

# Die BEMER-Elektromagnetfeldtherapie setzt die Strahlenresistenz von Krebszellen herab, indem sie die Bildung von ROS anregt und DNA-Schäden induziert

Katja Storch<sup>1,2</sup>✉, Ellen Dickreuter<sup>1,2</sup>✉, Anna Artati<sup>3</sup>, Jerzy Adamski<sup>3,4,5</sup>, Nils Cordes<sup>1,2,6,7,8\*</sup>

**1** OncoRay – National Center for Radiation Research in Oncology, Medizinische Fakultät und Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Dresden, **2** Helmholtz-Zentrum Dresden - Rossendorf, Institut für Radioonkologie, Dresden, **3** Institut für Experimentelle Genetik, Genomanalysezentrum, Helmholtz-Zentrum München, Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Neuherberg, **4** Lehrstuhl für Experimentelle Genetik, Technische Universität München, Freising-Weihenstephan, **5** Deutsches Zentrum für Diabetesforschung (DZD e.V.), München-Neuherberg, **6** Abteilung für Strahlenonkologie, Universitätsklinikum Carl Gustav Carus, Technische Universität Dresden, Dresden, **7** Deutsches Konsortium für Transnationale Krebsforschung (DKTK), Dresden, **8** Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ), Heidelberg

✉ Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

\* [Nils.Cordes@OncoRay.de](mailto:Nils.Cordes@OncoRay.de)

## OPEN ACCESS

**Zitation:** Storch K, Dickreuter E, Artati A, Adamski J, Cordes N (2016) BEMER Electromagnetic Field Therapy Reduces Cancer Cell Radiore-sistance by Enhanced ROS Formation and Induced DNA Damage. PLoS ONE 11(12): e0167931.  
doi:10.1371/journal.pone.0167931

**Editorin:** Kerstin Borgmann, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Eingegangen:** 01.08.2016

**Angenommen:** 22.11.2016

**Veröffentlicht:** 13.12.2016

**Copyright:** © 2016 Storch et al. Dieser Open-Access-Artikel wird unter den Bedingungen der [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) veröffentlicht, die die uneingeschränkte Nutzung, Verbreitung und Reproduktion in beliebigen Medien erlaubt, sofern der ursprüngliche Autor und die Quelle genannt werden.

**Erklärung zur Datenlage** Alle maßgeblichen Daten sind in diesem Artikel enthalten.

**Finanzierung:** Diese Forschung und die Autoren wurden teilweise von der BEMER Int. AG (Liechtenstein) und mit Fördermitteln der Deutschen Krebshilfe (108976 an N.C.), der Europäischen Union (Nr. 642623 an N.C.) und dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung, Europa fördert Sachsen (EFRE, 100066308) unterstützt. Diese Arbeit wurde ferner durch Mittel des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) an das Deutsche Zentrum für Diabetesforschung (DZD e.V.) gefördert. Die Geldgeber waren an Studiendesign, Erhebung und Auswertung der Daten, der Veröffentlichungsentscheidung und der Erstellung des Manuskripts nicht beteiligt.

**Interessenkonflikt:** Die BEMER Int. AG war an Studiendesign, Erhebung und Auswertung der Daten, der Veröffentlichungsentscheidung und der Erstellung des Manuskripts nicht beteiligt. Insbesondere bleibt auch unsere Einhaltung der PLOS-ONE-Grundsätze zur Weitergabe von Daten und Material davon unberührt.

## Zusammenfassung

Es wird davon ausgegangen, dass jedes Jahr über 450.000 Menschen in Deutschland eine Krebsdiagnose erhalten und sich im Anschluss einer multimodalen Standardtherapie unterziehen, die chirurgische, chemotherapeutische und strahlentherapeutische Maßnahmen umfasst. Darüber hinaus kommen auch immer mehr solche Wirkstoffe zum Einsatz, die bestimmte molekulare Zielstrukturen angreifen. Die intrinsische und/oder erworbene Resistenz gegen diese Therapiemodalitäten rechtfertigt ein gründlicheres Verständnis der Tumorbilogie auf molekularer Ebene und die Erwägung alternativer bzw. komplementärer therapeutischer Interventionen, da sie breitere und auch neue Möglichkeiten für eine personalisierte Therapie eröffnen. Insbesondere letzterer Aspekt wird durch die verstärkte Hinwendung der Bevölkerung zu einer nicht invasiven komplementären bzw. alternativen Medizin noch unterstrichen. Zu den in diesem Zusammenhang erforschten Verfahren zählt die Anwendung niedrig dosierter elektromagnetischer Felder (EMF) zur Modulierung zellulärer Prozesse. Als physikalisch-vaskuläre Therapie ist hier vor allem die BEMER-

Therapie zu nennen, da sie nachweislich zur Normalisierung der Mikrozirkulation durch ein niederfrequentes gepulstes EMF-Muster führt. Indes bleibt offen, ob dieses EMF-Muster das Überleben von Krebszellen in Kombination mit einer strahlen- und/oder chemotherapeutischen Behandlung und dem molekular gezielt wirkenden Mittel Cetuximab beeinflusst, das den Epidermal Growth Factor Receptor inhibiert. Auf Grundlage besonders physiologienaher matrix-basierter 3D-Zellkulturmodelle und Krebszelllinien der Lunge, des Kopfes und Halses, des Kolorektems und des Pankreas weisen wir nach, dass die BEMER-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen deutliche Veränderungen bei verschiedenen Zwischenprodukten der Glykolyse und der Pfade des Tricarbonsäurezyklus sowie eine verstärkte Strahlensensibilisierung der Krebszellen induziert, die mit vermehrten DNA-Doppelstrangbrüchen und einer verstärkten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies einhergehen. Faszinierenderweise führte die Behandlung der Zellen mit dem BEMER-EMF-Muster aber nicht zu einer Sensibilisierung gegenüber der Chemotherapie und Behandlung mit Cetuximab. Weiterführende Studien sind notwendig, um die Mechanismen besser verstehen zu können, die den durch das BEMER-EMF-Muster induzierten zellulären Veränderungen zugrunde liegen, und um die Anwendungsgebiete im Bereich der Humanerkrankungen auszuloten.

## Einleitung

Moderne multimodale Strategien zur Krebsbekämpfung umfassen chirurgische, chemotherapeutische und strahlentherapeutische Maßnahmen. Die Kombination aus intrinsischen und erworbenen Therapieresistenzen, normalen Gewebetoxizitäten und der nicht gegebenen biologischen Personalisierung ist nach wie vor ein Hindernis, das einer entscheidenden Verbesserung der Überlebenschancen von Krebspatienten im Wege stehen [1–4]. Während wir die Tumorbilogie dank der verschiedenen "-omik"-Technologien und der Molekularbiologie immer besser verstehen und damit auf eine Fülle von Möglichkeiten zur Entwicklung gezielt wirkender Substanzen zurückgreifen können, finden auch die Behandlungsstrategien der Komplementär- und Alternativmedizin immer öfter ihren Weg in die konventionelle Krebstherapie, ohne dass die zugrunde liegenden Wirkmechanismen gut verstanden wären. Angesichts der wachsenden Nachfrage seitens der Bevölkerung und des brachliegenden Potenzials derartiger Ansätze haben wir eine bestimmte Elektromagnetfeldtherapie (EMF) zur Sensibilisierung von Krebszellen untersucht, die nachweislich zu einer effektiven Normalisierung der Mikrozirkulation im Gewebe führt.

Unsere Literaturrecherche ergab, dass bei Anwendung von EMF [5] eine Wirkung auf zelluläre Funktionen und auf die Reaktion auf Krebstherapien zu beobachten ist. EMF-Therapien verminderten die Proliferation [6–9] und induzierten Apoptose [8,10–13] in verschiedenen Krebszellen wie bspw. Osteosarkom, Brustkrebs, Magenkrebs, Kolonkarzinom und Melanom. Ferner konnten Marchesi et al. nachweisen, dass eine EMF-Behandlung bei Neuroblastomzellen Autophagieprozesse in Gang setzt [14]. Interessanterweise war nach EMF-Therapie die Tumervaskularisierung bei Brustkrebs in vitro und in vivo reduziert [15,16]. Dazu passt, dass die EMF-Therapie das Tumorstadium in Mausmodellen des malignen Melanoms, des Kolonkarzinoms und des Adenokarzinoms verminderte [9,17]. Baharara et al. wiesen nach, dass eine extrem niedrig dosierte EMF-Therapie die Sensibilität von cisplatinresistenten menschlichen Ovarialkarzinomzellen durch gesteigerte Apoptoseraten erhöhte [18]. In kombiniertem Einsatz mit einer Strahlentherapie verbesserte EMF das Überleben von Mäusen mit Hepatom im Vergleich zu einer bloßen EMF- oder Strahlentherapie [19]. Einen ähnlichen Effekt wiesen Cameron et al. bei Brustkrebsxenografts auch mit Lungenmetastasen nach [20]. Diese Untersuchungen unterstreichen ganz klar, welches Potenzial die EMF-Therapie in Kombination mit herkömmlichen Krebstherapien als neuartiges Verfahren zur Tumorsensibilisierung hat. Dabei ist zu beachten, dass sich die EMF-Muster in den verschiedenen Studien hinsichtlich Stärke, Richtung, Frequenz und Wellenform stark voneinander unterscheiden, wobei letztere von Sinus- bis hin zu rechteckigen oder gepulsten Formen reicht [5,21]. Am häufigsten kamen gepulste niederfrequente EMF-Muster zum Einsatz.

In der vorliegenden Arbeit bedienen wir uns des Systems der bio-elektromagnetischen Energieregulierung (BEMER), die auf einem niederfrequenten gepulsten Magnetfeld (max. 35  $\mu$ T) mit einer Serie von halbwellenförmigen sinusartigen Intensitätsschwankungen beruht und nachweislich die Vasomotion bzw. Mikrozirkulation anregt und damit die Durchblutung, Nährstoffversorgung und Beseitigung von Stoffwechselprodukten ankurbelt [22,23]. In einer randomisierten doppelblinden Pilotstudie linderte die BEMER-Behandlung die Erschöpfung von Patienten mit Multipler Sklerose (MS) [24]. Eine langfristige Anschlussstudie bewies die Nutzwirkung einer chronischen BEMER-Therapie bei MS-bedingter Erschöpfung [25]. Im zellbiologischen Bereich konnten Walther et al. unter BEMER-Behandlung veränderte Expressionsmuster bei einer begrenzten Zahl von Genprodukten nachweisen, die u. a. mit dem Energiemetabolismus, der Stabilisierung des Zytoskeletts und dem Vesikeltransport in menschlichen mesenchymalen Stammzellen und menschlichen Chondrozyten in Zusammenhang stehen [26]. Eine weitere Studie belegt, dass die BEMER-Behandlung das Wachstum von EL4-T-Zell-Lymphomen bei der Maus verzögert und das Überleben der Tiere verlängert [27]. Interessanterweise

kommt es bei BEMER-Behandlung und paralleler Applikation von synthetischem HPMa-Copolymer-basiertem Doxorubicin zu einer synergistischen gegen den Krebs gerichteten Wirkung [27].

Anhand von Zellen solider Tumoren untersuchten wir, auf welche Weise das BEMER-EMF-Muster das Metabolom im Bereich Glykolyse und Tricarbonsäurezyklus (TCA) sowie die Sensibilität für Strahlen- und Chemotherapie und Cetuximab beeinflusst. Um diese Frage sinnvoll beantworten zu können, bedienten wir uns eines besonders physiologienahen lamininreichen 3D-Zellkulturmodells, das auf einer extrazellulären Matrix (IrECM) beruht. Dabei zeigte sich, dass die BEMER-Behandlung eine deutliche strahlensensibilisierende Wirkung auf die Krebszellen hat, deren zugrunde liegender Mechanismus auf reaktiven Sauerstoffspezies und vermehrten DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) fußt.

## Materialien und Methoden

### Zellkultur und Bestrahlung

Die menschliche Plattenepithelkarzinomzelllinie des Kopfes und Halses (HNSCC) UTSCC15 wurde freundlicherweise von R. Grenman (Universitätsklinikum Turku, Finnland) zur Verfügung gestellt; die menschliche Bronchialkarzinomzelllinie DLD1 und die menschliche duktale Pankreas-Adenokarzinomzelllinie MiaPaca2 wurde von der American Tissue Culture Collection erworben. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; PAA, Cölbe, Deutschland) mit Glutamax-I, 10 % fötalem Kalbsserum (FCS; PAA) und 1 % nichtessenziellen Aminosäuren (PAA) bei 37 °C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 8,5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Alle Experimente wurden an asynchron wachsenden Zellen durchgeführt. Drei (3D)-dimensionale Zellkulturen wurden durch Einbetten der Zellen in 0,5 mg/ml IrECM (Matrigel™; BD, Heidelberg, Deutschland) präpariert [28–30]. Die Bestrahlung erfolgte bei Raumtemperatur durch mit 0,5 mm Cu gefilterte Röntgen-Einzeldosen von 200 kV (Yxlon Y.TU 320; Yxlon; Dosisleistung ~1,3 Gy/min bei 20 mA). Die aufgenommene Dosis wurde mit einem Duplex-Dosimeter (PTW) bestimmt.

### BEMER-Therapie

Die BEMER-Therapie (Bio-elektromagnetische Energieregulierung) beruht auf einem niederfrequenten gepulsten Magnetfeld [22,23], das jeweils für 8 min, 1 h oder 24 h angelegt wird. Die physikalischen Eigenschaften dieses Geräts werden in folgenden Patenten auseinandergesetzt: EP 0995463 A1, WO 2008025731 A1; WO 2011023634 A1 [31–33]. Das elektromagnetische Feld (EMF) mit einer Impulsdauer von 30 ms und einer Impulsfrequenz von 30 Hz wurde erzeugt mithilfe einer handelsüblichen Regeleinheit B.Box Classic (BEMER AG Int.; Abb. 1A) mit zehn verschiedenen Feldstärken (von 0 µT bis 35 µT) und Mattenapplikator (Abb. 1B) mit Flachspulensystem (Bio-Electromagnetic-Energy-Regulation, BEMER International AG, Triesen, Liechtenstein). Der Impulsgenerator benötigt eine Netzspannung von 230 V AC/50 Hz. Auf Grundlage dieser im Handel erhältlichen Konstruktion wurde der Mattenapplikator speziell zur Behandlung von Zellkulturen mit einer Höchstbetriebsspannung von 12 V DC entwickelt. Außerdem wurden auf Stufe 1 (~2,7 µT), Stufe 4 (~13 µT), Stufe 7 (~23 µT) und Stufe 10 (~35 µT) verschiedene Signalstärken verwendet. Das Signal besteht aus einer Abfolge von Einzelimpulsen mit einer Impulsdauer von ca. 33 Millisekunden und einer Amplitude von 3 bis 35 µT innerhalb eines voreingestellten Intervalls von 18 bis 22 Sekunden. Die bevorzugte Exponentialfunktion (s. EP 0995463 A1) ist  $y = (x^3 \cdot e^{\sin(x^3)}) : c$  (wobei y die Amplitude ist) [31]. Die Amplituden der Einzelimpulse entsprechen einer E-Funktion und werden in Impulsgruppen zusammengefasst. Wie in Abb. 1C dargestellt, wurden die BEMER-behandelten Zellen innerhalb des gekennzeichneten Bereichs oberhalb der Flachspule auf der Matte platziert und dann mit den angegebenen Signalstärken 8 min, 1 h oder 24 h lang stimuliert. Die BEMER-Therapie erfolgte bei 37 °C in einer befeuchteten Atmosphäre mit 8,5 % CO<sub>2</sub> (pH 7,4). Die Kontrollzellen erhielten eine Scheinbehandlung, indem sie für den entsprechenden Zeitraum auf den BEMER-Applikator gestellt wurden, jedoch kein BEMER-Signal erhielten. Die BEMER-Signalstärke wurde mithilfe eines 3D-Teslameters (PCE-G28, PCE, Deutschland) gemessen und bei jeder Behandlung an dieselbe Stelle auf dem BEMER-Applikator gestellt.

**Abb. 1. Das BEMER-Gerät und seine Funktion.** (A) Das elektromagnetische Feld (EMF) mit einer Impulsdauer von 30 ms und einer Impulsfrequenz von 30 Hz wurde mit einer im Handel erhältlichen Steuereinheit B.Box Classic (BEMER AG Int.) erzeugt, wobei 10 verschiedene Magnetfeldstärken (0 µT bis 35 µT) angelegt wurden. (B) Der Mattenapplikator mit Flachspulensystem, speziell für die Zellkultur entwickelt. (C) Messung mit dem Mattenapplikator und schematisch dargestellte Anordnung der Zellkulturplatten während der BEMER-Behandlung (rote Rechtecke).

doi:10.1371/journal.pone.0167931.g001

### Gewinnung von Proben für die ungezielte Metabolomanalyse

Zur Metabolomanalyse wurden A549-Zellen 24 h lang in 3D IrECM kultiviert und dann der BEMER-Therapie unterzogen (~13  $\mu$ T, 8 min; scheinbehandelte Zellen als Kontrolle). Nach 1 h wurden die Zellen in 200  $\mu$ l gekühltem 80 % MeOH mit 4 Extraktionsstandards geerntet, um die Effizienz der Extraktion zu messen. Die Extraktionslösung und das Zellmaterial wurden in ein 2-ml-Mikroröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Als nächstes wurden die Zellen mit 200  $\mu$ l Extraktionslösung gewaschen, die in dasselbe Mikroröhrchen pipettiert wurde. Die Proben wurden bis zur Analyse sofort bei -80 °C eingelagert.

### Ungezielte Metabolomanalyse

Die ungezielte Metabolomanalyse wurde am Genomanalysezentrum des Helmholtz-Zentrums in München durchgeführt. Vor der Analyse wurden alle Proben bei -80 °C eingelagert. Vor der Homogenisierung wurden 160 mg Glasperlen mit 0,5 mm Durchmesser (Precellys, Berlin, Deutschland) in die Röhrchen mit den Zellysaten gegeben, die zuvor in 80 % v/v methanolischer Extraktionslösung mit 4 Wiederherstellungsstandards aufgenommen worden waren. Die Lysate wurden zweimal 25 s lang bei 5.500 U/min mit einer Pause von 5 s homogenisiert. Die Homogenisierung erfolgte in einem Precellys 24 Homogenisierer (PEQLAB Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland) mit integrierter Kühlung zur Sicherstellung einer Temperatur von 4 °C. Im Anschluss wurden die Zellysate 5 min lang bei 11.000 x g und 4 °C zentrifugiert, und die transparenten Extraktionsüberstände wurden weiterverwendet. Die einzelnen Proben wurden durch Aufteilung in zwei Aliquots von je 105  $\mu$ l in 96-Loch-350- $\mu$ l-PCR-Platten überführt. Das erste Aliquot wurde für die LC-MS/MS-Analyse im positiven Elektrospray-Ionisationsmodus verwendet, das zweite Aliquot für die Analyse im Negativ-Modus.

Zusätzlich zu den experimentellen Proben wurden sämtliche Zellhomogenisate gepoolt und auf die 96-Loch-PCR-Platte verteilt (105  $\mu$ l pro Loch, 3 Löcher pro Ionisationsmodus). Außerdem wurden 100  $\mu$ l einer gepoolten menschlichen Referenz-Plasmaprobe (Seralab, West Sussex, Großbritannien) separat extrahiert, und das Extrakt wurde in die 96-Loch-PCR-Platte (1 Loch je Ionisationsmodus, 105  $\mu$ l je Loch) überführt. Als zusätzliche Kontrolle zur Hintergrundmessung und -normalisierung wurden reine IrECM-Proben nach dem oben beschriebenen Verfahren aufbereitet. Diese Proben dienten als Kontrollreplikate zur Bestimmung der Prozessvariabilität während der gesamten Studie. Neben der Referenz-Plasmaprobe wurden 100  $\mu$ l Wasser extrahiert, und das Extrakt wurde in eine 96-Loch-Platte (3 Löcher pro Ionisationsmodus, 105  $\mu$ l pro Loch) aliquotiert. Diese Proben dienten als Leerproben. Im Anschluss wurden die Proben in einem TurboVap 96 (Zymark, Sotax, Lörrach, Deutschland) getrocknet.

Vor der LC-MS/MS im positiven Ionisationsmodus wurden die Proben in 50  $\mu$ l 0,1 % Ameisensäure rekonstituiert. Die im negativen Ionisationsmodus analysierten Proben wurden in 50  $\mu$ l 6,5 mM Ammoniumbicarbonat (pH 8,0) rekonstituiert. Die Rekonstitutionslösungen für die beiden Ionisationsmodi enthielten interne Standards zur Kontrolle der Geräteleistung. Außerdem dienten sie als Retentionsmarker. Die LC-MS/MS-Analyse wurde mit einem linearen Ionenfallen-LTQ-XL-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich, Deutschland) in Verbindung mit einem Waters Acquity UPLC-System (Waters GmbH, Eschborn, Deutschland) durchgeführt. Es wurden je zwei separate Säulen (2,1 x 100 mm Waters BEH C18, Partikelgröße 1,7  $\mu$ m) für saure (Lösungsmittel A: 0,1 % Ameisensäure in Wasser, Lösungsmittel B: 0,1 % Ameisensäure in Methanol) und für basische (Lösungsmittel A: 6,5 mM Ammoniumbicarbonat (pH 8,0), Lösungsmittel B: 6,5 mM Ammoniumbicarbonat in 95 % Methanol) Mobilphasenbedingungen verwendet, die jeweils auf positive oder negative Elektrospray-Ionisation optimiert waren. Nach Injektion der Probenextrakte wurden die Säulen mit einem Gradienten von 99,5 % A bis 98 % B über eine Laufzeit von 11 min und bei einem Durchsatz von 0,35 ml/min eluiert. Das eluierte Material wurde direkt durch die Elektrospray-Ionisationsquelle des LTQ XL-Massenspektrometers geleitet. Der komplette MS-Scan wurde im Bereich von 80 bis 1.000 m/z durchgeführt, wobei mithilfe einer dynamischen Ausschlussmethode zur Erfassung einer noch größeren Bandbreite von Metaboliten zwischen MS- und MS/MS-Scans gewechselt wurde.

Die Metaboliten wurden durch Vergleich der LC-MS/MS-Daten mit der Substanzdatenbank der Firma Metabolon (Metabolon, Inc., Durham, NC, USA) auf Grundlage von Retentionsindex, Vorproduktmasse und MS/MS-Spektren annotiert. In der vorliegenden Arbeit wurden 315 Metaboliten, 240 bekannte Verbindungen (biologische Substanzen mit Namen) und 75 Verbindungen unbekannter Struktur (biologische Substanzen ohne Namen) identifiziert. Die unbekannten Substanzen sind jeweils durch ein X und eine Zahl gekennzeichnet. Die Metaboliten wurden auf Grundlage von PubChem, KEGG und der Human Metabolome Database zellulären Wegen zugeordnet.

### 3D-Koloniebildungsassay

Zur Bestimmung des klonogenen Zellüberlebens wurden 3D-Koloniebildungsassays nach einer veröffentlichten Methodik durchgeführt [28,34]. Dazu wurden die Zellen in 0,5 mg/ml 3D IrECM in 96-Loch-Platten

(BD) eingebettet. Nach 23 h wurden die Zellen der BEMER-Behandlung mit verschiedenen Signalstärken und -dauern unterzogen. Die Bestrahlung erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der BEMER-Behandlung. Bei der Mehrzahl der Experimente wurde die Strahlentherapie 1 h nach der BEMER-Behandlung verabreicht. Nach 8 bis 10 Tagen wurden die Zellkolonien (>50 Zellen) mikroskopisch ausgezählt. Repräsentative Kolonien wurden mit einer Axiovert 40 CFL (Zeiss, Jena, Deutschland) dokumentiert. Die einzelnen Punkte der Überlebenskurve stellen den Mittelwert der überlebenden Fraktionen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar.

### **3D-Mikrotumorassay**

Die 3D-Mikrotumoren wurden in 96-Loch-Platten (BD) aus einzelnen Zellen in 0,5 mg/ml 3D IrECM über einen Zeitraum von 3 Tagen gezüchtet. Nach 3 Tagen wurden die Zellen der BEMER-Behandlung mit verschiedenen Signalstärken und -dauern unterzogen. Die Bestrahlung erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach der BEMER-Behandlung. Nach 8 bis 10 Tagen wurden die Zellkolonien (>50 Zellen) mikroskopisch ausgezählt. Die einzelnen Punkte der Überlebenskurve stellen den Mittelwert der überlebenden Fraktionen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten dar.

### **Behandlung mit Cetuximab, Cisplatin und Gemcitabin**

24 h nach Aussaat wurden die Zellen mit Cetuximab (Erbix<sup>®</sup>, Merck, Darmstadt, Deutschland; 5 µg/ml; IgG als Kontrolle), Cisplatin (Teva, Ulm, Deutschland; 0,1 µM) oder Gemcitabin (Medac, Wedel, Deutschland; 10 nM) behandelt. Nach 23 h Inkubation wurden die Zellen der BEMER-Behandlung (~13 µT, 8 min) unterzogen und 1 h später wie beschrieben bestrahlt. Cetuximab wurde die gesamte Wachstumsperiode über im Zellkulturmedium belassen; die Cisplatin- und Gemcitabin-behandelten Zellen wurden 48 h nach der Behandlung mit Zellkulturmedium gewaschen.

### **Fokus-Test**

$4 \times 10^5$  Zellen pro Loch wurden 23 h lang in 3D IrECM kultiviert, der BEMER-Behandlung mit verschiedenen Signalstärken unterzogen (~13 µT bzw. ~35 µT; 8 min) und 1 h danach mit 6 Gy bestrahlt bzw. unbestrahlt belassen. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen mit PBS und Trypsin (PAA) isoliert, mit 3 % Formaldehyd/PBS (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert, mit 0,25 % Triton-X-100/PBS (Roth, Karlsruhe, Deutschland) permeabilisiert und mit spezifischen Antikörpern gegen γH2AX und 53BP1 angefärbt. Die Proben wurden auf einen mit Vectashield/DAPI-Eindeckmedium bedeckten Objektträger aufgebracht. γH2AX/53BP1-positive Fokuse wurden unter einem Axioscope 2 Plus-Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) ausgezählt und als Rest-DSB definiert [34]. Die Immunfluoreszenzaufnahmen wurden mit LSM 510 meta (Zeiss) dokumentiert.

### **ROS-Fänger-Analyse**

Es wurden drei verschiedene ROS-Fänger (Thermo Fisher Scientific (Darmstadt, Deutschland)), d. h. Natriumpyruvat (Wasserstoffradikale, 10 µM), MnTBAP (Superoxidanion) und Carboxy-PTIO (Stickoxid) und (beide 50 µM) eingesetzt (als Kontrolle diente vollständiges Zellkulturmedium), und die Klonogenität und DSB wurden in 3D-Zellkulturen untersucht. Die Zellen wurden 10 min. vor der BEMER-Therapie (~35 µT, 8 min) mit den Radikalfängern behandelt. Nach einer Stunde wurden die Zellen mit 6 Gy bestrahlt. Für den Fokus-Test wurden die Zellen 24 h nach Bestrahlung isoliert und fixiert; für CFA wurden die Zellen zelllinienabhängig über mehrere Tage kultiviert.

### **Auswertung der Daten**

Es wurde jeweils der Mittelwert ± Standardabweichung (SD) aus mindestens drei unabhängigen Experimenten unter Bezugnahme auf nicht behandelte (n. b.) Proben berechnet, die jeweils in Gesamtzahlen oder als 1,0 definiert wurden. Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde mit Microsoft<sup>®</sup> Excel 2003 ein t-Test nach Student durchgeführt. Ein P-Wert von unter 0,05 wurde als statistisch signifikant gewertet.

## Ergebnisse

### BEMER-Behandlung moduliert den Metabolismus von Krebszellen

Früheren Daten nach zu urteilen ist es wahrscheinlich, dass die EMF-Behandlung den Zellstoffwechsel beeinflusst [7,35]. Eine Analyse des Stoffwechsels von A549-Krebszellen mit dem BEMER-System zeigt, dass die Metaboliten verschiedener Stoffwechselwege (Abb. 2A) und insbesondere der Glykolyse und des Tricarbonsäurezyklus im Verhältnis zu unbehandelten Zellen signifikant verändert sind (Abb. 2B–2D). Die Konzentrationen von Pyruvat, Succinat, Aspartat und Adenosin-Diphosphat (ADP) waren nach der BEMER-Behandlung signifikant herunterreguliert, während Serin signifikant heraufreguliert war (Abb. 2B–2D). Diese Daten belegen, dass das spezifische niederfrequente gepulste BEMER-EMF-Muster Veränderungen in bestimmten Bereichen des Zellstoffwechsels induziert.

### BEMER-Behandlung beeinflusst nicht das basale Tumorzellüberleben, erhöht aber zeitabhängig die Strahlenempfindlichkeit der Tumorzellen

Als nächstes untersuchten wir das basale Tumorzellüberleben eines Panels von vier Zelllinien (A549, UTSCC15, Mia- PaCa, DLD1) nach der BEMER-Behandlung. Interessanterweise hatte die BEMER-Behandlung keinen Einfluss auf das basale Überleben der untersuchten Zelllinien (Abb. 3A und 3B). In Kombination mit Röntgenbestrahlung reagierten die in 3D IrECM wachsenden Zellkulturen nach achtminütiger BEMER-Behandlung mit einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit (Abb. 3C und 3D). Bei längeren Behandlungszeiten war die erhöhte Empfindlichkeit nicht mehr feststellbar (Abb. 3D).

Interessanterweise konnte das Potenzial einer Vorbehandlung mit dem BEMER-Signal zur Steigerung der Strahlenempfindlichkeit in den 3D-gezüchteten Mikrotumoren A549, UTSCC15, MiaPaCa und DLD1 im Verhältnis zu den scheinbehandelten Mikrotumoren zeitabhängig bestätigt werden (Abb. 4A und 4B). Eine BEMER-Vorbehandlung von 8 Minuten Dauer führte bei allen untersuchten Zelllinien zu einer erhöhten Strahlenempfindlichkeit, während sich längere Behandlungszeiten als weniger bis gar nicht wirksam erwiesen (Abb. 4C). Diese Befunde zeigen augenscheinlich, dass die zelluläre Strahlenempfindlichkeit menschlicher Krebszellen, die in einer physiologischen Umgebung kultiviert werden, durch das spezifische BEMER-EMF-Muster zeitabhängig erhöht werden kann.

### Das Ausmaß der BEMER-induzierte Strahlensensibilisierung hängt vom zeitlichen Abstand zwischen BEMER-Behandlung und Strahlentherapie und BEMER-EMF-Frequenz ab

Zur weiteren Charakterisierung der Sensibilisierungswirkung durch die BEMER-Vorbehandlung modulierten wir den zeitlichen Abstand zwischen BEMER- und Strahlenbehandlung (Abb. 5A). Dabei fanden wir, dass sich die überlebenden Fraktionen der mit 6 Gy bestrahlten Zellen je nach untersuchtem zeitlichen Abstand deutlich voneinander unterschieden (Abb. 5B). Mit länger werdendem zeitlichen Abstand zwischen BEMER-Behandlung und Strahlentherapie ließ der Sensibilisierungseffekt nach und verschwand bei 24 h vollständig (Abb. 5B).

Als Nächstes beschäftigten wir uns mit der Frage, ob die Frequenz der BEMER-Behandlung die Strahlenresistenz der Krebszellen beeinflusst (Abb. 5C und 5D). Generell wird empfohlen, die BEMER-Behandlung zweimal täglich im Abstand von 12 h durchzuführen [22,24]. Daher wurden die 3D-kultivierten Zellen entweder einmal mit dem BEMER-Signal (~13  $\mu$ T, 8 min) 1 h Stunde vor der Bestrahlung oder zweimal mit einem zeitlichen Abstand zwischen zwei BEMER-Behandlungen von 12 h, gefolgt von einer Bestrahlung nach 1 h behandelt (Abb. 5C). Nur die A549-Zellen zeigten nach ein- oder zweimaliger BEMER-Behandlung eine Strahlensensibilisierung (Abb. 5D). Bei den UTSCC15- und MiaPaCa2-Zellen führte nur die einmalige BEMER-Behandlung zu einer Strahlensensibilisierung (Abb. 5D).

**Abb. 2. Das spezifische BEMER-EMF-Muster beeinflusst den Stoffwechsel der Krebszellen.** (A) Tortendiagramm mit den identifizierten Metaboliten, geordnet nach Pfad (Z 225). (B) Wärmekartierung zum Vergleich der Konzentration an Metaboliten in A549-Zellen mit BEMER-Signal-Behandlung (~13  $\mu$ T, 8 min) und BEMER-Scheinbehandlung. Rot und blau bedeuten Herauf- bzw. Herunterregulierung. Die Zellen wurden 24 h vor der BEMER-Behandlung in 3D IrECM kultiviert. (C) Menge der angegebenen Metaboliten in A549-Zellen ohne (Schein-) und mit BEMER-EMF-Behandlung. (D) Schematische Darstellung Glykolyse und TCA-Zyklus. Die in blau dargestellten Metaboliten waren nach der BEMER-Behandlung im Vergleich zu den scheinbehandelten Kontrollen herunterreguliert, die in rot dargestellten heraufreguliert und die schwarz dargestellten unverändert. Die in grün dargestellten Metaboliten wurden im Rahmen der Metabolomanalyse nicht erfasst. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SA dargestellt. t-Test nach Student, n = 5. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01.

Wie in [Abb. 3D](#) ([Abb. 5D](#)) dargestellt, blieben die DLD1-Zellen gegen die BEMER-Behandlung resistent. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine einmalige BEMER-Behandlung mit kurz darauf folgender Strahlentherapie von allen im Rahmen dieser Studie getesteten Kombinationen hinsichtlich der Strahlensensibilisierung von Tumorzellen am wirksamsten ist.

**Abb. 3. BEMER-Behandlung vermittelt Strahlensensibilisierung bei Krebszellen.** (A) Phasenkontrastaufnahmen und (B) basale überlebende Fraktion von 3D-kultivierten BEMER-behandelten ( $\sim 13 \mu\text{T}$ , 8 min, 1 h, 24 h) und BEMER-scheinbehandelten Krebszelllinien. (C) Flussdiagramm d. Koloniebildungsassays. (D) Klonogenes Zellüberleben nach BEMER-Behandlung ( $\sim 13 \mu\text{T}$ , 8 min, 1 h, 24 h) in Kombination mit Strahlentherapie (2 u. 6 Gy). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SA dargestellt. t-Test nach Student.  $n = 3$ . \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

doi:10.1371/journal.pone.0167931.g003

### BEMER-Behandlung hat keine zusätzliche Wirkung auf die Radiochemosensibilität

Da es sich bei der Strahlenchemotherapie um die Standardversorgung für die im Rahmen dieser Arbeit getesteten Tumorarten handelt, untersuchten wir das klonogene Überleben nach der entsprechenden Strahlenchemotherapie ([Abb. 6](#) und [7](#)). Gemäß den Behandlungsplänen ([Abb. 6A](#) und [7A](#)) wurden die Chemotherapeutika Cisplatin und Gemcitabin bzw. der gegen den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gerichtete Antikörper Cetuximab geprüft. Cisplatin und Gemcitabin führten entweder allein oder in Kombination mit der BEMER-Behandlung bei allen untersuchten Zelllinien zu einem signifikant herabgesetzten klonogenen Zellüberleben ([Abb. 6B und 6C](#)). Eine Cetuximab-Behandlung mit oder ohne BEMER-Behandlung führte zu einem reduzierten basalen Überleben bei UTSCC15-Zellen, nicht jedoch bei A549-, MiaPaCa2 und DLD1-Zellen ([Abb. 6D](#)).

Die Kombination von Cisplatin, Strahlentherapie und BEMER-Behandlung war hinsichtlich des klonogenen Überlebens der A549- und UTSCC15-Zellen genauso toxisch wie die Kombination Cisplatin/Strahlentherapie ([Abb. 7B](#)). Bei den MiaPaCa2-Zellen zeigte die Kombination Gemcitabin/Strahlentherapie keinerlei Wirkung auf das Zellüberleben, während die Kombination Gemcitabin/Strahlentherapie/BEMER zu einem signifikant herabgesetzten Überleben im Vergleich zu den BEMER-scheinbehandelten bestrahlten Kontrollen führte ([Abb. 7C](#)). Cetuximab plus Strahlentherapie führte bei A549 und MiaPaCa2 zu einem signifikant erniedrigten klonogenen Überleben, wobei sich der Effekt durch Anwendung von BEMER nicht weiter steigern ließ ([Abb. 7D](#)). Bei UTSCC15 und DLD1 wurde das klonogene Zellüberleben weder durch Cetuximab plus Strahlentherapie allein noch in Kombination mit BEMER-Behandlung beeinflusst ([Abb. 7D](#)). Damit führte die Kombination von BEMER-Behandlung und Strahlenchemotherapie insgesamt zu keiner gesteigerten Sensibilität der Krebszellen.

**Abb. 4. BEMER-Behandlung erhöht Strahlenempfindlichkeit von Mikrotumoren.** (A) Flussdiagramm d. Koloniebildungsassays. (B) Basale überlebende Fraktion von Mikrotumoren mit BEMER-Behandlung ( $\sim 13 \mu\text{T}$ , 8 min, 1 h, 24 h) und BEMER-Scheinbehandlung. (C) Klonogenes Überleben nach BEMER-Behandlung ( $\sim 13 \mu\text{T}$ , 8 min, 1 h, 24 h) in Kombination mit Strahlentherapie (2 u. 6 Gy). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SA dargestellt. Der t-Test nach Student vergleicht die BEMER-Behandlung mit den scheinbehandelten Proben gegenüber.  $n = 3$ . \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

doi:10.1371/journal.pone.0167931.g004

### BEMER-Behandlung erniedrigt Strahlenresistenz und induziert DSB-Ereignisse in Abhängigkeit von der BEMER-Signalstärke

Zur Beantwortung der Frage, ob die sensibilisierende Wirkung der BEMER-Behandlung mit erhöhter Signalstärke und vermehrten strahleninduzierten DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB) in Verbindung steht, applizierten wir das BEMER-Signal in unterschiedlicher Stärke (zw. 2,7 und  $35 \mu\text{T}$ ) 1 h nach der Röntgenbestrahlung mit 6 Gy ([Abb. 8A](#)). Bei A549, UTSCC15 und MiaPaCa2, nicht aber bei DLD1 induzierte die BEMER-Behandlung im Vergleich zu den BEMER-scheinbehandelten bestrahlten Kontrollen eine signalstärkeabhängige Strahlensensibilisierung ([Abb. 8B](#)). Entsprechend zeigten sich bei den BEMER-EMF-behandelten A549- und UTSCC15-Zellen signalstärkeabhängig signifikant erhöhte DSB-Zahlen ([Abb. 8C und 8D](#)). Diese Ergebnisse deuten auf eine Verbindung zwischen der durch die BEMER-Behandlung vermittelten Strahlensensibilisierung und der DSB-Induktion hin.

**Abb. 5. Durch BEMER-Behandlung vermittelte Strahlensensibilisierung hängt von Behandlungsintervall und -frequenz ab.** (A) Flussdiagramm d. Koloniebildungsassays. (B) Klonogenes Überleben nach BEMER-Behandlung ( $\sim 13 \mu\text{T}$ , 8 min) in Kombination mit Bestrahlung (6 Gy) der angegebenen Zelllinien. BEMER-scheinbehandelte und bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Zwischen BEMER-Behandlung und Strahlentherapie wurden Zeitintervalle von 0, 1, 6 und 24 h eingehalten. (C) Flussdiagramm d. Koloniebildungsassays.

(D) Klonogenes Überleben nach einmaliger oder zweimaliger BEMER-Behandlung ( $\sim 13 \mu\text{T}$ , 8 min) in Kombination mit Bestrahlung (6 Gy) der angegebenen Zelllinien (BEMER-scheinbehandelte bestrahlten Zellen dienten als Kontrolle). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SA dargestellt. t-Test nach Student,  $n = 3$ . \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ . n. s., nicht signifikant.

doi:10.1371/journal.pone.0167931.g005

### **BEMER-Behandlung führt zu verstärkter ROS-Bildung und damit zu erhöhter Strahlenempfindlichkeit durch vermehrte DSB**

Da ROS als grundlegende regulierende Elemente verschiedener metabolischer Prozesse fungieren und außerdem die DNA schädigen können, experimentierten wir mit verschiedenen ROS-Fängern (Natriumpyruvat, MnTBAP, Carboxy-PTIO), die im Vorfeld der BEMER-Behandlung verabreicht wurden ([Abb. 9A](#)). Während Natriumpyruvat den Effekt der BEMER-Behandlung auf UTSCC15-, nicht aber auf A549-Zellen unterdrückte ([Abb. 9B](#)), hoben die ROS-Fänger MnTBAP und Carboxy-PTIO die BEMER-vermittelte Strahlensensibilisierung bei beiden Zelllinien auf, was ein ähnliches klonogenes Überleben wie bei den BEMER-scheinbehandelten bestrahlten Kontrollen zur Folge hatte ([Abb. 9B](#)).

**Abb. 6. Sensibilität gegenüber Chemotherapie und Cetuximab wird durch BEMER-Behandlung nicht beeinflusst.** (A) Flussdiagramm d. Koloniebildungsassays. Die Zellen wurden in 3D IrECM ausplattiert, mit den jeweiligen Wirkstoffen behandelt und 23 h später einer BEMER-Behandlung unterzogen. (B) Basale überlebende Fraktion nach Behandlung mit Cisplatin ( $0,1 \mu\text{M}$ ; DMEM als Kontrolle) bzw. BEMER ( $\sim 13 \mu\text{T}$ , 8 min). (C) Basale überlebende Fraktion nach Behandlung mit Gemcitabin ( $10 \text{ nM}$ ; DMEM als Kontrolle) und BEMER ( $\sim 13 \mu\text{T}$ , 8 min). BEMER-scheinbehandelte Zellen fungierten als Kontrolle. (D) Basale überlebende Fraktion nach Behandlung mit Cetuximab ( $5 \mu\text{g/ml}$ ; IgG als Kontrolle) und BEMER ( $\sim 13 \mu\text{T}$ , 8 min). IgG-behandelte Zellen fungierten als Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SA dargestellt. t-Test nach Student,  $n = 3$ . \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ . n. s., nicht signifikant.

doi:10.1371/journal.pone.0167931.g006

Im nächsten Schritt untersuchten wir die Wirkung einer Vorbehandlung mit MnTBAP und Carboxy-PTIO auf die durch BEMER-Behandlung und Bestrahlung induzierten DSB. Hier zeigte sich, dass beide ROS-Fänger die DSB auf ein ähnliches Niveau wie bei den Kontrollen herabsetzten ([Abb. 9C](#)). Dieser Befund deutet darauf hin, dass die von der BEMER-Behandlung vermittelte Strahlensensibilisierung durch erhöhte ROS-Konzentrationen und damit einhergehend der Entstehung von DSB bedingt ist.

## **Diskussion**

Verschiedene Studien haben den Einfluss der EMF-Behandlung auf eine Reihe von Tumorzellfunktionen herausgearbeitet, die sich günstig auf Therapieansprechen und Tumorstadium auswirken. Vor diesem Hintergrund stellten wir die Hypothese auf, dass die BEMER-Behandlung das Potenzial hat, die Chemo- und Strahlenempfindlichkeit von Tumorzellen zu verstärken. In der vorliegenden Studie beweisen wir, dass eine Vorbehandlung mit dem spezifischen niederfrequenten gepulsten EMF-Muster des BEMER-Systems im Vergleich zu einer bloßen Strahlentherapie auf Krebszellen strahlensensibilisierend wirkt.

Mechanistisch wird dieser Effekt durch erhöhte ROS-Konzentrationen bewirkt, die eine zentrale Rolle bei der Erzeugung von DSB spielen.

Bei der Sichtung der Literatur auf Wirkungen der EMF-Therapie auf Tumorzellen muss man sich allerdings vor Augen halten, dass bei den EMF-Geräten und Behandlungsmodalitäten erhebliche Unterschiede bestehen. Es ist äußerst unwahrscheinlich, dass unterschiedliche EMF-Signal-Impulsdauern, -stärken, -amplituden und -frequenzen das Zellverhalten und den Grad der untersuchten Effekte differenziell beeinflussen. Der Einsatz des BEMER-Systems hatte einen eindeutigen Vorteil, da bereits dokumentierte Beobachtungen hinsichtlich einer verbesserter Durchblutung, Vasomotion und Mikrozirkulation vorlagen [[22,23](#)]. Das BEMER-EMF-Muster wurde im Zusammenspiel mit herkömmlichen Krebstherapien getestet, um dessen therapiesensibilisierendes Potenzial in Erfahrung zu bringen.

**Abb. 7. Durch BEMER-Behandlung vermittelte Strahlensensibilisierung wird durch Chemotherapie und Cetuximab nicht beeinflusst.** (A) Flussdiagramm d. Koloniebildungsassays. (B) Klonogenes Überleben nach Bestrahlung (6 Gy) in Kombination mit BEMER- ( $\sim 13 \mu\text{T}$ , 8 min) und Cisplatin-Behandlung ( $0,1 \mu\text{M}$ ; DMEM als Kontrolle). (C) Klonogenes Überleben nach Bestrahlung (6 Gy) in Kombination mit BEMER- ( $\sim 13 \mu\text{T}$ , 8 min) und Gemcitabin-Behandlung ( $10 \text{ nM}$ ; DMEM als Kontrolle). Scheinbehandelte bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. (D) Klonogenes Überleben nach Bestrahlung (6 Gy) in Kombination mit BEMER- ( $\sim 13 \mu\text{T}$ , 8 min) und Cetuximab-Behandlung ( $5 \mu\text{g/ml}$ ; IgG als Kontrolle). IgG-behandelte bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SA dargestellt. t-Test nach Student,  $n = 3$ . \*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ . n. s., nicht signifikant.

doi:10.1371/journal.pone.0167931.g007

Wir führten zunächst eine weitgefassete Metabolomanalyse durch, da die EMF-Behandlung der Literatur zu-

folge physiologische und metabolische Abläufe beeinflusst [7,35,36]. Krebszellen haben einen entgleisten Metabolismus und erzeugen ihre Energie hauptsächlich durch Glykolyse [37,38]. Interessanterweise entdeckten wir, dass die Konzentration der Metaboliten der Glykolyse wie auch des TCA-Zyklus nach BEMER-Behandlung erniedrigt war. Die Identifizierung dieser Veränderungen ist in vitro nur schwer zu bewerkstelligen. Dennoch war es von größter Wichtigkeit, zu zeigen, dass die BEMER-Behandlung weder Krebszellen zur Proliferation anregt noch das Überleben einzelner Zellen oder auch Mikrotumoren verbessert.

Faszinierenderweise fanden wir, dass Zellen aus Lunge, Kopf und Hals sowie Pankreas durch BEMER-EMF-Behandlung strahlensensibilisiert werden. Da ca. 60 % aller Krebspatienten eine Strahlentherapie allein oder im Rahmen einer Strahlenchemotherapie erhalten, liefert dieser Befund eine erste Grundlage zur Beschreibung des therapeutischen Potenzials der Anwendung der BEMER-Therapie bei Krebspatienten kurz vor der Strahlentherapie.

**Abb. 8. Strahlensensibilisierung und DSB-Ereignisse hängen von der Intensität des BEMER-Signals ab.** (A) Flussdiagramm des Koloniebildungsassays und Fokustests. (B) Klonogenes Überleben von A549- und UTSCC15-Zellen nach Bestrahlung (6 Gy) in Kombination mit BEMER-Behandlung (2,7-35  $\mu$ T; 8 min). (C) Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen Kerne mit  $\gamma$ H2AX/53BP1-positiven Fokussen von A549-Zellen nach 6-Gy-Bestrahlung mit (~13 oder ~35  $\mu$ T; 8 min) und ohne BEMER-Behandlung. (D) Anzahl der  $\gamma$ H2AX/53BP1-positiven DSB in A549- und UTSCC15-Zellen 24 h nach Bestrahlung. BEMER-scheinbehandelte bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SA dargestellt. t-Test nach Student, n = 3. \* P < 0,05; \*\* P < 0,01.

doi:10.1371/journal.pone.0167931.g008

Im Rahmen der für in-vivo-Wachstumsbedingungen intensiv validierten besonders physiologienahen Zellkulturmodelle [34,39] weisen unsere Ergebnisse auf einen differenziellen Einfluss der BEMER-EMF-Behandlung in verschiedenen Tumorarten hin. Warum kolorektale Krebszellen sich gegen die BEMER-Behandlung als resistent erwiesen, verdient unter Berücksichtigung der Tatsache, dass nur eine Zelllinie untersucht wurde, nähere Beschäftigung. Ferner fanden wir, dass die BEMER-induzierte Strahlensensibilisierung (i) von der Behandlungsdauer, (ii) vom Zeitintervall zwischen BEMER-Behandlung und Strahlentherapie sowie (iii) von der EMF-Signalstärke abhängt. Obwohl hinsichtlich einer klinischen Anwendung hochgradig spekulativ, wird deutlich, dass die BEMER-Behandlung insbesondere dann strahlensensibilisierend wirkt, wenn sie 1 h vor der Strahlentherapie mit einer gewissen Intensität verabreicht wird.

Hinsichtlich des Potenzials der BEMER-Behandlung in Zusammenhang mit einer Chemo- oder Strahlenchemotherapie beobachteten wir keine Veränderungen des klonogenen Überlebens der Krebszellen nach Chemotherapie allein oder nach Strahlenchemotherapie. Dieser Befund weist stark darauf hin, dass die Chemotherapie ihre zytotoxische Wirkung durch molekulare Mechanismen entfaltet, die anders als Röntgenstrahlung in keinem Zusammenhang mit den BEMER-induzierten Veränderungen der Zellphysiologie stehen. Dies könnte aber auch unserem Behandlungsplan mit einer medikamentösen Vorbehandlung 23 h vor Applikation des BEMER-Signals geschuldet sein. Ruiz-Gómez et al. wiesen nach, dass die EMF-Therapie noch effizienter ist, wenn die Zellen gleichzeitig mit EMF und Zytostatika behandelt werden [40]. Bei unseren Versuchen führte die Verabreichung von Cisplatin zusätzlich zur BEMER-/Strahlentherapie zu einem Verlust der strahlensensibilisierenden Wirkung der BEMER-Behandlung. Die Diskussion dieser Beobachtungen vor einem klinischen Hintergrund ist sehr problematisch und spekulativ. In-vivo-Studien zum Einsatz klinischer Strahlentherapien sind dringend erforderlich, um das translationale Potenzial der BEMER-EMF-Behandlung für die Krebspatienten auszuloten.

**Abb. 9. BEMER-Behandlung induziert verstärkte Bildung von ROS und damit einhergehend vermehrte DSB.** (A) Flussdiagramm des Koloniebildungsassays und Fokustests. (B) Überlebende Fraktion der angegebenen Zelllinien nach Behandlung mit Natriumpyruvat (10  $\mu$ M), MnTBAP (50  $\mu$ M) oder Carboxy-PTIO (50  $\mu$ M) in Kombination mit BEMER- und Strahlentherapie. (C) Anzahl der  $\gamma$ H2AX/53BP1-positiven DSB in A549- und UTSCC15-Zellen 24 h nach Bestrahlung. Die Zellen wurden mit den angegebenen Radikalfängern und BEMER-Therapie behandelt. BEMER-scheinbehandelte bestrahlte Zellen dienten als Kontrolle. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SA dargestellt. t-Test nach Student, n = 3. \*\* P < 0,01. n. s., nicht signifikant.

doi:10.1371/journal.pone.0167931.g009

Um den kontextuell mit der BEMER-Behandlung verbundenen bestrahlungsvermittelten Mechanismen weiter nachzugehen, bestimmten wir die ROS-Konzentrationen und DSB als die tödlichsten durch Röntgenstrahlung induzierten DNA-Schäden [41]. Interessanterweise führte der Einsatz von Superoxidation- (MnTBAP) und Stickoxid-Fängern (Carboxy-PTIO) zur Aufhebung der BEMER-vermittelten Strahlensensibilisierung, was stark darauf hindeutet, dass das spezifische BEMER-EMF-Muster zu einer deutlichen Steigerung der ROS-Bildung durch noch unbekannte Mechanismen führt. Ungeachtet der Tatsache, dass unsere Beobachtungen mit anderen Krebsforschungsstudien konform gehen, denen zufolge die EMF-Behandlung

über die Bildung freier Radikale indirekt zu DNA-Strangbrüchen führt [5,42,43], ist die Induktion von DNA-Schäden durch EMF Gegenstand kontroverser Diskussionen. Andere Arbeiten dokumentieren Veränderungen des Redoxzustands sowie vermehrte DNA-Schäden in EMF-behandelten Neuroblastom- [44] oder Leukämiezellen [45,46]. Mechanistisch betrachtet verminderte die EMF-Therapie die Aktivität antioxidativer Enzyme, erhöhte die Konzentration von Stickstoffzwischenprodukten in Leukämiezellen [45] und führte zu einer verstärkten Bildung von ROS in Neuroblastomzellen [46]. Kim et al. veröffentlichten eine Studie zur repetitiven EMF-Behandlung von Zervixkarzinomzellen und normalen Lungenfibroblasten, wobei es zu einer verstärkten Phosphorylierung von  $\gamma$ H2AX kam, die ein Beleg für DSB ist [47]. Damit übereinstimmend fanden Winkler et al. nach EMF-Behandlung vermehrt chromosomale Aberrationen und Mikronuklei [48]. Diese Untersuchungen stützen unsere Auffassung, dass die BEMER-Behandlung die Bildung von ROS ankurbelt, die sich nach Bestrahlung in vermehrten DSB äußert, die schließlich als Strahlensensibilisierung in Erscheinung treten.

Zusammenfassend deuten unsere Daten darauf hin, dass die BEMER-Behandlung Krebszellen ROS-vermittelt und intensitätsabhängig für Bestrahlung sensibilisiert. Weitere Studien an nach Standardschema strahlentherapierten tierischen Tumormodellen sind notwendig, um der Frage eines ausgewogenen und sicheren Einsatzes sowie der Übertragbarkeit der Forschungsergebnisse in die Klinik zu nachzugehen.

## **Danksagung**

Diese Forschung und die Autoren wurden zum Teil von der BEMER Int. AG (Liechtenstein) und mit Fördermitteln der Deutschen Krebshilfe (108976 an N.C.), der Europäischen Union (RADIATE; GA Nr. 642623 an N.C.) und dem Europäischen Fonds für regionale Entwicklung, Europa für Sachsen (EFRE) (100066308) unterstützt. Diese Arbeit wurde ferner durch Mittel des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) an das Deutsche Zentrum für Diabetesforschung (DZD e.V.) gefördert. Wir danken R. Grenman für die freundliche Zurverfügungstellung der UTSCC15-Zelllinie.

## **Beiträge der einzelnen Autoren**

Konzeption: NC.

Datenpflege: KS ED AA.

Formelle Analyse KS ED AA.

Beschaffung von Fördermitteln NC.

Recherche: KS ED AA.

Methodik: KS ED AA NC.

Projektmanagement: NC.

Ressourcen: JA.

Leitung: JA NC.

Validierung: KS ED AA.

Visualisierung: KS ED NC.

Autorenschaft – Originalmanuskript KS ED NC.

Autorenschaft – kritische Durchsicht und Bearbeitung: KS ED AA JA NC.