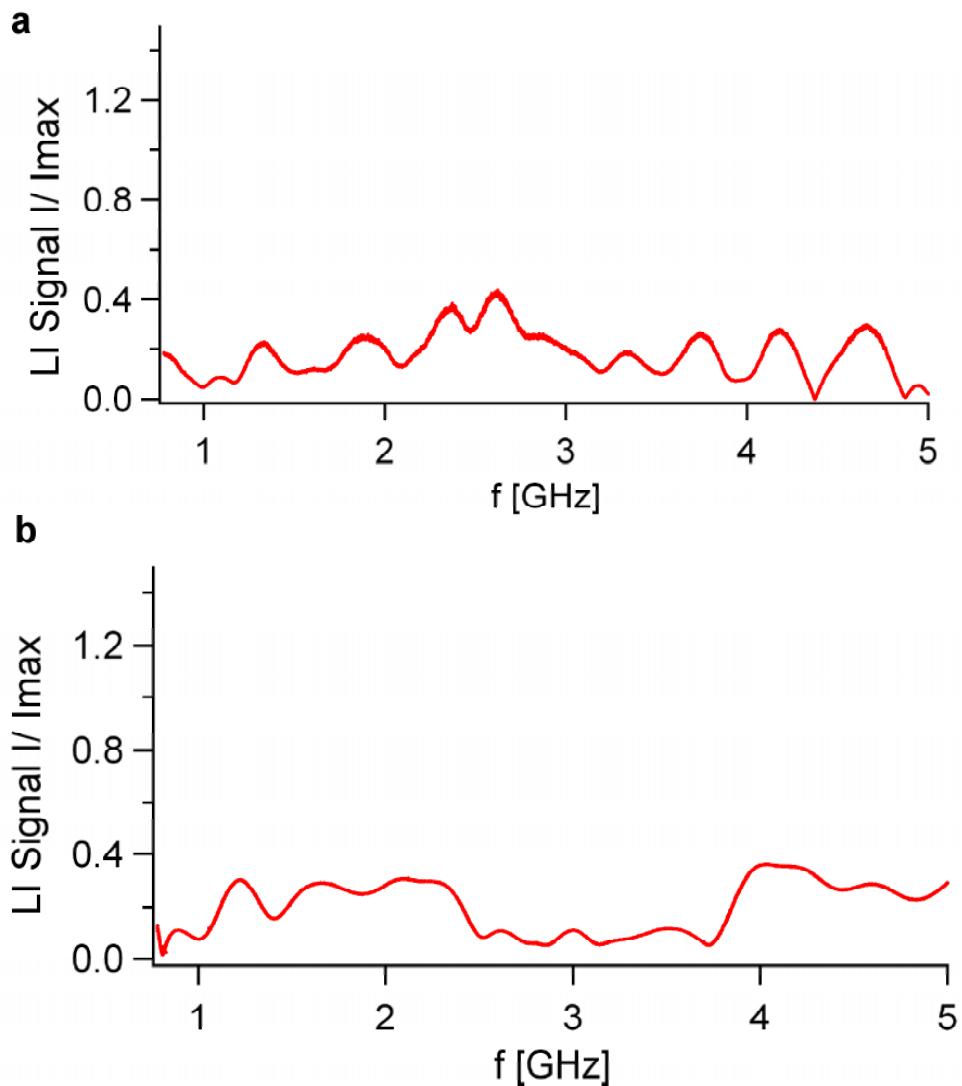


Abb. 8.7: Auf das Maximum bei $f = 22$ GHz normierter Lock In Plot eines Frequenzsweeps von 700 MHz ... 5 GHz ($P = +18$ dBm) von Melanomzellen bei $T = 28^\circ$ C. Zwischen den beiden unabhängigen, zu verschiedenen Zeiten durchgeführten Messungen (a und b) sind trotz langer Integrationszeiten keine Korrelationen in der Intensität des Signals zu erkennen, es handelt sich also um nicht reproduzierbare Signale, die auf eine leider nicht zu vermeidende HF-Einstrahlung in die Messzelle und damit verbundenes Rauschen zurückzuführen sind.

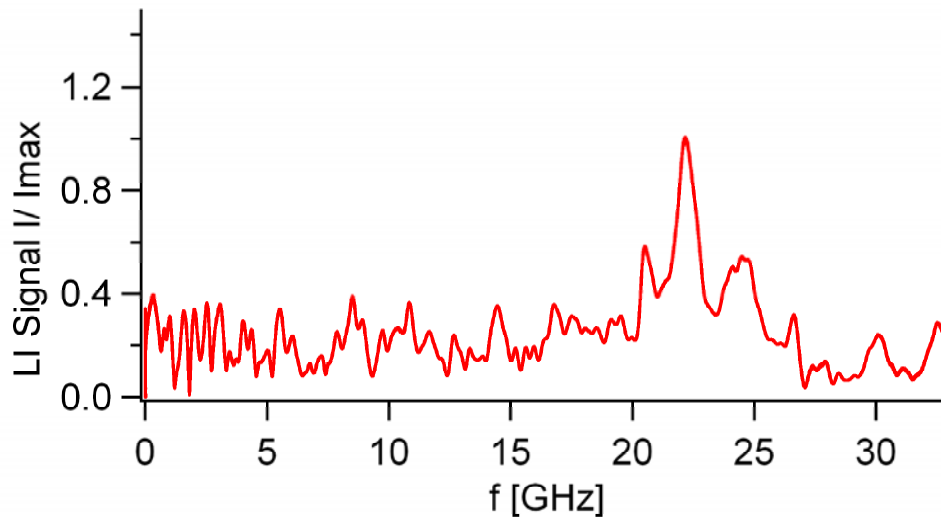


Abb. 8.8: Auf das Maximum normierter Lock In Plot eines Frequenzsweeps von 700 MHz – 33 GHz ($P = +18$ dBm) von Melanomzellen bei $T = 35^\circ$ C. Im Bereich von 22 GHz ist ein erhöhtes Signal registrierbar, das mit einer bei dieser Frequenz erhöhten Absorption identifiziert wird.

Wie bereits erwähnt, stellen die verwendeten Melanomzellen vom TypM2/A7 sehr kanalaktive Zellen dar. Die Tatsache, dass diese Zellen im Rahmen unserer Messgenauigkeit und trotz hoher SAR Werte lediglich Temperatureffekte aufwiesen, legt die Vermutung nahe, dass auch für weitere Zelltypen keine direkten Einflüsse auf das Kanalverhalten zu beobachten sein werden.

Um dies zu überprüfen, wurden Frequenzsweeps an Fibroblasten bei $T = 27^\circ$ C durchgeführt. In Abb. II.8.9 ist sofort zu erkennen, dass die bei den Melanomzellen gefundenen Störungen im Signal kein Zelltyp-spezifisches Problem darstellen, sondern ihren Ursprung in der Tat im Aufbau der Apparatur haben. Auch hier wird bei vergleichenden Messungen in Abb. II.8.10 klar, dass die Ursache der im Bereich 700 MHz–5 GHz gefundenen Intensitätsspitzen nicht auf zellulärer Ebene zu suchen ist. Erneut konnte jedoch die Wasserabsorption bei ca. 22 GHz gefunden werden.

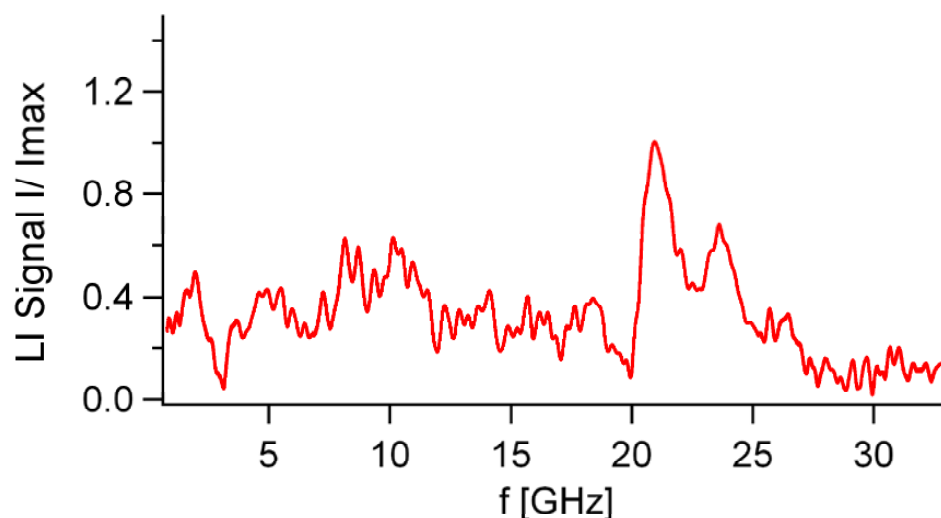


Abb. 8.9: Auf das Maximum normierter Lock In Plot eines Frequenzsweeps von 700 MHz – 33 GHz ($P = +18$ dBm) von Fibroblasten bei $T = 27^\circ$ C. Im Bereich von $f = 22$ GHz ist wie schon bei den Melanomzellen ein deutlicher Anstieg im Signal registrierbar, der allein auf eine Wasserresonanz zurückgeführt wird.

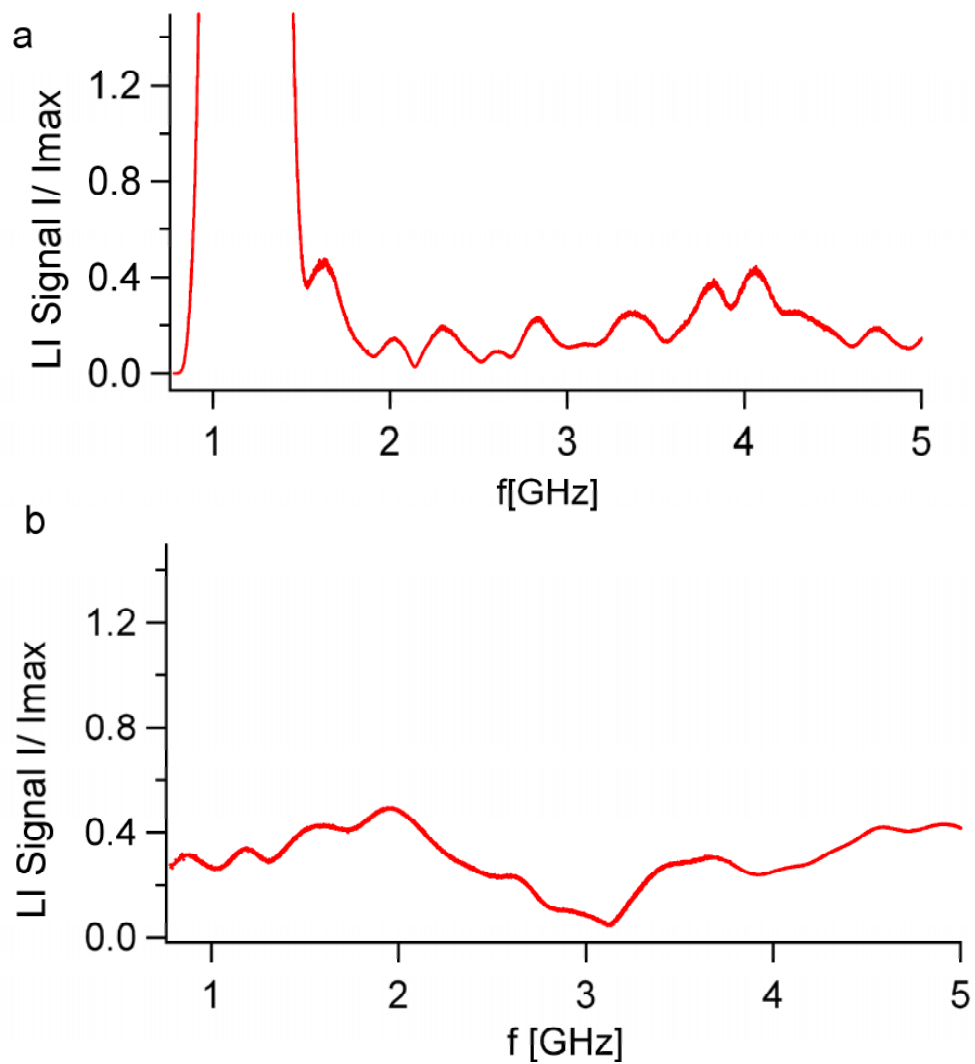


Abb. 8.10: Auf das Maximum bei $f = 22$ GHz normierter Lock In Plot eines Frequenzsweeps von 700 MHz ... 5 GHz von Fibroblasten bei 27° C. Zwischen den beiden unabhängigen, zu verschiedenen Zeiten durchgeführten Messungen (a und b) sind trotz langer Integrationszeiten und wie schon bei den Melanomzellen keine Korrelationen in der Intensität des Signals zu erkennen, es handelt sich also um nicht reproduzierbare Signale, die auf eine leider nicht zu vermeidende HF Einstrahlung in die Messzelle und damit verbundenes Rauschen zurückzuführen sind. Die sehr große Struktur in (a) bei $f \approx 1$ GHz ist auf ein HF Übersprechen in die Messzelle bei dieser speziellen Messung zurückzuführen.

Als letzter Zelltyp wurden Keratinozyten untersucht (Abb. II.8.11). Auch dieser Zelltyp brachte keine neuen Erkenntnisse sondern folgt der gleichen Erklärung wie die anderen beiden Zelltypen.

Zusammenfassend sind die Ergebnisse dieses Kapitels zwar im Detail nur als quantitative Hinweise zu verstehen, erlauben aber dennoch die Aussage, dass selbst bei sehr hohen SAR Werten die einzigen reproduzierbaren und sich deutlich vom Rauschen abhebenden Effekte reine Temperatureffekte sind, die sich wie gezeigt über eine temperaturabhängige Veränderung der Ionenleitfähigkeit erklären lassen. Kleinere, in einer HF bedingten Veränderung der Leitfähigkeiten von Ionenkanälen beruhende Effekte konnten im Rahmen dieser Messungen nicht gefunden werden, können aber selbstverständlich wegen der beschriebenen nicht genügenden Empfindlichkeit unserer Apparatur auch nicht ausgeschlossen werden.

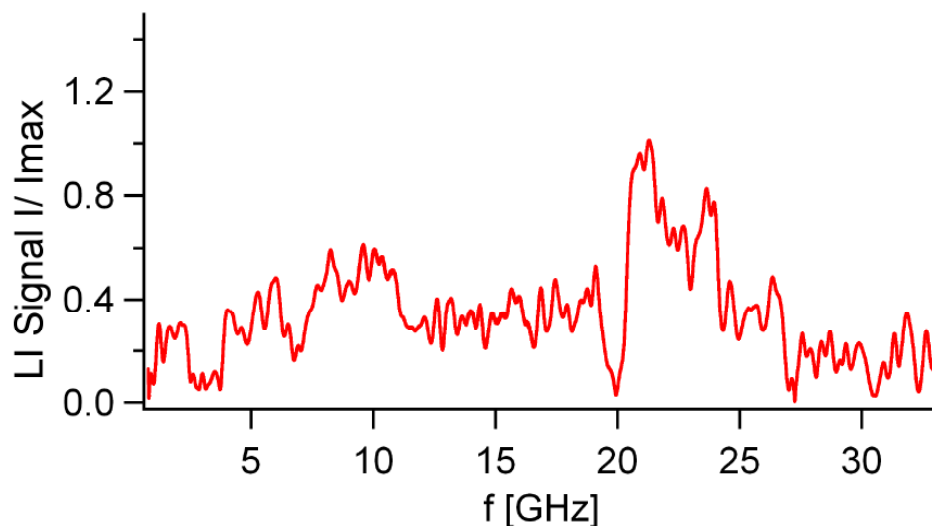


Abb. 8.11: Auf das Maximum normierter Lock In Plot eines Frequenzsweeps von 700MHz ... 33GHz ($P=+18\text{dBm}$) von Keratinozyten bei $T=27^\circ\text{C}$. Im Bereich von 22GHz ist wiederum ein deutlicher Anstieg im Lock In Signal registrierbar, der wie bereits bei den anderen Zelltypen allein auf eine Wasserabsorption zurückgeführt werden kann.

III Theoretische Modellierung

1 Modellierung der experimentellen Ausgangssituation im Hinblick auf die polarisationsspezifischen Besonderheiten der neuronalen Zellmembran

Biologische Zellmembranen weisen hinsichtlich der passiven elektrischen Eigenschaften im Vergleich zu einer reinen Lipid-Doppelschicht gewaltige Unterschiede auf. Die Berücksichtigung der sogenannten Schaltladungen führt zu einer spannungsabhängigen effektiven Membrankapazität, sowie zu einer merklich reduzierten spontanen Aktivität. Die hier vorgeschlagene Modellierung spiegelt die reale, im Teil II beschriebene physikalische Situation eines *Patch-Clamp*-Experiments unter sogenannten *current-clamp*-Bedingungen wieder.

1.1 Spannungsabhängige Ionenkanäle

Eine biologische Membran besteht aus einer Lipid-Doppelschicht, in die sogenannte Membranproteine eingelagert sind. Diese Proteine gewährleisten unter anderem die *Kommunikation* einer Zelle mit ihrer Umgebung. Der Informationsaustausch kann, wie im Falle von Nervenzellen, durch elektrische Signale in Form von Aktionspotentialen erfolgen. Diese elektrischen Signale werden hauptsächlich durch sogenannte spannungsabhängige Ionenkanäle verursacht. Diese Membranproteine erlauben den spannungsabhängigen Transport von Ionen über die ansonsten undurchlässige Membran hinweg. Je nach vorherrschendem Membranpotential, also der Spannungsdifferenz an der Zellmembran, sind die Ionenkanäle mehrheitlich offen oder geschlossen. Die Konformationsänderungen der Ionenkanäle erfolgen einerseits stochastisch, andererseits hängen sie sensitiv vom Membranpotential ab. Die Ursache für die Spannungsabhängigkeit ist in den geladenen Segmenten des Ionenkanals zu suchen, die sich in dem elektrischen Feld beim Schalten verschieben müssen. In diesem Zusammenhang spricht man dann von sogenannten Schaltladungen, die während eines Konformationsübergangs in der Zellmembran verschoben werden müssen. Dies verursacht wiederum polarisationsspezifische Besonderheiten, deren Modellierung und Berücksichtigung bei der Untersuchung der elektrischen Eigenschaften der neuronalen Zellmembran wichtiger Bestandteil dieses Forschungsvorhabens war (Loidl *et al.*, 2006).

1.2 Überhöhte Membrankapazität

Ein erstes wichtiges Resultat stellt die Erklärung einer erhöhten effektiven Membrankapazität dar. Approximativ ist die Membrankapazität C_m einer Lipid-Doppelschicht gegeben durch:

$$C_m = \epsilon_0 \epsilon_m / d, \quad (1.1)$$

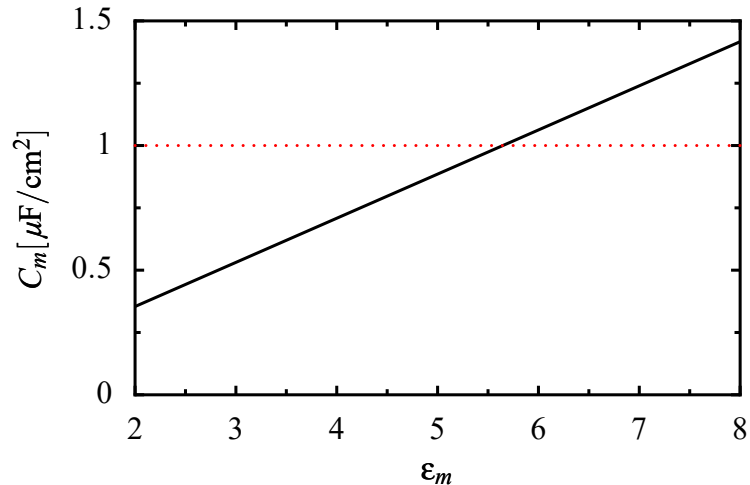


Abb. 1.1: Die Membrankapazität als Funktion der Permittivität eines membranbildenden Materials. Die vertikale, gepunktete Linie bezieht sich auf die physiologisch beobachtete Membrankapazität von $C_m = 1 \mu F cm^{-2}$.

wobei d die Membrandicke, ϵ_0 die dielektrische Konstante des Vakuums und ϵ_m die relative dielektrische Konstante der Lipidmoleküle bezeichnet, s. z.B. (Pethig and Kell, 1987).

Abbildung 1.1 zeigt, entsprechend Gl. (1.1) die Abhängigkeit der Membrankapazität von der relativen dielektrischen Konstante ϵ_m für $d = 5 \text{ nm}$ und $\epsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} \mu F/m$. Für die Permittivität einer planaren Lipid-Doppelschicht der Dicke $d = 5 \text{ nm}$ findet man (Pethig and Kell, 1987): $\epsilon_m \approx 2,0 - 2,2$. Daraus würde sich eine Membrankapazität ergeben, die kleiner als $0,5 \mu F/cm^2$ ist. Paradoxerweise finden sich jedoch in vielen physiologischen Lehrbüchern, z.B. (Keener and Sneyd, 1998) und (Loidl *et al.*, 2006) Werte um $1,0 \mu F/cm^2$, also Werte, die doppelt so groß sind, als die Werte, die man für homogene Lipiddoppelschichten erwarten würde (Pethig and Kell, 1987). Dieses Paradoxon zwischen den unterschiedlichen experimentellen Befunden wird im Folgenden aufgelöst. Ausgangspunkt dafür ist die Berücksichtigung von sogenannten „Schaltströmen“.

1.3 Schaltstrom

Spannungsabhängige Ionenkanäle sind an der biologischen Signalverarbeitung beteiligt und sind insbesondere in der Zellmembran von Nervenzellen zu finden (Loidl *et al.*, 2006). Die elektrischen Eigenschaften der gesamten Zelle werden durch die Ionenkanäle maßgeblich bestimmt, was deren Berücksichtigung in einer theoretischen Modellierung unabdingbar macht. Die Schlüsselrolle, die die spannungsabhängigen Ionenkanäle einnehmen, beruht dabei nicht nur auf der Ermöglichung eines ionischen Stroms durch die ansonsten für Ionen undurchlässige Zellmembran, sondern auch darauf, dass die Proteine, die die Ionenkanäle formen, eine inhomogene Ladungsverteilung aufweisen und somit bei Konfigurationsänderungen Ladungsverschiebungen und Polarisationsänderungen auftreten.

Es soll hier bemerkt werden, dass die Spannungsabhängigkeit der Ionenkanäle sich dabei vor allem auf die Tatsache bezieht, dass die Konfiguration, in der ein Ionenkanal vorliegt, von der, an der Zellmembran anliegenden Membranspannung, abhängt (Hille,

2001). Während für bestimmte Membranspannungen ein offener Kanal energetisch begünstigt ist, ist bei einer anderen Membranspannung die geschlossene Konfiguration wahrscheinlicher. Dabei legt die Spannungsdifferenz an der Zellmembran die Konfiguration nicht zwingend fest, sondern gibt nur Wahrscheinlichkeiten für das Auftreten der verschiedenen Konfigurationen an. Verursacht wird diese Spannungsabhängigkeit durch diese Ladungen, die beim Schalten von einer in die andere Konfiguration innerhalb der Zellmembran verschoben werden müssen. Die exakte, mikroskopisch mechanische Funktionsweise des Schaltmechanismus ist ein aktueller, kontrovers diskutierter Forschungsgegenstand und wird hier im Sinne einer Verschiebung einer effektiven Ladung innerhalb der Zellmembran betrachtet. Jedoch kann die Bewegung dieser gebundenen Ladungen in Experimenten in Form des „Schaltstroms“ gemessen werden. In derartigen Experimenten wird bei vorgegebener Membranspannungsveränderung der Strom mittels einer interzellulären und einer extrazellulären Elektrode gemessen. Hier sei angemerkt, dass die Studien im Projektbereich II auf dieser Art der Messung beruhen, s. Teil II. Da der Schaltstrom durch das Öffnen und Schließen der Ionenkanäle verursacht wird, würde man annehmen, dass im statischen Fall dieser verschwindet. Dies ist jedoch nicht der Fall, da auch bei konstanter Membranspannung Fluktuationen der Anzahl der offenen Kanäle auftreten, welche Fluktuationen des Schaltstroms verursachen. Obwohl diese Stromschwankungen im zeitlichen Mittel verschwinden, können diese aufgrund des stark nichtlinearen Verhaltens der Zellmembran gegenüber einer äußeren Störung drastische Konsequenzen haben, s. dazu Kapitel 2. In Gegenwart eines zeitabhängigen elektrischen Feldes beeinflusst dieses das an der Membran anliegende Potential, was die Übergangswahrscheinlichkeiten für Konfigurationsübergänge der Ionenkanäle moduliert und letztlich einen zeitabhängigen Polarisationsstrom verursacht.

1.4 Effektive Membrankapazität

Um den Effekt des Schaltstroms im jeweiligen Experiment (Patch Clamp Untersuchungen und dielektrische Spektroskopie) analysieren zu können, muss die jeweilige experimentelle Ausgangssituation berücksichtigt und entsprechend modelliert werden. Im Hinblick auf die passiven elektrischen Eigenschaften und, im Besonderen, auf die elektrische Kapazität biologischer Membranen erfolgte diese Modellierung innerhalb dieses Projekts und soll im Folgenden dargestellt werden. In Kap. 1.5 wird die Modellierung dann auf ein konkretes Beispiel angewendet.

Für eine transmembrane Elektrodenkonfiguration (vgl. Patch Clamp Untersuchungen) werden die elektrischen Eigenschaften einer Zellmembran durch das in Abb. 1.2 aufgezeigte Ersatzschaltbild beschrieben. Wesentliche Beiträge zu den elektrischen Eigenschaften ergeben sich aufgrund der Ionenundurchlässigkeit der Lipiddoppelschicht, dem ionischen Stromfluss durch Poren und Kanäle in der Membran und einem, durch Schaltvorgänge hervorgerufenen Polarisationsstrom innerhalb der Membran. Membrankapazität, ionischer Widerstand und der durch die Schaltdynamik verursachte Widerstand sind parallel geschaltet. Dabei bezieht sich hier die Membrankapazität auf die Kapazität einer Lipiddoppelschicht. Geht man von der (physiologisch relevanten) Situation aus, dass in der Ruhelage die meisten Ionenkanäle geschlossen sind (Situation „at rest“), so ist der durch den Fluss von Ionen verursachte Strom

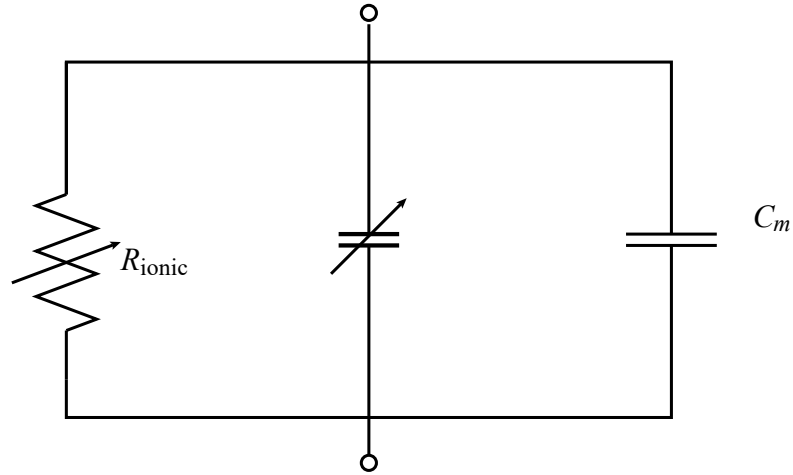


Abb. 1.2: Ersatzschaltbild einer Zellmembran unter Berücksichtigung der Schaltströme für ein Experiment mit transmembraner Elektrodenanordnung, s. „Patch Clamp“ im Projektbereich II.

verschwindend klein. Öffnen sich nun, z.B. aufgrund einer externen Anregung die Ionenkanäle, so beobachtet man zunächst einen „Schaltstrom“ und erst dann kommt es zur ionischen Leitfähigkeit durch die Membran hindurch.

Entsprechend dem ersten Kirchhoffschen Gesetz gilt für die Membranspannung V , vgl. Abb. 1.2:

$$I_{\text{ext}}(t) = C_m \frac{d}{dt} V(t) + I_{\text{ionic}}(t) + I_{\text{gating}}(t), \quad (1.2)$$

wobei I_{ext} der durch die transmembranen Elektroden aufgeprägte Strom ist, I_{ionic} der ionische Strom und I_{gating} der Strom aufgrund der Bewegung von Ladungen innerhalb der Zellmembran beim Schalten. C_m beschreibt die Kapazität der Lipiddoppelschicht. Wie oben beschrieben, sind die beiden Ströme I_{gating} und I_{ionic} nicht unabhängig voneinander. Durch Integration der Gleichung (1.2) erhält man die entsprechende Gleichung für die Ladungsdifferenz zwischen Zellinnen- und Zellaußenseite:

$$Q_{\text{ext}}(t) = Q_{\text{capacity}}(t) + Q_{\text{ionic}}(t) + Q_{\text{gating}}(t). \quad (1.3)$$

Die an der Innenseite der Zellmembran lokalisierte Schaltladung $Q_{\text{gating}}(t)$ ist dabei durch das Produkt der Anzahl der offenen Kanäle $N(V, t)$ und der Einzel-Kanal-Schaltladung q gegeben. Somit ist

$$I_{\text{gating}}(t) = \frac{d}{dt} Q_{\text{gating}}(t) = \left(\frac{d}{dt} N(V, t) \right) \times q. \quad (1.4)$$

Darüber hinaus ist der ionische Strom – Ohmsches Verhalten angenommen – durch das Produkt der Einzel-Kanal-Leitfähigkeit σ , der Anzahl offener Kanäle $N(V, t)$ und der an der Zellmembran anliegenden Spannung V gegeben:

$$I_{\text{ionic}}(t) = \frac{d}{dt} Q_{\text{ionic}}(t) = N(V, t) \sigma V. \quad (1.5)$$

Unter der Annahme, dass $N(V, t)$ nur über V von der Zeit t abhängt, d.h. $N(V(t))$, ergibt sich aus Gl. (1.2):

$$I_{\text{ext}}(t) = C_{\text{eff}}(V) \frac{d}{dt} V + N(V) \sigma V, \quad (1.6)$$

mit der effektiven Kapazität:

$$C_{\text{eff}}(V) = C_m + q \frac{d}{dV} N(V). \quad (1.7)$$

Die effektive Kapazität C_{eff} der Zellmembran ergibt sich daher in diesem vereinfachten Fall aus der Summe der Kapazität der Lipiddoppelschicht C_m und einer durch Schaltladungen verursachten Kapazität. Für den Fall positiver Schaltladungen, d.h. $q > 0$, und $\frac{dN(V)}{dV} > 0$ kann man somit eine Erhöhung der effektiven Membrankapazität beobachten, was wiederum eine höhere Kapazität der biologischen Membran im Vergleich zur der einer Lipiddoppelschicht bestätigt.

Obige Modellierung kann nun ohne weiteres auf verschiedene biologische Systeme angewendet werden. Voraussetzung ist jedoch, dass die Zellkommunikation über Änderungen des Membranpotentials vonstatten geht und diese durch das „Schalten“ von spannungsabhängigen Ionenkanälen verursacht wird. Im folgenden Kapitel wird nun obige Modellierung auf das Musterbeispiel, aber im Hinblick auf die Beschreibung der Generierung und Propagation von Aktionspotentialen universelles System – nämlich Hodgkin-Huxleys *squid giant axon* – angewendet und quantitativ ausgewertet.

1.5 Kapazitätserhöhung aufgrund von Schaltladungseffekten am Beispiel eines Archetyps einer neuronalen Zelle

Die Dynamik des Membranpotentials und insbesondere die Erzeugung von Aktionspotentialen im *squid giant axon* konnte von Hodgkin und Huxley durch ein empirisches Modell erstmalig beschrieben werden. Dieses Urmodell findet seither erfolgreich Anwendung bei der Beschreibung der elektrischen Membraneigenschaften von vielen anderen neuronalen Zellen. Jedoch ist es in seiner ursprünglichen Form nicht in der Lage spontane Aktionspotentiale oder auch den Einfluss von Schaltladungen zu berücksichtigen. Abhilfe bezüglich dieser Punkte schafft hier eine von uns entwickelte Erweiterung (Schmid *et al.*, 2006), welche Effekte des sogenannten Kanalrauschens und der Schaltladungseffekte beinhaltet. Das Modell sowie einige seiner wichtigsten Konsequenzen sind im Anhang A detailliert aufgeführt.

1.5.1 Bestimmung der effektiven Kapazitätserhöhung

Zur Bestimmung der effektiven Kapazität muss das vierdimensionale Problem geeignet vereinfacht werden. Eine Reduzierung der Dimensionalität kann durch Zeitskalenseparationsargumente erfolgen, vgl. Kapitel 1.6. In einem frühen Stadium der Spike-Initiierung ist die m -Dynamik die schnellste (mit einer typischen Zeitskala von ca. 0,3 ms – entspricht einer Frequenz von ca. 3.3 kHz), und die Dynamik der Schaltvariablen n und h die langsamste (ca. 5 ms), vgl. Gl. (1.16). Daher kann in diesem

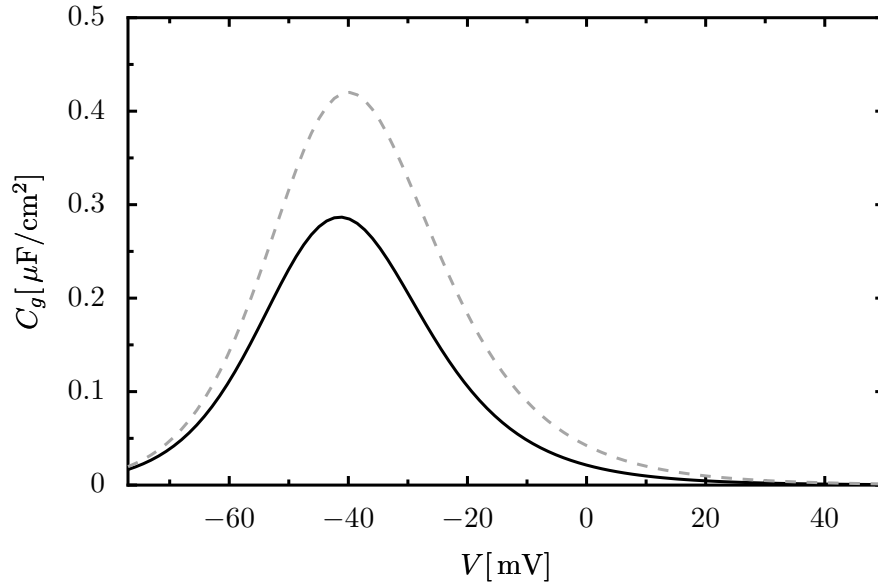


Abb. 1.3: Dargestellt ist die Abhängigkeit der, durch die Schaltladung verursachten, zusätzlichen, Kapazität von der Membranspannung: die durchgezogene, schwarze Linie ergibt sich aus Gl. (1.9b), während die gestrichelte, graue Linie der approximativen Lösung (Gl. (1.10)) entspricht. Eine Veränderung der Membranspannung, z.B. hervorgerufen durch externe Felder, beeinflusst somit die Kapazität der Zellmembran und nimmt daher Einfluss auf die Zeitskalen der Dynamik.

Fall ($V \approx V_{\text{rest}}$) eine adiabatische Elimination der m -Variable erfolgen, d.h. $m_{st}(V(t))$, während für n und h die Ruhewerte als approximative Werte verwendet werden, d.h. $n_{st}(V_{\text{rest}})$ und $h_{st}(V_{\text{rest}})$. Dabei sind die *steady-state*-Werte für die Schaltvariablen durch $x_{st} = \alpha_x(V) / [\alpha_x(V) + \beta_x(V)]$, $x = n, m, h$ gegeben. Mit dieser Approximation reduzieren sich dann die Gleichungen (A.1a) und (A.6) zu:

$$I_{\text{ext}}(t) = C_m \frac{dV(t)}{dt} + g_{\text{Na}}^{\text{max}} m_{st}^3(V(t)) h_{st}(V_{\text{rest}}) (V(t) - V_{\text{Na}}) + g_{\text{K}}^{\text{max}} n_{st}^4(V_{\text{rest}}) (V(t) - V_{\text{K}}) + g_l (V(t) - V_l) + 3\rho_{\text{Na}} \frac{dm_{st}(V(t))}{dt} q_m. \quad (1.8)$$

Da aufgrund der Zeitskalenseparation $\frac{dm_{st}(V(t))}{dt} \approx \frac{dm_{st}(V)}{dV} \frac{dV(t)}{dt}$ gilt, vereinfacht sich Gleichung (1.8) zu:

$$I_{\text{ext}}(t) = (C_m + C_g) \frac{dV(t)}{dt} + g_{\text{Na}}^{\text{max}} m_{st}^3(V(t)) h_{st}(V_{\text{rest}}) (V(t) - V_{\text{Na}}) + g_{\text{K}}^{\text{max}} n_{st}^4(V_{\text{rest}}) (V(t) - V_{\text{K}}) + g_l (V(t) - V_l) \quad (1.9a)$$

mit dem, durch die Schaltladungen verursachten, zusätzlichen Beitrag zur Membrankapazität:

$$C_g = 3\rho_{\text{Na}} q_m m_{st}(V) (1 - m_{st}(V)) \frac{d}{dV} \ln \frac{\alpha_m(V)}{\beta_m(V)}. \quad (1.9b)$$

Diese Gleichung kann mithilfe der Gleichung (A.5) in folgende Form gebracht werden:

$$C_g(V) \approx 3\rho_{\text{Na}} \frac{q_m^2}{k_B T} m_{st}(V) [1 - m_{st}(V)]. \quad (1.10)$$

Sind alle m -gates im Mittel halb offen, d.h. $m_{st} = 1/2$, so wird demnach die gesamte effektive Membrankapazität maximal. In Abb. 1.3 ist die Abhängigkeit der zusätzlichen Membrankapazität von der Membranspannung dargestellt. Eine durch, z.B., ein elektrisches Feld verursachte Veränderung der Membrankapazität hat somit Auswirkungen auf die Zeitskala mit der Aktionspotentiale erzeugt werden. So beobachtet man im Gleichgewicht – also at rest bei -65 mV – eine Erhöhung der Membrankapazität um 8,5% gegenüber der Kapazität der Lipid-Doppelschicht. Ist die Hälfte der m -gates offen, so kann eine Kapazitätserhöhung von ca. 29% beobachtet werden. Dies stellt eine signifikante Veränderung der Membrankapazität dar und beeinflusst die passiven elektrischen Eigenschaften, z.B. erhöht sich auch die Zeitkonstante der Dynamik des Membranpotentials. In diesem Kontext sei die sogenannte *Hodgkin's maximum velocity hypothesis* erwähnt (Hodgkin, 1975; Adrian, 1975; Hudspeth *et al.*, 2000; Nossal and Lecar, 1991): Berücksichtigt man Schaltladungen, so ergibt sich daraus eine optimale Ionenkanaldichte, für die die Ausbreitungsgeschwindigkeit eines Aktionspotentials maximiert wird. Interessanterweise findet man nun diese optimale Dichte in der Natur realisiert. Die Hypothese besagt, dass dies aufgrund einer angestrebten Maximierung der Signalübertragungsgeschwindigkeit evolutionär im Axon des Tintenfisches verwirklicht wurde. Ein verändertes zeitliches Anregungsverhalten würde diese Optimierung zunichte machen können.

1.5.2 Vergleich mit dem Experiment

Ein Vergleich der theoretischen Vorhersagen für den zusätzlichen Beitrag zur Membrankapazität mit den experimentell bestimmten Werten (Abb. 1.4 und (Fernández *et al.*, 1982)) zeigt eine qualitative Übereinstimmung. Jedoch zeigt ein direkter Vergleich, dass die theoretischen Werte ungefähr 3 mal größer als die experimentellen Werte sind. Da die Gültigkeit und Anwendbarkeit des Archetyps der neuronalen Zellmodellierungen für die im Experiment von Fernández verwendeten *squid giant axons* hier nicht bezweifelt wird, ist die Ursache für die Diskrepanz in den gemachten Approximationen zu suchen, mit deren Hilfe das nichtlineare vierdimensionale Problem auf eine eindimensionale Dynamik reduziert wurde, vgl. Kap. 1.5.1, wodurch die Bestimmung eines analytischen Ausdrucks für die effektive Membrankapazität erst möglich wurde. Insbesondere die Approximationen, die auf Separation von Zeitskalen beruhen, sind im Falle eines frequenzabhängigen Stimulus kritisch zu hinterfragen und eine ausführlichere Diskussion der Zeitskalen muss erfolgen, vgl. Kap. 1.6. Es soll hier bemerkt werden, dass im Experiment der zusätzliche Beitrag zur Membrankapazität von der Frequenz abhängt und mit zunehmender Frequenz abfällt.

Dennoch zeigt der Vergleich, dass das in Kapitel 1.4 dargestellte Verfahren eine approximative Bestimmung des zusätzlichen Beitrags zur Membrankapazität für Dynamiken, wie sie in vielen neuronalen Systemen beobachtet werden, ermöglicht.

1.6 Lineare Antwort einer neuronalen Zellmembran – deterministischer Fall

In diesem Abschnitt soll die lineare Antwort eines sinusförmigen getriebenen neuronalen Systems untersucht und für hohe Frequenzen diskutiert werden. Es wird die

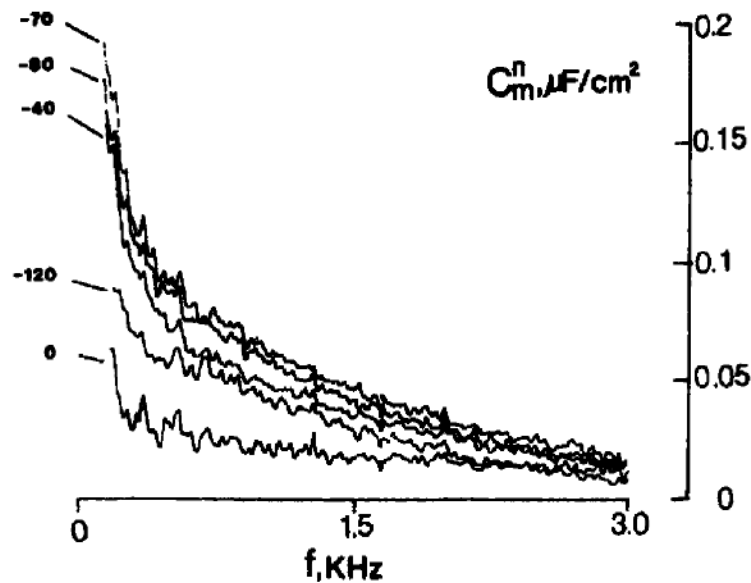


FIGURE 6. Voltage-dependent capacitance measured 155 ms after pulsing from a holding potential of 0 mV to the indicated potential. The record used to subtract the voltage-independent capacitance was obtained at 40 mV. Tris-Cl-TTX//200 TMAFG. Temperature, 12.5°C.

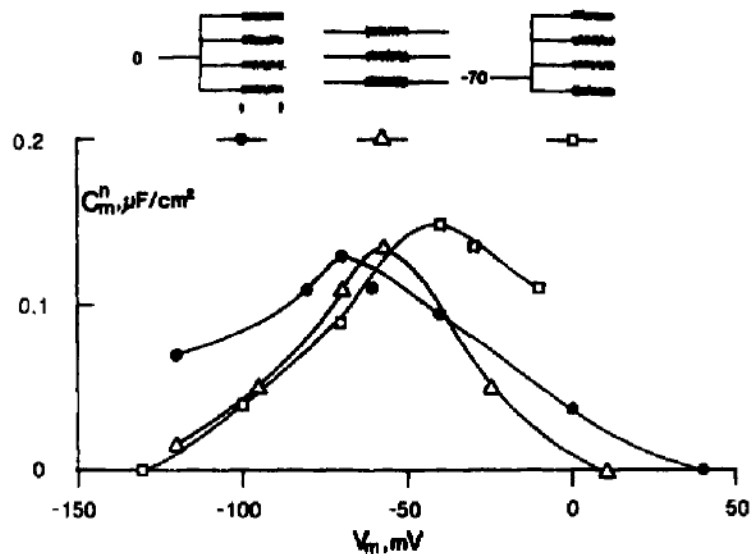


FIGURE 7. Voltage-dependent capacitance measured at $f = 100$ Hz as a function of membrane potential. The triangles correspond to measurements in steady state for various holding potentials. Tris-Cl-TTX//200 TMAFG. Temperature, 7.5°C. The filled circles correspond to measurements 155 ms after pulsing from a holding potential of 0 mV. Tris-Ac-TTX//200 TMAFG. Temperature, 12.5°C. Open squares correspond to measurements 155 ms after pulsing from a holding potential of -70 mV. Tris-Ac-TTX//200 TMAFG. Temperature, 12.5°C. The voltage-independent capacitance has been subtracted with records obtained at 10, 40, and -130 mV, respectively.

Abb. 1.4: Aus (Fernández *et al.*, 1982): Der durch Schaltladungen zusätzlich hervorgerufene Beitrag zur Kapazität der Zellmembran hängt von der Frequenz (obere Grafik) und vom Membranpotential (unteres Bild) ab.

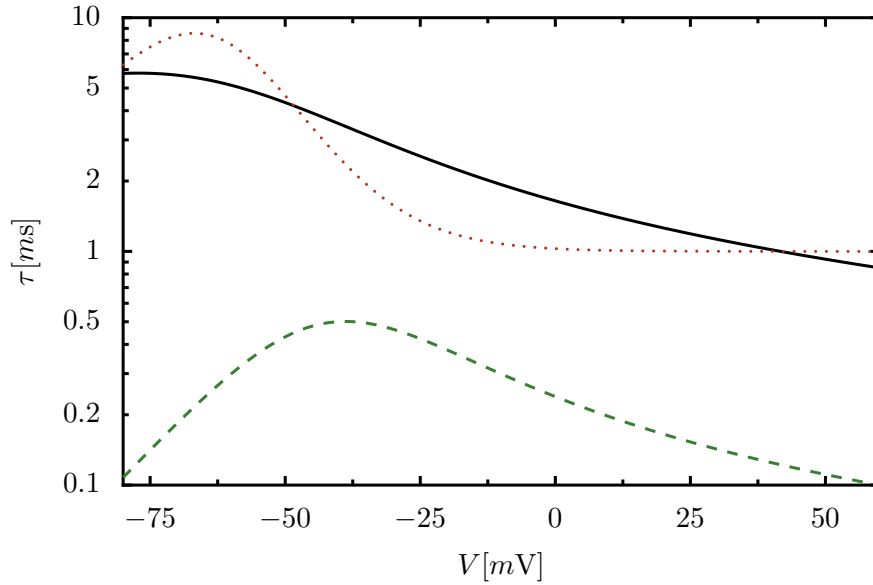


Abb. 1.5: Zeitskalen der Schaltdynamik im Archetyp der neuronalen Zellmodelle, s. Anhang A: τ_n – durchgezogene schwarze Linie, τ_m – gestrichelte grüne Linie und τ_h – gepunktete rote Linie.

Antwort des sich im Gleichgewicht befindenden Systems auf einen äußeren Stimulus diskutiert, wobei durch die Relaxation des Systems in den Gleichgewichtszustand die intrinsische Zeitskala definiert wird, mit welcher dann die Zeitskala des Antriebs verglichen werden muss.

Als Beispielsystem dient hierbei das archetypische Hodgkin-Huxley Modell, gegeben durch die Gleichungen (A.1 a) und (A.6). Für die Berechnung des zusätzlichen Beitrags zur Membrankapazität aufgrund von Schaltladungseffekten musste das Mustermodell, das aus vier nichtlinearen, gekoppelten Differentialgleichungen für das Membranpotential und den drei „Schaltvariablen“ besteht, durch adiabatische Elimination auf eine eindimensionale Beschreibung vereinfacht werden, die es uns erlaubt, eine effektive Membrankapazität zu definieren. Die Vereinfachung erfolgte dabei aufgrund einer Zeitskalenseparation, vgl. Kap. 1.5.1.

Die Gleichung der deterministischen Dynamik der Schaltvariablen, vgl. Gl. (A.6), kann in

$$\frac{dx(t)}{dt} = \frac{x_{st} - x(t)}{\tau_x}, \quad x = n, m, h \quad (1.11)$$

umgeschrieben werden. In Gl. (1.11) sind der Gleichgewichtswert x_{st} und die Zeitskala τ_x durch die Öffnungs- und Schließraten gegeben:

$$x_{st}(V) = \frac{\alpha_x(V)}{\alpha_x(V) + \beta_x(V)}, \quad (1.12)$$

$$\tau_x(V) = \frac{1}{\alpha_x(V) + \beta_x(V)}. \quad (1.13)$$

In Abbildung 1.5 sind die Zeitskalen der Dynamiken der Schaltvariablen als Funktion des Membranpotentials V dargestellt. Ebenso kann die Zeitskala der V -Dynamik im archetypischen Hodgkin-Huxley Modell in der Nähe des *rest potentials*, $V_{rest} = -65$ mV

aus

$$C_m \frac{dV(t)}{dt} = g_{Na}^{\max} m_{st}^3 h_{st} (V - V_{Na}) + g_K^{\max} n_{st}^4 (V - V_K) + g_l (V - V_l) \quad (1.14)$$

bestimmt werden und durch eine Taylor-Entwicklung um das *rest potential* in folgende Form gebracht werden:

$$\frac{dV(t)}{dt} = \frac{V_{\text{rest}} - V(t)}{\tau_V}. \quad (1.15)$$

Für die V -Dynamik findet man eine typische Zeitskala von $\tau_V = 0,9$ ms. Wie oben dargestellt, führen Schaltladungseffekte zu einer Verlangsamung der Membrandynamik, d.h. zu einem geringfügig größeren τ_V , vgl. zusätzlicher Beitrag zur Membrankapazität (Kapitel 1.4). In der Nähe des Gleichgewichts, $V_{\text{rest}} = -65$ mV, ist eine klare Separation der Zeitskalen zu beobachten, d. h.,

$$\tau_m < \tau_V < \tau_n, \tau_h, \quad (1.16)$$

innerhalb der typischen Zeitskalen für die Dynamik der Schaltvariablen m, h und n : $\tau_m \approx 0,3$ ms, $\tau_h \approx 9$ ms, $\tau_n \approx 5$ ms. Im Hinblick auf die Betrachtungen im vorangegangenen Kapitel 1.5 sei erwähnt, dass eine Berücksichtigung des Schaltladungseffekts die Zeitskalen „at rest“ nur geringfügig (nicht um eine oder mehrere Größenordnungen) beeinflusst.

Wird die Antwort der linearisierten Dynamik des Membranpotentials auf eine externe Störung $I_{\text{ext}}(t)$ diskutiert, so empfiehlt es sich, die Lösung im Fourierraum zu untersuchen. Für die fouriertransformierte Auslenkung aus dem Gleichgewicht $\delta\tilde{V} = \tilde{V}(\omega) - V_{\text{rest}}$ und den Stimulus im Frequenzraum $\tilde{I}_{\text{ext}}(\omega)$ gilt:

$$\delta\tilde{V}(\omega) = \chi(\omega) \tilde{I}_{\text{ext}}(\omega), \quad (1.17)$$

mit der *linearen Antwortfunktion* $\chi(\omega)$:

$$\chi(\omega) = \frac{\tau}{1 - i\omega\tau}, \quad (1.18)$$

wobei i die imaginäre Einheit ist, d.h. $i = \sqrt{-1}$. Im Limes hoher Frequenzen ($\omega \gg 1/\tau$) skaliert die maximale Auslenkung aus der Ruhelage, d.h. $|\delta\tilde{V}(\omega)|$ wie $1/\omega$, da

$$|\chi(\omega)| = 1/\sqrt{\tau^{-2} + \omega^2} \rightarrow 1/\omega, \quad \text{für } \omega \gg 1/\tau. \quad (1.19)$$

Da in neuronalen Systemen typischerweise für die Zeitskalen $1/\tau \ll 1$ MHz gilt, erwartet man für schwache elektromagnetische Stimuli mit Frequenzen im MHz bis GHz-Bereich keine signifikanten Änderungen oder gar Resonanzen in der linearen Antwort.

Damit können Schaltladungseffekte als Ursache resonanter Phänomene im MHz bis GHz-Bereich zumindest in Hodgkin-Huxley-artigen Systemen ausgeschlossen werden. Jedoch ergeben sich aus diesen Resultaten interessante Überlegungen und neue Modellierungsansätze für die α -Dispersion in biologischen Geweben für Frequenzen bis in den MHz-Bereich.

1.7 Zusammenfassung: Einfluss von Schaltladungseffekten

Das Studium der polarisationsspezifischen Besonderheiten einer erregbaren neuronalen Zellmembran bedarf der Berücksichtigung von Schaltladungseffekten. Es gelang uns, den Polarisationsstrom aufgrund der Bewegung von Schaltladungen als Ursache für die im Experiment beobachtbare Erhöhung der effektiven Membrankapazität auszumachen. Quantitativ wird dies anhand eines archetypischen Beispielmmodells der Beschreibung der Dynamik des Membranpotentials gezeigt. Die Untersuchungen zeigten, dass die Schaltladungseffekte die im System intrinsisch auftretenden typischen Zeitskalen nicht drastisch modifizieren. Insbesondere liefern unsere theoretischen Untersuchungen keinen Anhaltspunkt für das Auftreten von resonanten Phänomenen im MHz- und GHz Bereich aufgrund von Schaltladungseffekten.

2 Einfluss von Rauschen: Anomale Signalverstärkung – Effekt der Stochastischen Resonanz

Um die Rauscheinflüsse auf die Verarbeitung von schwachen Signalen zu bestimmen, untersuchten wir die nichtlineare Antwort einer Zellmembran im Hinblick auf ein Auftreten des Effekts der *Intrinsischen Stochastischen Resonanz* als Funktion der Antriebsfrequenz und der Antriebsamplitude eines harmonischen Antriebs. Entsprechend der in der Literaturstudie (Loidl *et al.*, 2006) diskutierten Beobachtung, dass Rauschen auch in neuronalen Systemen zu einer anomalen Verstärkung eines schwachen Signals (Effekt der Stochastischen Resonanz) führen kann, zeigen unsere Studien an dem von uns entwickelten Membranmodell (vgl. Anhang A), eine rauschinduzierte Verstärkung eines Signals. Inwieweit die stabilisierende Wirkung von Schaltladungseffekten, die in Kap. 1 vorgestellt und diskutiert wird, den Effekt der Stochastischen Resonanz beeinflussen, wird im Folgenden geklärt.

2.1 Der Effekt der Stochastischen Resonanz

Man bezeichnet als *Stochastische Resonanz* ein Phänomen, bei dem Rauschen die Qualität der Antwort auf ein ursprüngliches Signal verstärkt: Mit zunehmender Rauschstärke wird die Qualität des Ausgangs-Signals besser. Im Literaturbericht (Loidl *et al.*, 2006) wurde anhand eines einfachen Systems der Effekt der *Stochastischen Resonanz* erklärt. Im Wesentlichen beruht er auf der Tatsache, dass erst Rauschen bestimmte Anregungen bzw. Übergänge, ermöglicht. Da die Skalen der Übergänge wesentlich größer als die des Antriebs sein können, kann Verstärkung beobachtet werden. Im optimalen Fall passen die Zeitskalen der rauschinduzierten Übergänge und des Antriebs zusammen, und eine maximale Verstärkung kann beobachtet werden. Typischerweise trägt man charakteristische Maße, wie etwa das Signal-zu-Rauschverhältnis, die spektrale Verstärkung oder andere, informations-theoretische Maße, gegenüber der Rauschstärke auf, und beobachtet eine optimale Intensität des Rauschens bei der die Signal-Verstärkung maximal wird. Es gibt eine ganze Reihe von biologischen Systemen in denen der Effekt der Stochastischen Resonanz bereits experimentell nachgewiesen werden konnte (Loidl *et al.*, 2006; Gammaitoni *et al.*, 1998; Hänggi, 2002). Die Frage, ob ein solcher Effekt auch auf (sub-)zellulärer Ebene beobachtbar ist, war Bestandteil dieses Forschungsvorhabens - speziell unter der Berücksichtigung der polarisationsspezifischen Besonderheiten der Zellmembranen. Das in Anhang A dargestellte Modell berücksichtigt die Besonderheiten der Zellmembran, die sich aus dem Vorhandensein von spannungsgesteuerten Ionenkanälen ergeben. Es erschien uns daher als geeignetes Modellsystem für die Untersuchungen zur stochastischen Verstärkung schwacher elektrischer Signale.

2.2 Theorie der linearen Antwort in Systemen mit Rauschen

Bevor im nächsten Kapitel auf den Fall einer periodisch getriebenen Dynamik des Membranpotentials unter Berücksichtigung des Kanalrauschens eingegangen wird, wird hier allgemein die lineare Antwort eines Systems unter dem Einfluss von Rauschen auf einen periodischen Stimulus $A \sin(\Omega t)$ diskutiert. Die Dynamik des Systems wird durch folgende Langevin-Gleichung beschrieben:

$$\frac{dx(t)}{dt} = f(x(t); t) + A \sin(\Omega t) + \sqrt{2D}\xi(t), \quad (2.1)$$

wobei $f(x(t); t)$ eine – im Allgemeinen – zeitabhängige und nichtlineare Funktion von x ist, und ξ Gauss'sches weißes Rauschen mit Mittelwert null und Autokorrelation $\langle \xi(t)\xi(s) \rangle = \delta(t-s)$ ist (die spitzen Klammern bezeichnen dabei eine Ensemblemitteilung über alle Realisierungen). D ist die Stärke des Rauschens. Im Unterschied zur deterministischen Dynamik, wie sie in Kapitel 1.6 dargestellt wurde, wird das $x(t)$ zu einer stochastischen Variablen und es muss zur Wahrscheinlichkeitsverteilung $P(x, t)$ übergegangen werden. Für diese gilt:

$$\frac{\partial}{\partial t} P(x, t) = \mathcal{L}P(x, t), \quad (2.2a)$$

mit dem Fokker-Planck Operator:

$$\mathcal{L} = \mathcal{L}_0 + \mathcal{L}_{\text{ext}} \quad (2.2b)$$

$$\mathcal{L}_0 = -\frac{\partial}{\partial x} f(x, t) + D \frac{\partial^2}{\partial x^2} \quad (2.2c)$$

$$\mathcal{L}_{\text{ext}} = -A \sin(\Omega t) \frac{\partial}{\partial x} \quad (2.2d)$$

Für den Mittelwert, d.h. $\langle x(t) \rangle = \int x P(x, t) dx$, findet man für kleine Antriebsamplituden im asymptotischen Langzeitlimes (Hänggi and Thomas, 1982):

$$\langle x(t) \rangle = \langle x(t) \rangle_0 + \int_{-\infty}^t \chi(t-s) A \sin(\Omega s) ds, \quad (2.3)$$

wobei $\langle x(t) \rangle_0$ dem Mittelwert von $x(t)$ im ungetriebenen Fall entspricht und $\chi(t)$ die Lineare-Antwort-Funktion ist. Aus dem Fluktuations-Dissipationstheorem kann die Antwortfunktion abgeleitet werden. Für die fourierintegrierte Antwortfunktion findet man:

$$\chi(\omega) = \sum_{n=1}^{\infty} \frac{\lambda_n g_n}{\lambda_n + i\omega}, \quad (2.4)$$

wobei die λ_n durch die im System auftretenden Zeitskalen gegeben sind, und g_n frequenzunabhängige Gewichtungsfaktoren darstellen. Im Limes hoher Frequenzen, klingt wegen $\{g_n\} \rightarrow 0$ für $n \gg 1$, die Antwort eines getriebenen stochastischen Systems mit $1/\omega$ ab, vgl. deterministische Membrandynamik, Kapitel 1.6. Es gilt somit:

$$|\chi(\omega)|^2 \rightarrow 1/\omega^2, \quad \text{für } \omega \gg \lambda_{\text{rel}}, \quad (2.5)$$

wobei λ_{rel} die typische Relaxationszeit bezeichnet: $\lambda_{\text{rel}} \approx \max(\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3)$. Da in axonalen Systemen die auftretenden intrinsischen Zeitskalen Frequenzen im kHz-Bereich entsprechen, wird im MHz- und GHz-Bereich die Antwort des Systems mit $1/\omega$ unterdrückt.

Spektrale Verstärkung

Im Langzeitlimit ergibt sich dann für die mittlere Auslenkung aufgrund des zeitabhängigen periodischen Signals:

$$\langle x(t) - \langle x(t) \rangle_0 \rangle = A |\chi(\Omega)| \sin(\Omega t + \phi), \quad (2.6)$$

wobei ϕ eine eventuell auftretende Phasenverschiebung zwischen Antriebssignal und Antwortsignal ist. Sie hängt vom Verhältnis von Real- und Imaginärteil der Antwortfunktion $\chi(\omega)$ ab. Für die Leistung des Antriebssignals findet man: $p_A = \pi A^2$, für die Leistung des Antwortsignals $p_{\text{response}} = \pi A^2 |\chi(\Omega)|^2$. Die spektrale Leistung η , d.h. das Verhältnis von Leistung des Antwortsignals bei der Antriebsfrequenz und der Eingangsleistung, ist dann für hohe Frequenzen:

$$\eta = \frac{p_{\text{response}}}{p_A} = |\chi(\Omega)|^2 \rightarrow \frac{1}{\Omega^2}, \quad \text{für } \omega \gg \lambda_{\text{rel}}. \quad (2.7)$$

Die spektrale Verstärkung, in deren Rauschabhängigkeit der Effekt der *Stochastischen Resonanz* z.B. sichtbar wird (Gammaitoni *et al.*, 1998), fällt für hohe Frequenz wie $1/\Omega^2$ ab.

2.3 Analyse der Nichtlinearen Antwort einer periodisch stimulierten Zellmembran

Das Auftreten des Effekts der *Stochastischen Resonanz* wurde numerisch in dem von uns entwickelten Modellsystem, vgl. Gl. (A.1)-(A.3), untersucht. Dazu wurde das Antwortverhalten der Zellmembran auf ein externes periodisches Stromsignal als Funktion der Membran-Ausschnittsgröße S untersucht. Um die Güte des Antwortsignals zu analysieren, wurde dessen Signal-zu-Rauschverhältnis bestimmt.

Die numerische Integration der Langevin-Gleichungen des Modells erfolgt mithilfe des stochastischen Euler-Algorithmus mit einem Zeitschritt kleiner als $10 \mu\text{s}$. Das der Zellmembran aufgeprägte, periodische Stromsignal ist durch

$$I_{\text{ext}}(t) = A \sin(\Omega t) \quad (2.8)$$

gegeben, wobei A die Amplitude und Ω die Kreisfrequenz des angelegten Signals bedeuten. Da – im deterministischen Fall – ein schwacher Stimulus allein nicht in der Lage ist Aktionspotentiale hervorzurufen, würde das Membranpotential $V(t)$ um den Gleichgewichtswert V_{rest} kleine Oszillationen ausführen, deren Amplituden mit der Antriebsamplitude skalieren. Aufgrund des intrinsischen Rauschens kann das Membranpotential jedoch gelegentlich die im System vorhandene Aktivierungsschwelle überwinden, sodass es zu einer gänzlichen Depolarisierung der Zellmembran kommen kann und somit ein Aktionspotential hervorgerufen wird. Eine solche Aktivierung hat eine Oszillation des Membranpotentials zur Folge, deren Amplitude im Vergleich zu den deterministisch stimulierten Schwankungen um den Gleichgewichtswert mehrere Ordnungen größer ist. Da physiologisch vor allem das Auftreten solcher Aktivierungen, nämlich der Aktionspotentiale von Relevanz ist und darauf die gesamte neuronale Informationsverarbeitung beruht, wurden aus dem nichtlinearen Antwortsignal, also dem

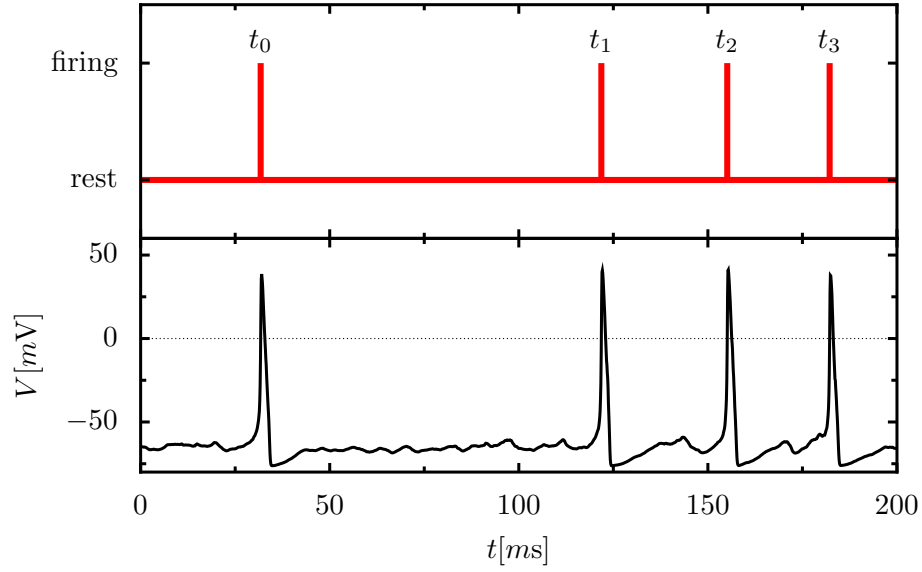


Abb. 2.1: Skizze: Extraktion der Spike-Ereignisse t_i aus dem Membranpotential $V(t)$ für $S = 10 \mu\text{m}^2$ und $I_{\text{ext}} = 0$. Die Spike-Ereignisse definieren den Punktprozess $u(t)$, vgl. Gl. (2.9).

Membranpotential $V(t)$, diejenigen Ereignisse t_i extrahiert, für die das Membranpotential zu Beginn eines Aktionspotentials eine Detektionsschwelle überschreitet, vgl. Abb. 2.1. Bemerkend sei hier erwähnt, dass im physiologisch relevanten Bereich solche Aktionspotentiale entweder ganz oder gar nicht auftreten, d.h. insbesondere können keine *halben* Aktionspotentiale beobachtet werden. Die zeitlichen Ereignisse t_i ergeben den sogenannten *spike train*, der dann als physiologisch relevanter Prozess im Folgenden analysiert wird. In Abbildung 2.1 ist das Verfahren zur Extraktion der Spike-Ereignisse exemplarisch für eine Realisation des simulierten Membranpotentials $V(t)$ aufgezeigt. Innerhalb der gesamten integrierten Zeit $\mathcal{T}$ findet man dann, abhängig von der Rauschstärke und den Antriebsparametern, N Spike-Ereignisse. Der Punktprozess ist dann durch

$$u(t) := \sum_{i=1}^N \delta(t - t_i), \quad (2.9)$$

definiert, wobei δ die Dirac'sche δ -Funktion bedeutet. Die gesamte integrierte Zeit wurde so gewählt, dass einerseits transiente Effekte aufgrund der anfänglichen Initialisierung der Simulationen nicht mehr zu beobachten waren und andererseits stets über ein ganzzahliges Vielfaches der Antriebsperiode $\frac{2\pi}{\Omega}$ integriert wurde. So variiert die gesamte integrierte Zeit für die verschiedenen Antriebsfrequenzen. Typischerweise betrug bei den hier gezeigten Simulationsergebnissen die gesamte integrierte Zeit ca. 2 Wochen.

Als nächster Schritt wurde das Leistungsspektrum $PSD_{u(t)}(\omega)$ des Punktprozesses $u(t)$ berechnet:

$$PSD_{u(t)}(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} \left\{ \frac{1}{\mathcal{T}} \int_0^{\mathcal{T}} u(t) u(t + \tau) d\tau \right\} e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (2.10a)$$

$$= \frac{1}{\mathcal{T}} \left| \sum_n e^{-i\omega t_n} \right|^2. \quad (2.10b)$$

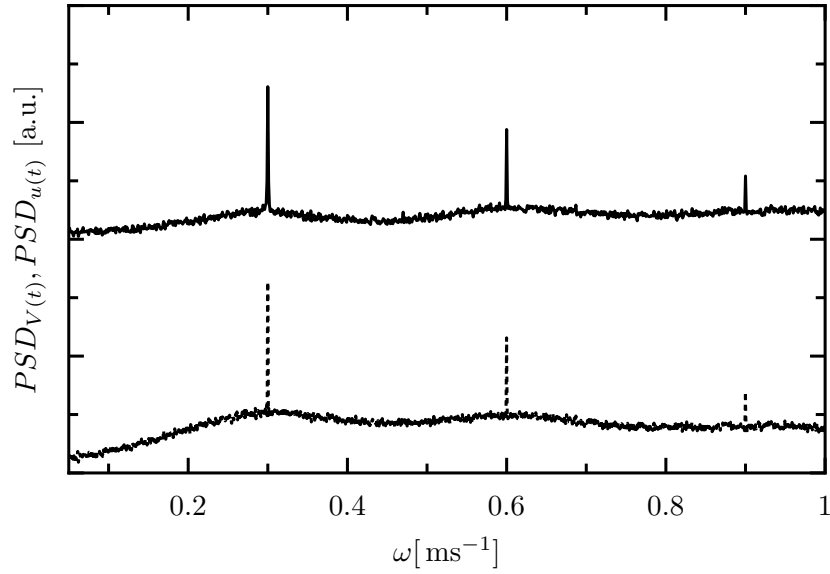


Abb. 2.2: Beispiel für die Leistungsspektren des Membranpotentials ($PSD_{V(t)}$ – gestrichelte Linie) und des korrespondierenden Punktprozesses in einer semi-logarithmischen Darstellung für ein periodisches Antriebssignal $I_{\text{ext}}(t) = \sin(0,3 \cdot t[\text{ms}])$ [μAcm^{-2}]. Die Spikes im Spektrum treten bei der fundamentalen Antriebskreisfrequenz und deren höheren Harmonischen auf. Da sich die Kurven überlappen würden, wurde $PSD_{u(t)}$ mit einem konstanten Faktor re-skaliert. In dieser Darstellung korrespondiert diese Skalierung zu einer Verschiebung der Kurve nach oben.

Vor dem Hintergrund, dass bei einer Erregung der Zellmembran das Membranpotential $V(t)$ viel stärker variiert als dies bei den stimulierten Oszillationen um den Gleichgewichtswert der Fall ist, kann der Übergang vom Membranpotential $V(t)$ zum Punktprozess $u(t)$ auch im Sinne einer Näherung verstanden werden, die insbesondere für kleine Antriebsamplituden gerechtfertigt ist. Ein Vergleich der Leistungsspektren der Membranspannung $V(t)$ und des Punktprozesses unterstützt die Anwendbarkeit obigen Verfahrens, vgl. Abbildung 2.2. Die Berechnung des Leistungsspektrums des Membranpotentials $V(t)$ erfolgte dabei analog zu der des Punktprozesses, vgl. Gleichung (2.10a). Im Folgenden wird daher das vom Punkt-Prozess $u(t)$ bestimmte Signal-zu-Rauschverhältnis diskutiert.

Das Signal-zu-Rauschverhältnis bei der Frequenz des Antriebs ist durch:

$$SNR := \left[2 \lim_{\Delta\omega \rightarrow 0} \int_{\Omega - \Delta\omega}^{\Omega + \Delta\omega} PSD(\omega) d\omega \right] / PSD_N(\Omega), \quad (2.11)$$

definiert, wobei Ω die Antriebsfrequenz und $PSD_N(\Omega)$ die Leistungsdichte des Hintergrundrauschens bei der Antriebsfrequenz bedeuten. Diese Definition des Signal-zu-Rauschverhältnisses wird in der Literatur oft auch als *narrow-band SNR* bezeichnet. Entsprechend der Gleichung (2.11) hat dann das Signal-zu-Rauschverhältnis SNR die Dimension Hz. Zur numerischen Berechnung des SNR , wurde die Fläche unter dem Peak im Leistungsspektrum bei der Antriebsfrequenz Ω , d.h. die Leistung des Ausgangssignals bei der Antriebsfrequenz, bestimmt und durch den Wert des Hintergrundrauschens geteilt.

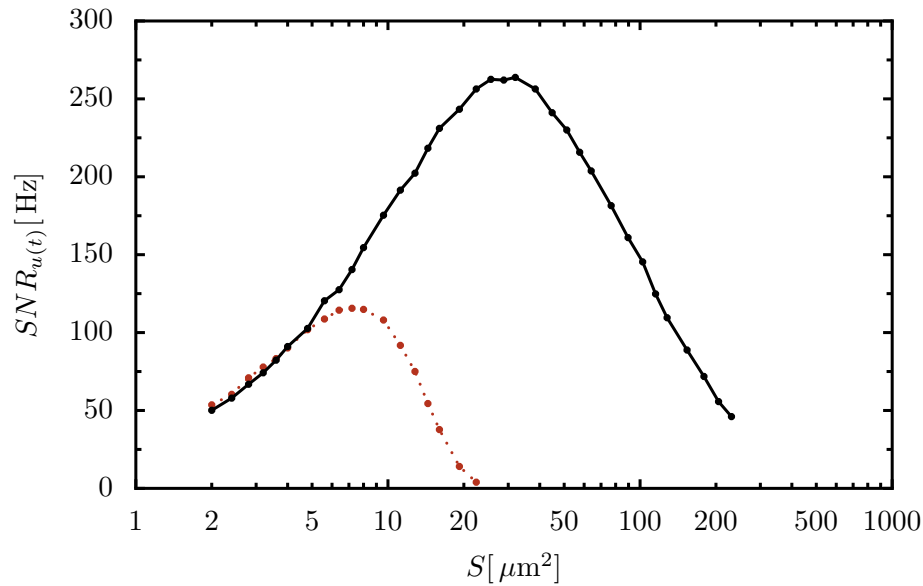


Abb. 2.3: Das Signal-zu-Rauschverhältnis des aus dem simulierten Membranpotential extrahierten Punktprozesses $u(t)$ bei der Antriebsfrequenz $\Omega = 0,3[\text{ms}^{-1}]$ (entspricht $f = 0,3\text{ms}^{-1}/(2\pi) \approx 48\text{Hz}$) als Funktion der Größe eines Membranstücks S . Bei der Simulation der Dynamik des Membranpotentials fand das in Anhang A diskutierte Modell für die Temperatur $T = 6,3^\circ\text{C}$ und einer Antriebsamplitude von $1\mu\text{Acm}^{-2}$ Verwendung. Während bei der Berechnung der durchgezogenen und schwarzen Kurve Schaltladungseffekte unberücksichtigt bleiben, wurden diese bei der gepunkteten, roten Kurve berücksichtigt (unterschiedliche Komplexität).

2.3.1 Einfluss der membranspezifischen Besonderheiten auf den Effekt der Stochastischen Resonanz – Antwortverhalten hinsichtlich unterschiedlicher Komplexität

Für Abbildung 2.3 wurde das Signal-zu-Rauschverhältnis des aus dem simulierten Membranpotential extrahierten Punktprozesses für einen schwachen (*sub-threshold*) periodischen Antrieb mit Kreisfrequenz $0,3\text{ms}^{-1}$ (entspricht $f \approx 48\text{Hz}$) für unterschiedlich komplexe Situationen (mit und ohne Berücksichtigung der Schaltladungseffekte) berechnet. Hier sei bemerkt, dass die Wahl auf diese Frequenz fiel, da diese in den Bereich der in unserem Modellsystem vorkommenden typischen Zeitskala fällt, vgl. Kap. 1.6. Für das stochastische Modell (ohne Schaltladungseffekte) konnte gezeigt werden, dass der Effekt der *Stochastischen Resonanz* in der Nähe dieser Frequenz maximal ist (Schmid *et al.*, 2003). Sowohl unter Berücksichtigung von Schaltladungseffekten als auch im Fall deren Vernachlässigung beobachtet man den Effekt der *Intrinsischen Stochastischen Resonanz*, d.h. intrinsische Fluktuationen – hier die Fluktuation der Anzahl der offenen Ionenkanäle – können die Qualität eines Signals verbessern. Der Vergleich zeigt jedoch, dass eine Berücksichtigung der polarisationsspezifischen Besonderheiten der Zellmembran zu einem verringerten maximalen Signal-zu-Rauschverhältnis führt, und dass das Auftreten dieses Maximums zu kleineren Systemgrößen hin verschoben ist. So beobachtet man ein maximales Signal-zu-Rauschverhältnis bei einer Membranausschnittsgröße von ungefähr $7,2\mu\text{m}^2$, vgl. Abbildung 2.3.

Damit wurde gezeigt, dass unter der Berücksichtigung von polarisationsspezifischen Besonderheiten von axonalen Zellmembranen, deren Dynamik durch Hodgkin-Huxley-artigen Modelle beschrieben werden können, der Effekt der *Stochastischen Resonanz*

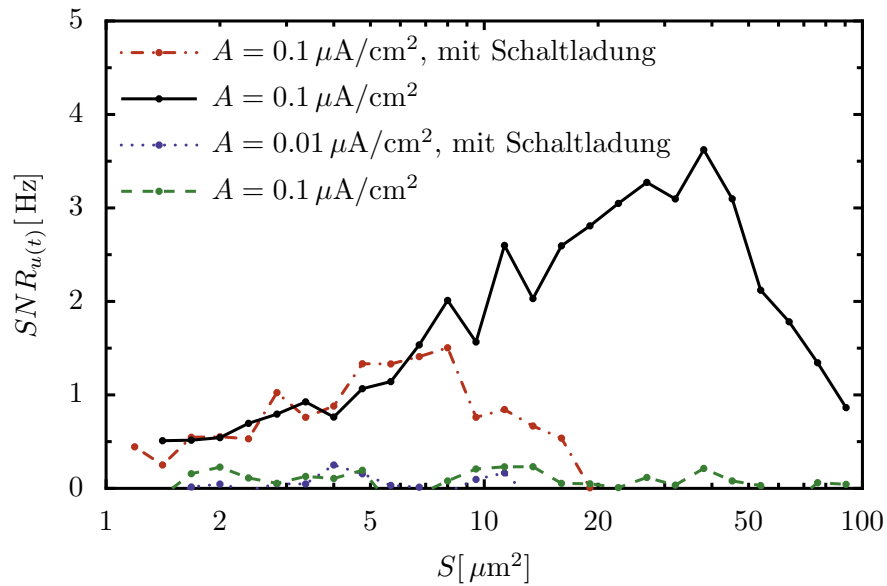


Abb. 2.4: Wie in Abbildung 2.3: Dargestellt ist das Signal-zu-Rauschverhältnis als Funktion der Membrangröße S für die Antriebsfrequenz $\Omega = 0,3[\text{ms}^{-1}]$ (entspricht 48 Hz) und verschiedene Antriebsamplituden $0,1 \mu\text{Acm}^{-2}$ (durchgezogene schwarze Linien für den Fall ohne Schaltladungen, gepunkt-gestrichelte rote Kurve für den Fall mit Schaltladungen) und $0,01 \mu\text{Acm}^{-2}$ (gestrichelte grüne Kurve: ohne Schaltladungseffekte, gepunktete blaue Linie: mit Schaltladungseffekte). Mit abnehmender Antriebsamplitude fällt das Signal-zu-Rauschverhältnis drastisch ab. Für eine Antriebsamplitude von $0,01 \mu\text{Acm}^{-2}$ ist der Effekt der Stochastischen Resonanz aufgrund des Rauschens nicht mehr erkennbar.

weniger stark ausgeprägt ist, als dies ohne deren Berücksichtigung der Fall wäre. Auch hier zeigt sich die „stabilisierende“ Wirkung der Schaltladungseffekte.

Insbesondere beobachtet man, vgl. Abbildungen 2.3 und 2.4, dass mit abnehmender Antriebsamplitude das Signal-zu-Rauschverhältnis drastisch abfällt und der Effekt der Stochastischen Resonanz weniger deutlich ausgeprägt ist.

2.3.2 Anomale Verstärkung als Funktion der Signalamplitude

Zur Untersuchung der Abhängigkeit des Signal-zu-Rauschverhältnisses von der Antriebsamplitude wurde ein periodischer Strom auf unterschiedlich große Membranausschnitte aufgeprägt, und das resultierende Feuerverhalten analysiert, vgl. Abbildung 2.5. Für die untersuchten Membranausschnitte geht mit der Abnahme der Antriebsamplitude auch ein verringertes Signal-zu-Rauschverhältnis einher. Das periodische Eingangssignal trägt somit mit kleiner werdender Amplitude immer weniger zum Ausgangssignal bei. Jedoch wird eine optimale Systemgröße beobachtet, d.h. der Effekt der *Intrinsischen Stochastischen Resonanz* tritt auf.

Lineare Antwort: Signal-zu-Rauschverhältnis

Für kleine Antriebsamplituden erwartet man für getriebene verrauschte Systeme eine quadratische Abhängigkeit des Signal-zu-Rauschverhältnisses zur Antriebsamplitude

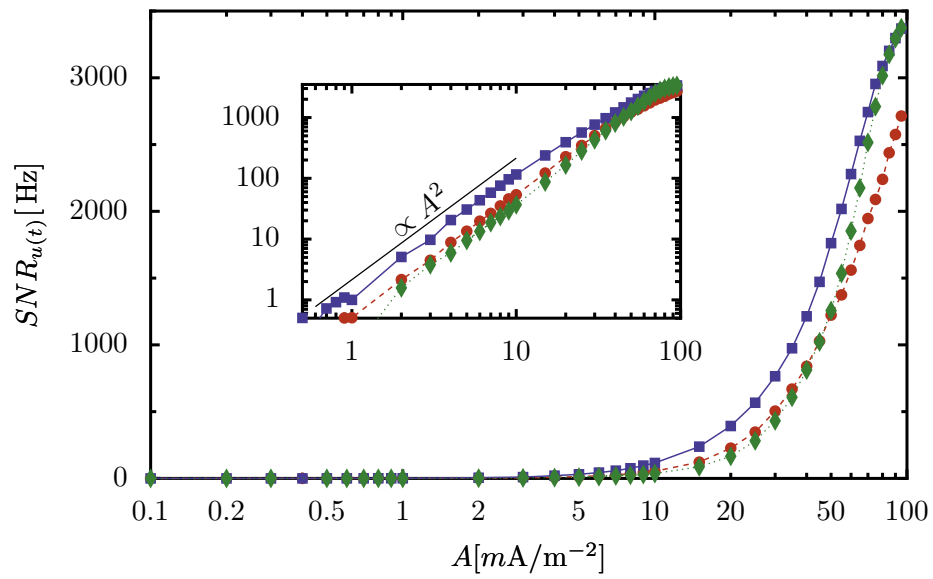


Abb. 2.5: Das Signal-zu-Rauschverhältnis des aus dem simulierten Membranpotential extrahierten Punktprozesses als Funktion der Antriebsamplitude A (in Milliampere pro Quadratmeter: mA m^{-2}) für eine Antriebsfrequenz von $\Omega = 0,3 \text{ ms}^{-1}$ ($f \approx 48 \text{ Hz}$) und verschiedene Membranauschnittsgrößen S : $S = 2 \mu\text{m}^2$ (gestrichelte rote Linie, rote Kreise), $S = 7,2 \mu\text{m}^2$ (durchgezogene blaue Linie, blaue Quadrate) und $S = 16 \mu\text{m}^2$ (gepunktete grüne Linie, grüne Karo-Symbole). Mit abnehmender Antriebsamplitude A nimmt das Signal-zu-Rauschverhältnis ab. Im inneren Bild sind die Kurven der unterschiedlichen Signal-zu-Rauschverhältnisse in doppelt logarithmischer Darstellung gezeigt. Im Bereich der Gültigkeit der Theorie der linearen Antwort findet man eine quadratische Abhängigkeit des Signal-zu-Rauschverhältnisses von der Antriebsamplitude A . Die schwarze Gerade zeigt eine quadratischen Abhängigkeit, vgl. Gl. (2.12).

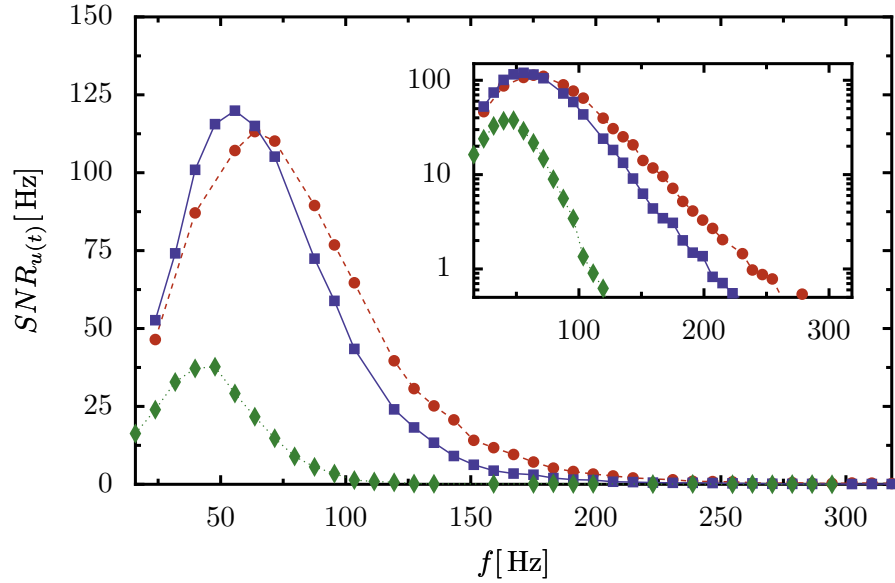


Abb. 2.6: Das Signal-zu-Rauschverhältnis des aus dem simulierten Membranpotential extrahierten Punktprozesses als Funktion der Frequenz für eine Antriebsamplitude von $1,0 \mu\text{Acm}^{-2}$ und verschiedene Membranflächen S : $S = 5 \mu\text{m}^2$ (gestrichelte rote Linie, rote Kreise), $S = 7,2 \mu\text{m}^2$ (durchgezogene blaue Linie, blaue Quadrate) und $S = 16 \mu\text{m}^2$ (gepunktete grüne Linie, grüne Karo-Symbole). Das innere Bild zeigt das Signal-zu-Rauschverhältnis auf einer logarithmischen Skala. Mit zunehmender Antriebsfrequenz nimmt das Signal-zu-Rauschverhältnis kontinuierlich ab.

(Gammaitoni *et al.*, 1998):

$$SNR \propto A^2, \quad (2.12)$$

wobei die Proportionalitätskonstante vom System, von der Temperatur und von der Antriebsfrequenz Ω abhängt. Daher fallen im Inset von Abbildung 2.5 die verschiedenen Kurven für $A \rightarrow 0$ nicht zusammen. Ein Vergleich zeigt, dass für Antriebsamplituden kleiner als $10 \text{ mA}_{\text{m}^2}$ die Theorie der linearen Antwort eine gute Approximation darstellt.

2.3.3 Anomale Verstärkung als Funktion der Frequenz

In Abbildung 2.6 ist das Signal-zu-Rauschverhältnis des aus dem simulierten Membranpotential extrahierten Punktprozesses für verschiedene Größen des Membranausschnittes als Funktion der Antriebskreisfrequenz Ω aufgezeigt. Man beobachtet, dass ein optimales Signal-zu-Rauschverhältnis stets bei Frequenzen um $\Omega = 0,3 \text{ ms}^{-1}$ (entspricht $f \approx 48 \text{ Hz}$) oder kleiner auftritt. Dies fällt gerade mit den im Modell intrinsisch auftretenden Zeitskalen zusammen, vgl. die Diskussion der Zeitskalen in Kap. 1.6. Innerhalb unseres Modells erwartet man daher, dass der Effekt der *Stochastischen Resonanz* für Antriebsfrequenzen im MHz-Bereich oder höher weniger ausgeprägt bzw. nicht mehr beobachtbar ist. Die Universalität unseres Modellierungsansatzes legt nahe, dass der Effekt der anomalen Verstärkung (*Stochastische Resonanz*) in neuronalen Systemen allgemein bei Frequenzen im MHz-GHz-Bereich keine signifikante Rolle spielen kann.

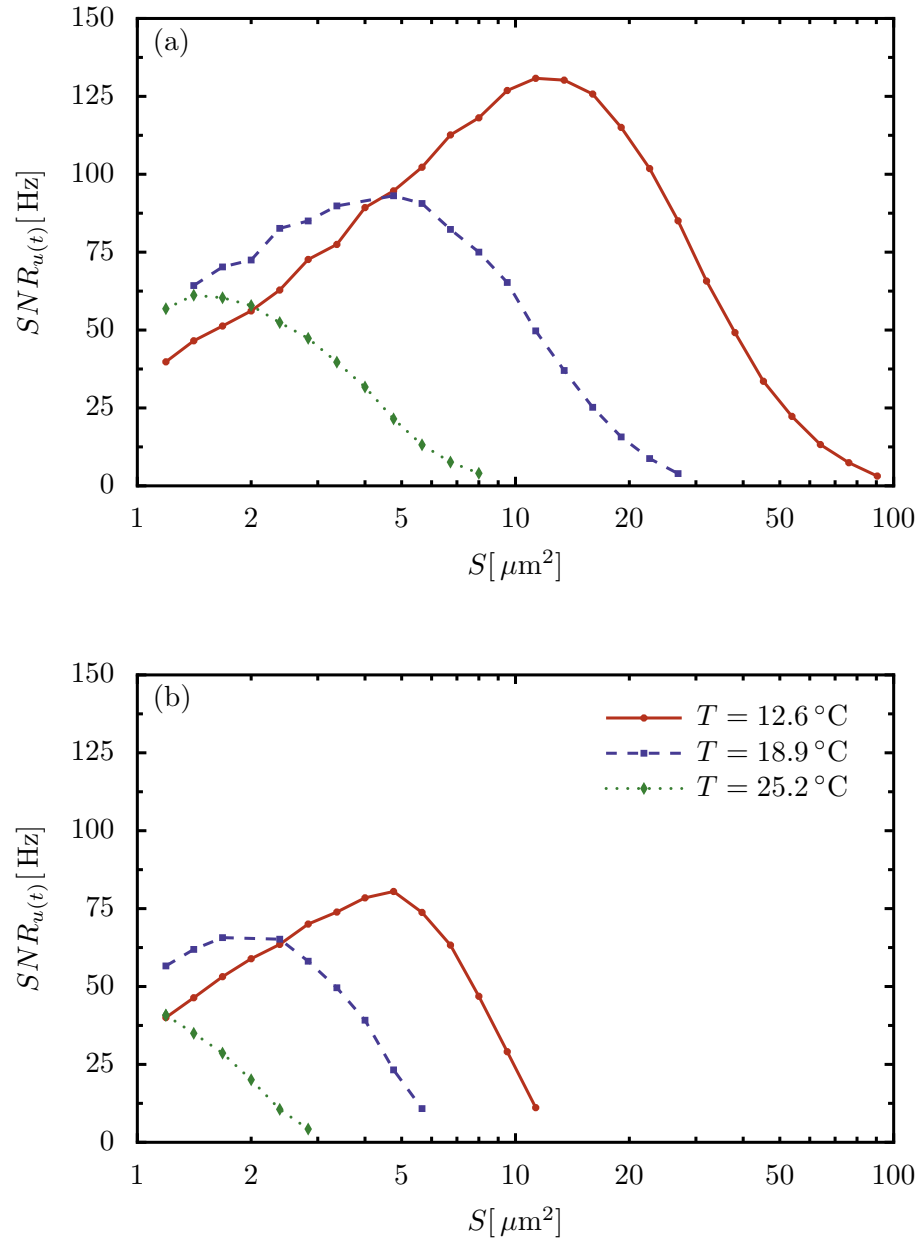


Abb. 2.7: Das Signal-zu-Rauschverhältnis des aus dem simulierten Membranpotential extrahierten Punktprozesses für einen periodisch stimulierten Membranfleck der Größe S und verschiedenen Temperaturen, vgl. Legende in Abbildung (b). Bei der Simulation des Membranpotentials, vgl. Anhang A, wurden in (a) Schaltladungseffekte vernachlässigt, während sie bei (b) berücksichtigt wurden. Der Effekt der *intrinsic Stochastic Resonance* weist eine Temperaturabhängigkeit auf. Dennoch wirken sich Schaltladungseffekte stets negativ auf die Signalqualität, d.h. hier den Wert des Signal-zu-Rauschverhältnisses, aus.

2.3.4 Einfluss der Temperatur auf den Effekt der Stochastischen Resonanz

Da Strahlungseinwirkung im Allgemeinen eine Gewebeerwärmung zur Folge hat, soll hier untersucht werden, welche Konsequenzen eine veränderte Temperatur im Hinblick auf den Effekt der *Intrinsischen Stochastischen Resonanz* hat. Die Berücksichtigung der Temperatur kann im Sinne von modifizierten Übergangsraten, vgl. Anhang A und (Hodgkin and Huxley, 1952), erfolgen. Durch eine Erwärmung vergrößern sich die Übergangsraten, vgl. Gl. (A.3) und Gl. (A.4), wodurch sich die intrinsischen Zeitskalen τ vergrößern, und die Systemantwort auf ein hochfrequentes Signal vermindert wird. Daher sind für eine Gewebeerwärmung um einige °C, die die Zeitskalen nur unmerklich verändert, keine signifikanten Änderungen des Antwortsignals auf einen Antrieb mit Frequenzen im MHz-GHz-Bereich zu erwarten.

In Abbildung 2.7 ist die Abhängigkeit des Signal-zu-Rauschverhältnisses des extrahierten Punktprozesses von der Größe des Membranausschnitts für verschiedene Temperaturen sowohl unter Berücksichtigung der Schaltladungseffekte also auch unter deren Vernachlässigung gezeigt. Eine Erwärmung führt in diesem erweiterten Modell zu einer Reduktion des Effekts der *Intrinsischen Stochastischen Resonanz*.

2.4 Zusammenfassung: Einfluss von intrinsischem Rauschen

In vielen neuronalen Systemen beobachtet man aufgrund von spontanen Konfigurationsänderungen von in die Zellmembran eingelagerten Kanalproteinen Leitfähigkeitsfluktuationen. Wie allgemeine Überlegungen und Untersuchungen an dem von uns entwickelten Mustermodell zeigen, erwartet man, dass die Güte (spektrale Verstärkung bzw. Signal-zu-Rauschverhältnis) des Antwortsignals auf einen periodischen Stimulus mit Frequenzen im MHz-GHz-Bereich mit steigender Antriebsfrequenz monoton abnimmt. Da den intrinsischen Zeitskalen Frequenzen im kHz-MHz-Bereich entsprechen, können keine resonanten Phänomene im MHz-GHz-Bereich auftreten, vgl. experimentelle Befunde in Teil I und Teil II dieses Berichts. Der Effekt der Stochastischen Resonanz spielt für diesen Frequenzbereich keine signifikante Rolle.

3 Einzelzellmodellierung bezüglich der Realsituation

Während in Kap. 1 die Modellierung der elektrischen Eigenschaften von Zellmembranen im Vordergrund stand, und in Kap. 2 der Einfluss von Rauschen auf die Dynamik des Membranpotentials diskutiert wurde, also Untersuchungen auf subzellulärer Ebene dargestellt wurden, sollen nun Untersuchungen an Einzel-Zellen vorgestellt werden. Da im Experiment annähernd kugelförmige Zellen einer häufig aufzufindenden Realsituation entsprechen, stellen wir diesbezüglich im Folgenden eine theoretische Modellierung im Sinne einer sphärischen Symmetrie vor.

3.1 Experimentelle Ausgangssituation

Im Rahmen der dielektrischen Studien, vgl. Teil I Kapitel 2.4, wurden die dielektrischen Eigenschaften von Vesikeln, gebildet aus Modellmembranen (DMPC, DOPC, DPPC), bestimmt. Die Lipidmoleküle bilden dabei Lipid-Doppelschichten aus, die kugelförmige Vesikel formen. Diese Vesikel sind dann durch eine oder mehrere Lipid-Doppelschichten begrenzt. Wie in Teil II gezeigt, ist ein durch ein abgeschnittenes Koaxialkabel ausstrahlendes elektrisches Feld auf der Längenskala eines solchen Vesikels (Radius $\sim \mu\text{m}$) quasi homogen. Folgende Approximationen können daher vorgenommen werden:

1. sphärische Geometrie der Zelle
2. „homogene“ Zellmembran, die durch ein σ_m und ϵ_m charakterisiert werden kann
3. homogene elektrische Feldverteilung.

Mit obigen Idealisierungen kann das in Abbildung 3.1 skizzierte sphärische Zellmodell abgeleitet werden. Die betrachteten kugelförmigen Einzel-Zellen besitzen einen Außendurchmesser von $R = 10\text{ }\mu\text{m}$. Die Zellmembranen haben eine Dicke von $d = 5\text{ nm}$. Deren elektrische Eigenschaften werden durch die Leitfähigkeit σ_m und die Permittivität ϵ_m charakterisiert. Das Zytoplasma (σ_i, ϵ_i) und die extrazelluläre Matrix (σ_e, ϵ_e) sind im Experiment an künstlichen Zellen durch Kochsalzlösungen vorgegeben. In den theoretischen Überlegungen wird entsprechend Punkt 3. das externe elektrische Feld $\vec{E}_e(t)$ als homogen angenommen.

3.2 Induziertes Membranpotential und resultierendes elektrisches Feld

Aufgrund des elektrischen Feldes und der unterschiedlichen Leitfähigkeiten der verschiedenen Komponenten, kommt es an der Zellmembran zum Aufbau eines Membranpotentials $V(\Theta)$ (Kotnik *et al.*, 1997):

$$V(\Theta) = f_s E_e R \cos(\Theta), \quad (3.1)$$

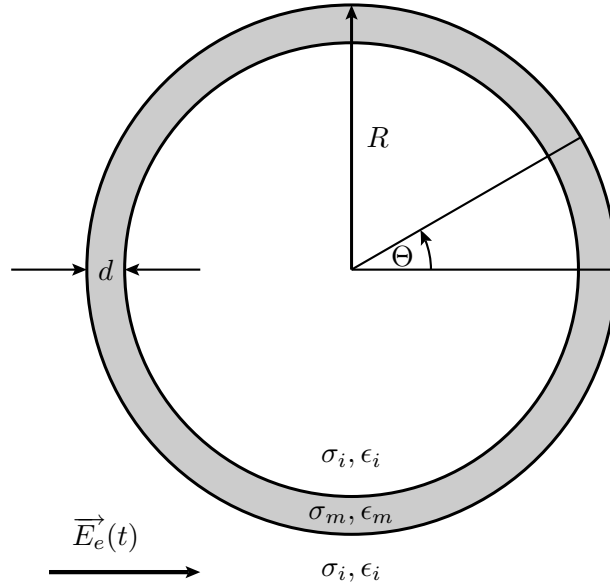


Abb. 3.1: Skizze einer sphärischen Zelle mit Radius R und Zellmembrandurchmesser d in einem konstanten elektrischen Feld $\vec{E}_e(t)$.

wobei E_e die Feldstärke eines statischen Feldes und Θ der Winkel in Polarkoordinaten (vgl. Abbildung 3.1) bedeuten. Der Strukturfaktor f_S ist durch

$$f_S = \frac{3\sigma_e [3dR^2\sigma_i + (3d^2R - d^3)(\sigma_m - \sigma_i)]}{2R^3(\sigma_m + 2\sigma_e)(\sigma_m + \frac{1}{2}\sigma_i) - 2(R-d)^3(\sigma_e - \sigma_m)(\sigma_i - \sigma_m)} \quad (3.2)$$

gegeben. $V(\Theta)$ wird für $\Theta = 0$ maximal. Im Folgenden beschränken wir uns nun auf den maximalen Fall.

Unter physiologischen Bedingungen gilt $\sigma_i, \sigma_e \gg \sigma_m$ und $R \gg d$. Es kann daher eine Taylor-Entwicklung von f_S in den kleinen Parametern $\frac{\sigma_m}{\sigma_e}, \frac{\sigma_m}{\sigma_i}$ und $\frac{d}{R}$ durchgeführt werden. Damit ergibt sich bis zur ersten Ordnung:

$$f_S \approx \frac{9}{6 + 6\frac{\sigma_m}{\sigma_i}\frac{R}{d} + 3\frac{\sigma_m}{\sigma_e}\frac{R}{d}}. \quad (3.3)$$

Da zudem $\frac{\sigma_m}{\sigma_e}, \frac{\sigma_m}{\sigma_i} \ll \frac{d}{R}$ gilt, findet man den konstanten Faktor $f_S \approx 1.5$, vgl. z.B. (Kotnik *et al.*, 1997; Pethig and Kell, 1987).

Das Membranpotential V ist die induzierte Potentialdifferenz, die zwischen Außen- und Innenseite der Membran anliegt. Der Betrag des daraus resultierenden elektrischen Feldes in der Membran ist dann für $\Theta = 0$:

$$E_m = \frac{V}{d} = \frac{f_S E_e R}{d}. \quad (3.4)$$

Obige Beschreibung kann auf den sinusförmig getriebenen Fall durch Übergang auf komplexe Leitfähigkeiten erweitert werden (Loidl *et al.*, 2006):

$$\sigma_m \mapsto \sigma_m + i\omega\epsilon_m(\omega), \quad (3.5a)$$

$$\sigma_i \mapsto \sigma_i + i\omega\epsilon_i(\omega), \quad (3.5b)$$

$$\sigma_e \mapsto \sigma_e + i\omega\epsilon_e(\omega), \quad (3.5c)$$

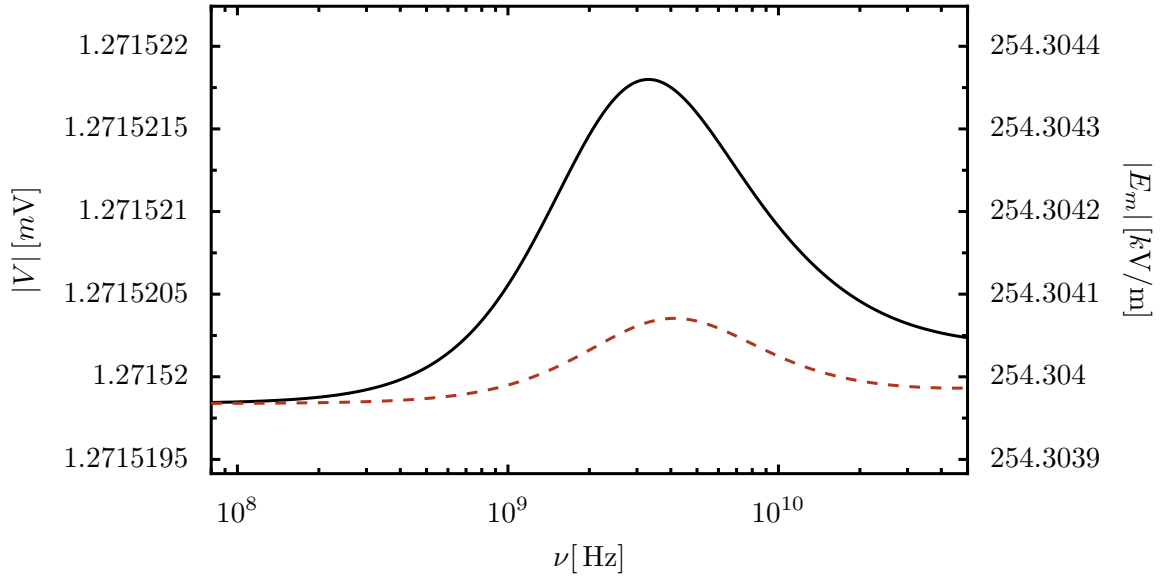


Abb. 3.2: Der Betrag des induzierten Membranpotentials (linke Ordinate), vgl. Gl. (3.1), und des daraus resultierenden Beitrags zur Feldstärke in der Zellmembran (rechte Ordinate), vgl. Gl. (3.4), als Funktion der Frequenz des elektrischen Feldes, vgl. Gleichung (3.1). Die idealisierte, sphärische Zelle befindet sich in einem homogenen elektrischen Wechselfeld der Amplitude $E_e = 200 \text{ V/cm}$ und der Frequenz ν . Für das Zytoplasma und die extrazelluläre Matrix wurden die Werte für $\epsilon(\omega)$ und $\sigma(\omega)$ aus dem Projektteil I herangezogen (37°C), während für die Membran Werte aus der Literatur Verwendung fanden (Kotnik *et al.*, 1997; Gascoyne *et al.*, 1993; Klösgen *et al.*, 1996). Bei der Berechnung der roten gestrichelten Kurve wurden keine Relaxationsstufen für die Dielektrik der Membran berücksichtigt, während bei der Berechnung der durchgezogenen schwarzen Kurve Gleichung (3.6) verwendet wurde.

wobei i die imaginäre Einheit ist, d.h. $i^2 = -1$ und $\omega = 2\pi\nu$, mit der Frequenz ν des externen Feldes.

Künstliche Zellen

Aus Modellmembranen (DMPC, DOPC, DPPC) gebildete Vesikel werden den in Kapitel 3.1 durchgeführten Approximationen in idealer Weise gerecht. Für die Dielektrizitätskonstanten des Zytoplasmas und des extra-zellulären Mediums werden im Folgenden die Daten aus dem Projektteil I (37°C , 154 mmol NaCl), Kap. 2.3. verwendet. Für die Daten der Membran werden die entsprechenden Werte aus der Literatur verwendet (Kotnik *et al.*, 1997; Gascoyne *et al.*, 1993; Klösgen *et al.*, 1996):

$$\sigma_m(\omega) = \sigma_m(0) + \omega \sum_{k=1}^2 \frac{\Delta\epsilon_k \omega \tau_{mk}}{1 + \omega^2 \tau_{mk}^2} \quad (3.6a)$$

$$\epsilon_m(\omega) = \epsilon_m(0) - \sum_{k=1}^2 \frac{\Delta\epsilon_k \omega^2 \tau_{mk}^2}{1 + \omega^2 \tau_{mk}^2} \quad (3.6b)$$

mit

$$\sigma_m(0) = 3 \cdot 10^{-7} \text{ S/m} \quad (3.6c)$$

$$\epsilon_m(0) = 4.4 \cdot 10^{-11} \text{ As/Vm} \quad (3.6d)$$

$$\Delta\epsilon_{m1} = 2.3 \cdot 10^{-11} \text{ As/Vm} \quad (3.6e)$$

$$\Delta\epsilon_{m2} = 7.4 \cdot 10^{-12} \text{ As/Vm} \quad (3.6f)$$

$$\tau_{m1} = 3.0 \cdot 10^{-9} \text{ s} \quad (3.6g)$$

$$\tau_{m2} = 4.6 \cdot 10^{-10} \text{ s}. \quad (3.6h)$$

In Abbildung 3.2 ist der Betrag des Membranpotentials und der daraus resultierende Beitrag zum innermembranen elektrischen Feld als Funktion der Antriebsfrequenz eines externen elektrischen Wechselfeldes aufgetragen. Man findet ein induziertes Membranpotential von der Größenordnung einiger mV im Falle eines äußeren Wechselfeldes mit Amplitude $E_e = 200 \text{ V/cm}$. Im Falle eines Wechselfeldes steht in Gl. (3.1) die effektive Feldstärke, d.h. der Quotient aus der Feldamplitude und $\sqrt{2}$. Interessanterweise findet man im unteren GHz-Bereich ein maximales induziertes Membranpotential. Jedoch hebt sich dieses Maximum nicht stark ab: Im Vergleich zum Wert bei 100 MHz ist der maximale Wert nur um einige *ppm* größer. Die verwendete Feldstärke liegt mehr als einen Faktor 100 über dem gesetzlichen Grenzwert. Da das induzierte Feld mit der Feldstärke skaliert, erwartet man beim Grenzwert (61 Vm) ein induziertes Feld im μV -Bereich, das dann noch unter den thermisch induzierten Spannungsfluktuationen liegt ($\Delta V \approx 2.8 \times 10^{-5} \text{ V}$, vgl. (Loidl *et al.*, 2006)).

4 Kooperative komplexe Dynamik: Antwort von Zellverbänden auf schwache Signale

Im Folgenden wollen wir die Thematik der Einwirkung von Strahlung auf Verbände von Zellen und das Antwortverhalten als gesamtes Zellsystem näher erläutern.

4.1 Antwortverhalten von Verbänden von Zellen: Schwache Kopplung

Eine Situation die häufig vorliegt ist die, dass mehrere Zellen untereinander nur schwach miteinander wechselwirken aber als Gesamtheit demselben äußeren Stimulus, z.B. in Form eines elektromagnetischen Feldes, unterworfen sind. In diesem Fall spricht man von schwacher Kopplung, die in sehr guter Approximation als ein Verband unabhängiger Zellen betrachtet werden kann. Dies wiederum macht eine Analyse von allgemeiner Gültigkeit möglich, die auf grundlegenden statistischen Gesetzen beruht.

Hauptsächlich sind hier die Gesetze großer Zahlen und insbesondere der zentrale Grenzwertsatz zu nennen. Letzteres Gesetz besagt, dass die Summe der Antworten von unabhängigen Einzelsystemen mit zunehmender Anzahl einer Gaußschen Statistik folgt. Das wiederum bedingt ein typisches Skalierungsverhalten der Antwort eines Gesamtverbands von einzelnen Zellen.

Die Antwort $X_N(t)$ von N praktisch *identischen* Einzelzellen, die einem gemeinsamen Stimulus $s(t)$ unterworfen sind, ist

$$X_N(t) = \sum_{i=1}^N x_i(t), \quad (4.1)$$

und die relative bzw. intensive Antwort $\bar{x}_N$:

$$\bar{x}_N(t) = X_N(t) / N. \quad (4.2)$$

Der zentrale Grenzwert besagt nun, dass die Fluktuationen der extensiven Antwort $X_N(t)$ nur proportional der Wurzel aus N , also $\propto \sqrt{N}$ anwachsen. Dies wiederum impliziert, dass die relativen Fluktuationen der intensiven Antwort wie $1/\sqrt{N}$ verschwinden. Damit lassen sich nun auch generelle Aussagen zur Antwort insgesamt ableiten. Als typische Maße kann man wieder das Signal-Rausch-Verhältnis der Antwort $X_N(t)$, oder Maße wie den Korrelationskoeffizienten

$$C = \langle X_N(t) s(t) \rangle / [\sqrt{\langle X_N^2(t) \rangle \langle s^2(t) \rangle}], \quad (4.3)$$

heranziehen, worin der erste Term gerade die Kovarianz zwischen „Output“ $X_N(t)$ und „Signal“ $s(t)$ darstellt. Die entsprechende Funktion im Fourierraum bezeichnet man üblicherweise als „Kohärenzfunktion“.

Antwortverhalten von Zellverbänden bei schwacher Strahlung

Mit Hilfe der linearen Antwortfunktion auf schwache Strahlung $s(t)$ auf eine *einzelne* Zelle im Frequenzraum, d.h. $\chi(\omega)$ (vgl. Kapitel 2.2, Gleichung (2.4)), kann man nun das Antwortverhalten des Gesamtverbands bestimmen: Für die spektrale Dichte der gesamten Antwort $X_N(t)$ findet man

$$S_{XX}(\omega) = N S_{xx}^{(0)}(\omega) + N^2 |\chi(\omega)|^2 S_{ss}(\omega), \quad (4.4a)$$

bzw. für die intensive Antwort $\bar{x}_N(t)$:

$$S_{\bar{x}\bar{x}}(\omega) = S_{xx}^{(0)}(\omega)/N + |\chi(\omega)|^2 S_{ss}(\omega). \quad (4.4b)$$

Dabei bedeuten $S_{xx}(\omega)$ die spektrale Dichte der ungestörten Einzelzelle und $S_{ss}(\omega)$ die spektrale Dichte der Strahlung, die im Allgemeinen eine gewisse Bandbreite aufweist. Dabei haben wir vorausgesetzt, dass die verschiedenen Einzelsysteme annähernd als Ensemble von identischen Zellen vorliegen.

Entsprechend findet man für die spektrale Dichte S_{Xs} der Kreuz-Korrelation das Ergebnis:

$$S_{Xs}(\omega) = N \chi(\omega) S_{ss}(\omega). \quad (4.5)$$

Damit können wir nun im Hinblick auf das Verhalten mit zunehmender Anzahl N von Einzelzellen ziemlich allgemeine Aussagen formulieren.

- Mit zunehmender Zahl von Zellen N wird nur der zweite Anteil in (4.4b) relevant. Für die intensive Größe $\bar{x}_N(t)$ verschwinden daher die internen Fluktuationen mit zunehmender Größe des Verbandes. Damit verhält sich der gesamte Verband wie ein lineares System mit der typischen Transferfunktion $\chi(\omega)$ einer Einzelzelle!
- Mit der spektralen Dichte der Kreuz-Korrelation konvergiert dann die Kohärenzfunktion zunehmend gegen den Wert 1. Damit ergibt sich ein maximales kohärentes Verhalten wie man es für ein effektiv lineares System erwarten kann.
- Die Abhängigkeit von der Rauschstärke des Signals ist somit mit zunehmender Anzahl N allein durch die Rauschabhängigkeit des Antwortverhaltes $\chi(\omega)$ der Einzelzelle bestimmt. Bei relativen Größen wie der Kohärenzfunktion (strebt gegen die Konstante 1) wird somit die Abhängigkeit von der intensiven Rauschstärke zunehmend unterdrückt. Dies wiederum führt zu einem Sättigungsverhalten mit zunehmender Rauschstärke des Signals $s(t)$ was sich in einer typischen Verbreiterung des SNR vom „Output“ eines Signals der Kreisfrequenz Ω versus anwachsender Rauschstärke (Temperatur, bzw. die intensive Rauschstärke einer Einheit) äußert. Dieses Plateauverhalten ist in der Literatur auch als „Stochastische Resonanz ohne Abstimmung“ bekannt (Collins *et al.*, 1995).

4.2 Frequenzverhalten

Mit der Zurückführung der spektralen Eigenschaften der Antwort eines schwach gekoppelten Zellverbandes auf die spektralen Eigenschaften einer Einzelzelle, wie oben ausgeführt, kann man auch das Frequenzverhalten des Gesamtverbandes analysieren. Da in der Praxis das Regime niedriger Frequenzen das Antwortverhalten dominiert wird die Abhängigkeit wiederum mit zunehmender Frequenz proportional zu $1/\omega$ unterdrückt, s. Gl. (2.5). Insbesondere ist somit im Bereich von MHz und GHz mit keinen wesentlichen Effekten zu rechnen, vgl. Kapitel 2. Da ein Zellverband mit zunehmender Systemgröße sich immer besser durch eine Transferfunktion $\chi(\omega)$ wie die eines einzelnen linearen Systems beschreiben läßt, verändert sich die Systemantwort aufgrund einer einfallenden Strahlung im Frequenzbereich von MHz-GHz nur unwesentlich. Damit wird breitbandige Strahlung im Spektrum kaum verschoben und es findet eigentlich nur eine frequenzabhängige Absorption mit zunehmender Dicke des Zellverbandes statt.

4.3 Einfluss starker Strahlung

Mit zunehmender Stärke der einfallenden Strahlung muss das nichtlineare Antwortverhalten modelliert werden. In Abwesenheit von experimentellen Befunden für unsere Zellen bei starker Strahlung können wir keine quantitativen Vergleiche anbieten. Trotzdem kann man wiederum allgemeine Aussagen treffen. Wenn die Zellen nur schwach untereinander gekoppelt sind kann wiederum die Physik des zentralen Grenzwertsatzes herangezogen werden, der nach wie vor Gültigkeit auch bei starkem Signal besitzt. Im Wesentlichen wird man nun in erster Approximation die nichtlineare Antwortfunktion heranziehen müssen, die auch explizit die Stärke der elektromagnetischen Strahlung beinhaltet. Das Frequenzverhalten wird jedoch wiederum mit zunehmender Frequenz zu einer generellen Abschwächung führen. Da starke Signale auch höhere harmonische Anregungen und entsprechende Kombinationsfrequenzen generieren, werden diese Effekte noch zusätzlich unterdrückt werden.

4.4 Kooperatives Verhalten

Ein schwieriges Gebiet ist die Modellierung von Zellverbänden bei starker Kopplung der Zellen untereinander. Bei schwacher Kopplung weiß man, dass die Gültigkeit der statistischen Aussagen des zentralen Grenzwertsatzes immer noch eine gute Approximation darstellt. Darüber hinaus spielt nicht nur die *Stärke*, sondern auch die *Art* der Kopplung eine entscheidende Rolle. Bei Anwesenheit einer langreichweitigen Kopplung kann man die Methode eines effektiven, mittleren Feldes zur Anwendung bringen. Man erwartet dann ein Verhalten wie bei schwacher Strahlung aber mit (Amplituden)-renormalisierten Werten für die Transportgrößen wie Transferfunktion, wie etwa $\chi(\omega; A)$, wobei A ein Maß für die Stärke des elektromagnetischen Feldes ist.

4.5 Einfluss von Unordnung: der Fall mit unterschiedlichen Zelltypen (random media und Hybridsysteme)

Das obige Skalenverhalten und die statistischen Aussagen für ein Ensemble bestehend aus unterschiedlichen Zelltypen kann praktisch analog studiert werden. Bei gegenseitiger schwacher Kopplung bleiben die Gesetzmäßigkeiten der statistischen Analyse mittels des Grenzwertsatzes bestehen. Im Einzelnen ergeben sich nur kompliziertere Ausdrücke. Wir betrachten also wieder die kollektive Antwort:

$$X_N(t) = \sum_{i=1}^N x_i(t) , \quad (4.6)$$

worin nun aber die Antworten zweier Einheiten: $x_i(t)$ und $x_j(t)$ mit $i \neq j$ nicht (auch nicht approximativ) gleich sind.

Betrachten wir etwa das Spektrum der Kreuz-Korrelation so ergibt sich als Verallgemeinerung von Gl. (4.5) der Ausdruck

$$S_{Xs}(\omega) = S_{ss}(\omega) \sum_{i=1}^N \chi_i(\omega) . \quad (4.7)$$

worin die Antwortfunktion $\chi_i(\omega)$ sich auf die Einzelzelle $x_i(t)$ bezieht.

Für das Spektrum der Antwort $X_N(t)$ findet man nach Rechnung die Verallgemeinerung von Gl. (4.4), nämlich das Resultat:

$$S_{XX}(\omega) = S_{ss}(\omega) \left[\sum_{i=1}^N \left(S_{x_i x_i}^0(\omega) + |\chi_i(\omega)|^2 \right) + \sum_{i=1}^N \sum_{\substack{j=1 \\ j \neq i}}^N \chi_i^*(\omega) \chi_j(\omega) \right] . \quad (4.8)$$

Hier bedeutet χ^* die konjugiert komplexe Funktion. Damit ergibt sich wiederum, dass sich das System mit zunehmender Anzahl N von Zellen effektiv wie ein lineares System verhält mit einer mittleren Transferfunktion $\chi(\omega) = \sum_{i=1}^N \chi_i(\omega)/N$. Das Frequenzverhalten bleibt dasselbe wie für homogene Systeme: Die Antwort nimmt mit zunehmender Frequenz im MHz, bzw. GHz-Bereich rapide ab, proportional zur inversen Frequenz.

A Berücksichtigung der polarisationsspezifischen Besonderheiten der Zellmembran im Prototyp der Modelle zur Beschreibung der Dynamik des Membranpotentials

Die Berücksichtigung der Schaltladungen erfolgt im Sinne eines zusätzlichen Strombeitrags, der die Leitfähigkeit einer Zellmembran modifiziert. Ausgangspunkt der Modellierung war das archetypische Hodgkin-Huxley Modell, welches in unterschiedlichen Formen ein breites Anwendungsspektrum in der Physiologie findet und allgemein als Standard akzeptiert wird. Eine für dieses Projekt entscheidende Stärke dieses empirischen Modells beruht auf der Tatsache, dass eine vergleichsweise einfache physikalische Interpretation im Sinne eines elektrischen Ersatzschaltbildes und einer Zwei-Zustands-Dynamik der „Gates“ (offen und geschlossen) möglich ist und diese auch nach heutigem Wissensstand im Hinblick auf die molekulare Struktur der Ionenkanal-formenden Proteine nicht widerlegt werden kann. Physikalische Modellierungsansätze zur Berücksichtigung polarisationsspezifischer Besonderheiten, die sich aufgrund von Polarisierungseffekten innerhalb der Zellmembranen ergeben, können daher in diesem Mustermodell umgesetzt werden.

Es wurde analysiert, wie groß die Ladungstrennung an der Zellmembran innerhalb dieses Modells ist, und durch Umformungen schließlich eine Gleichung für die Dynamik des Membranpotentials hergeleitet (Schmid *et al.*, 2006). Im Vergleich zum ursprünglichen Hodgkin-Huxley Modell treten zusätzliche Terme auf, die den durch die Schaltladungen verursachten Strom berücksichtigen. Darüber hinaus dürfen bei kleinen Membranfleck-Größen auch die Fluktuationen in der Anzahl der offenen Ionenkanäle nicht vernachlässigt werden. Diese verursachen nämlich Leitfähigkeitsfluktuationen und können in der Dynamik der Schaltvariablen durch zusätzliche „Rausch“-Terme berücksichtigt werden.

Die Dynamik des Membranpotentials V an einem Membranfleck der Größe S wird dann durch folgendes System beschrieben:

$$I_{\text{ext}}(t) = C_m \frac{dV(t)}{dt} + g_{\text{Na}}^{\text{max}} m^3 h (V - V_{\text{Na}}) + g_{\text{K}}^{\text{max}} n^4 (V - V_{\text{K}}) + g_l (V - V_l) + \rho_{\text{Na}} 3 \frac{dm}{dt} q_m + \rho_{\text{Na}} \frac{dh}{dt} q_h + \rho_{\text{K}} 4 \frac{dn}{dt} q_n \quad (\text{A.1a})$$

$$\frac{d}{dt} x = \alpha_x(V) (1 - x) - \beta_x(V) x + \xi_x(t), \quad x = m, h, n, \quad (\text{A.1b})$$

dabei bedeuten $\xi_x(t)$, $x = m, h, n$ Gaußsches weißes Rauschen, d.h. stochastische

Symbol	Wert	Beschreibung
$V(m, h, n; t)$	Variable	Membranpotential in mV
$m(V; t)$	Variable	Na - Schaltvariable
$h(V; t)$	Variable	Na - Schaltvariable
$n(V; t)$	Variable	K - Schaltvariable
T	Kontrollparameter	Temperatur in Grad Celsius
S	Kontrollparameter	Größe des Membranflecks in μm^2
C_m	$1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$	Membrankapazität
E_{Na}	50 mV	„Umkehrpotential“ für Natrium
E_{K}	-77 mV	„Umkehrpotential“ für Kalium
E_L	-54,4 mV	„Umkehrpotential“ für Rest
$g_{\text{Na}}^{\text{max}}$	$120 \text{ mS}/\text{cm}^2$	Maximale Natrium-Leitfähigkeit
$g_{\text{K}}^{\text{max}}$	$36 \text{ mS}/\text{cm}^2$	Maximale Kalium-Leitfähigkeit
G_L	$0,3 \text{ mS}/\text{cm}^2$	Restleitfähigkeit
ρ_{Na}	$60 \mu\text{m}^{-2}$	Natriumionenkanaldichte
ρ_{K}	$18 \mu\text{m}^{-2}$	Kaliumionenkanaldichte
q_m	$3,746 e$	Ladung eines m -gates
q_h	$-3.7612 e$	Ladung eines h -gates
q_n	$2.709 e$	Ladung eines n -gates
e	$1,6022 \cdot 10^{-19} \text{ A s}$	Elementarladung

Tabelle A.1: Die Variablen und Parameter in unserer Hodgkin-Huxley-artigen Modellierung – ihr Wert und ihre Bedeutung.

Prozesse, deren Mittelwert verschwindet und deren Autokorrelationen durch

$$\langle \xi_m(t) \xi_m(t') \rangle = \frac{1}{S \rho_{\text{Na}}} [\alpha_m(V) (1 - m) + \beta_m(V) m] \delta(t - t'), \quad (\text{A.2a})$$

$$\langle \xi_h(t) \xi_h(t') \rangle = \frac{1}{S \rho_{\text{Na}}} [\alpha_h(V) (1 - h) + \beta_h(V) h] \delta(t - t'), \quad (\text{A.2b})$$

$$\langle \xi_n(t) \xi_n(t') \rangle = \frac{1}{S \rho_{\text{K}}} [\alpha_n(V) (1 - n) + \beta_n(V) n] \delta(t - t'), \quad (\text{A.2c})$$

gegeben sind. Die dynamische Zeit t hat die Dimension ms . Die Öffnungs- und Schließraten $\alpha_x(V)$ und $\beta_x(V)$ sind (Hodgkin and Huxley, 1952):

$$\alpha_m(V) = 0.1 f(T) \frac{V + 40}{1 - \exp\{-(V + 40)/10\}}, \quad (\text{A.3a})$$

$$\beta_m(V) = 4 f(T) \exp\{-(V + 65)/18\}, \quad (\text{A.3b})$$

$$\alpha_h(V) = 0.07 f(T) \exp\{-(V + 65)/20\}, \quad (\text{A.3c})$$

$$\beta_h(V) = \frac{f(T)}{1 + \exp\{-(V + 35)/10\}}, \quad (\text{A.3d})$$

$$\alpha_n(V) = 0.01 f(T) \frac{V + 55}{1 - \exp\{-(V + 55)/10\}}, \quad (\text{A.3e})$$

$$\beta_n(V) = 0.125 f(T) \exp\{-(V + 65)/80\}, \quad (\text{A.3f})$$

wobei $f(T)$ eine von der Temperatur abhängige Funktion ist:

$$f(T) = 3^{(T[^\circ\text{C}] - 6.3)/10}. \quad (\text{A.4})$$

Die Erklärung der einzelnen Symbole, sowie deren Werte sind in Tabelle A.1 explizit aufgeführt.

Bestimmung der Schaltladungen aus den Übergangsraten

Die Ladungen die während einer Konfigurationsänderung transportiert, bzw. verschoben werden, werden aus den Übergangsraten durch Vergleich mit einer Arrhenius-artigen Abhängigkeit (Schmid *et al.*, 2006), d.h.:

$$\alpha(V) = \alpha_0 \exp \left\{ \frac{qz \cdot V}{k_B T} \right\}, \quad (\text{A.5a})$$

$$\beta(V) = \beta_0 \exp \left\{ \frac{-q(1-z) \cdot V}{k_B T} \right\}, \quad (\text{A.5b})$$

vermittelt. In Gl. (A.5) ist k_B die Boltzmann-Konstante, T die Temperatur, q die Schaltladung und V das Membranpotential. z berücksichtigt die Asymmetrie. Damit ergeben sich die einzelnen Schaltladungen wie in Tabelle A angegeben.

Eine Analyse des obigen, von uns zwecks der Berücksichtigung von polarisationsspezifischen Besonderheiten entwickelten Modells, Gl. (A.1)-(A.3), ergab, dass der Schaltstrom einen inhibitorischen Einfluss auf die Erzeugung von Aktionspotentialen hat.

Deterministischer Fall

Die zeitliche Dynamik der Schaltvariablen ist im Standard-Hodgkin-Huxley Modell durch

$$\frac{d}{dt}x = \alpha_x(V) (1-x) - \beta_x(V) x, \quad (x = m, h, n), \quad (\text{A.6})$$

gegeben (Hodgkin and Huxley, 1952). Streng genommen ist eine derartige Beschreibung der Dynamik des Membranpotentials, wie diese durch die Gleichungen (A.1a) und (A.6) gegeben ist, nur für das Membranpotential eines unendlich großen Membranausschnitts eines *squid giant axons* gültig. Für kleinere Membranausschnitte spielen die Fluktuationen in der Anzahl der offenen Kanäle/Gates jedoch eine wichtige Rolle und eine deterministische Beschreibung wie in Gleichung (A.6) ist nicht mehr angebracht (Loidl *et al.*, 2006; Schmid *et al.*, 2001). Die tatsächliche Dynamik wird dann durch eine *Mastergleichung* beschrieben. Mit Hilfe der Kramers-Moyal Entwicklung kann man letztendlich die Langevin-Gleichung (A.1b) herleiten.

Im ursprünglichen (rein deterministischen) Hodgkin-Huxley Modell sind die Beiträge der Schaltströme so gering, dass diese auf die Form der Aktionspotentiale sowie auf das Anregungsverhalten der Zellmembran kaum Auswirkungen haben. Mit der Verlangsamung der Dynamik des Membranpotentials, die mit der Erhöhung der effektiven Membrankapazität einher geht (vgl. Kapitel 1.4), beobachtet man auch eine Verringerte neuronale Erregbarkeit (Schmid *et al.*, 2006). Darüberhinaus konnte in diesem erweiterten Modell gezeigt werden, dass Schaltladungseffekte die effektive Stärke des sogenannten Kanalrauschens verringern:

Abschwächung der effektiven Stärke des Kanalrauschens im Rahmen einer Hodgkin-Huxley Modellierung

In Abschnitt 1.1 wurde neben der Schaltladung auch noch ein anderer wichtiger Punkt beim Schalten der Ionenkanäle erwähnt, nämlich deren Rauschverhalten. Für ein gegebenes Membranpotential kann innerhalb eines deterministischen Modells nur der Erwartungswert der Anzahl der offenen Kanäle angegeben werden. Die tatsächliche Anzahl fluktuiert jedoch zeitlich (Loidl *et al.*, 2006). Wie in der Bestandsaufnahme ausführlich dargestellt, können diese Fluktuationen auch sogenannte Aktionspotentiale hervorrufen (Loidl *et al.*, 2006). Mehr noch können durch dieses intrinsische Rauschen schwache Signale verstärkt werden, d.h. man beobachtet eine anomale Signalverstärkung mit zunehmender Rauschstärke, vgl. Effekt der *Stochastischen Resonanz*. Es konnte jedoch gezeigt werden (Schmid *et al.*, 2006), dass Schaltladungseffekte eine drastische Reduktion des spontanen Feuerns zur Folge haben. Schaltladungen wirken daher stabilisierend und führen effektiv zu einer Unterdrückung spontaner Aktionspotentiale: Generell findet man ein häufigeres Auftreten von spontanen Aktionspotentialen für kleinere Membranflächen, bzw. für kleinere Ionenkanalzahl. In diesem Fall sind die Fluktuationen im Vergleich zum Mittelwert stärker als für große Systemgrößen. Im Literaturbericht wurde aufgezeigt, dass die Stärke des intrinsischen Rauschens proportional zum Inversen der spezifischen Ionenkanalanzahl ist. Der Schaltstrom, der dem ionischen Strom bei der Spike-Initiierung entgegen wirkt, stabilisiert das System insofern, als er die Erzeugung spontaner Aktionspotentiale unterdrückt, ohne dabei jedoch weder die Form des Nervenpulses, noch das Erregungsverhalten signifikant zu beeinflussen.

Literaturverzeichnis

- Adrian, R. H., *Conduction velocity and gating current in the Squid Giant Axon*, Proc. R. Soc. London **189**, 81–86 (1975)
- Anderson, L. S., Gajda, G. B., Stuchly, S. S., *Analysis of an open-ended coaxial line sensor in layered dielectrics*, IEEE Transactions on instrumentation and measurement **35** (1), 13-18 (1986)
- Armstrong, C. M., *Voltage-dependent ion channels and their gating*, Physiol. Rev. **72**, (4 Suppl), 5-13 (1992)
- Bako, I., Hutter, J., Palinkas, G., *Car-Parrinello molecular dynamics simulation of the hydrated calcium ion*, J. Chem. Phys. **117** (21), 9838-9843 (2002)
- Buchner, R., Barthel, J., Stauber, J., *The dielectric relaxation of water between 0 degrees C and 35 degrees C*, Chem. Phys. Lett. **306** (1-2), 57-63 (1999a)
- Buchner, R., Hefter, G. T., May, P. M., *Dielectric relaxation of aqueous NaCl solutions*, J. Phys. Chem. A, **103** (1): 1-9 (1999b)
- Car, R., Parrinello, M., *Unified Approach for Molecular-Dynamics and Density-Functional Theory*, Phys. Rev. Lett. **55** (22), 2471-2474 (1985)
- Catenaccio, A., Daruich, Y., Magallanes, C., *Temperature dependence of the permittivity of water*, Chem. Phys. Lett. **367** (5-6), 669-671 (2003)
- Chen, T., Hefter, G., Buchner, R., *Dielectric spectroscopy of aqueous solutions of KCl and CsCl*, J. Phys. Chem. A, **107** (20): 4025-4031 (2003)
- Collins, J. J., Chow, C. C., Imhoff, T., *Stochastic resonance without tuning*, Nature **376**, 236-238 (1995)
- Cruzeiro-Hansson, L., Ipsen, J. H., Mouritsen, O. G., *Intrinsic molecules in lipid membranes change the lipid-domain interfacial area: cholesterol at domain interfaces*, Biochim. Biophys. Acta **979** (2), 166-176 (1989)
- Davidson, D. W. and Cole, R. H., *Dielectric Relaxation in Glycerine*, J. Chem. Phys. **18**, 1417 (1950)
- Davidson, D. W. and Cole, R. H., *Dielectric Relaxation in Glycerol, Propylene Glycol, and n-Propanol*, J. Chem. Phys. **19**, 1484 (1951)
- Debye, P., Z. Phys. Z. **13**, 295 (1912)
- Ebel, H., Grabitz, P. and Heimbürg, T., *Enthalpy and volume changes in lipid membranes I. The proportionality of heat and volume changes in the lipid melting transition and its implication for the elastic constants*, J. Phys. Chem. B **105**, 7353-7360 (2001)
- Einstein, A., *Theorie der Opaleszenz von homogenen Flüssigkeiten und Flüssigkeitsgemischen in der Nähe des kritischen Zustandes*, Ann. d. Phys. **33** 1275 (1910)
- Ellison, W. J., Lamkaouchi, K., Moreau J. M., *Water: A dielectric reference*, Journal of Molecular Liquids **68**, 171-279, (1996)

- Fernández, J. M., Bezanilla, F., Taylor, R. E., *Distribution and kinetics of membrane dielectric polarization: II. Frequency domain studies of gating currents*, J. Gen. Physiol. **79**, 41–67 (1982)
- Fertig, N., Meyer, C., Blick, R. H., Trautmann, C., Behrends, J. C., *Microstructured glass chip for ion-channel electrophysiology*, Physical Review E **64** (4): Art. No. 040901 Part 1 (2001)
- Gajda, G. B., Stuchly, S. S., *Numerical-analysis of open-ended co-axial lines*, IEEE transactions on microwave theory and techniques **31** (5), 380-384 (1983)
- Gammaitoni, L., Hänggi, P., Jung, P., and Marchesoni, F., *Stochastic resonance*, Rev. Mod. Phys. **70**, 223–288 (1998)
- Gascoyne, P. R. C., Pethig, R., Burt, J. P. H. and Becker, F. F., *Membrane changes accompanying the induced differentiation of Friend murine erythroleukemia cells studied by dielectrophoresis*, Biochim. Biophys. Acta **1146**, 119-126 (1993)
- Gluckman, B. J., Netoff, T. I., Neel, E. J., Ditto, W. L., Spano, M. L., and Schiff, S. J., *Stochastic resonance in a neuronal network from mammalian brain*, Phys. Rev. Lett. **77**, 4098-4101 (1996)
- Grabitz, P., Ivanova, V. P., Heimburg, T., *Relaxation kinetics of lipid membranes and its relation to the heat capacity*, Biophys. J. **82**, 299-309 (2002)
- Grant, E. H., Sheppard, R. J., and South, G. P., *Dielectric Behaviour of Biological Molecules in Solution*, Oxford University Press, Oxford (1978)
- Hänggi, P., *Stochastic Resonance in biology*, ChemPhysChem **3**, 285-290 (2002)
- Hänggi, P., Thomas, H., *Stochastic processes: Time-evolution, symmetries and linear response*, Phys. Rep. **88**, 207-319 (1982)
- Hasted J., B. and Roderick, G., W., *Dielectric Properties of Aqueous and Alcoholic Electrolytic Solutions*, J. Chem. Phys., **29**, 17-26 (1958)
- Hasted J., B., Ritson, D., M. and Collie, C., H., *Dielectric Properties of Aqueous Ionic Solutions. Part I and II*, J. Chem. Phys., **16**, 1-21 (1948)
- Hasted, J. B., *Aqueous Dielectrics*, Chapman and Hall, London (1973)
- Hasted J. B, Husain, S. K., Frescura, F. A. M., Birch, J. R., *Far-Infrared Absorption in Liquid Water*, Chem. Phys. Lett. **118** (6), 622-625 (1985)
- Heimburg, T., *Mechanical aspects of membrane thermodynamics. Estimation of the mechanical properties of lipid membranes close to the chain melting transition from calorimetry*, Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1415** (1), 147-162 (1998)
- Hille, B., *Ion channels of excitable membranes*, 3rd Edition. Sinauer Associates, Sunderland, MA (2001)
- Hodgkin, A. L., Huxley, A. F., *A quantitative description of the membrane current and its application to conduction and excitation*, J. Physiol. (London) **117**, 500–544 (1952)
- Hodgkin, A., *Optimum density of sodium channels in an unmyelinated nerve*, Philos. Trans. R. Soc. London **270**, 297–300 (1975)

- Hoshi, T., Zagotta, W. N., Aldrich, R. W., *Biophysical and Molecular Mechanisms of Shaker Potassium Channel Inactivation*, Science **250** (4980), 533-538 (1990)
- Hudspeth, A. J., Choe, Y., Mehta, A. D., Martin, P., *Putting ion channels to work: Mechano-electrical transduction, adaptation, and amplification by hair cells*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**, 11765–11772 (2000)
- Ikeda, T., Boero, M., Terakura, K., *Hydration of alkali ions from first principles molecular dynamics revisited*, J. Chem. Phys. **126** (3), Art. No. 034501 (2007)
- Janiak, M.J., Small, D. M., Shipley, G. G., *Temperature and Compositional Dependence of the Structure of Hydrated Dimyristoyl Lecithin*, Journal of Biological Chemistry **254** (13), 6068-6078 (1979)
- Kaatze, U., *Dielectric-Spectroscopy of Aqueous-Solutions - Hydration Phenomena and Hydrogen-Bonded Networks*, J. Mol. Liquids **56**, 95-115 (1993)
- Keener, J., Sneyd, J., *Mathematical Physiology*, Springer, (1998)
- Klöggen B., Reichle, C., Kohlsmann, S. and Kramer, K. D., *Dielectric spectroscopy as a sensor of membrane headgroup mobility and hydration*, Biophys. J. **71**, 3251-3260 (1996)
- Kotnik, T., Bobanovic, F. and Miklavcic, D., *Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields – a theoretical analysis*, Bioelectrochem. Bioenerg. **43**, 285-291 (1997)
- Krekeler, C., Hess, B., Delle Site, L., *Density functional study of ion hydration for the alkali metal ions (Li⁺, Na⁺, K⁺) and the halide ions (F⁻, Br⁻, Cl⁻)*, J. Chem. Phys. **125** (5), Art. No. 054305 (2006)
- Krekeler, C., Delle Site, L., *Solvation of positive ions in water: The dominant role of water-water interaction*, unpublished, cond-mat./0702245 (2007)
- Krishnamurthy, S., Bansil, R., Wiafeakenten, J., *Low-Frequency Raman-Spectrum of Supercooled Water*, J. Chem. Phys. **79** (12), 5863-5870 (1983)
- Lev, A. A., Korchev, Y. E., Rostovtseva, T. K., Bashford, C. L., Edmonds, D. T., Pasternak, C. A., *Rapid switching of ion current in narrow pores: implications for biological ion channels*, Proc Biol Sci **252** (1335), 187-192 (1993)
- Liberti, M., Apollonio, F., Paffi, A., Pellegrino, M., D'Inzeo, G., *A coplanar-waveguide system for cells exposure during electrophysiological recordings*, IEEE transactions on Microwave Theory and Techniques **52** (11), 2521-2528 (2007)
- Linz, K. W., von Westphalen, C., Streckert, J., Hansen, V., Meyer, R., *Membrane potential and currents of isolated heart muscle cells exposed to pulsed radio frequency fields*, Bioelectromagnetics, **20** (8), 497-511 (1999)
- Loidl, A., Lunkenheimer, P., Wixforth, A., Schneider, M., Hänggi, P., Schmid, G., *Untersuchung zu der Fragestellung, ob makroskopische dielektrische Gewebeeigenschaften auch auf Zellebene bzw. im subzellulärem Bereich uneingeschränkte Gültigkeit besitzen : Bestandsaufnahme*, http://www.emf-forschungsprogramm.de/forschung/dosimetrie/dosimetrie_verg/dosi_075_ZwB_01.pdf (2006)

- Loidl, A., Lunkenheimer, P., Wixforth, A., Schneider, M., Hänggi, P., Schmid, G., *Untersuchung zu der Fragestellung, ob makroskopische dielektrische Gewebeeigenschaften auch auf Zellebene bzw. im subzellulärem Bereich uneingeschränkte Gültigkeit besitzen : Zwischenbericht*, unpublished (2007)
- Malmberg, C. G., Maryott, A. A., *Dielectric constant of water from 0° to 100°C*, J. Res. Nat. Bur. Stand. **56**, 1-8 (1956)
- Marchionni, I., Paffi, A., Pellegrino, M., Liberti, M., Apollonio, F., Abeti, R., Fontana, F., D'Inzeo, G., Mazzanti, M., *Comparison between low-level 50 Hz and 900 MHz electromagnetic stimulation on single channel ionic currents and on firing frequency in dorsal root ganglion isolated neurons*, Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes **1758** (5), 597-605 (2006)
- Martin, D. R. und Matyushov, D. V., *Cavity Field in Molecular Liquids. When a Polar Liquid becomes a Dielectric?*, unpublished, arXiv:0709.4451 (2007)
- Mason, P. R., Hasted, J. B., Moore, L., *The use of statistical theory in fitting equations to dielectric data*, Adv. Mol. Relax. Processes **6**, 217-232 (1974)
- McClellan, A. L. in „Dipole Moments“, Freeman, San Francisco (1963)
- Mizoguchi, K., Hori, Y., Tominaga, Y., *Study on dynamic structure in water and heavy-water by low-frequency Raman-Spectroscopy*, J. Chem. Phys. **97** (3) 1961-1968 (1992)
- Montal, M. and Mueller, E., *Formation of Bimolecular Membranes from Lipid Monolayers on a Study of Their Electrical Properties*, Proc. Nat. Acad. Sci. USA **69**, 3561 (1972)
- Neher, E., Sakmann, B., *Single-Channel Currents recorded from Membrane of denervated Frog Muscle-Fibers*, Nature **260** (5554), 799-802 (1976)
- Nörtemann, K., Hilland, J., Kaatze, U., *Dielectric properties of aqueous NaCl solutions at microwave frequencies*, J. Phys. Chem. A, **101**, 6864-6869 (1997)
- Nossal, R. J., Lecar, H., *Molecular and Cell Biophysics*, Addison-Wesley, Redwood City (1991)
- Pethig, R., Kell, D. B., *The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology*, Phys. Med. Biol. **32**, 933–970 (1987)
- Pickard, W. F., Barsoum, Y. H., *Radio-Frequency Bioeffects at the Membrane Level - Separation of Thermal and Athermal Contributions in the Characeae*, Journal of Membrane Biology **61** (1), 39-54 (1981)
- Platano, D., Mesirca, P., Paffi, A., Pellegrino, M., Liberti, M., Apollonio, F., Bersani, F., Aicardi, G., *Acute exposure to low-level CW and GSM-modulated 900 MHz radiofrequency does not affect Ba(2+) currents through voltage-gated calcium channels in rat cortical neurons*, Bioelectromagnetics (online first) (2007)
- Pottel, R., Göpel, K. D., Henze, R., Kaatze, U. and Uhlendorf, V., *The dielectric permittivity spectrum of aqueous colloidal phospholipid solutions between 1 kHz and 60 GHz*, Biophysical Chemistry **19**, 233-244 (1984)

- Querry, M. R. *et al.*, *Handbook of Optical Constants of Solids II*, (E. D. Palik, Edt.), Academic Press, p. 1059 (1991)
- Reinheimer J. A., Demkow, M. R., *Comparison of rapid Tests for assessing UHT Milk Sterility*, Journal of Dairy Research **57** (2), 239-243 (1990)
- Roche Lexikon Medizin, 4. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München (1999)
- Ronne, C., Thrane, L., Astrand, P. O. *et al.*, *Investigation of the temperature dependence of dielectric relaxation in liquid water by THz reflection spectroscopy and molecular dynamics simulation*, J. Chem. Phys. **107** (14), 5319-5331 (1997)
- Russel, D. F., Wilkens, L. A., and Moss, F., *Use of behavioural stochastic resonance by paddle fish for feeding*, Nature **402**, 291-294 (1999)
- Sachs, F., Qin, F., *Gated, ion-selective channels observed with patch pipettes in the absence of membranes: novel properties of a gigaseal*, Biophys J **65** (3), 1101-1107 (1993)
- Sakmann, B., Neher, E., *Single Channel Recording*, Plenum, New York (1995)
- Schmid, G., Goychuk, I., Hänggi, P., *Stochastic resonance as a collective property of ion channel assemblies*, Europhys. Lett. **56**, 22-28 (2001)
- Schmid, G., Goychuk, I., and Hänggi, P., *Membrane clusters of ion channels: size effects for stochastic resonance*, in: *Statistical mechanics of complex networks*, R. Pastor Satorras, M. Rubi, and A. Diaz Guilera, eds., Lecture Notes in Physics, vol. **625**, pp. 195–206, Springer, Berlin (2003)
- Schmid, G., Goychuk, I., Hänggi, P., *Capacitance fluctuations causing channel noise reduction in stochastic Hodgkin-Huxley systems*, Phys. Biol. **3**, 248–254 (2006)
- Schneider, U., Brand, R., Lunkenheimer, P., *et al.*, *Excess wing in the dielectric loss of glass formers: A Johari-Goldstein beta relaxation?*, Phys. Rev. Lett. **84** (24), 5560-5563 (2000)
- Schrader, W and Kaatz, U., *Zwitterion Headgroup Orientation Correlation and Mobility and the Domain Structure of Membranes*, J. Phys. Chem. B **105**, 6266-6272 (2001)
- Schrader, W., Ebel, H., Grabitz, P., Hanke, E., Heimburg, T., Hoeckel, M., Kahle, M., Wente, F. and Kaatz, U., *Compressibility of lipid mixtures studied by calorimetry and ultrasonic velocity measurements*, J. Phys. Chem. B **106**, 6581-6586 (2002)
- Schwan, H. P., *Electrical properties of blood and its constituents: alternating current spectroscopy*, Blut **46** (4), 185-197 (1983)
- Seeger, H., Fidorra, M. and Heimburg, T., *Domain size and fluctuations at domain interfaces in lipid mixtures*, Macromolecular Symposia (Wiley) **219**, 85-96 (2005)
- Segelstein, D. J., *The complex refractive index of water*, M.S. Thesis, University of Missouri, Kansas City, Missouri (1981)
- Sharma, M., Resta, R., Car, R., *Dipolar Correlations and the Dielectric Permittivity of Water*, Phys. Rev. Lett. **98**, 247401 (2007)
- Silvestrelli, P. L., Parrinello, M., *Water molecule dipole in the gas and in the liquid phase*, Phys. Rev. Lett. **82** (16), 3308-3311 (1999)

- Simeonova, M., Gimsa, J., *The influence of the molecular structure of lipid membranes on the electric field distribution and energy absorption*, Bioelectromagnetics **27** (8), 652-666 (2006)
- Stuchly, M. A., Stuchly, S. S., *Coaxial Line Reflection Methods for Measuring Dielectric-Properties of Biological Substances at Radio and Microwave-Frequencies - A Review*, IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement **29** (3), 176-183 (1980)
- Sugar, I. P., Thompson, T. E., Biltonen, R. L., *Monte Carlo simulation of two-component bilayers: DMPC/DSPC mixtures*, Biophys J **76** (4), 2099-110 (1999)
- Thrane, L., Jacobsen, R. H., Jepsen, P. U., Keiding, S. R., *THz reflection spectroscopy of liquid water*, Chem. Phys. Lett. **240** (4), 330-333 (1995)
- Tirado, M., Grosse, C., Schrader, W., Kaatz, U., *Broad frequency range dielectric spectroscopy of aqueous suspensions of phospholipid vesicles*, Journal of Non-Crystalline Solids **305**, 373-378 (2002)
- Visser, W., Scheffers, W. A., Batenburg-van der Vegte, W. H. and van Dijken, J. P., *Oxygen requirements of yeasts*, Appl. Environ. Microbiol. **56**, 3785-3792 (1990)
- Wei, Y. Z., Chiang, P., Sridhar, S., *Ion size effects on the dynamic and static dielectric-properties of aqueous alkali solutions*, J. Chem. Phys. **96** (6), 4569-4573 (1992)
- White, M. J., DiCaprio, M. J. and Greenberg, D. A., *Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures*, Journal of Neuroscience Methods, **70** (2), 195-200 (1996)
- Zhi-Jun, Y., Sriranganathan, N., Vaught, T., Arastu, S. K. and Ahmed, S. A., *A dye-based lymphocyte proliferation assay that permits multiple immunological analyses: mRNA, cytogenetic, apoptosis, and immunophenotyping studies*, J. Immunol. Methods **210**, 25-39 (1997)