

## **Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben:**

**„Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder der  
Mobilfunkkommunikation auf Sinnesorgane.  
B. Das visuelle System.“**

Im Auftrag des Bundesamts für Strahlenschutz

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

Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg  
Fakultät V, Mathematik und Naturwissenschaften  
Institut für Biologie und Umweltwissenschaften  
D-26111 – Oldenburg

Autor: Apl. Prof. Dr. Josef Ammermüller  
e-mail: josef.ammermueller@uni-oldenburg.de  
Tel: 0441-7983420  
Fax: 0441-7983423

**September 2007**

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Zusammenfassung/Abstract</b>	<b>3</b>
<b>1</b>	<b>Zielsetzungen des Forschungsprojektes</b>	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Experimentelle Methoden</b>	<b>7</b>
2.1	Expositionseinrichtung	7
2.2	Präparation	8
2.3	Lichtstimulation und Befeldung	8
2.4	Temperaturregulation	9
2.5	Elektrophysiologische Ableitung	10
2.6	Aufbereitung der Rohdaten	10
2.7	Statistische Analyse	13
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>15</b>
3.1	Literaturstudie	15
3.2	<b>Experimente GSM 900 MHz</b>	<b>15</b>
3.2.1	Temperaturkonstanz GSM 900 MHz	16
3.2.2	Vergleich der Antwortparameter	17
3.3	<b>Experimente GSM 1800 MHz</b>	<b>20</b>
3.3.1	Temperaturkonstanz GSM 1800 MHz	20
3.3.2	Vergleich der Antwortparameter	21
3.4	<b>Experimente UMTS</b>	<b>24</b>
3.4.1	Temperaturkonstanz UMTS	24
3.4.2	Vergleich der Antwortparameter	25
3.4.3	Vergleich der Scheinbefeldungen	28
<b>4</b>	<b>Statistische Auswertung mit GLMM</b>	<b>30</b>
4.1	Experimente GSM 900 MHz	30
4.2	Experimente GSM 1800 MHz	32
4.3	Experimente UMTS	33
4.4	GLMM Gesamtauswertung	35
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>36</b>
<b>6</b>	<b>Literatur</b>	<b>40</b>
	<b>Anhang</b>	
1	Literaturstudie	
2	Aufbau einer Expositionseinrichtung	
3	Statistische Tabellen multipler Mittelwertvergleich	

## Zusammenfassung

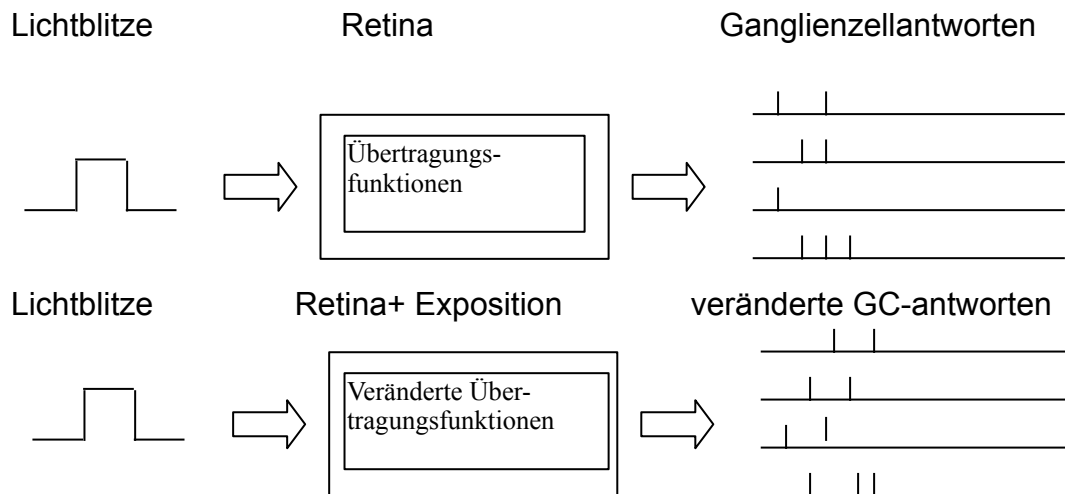
In der vorliegenden, doppelt verblindeten Studie wurde der Einfluss hochfrequenter elektromagnetischer Felder (HF-EMF) auf die neuronale Aktivität retinaler Ganglienzellen in der isolierten Mausretina untersucht. Die Befeldung wurde in geeichten Hohlraumresonatoren durchgeführt. Die Feldverteilung im Resonator und der Retina wurde mit der Methode der Finiten Differenzen im Zeitbereich (FTTD) berechnet. Die Simulationen wurden durch ein dosimetrisches Messsystem (DASY4) empirisch überprüft. Frequenzen und Modulationen der HF-EMF wurden entsprechend der Mobilfunkstandards nach GSM 900 MHz, GSM 1800 MHz und UMTS Standard gewählt. Die berechneten spezifischen Absorptionsraten (SAR) innerhalb der Retina betragen 0,02 W/kg, 0,2 W/kg, 2 W/kg sowie 20 W/kg. Scheinbefeldung (0 W/kg) diente als Kontrolle. Die Retinae wurden in einem Präparatehalter innerhalb des Hohlleiters platziert, wo sie von temperierter Ringerlösung umspült wurden. Um Temperatureffekte bei Befeldung zu minimieren wurde die Temperatur der Ringerlösung kontinuierlich gemessen und geregelt. Lichtantworten retinaler Ganglienzellen bestehen aus Folgen von Aktionspotentialen, die extrazellulär mit Glasmikroelektroden gemessen wurden. Die extrazellulär abgeleiteten Aktionspotentiale wurden verstärkt, gefiltert und für die Analyse gespeichert. Lichtantworten wurden durch Reizung der Retina mit Lichtblitzen zunehmender Intensität erzeugt, welche den dynamischen Bereich der Antwort - Intensitäts Kennlinien der Ganglienzellen überdeckten. In jedem Experiment wurde jeweils vor, während und nach Befeldung gereizt und die entsprechenden Lichtantworten abgeleitet. Als abhängige Parameter dienten die gemessenen Raten und Latenzen der Lichtantworten der Ganglienzellen auf die Reizung mit diesen unterschiedlichen, definierten Lichtintensitäten, sowohl bei Licht-AN als auch bei Licht-AUS. Mindestens 25 auf Licht-AN und 25 auf Licht-Aus reagierende Ganglienzellen wurden jeweils pro Befeldungsbedingung gemessen (jeder SAR Wert für jede Frequenz). Veränderungen der Lichtantworten wurden durch die Berechnung der Quotienten beziehungsweise Differenzen der Raten und Latenzen während und nach Befeldung relativ zu den Werten vor Befeldung bestimmt. Diese Quotienten und Differenzen wurden statistisch mit einem „General linear mixed model“ auf signifikante Haupteffekte und Zwei-Wege Interaktionen getestet. Die stärksten Haupteffekte auf Veränderungen der Antwortraten und Latenzen wurden durch die Lichtintensität, die Messreihenfolge und die Temperatur verursacht. Der SAR Wert spielte, wenn überhaupt, als Haupteffekt eine untergeordnete Rolle. Ein fast durchgehend gefundener, signifikanter Effekt der Interaktion SAR \* Intensität könnte auf einem schwachen indirekten, mit Befeldung korrelierenden Temperatureffekt beruhen, der trotz Temperaturregulation noch vorhanden war.

## **Abstract**

In this double-blind study the effect of high-frequency, electromagnetic fields (HF-EMF) onto the neuronal activity of retinal ganglion cells was studied in the isolated mouse retina. HF-EMF exposure of the retinae was performed in calibrated waveguide resonators. HF-Field distribution inside the waveguides was calculated based on finite-difference time-domain (FDTD) analysis. Simulations were empirically validated using a dosimetric assessment system (DASY4). Frequencies and modulations of HF-EMF according to GSM 900 MHz, GSM 1800 MHz, and UMTS mobile phone standards were chosen. Calculated specific absorption rates (SAR) were 0.02 W/kg, 0.2 W/kg, 2 W/kg, and 20 W/kg inside the retina. Sham exposure (0 W/kg) served as control. Retinae were placed in a preparation holder inside the waveguide where they were superfused with heated Ringer solution. In order to minimize temperature effects during exposure the temperature of the Ringer solution was continuously measured and regulated. Light responses of retinal ganglion cells consist of series of action potentials (spikes), which were recorded extracellularly with glass microelectrodes. These extracellularly recorded spikes were amplified, filtered and sampled for analysis. Light responses were elicited by stimulating the retina with light flashes of increasing intensity, covering the dynamic range of the response - intensity curves of ganglion cells. In each experiment stimulation and recording was done before, during and after HF-EMF exposure, respectively. Measured dependent parameters of the light responses were the spike rates and latencies of the ganglion cell responses to these various, defined light intensities, both at light-ON and light OFF. At least 25 ON and 25 OFF responding ganglion cells were measured for each exposure condition (each frequency and SAR value), respectively. Changes in the light responses were determined by calculating the ratios and differences of the responses during and after exposure relative to the responses before exposure. These ratios and differences were tested for main effects and two-way interactions with general linear mixed model statistics. The most significant main effects on changes of ratios or differences resulted from light intensity, measurement sequence, and temperature. If any, SAR values played a minor role. A consistent interaction SAR\* intensity could tentatively be explained by weak, indirect temperature effects that still existed although temperature was regulated, and which correlate with exposure level.

# 1 Zielsetzungen des Forschungsprojektes

Für die vorliegende Zielsetzung der Untersuchung des Einflusses hochfrequenter elektromagnetischer Felder (HF-EMF) der Mobilfunkkommunikation auf Sinnesorgane stellt die Retina ein ausgezeichnetes Testsystem dar. Sie bildet ein neuronales Übertragungssystem, welches ein physikalisches Eingangssignal (Lichtreize) in ein neuronales Ausgangssignal (elektrische Aktivität der retinalen Ganglienzellen) umwandelt (Abb. 1). Wie jedes System ist auch die Retina durch eine oder mehrere raum-zeitliche Übertragungsfunktion(en) gekennzeichnet. Diese Übertragungsfunktionen ergeben sich aus der neuronalen Verarbeitung innerhalb der Retina – also aus den Aktivitäten der Sehzellen und der weiteren Signalverarbeitung in den nachgeschalteten Interneuronen. Ändert sich die neuronale Verarbeitung dann ändern sich auch die Übertragungsfunktionen und somit das Ausgangssignal bzw. die Ausgangsaktivität der Ganglienzellen. Somit ist jede signifikante Veränderung in der neuronalen Verarbeitung im Ausgangssignal detektierbar, unabhängig davon, wo diese Änderung in der Retina stattfindet.



**Abb.1:** Versuchsparadigma

Aus der normalen physiologischen Funktionsweise der Retina wissen wir dass die Ausgangsaktivität sehr sensitiv sowohl auf Änderungen des Transduktionsprozesses in den Photorezeptoren (Latenzen und Sensitivität der Antworten) als auch auf Änderungen der synaptischen Übertragungsmechanismen (Antwortrate und zeitliche Antwortstruktur) reagiert (Rodieck, 1998). Dabei kommen in der Retina sowohl Änderungen an chemischen als auch an elektrischen Synapsen (gap junctions) in Frage.

Aus den spärlichen Hinweisen aus der Literatur auf nicht-thermische neuronale Effekte von HF-EMF kann man über drei mögliche Mechanismen spekulieren: Effekte auf die Fluidität der Photorezeptormembran, Effekte auf Connexine und eventuell Effekte auf die chemische synaptische Übertragung durch Änderung von Calciumströmen (siehe Literaturstudie).

In der vorliegenden Studie wird dabei a priori keine spezifische Annahme über einen eventuellen Wirkungsmechanismus vorausgesetzt. In den verschiedenen

Experimenten können alle Hauptantworttypen der Ganglienzellen (ON und OFF Ganglienzellen) erfasst werden, die jeweils am Ende verschiedener Übertragungswege stehen und unterschiedliche Übertragungsfunktionen besitzen (Völgyi et al., 2004). Somit ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, alle möglichen durch Exposition hervorgerufenen Veränderungen zu detektieren, auch wenn diese nur in einem einzelnen Übertragungsweg stattfinden sollten (z.B. Veränderungen an den gap-junctions welche das Stäbchensignal über elektrische Synapsen exklusiv in den ON-pathway einspeisen).

Nicht unerwähnt bleiben sollte, dass die Retina auch als Modellsystem für das Zentralnervensystem dienen kann. Aufgrund der Entwicklung aus Ausstülpungen des Zwischenhirns ist die Retina im Unterschied zu sämtlichen anderen Sinnesorganen als Teil des Gehirns zu betrachten. Obwohl die Retina natürlich auf die Verarbeitung von visuellen Signalen spezialisiert ist, entsprechen die verschiedenen Zelltypen, synaptischen Verschaltungen und Neurotransmitter prinzipiell denen im Zentralnervensystem (Dowling, 1987). Im weiteren Sinne, und mit entsprechender Vorsicht können deswegen Ergebnisse aus der Retina prinzipiell auch auf das Zentralnervensystem übertragen werden.

Die speziellen Zielsetzungen des Forschungsvorhabens bestehen aus folgenden Punkten:

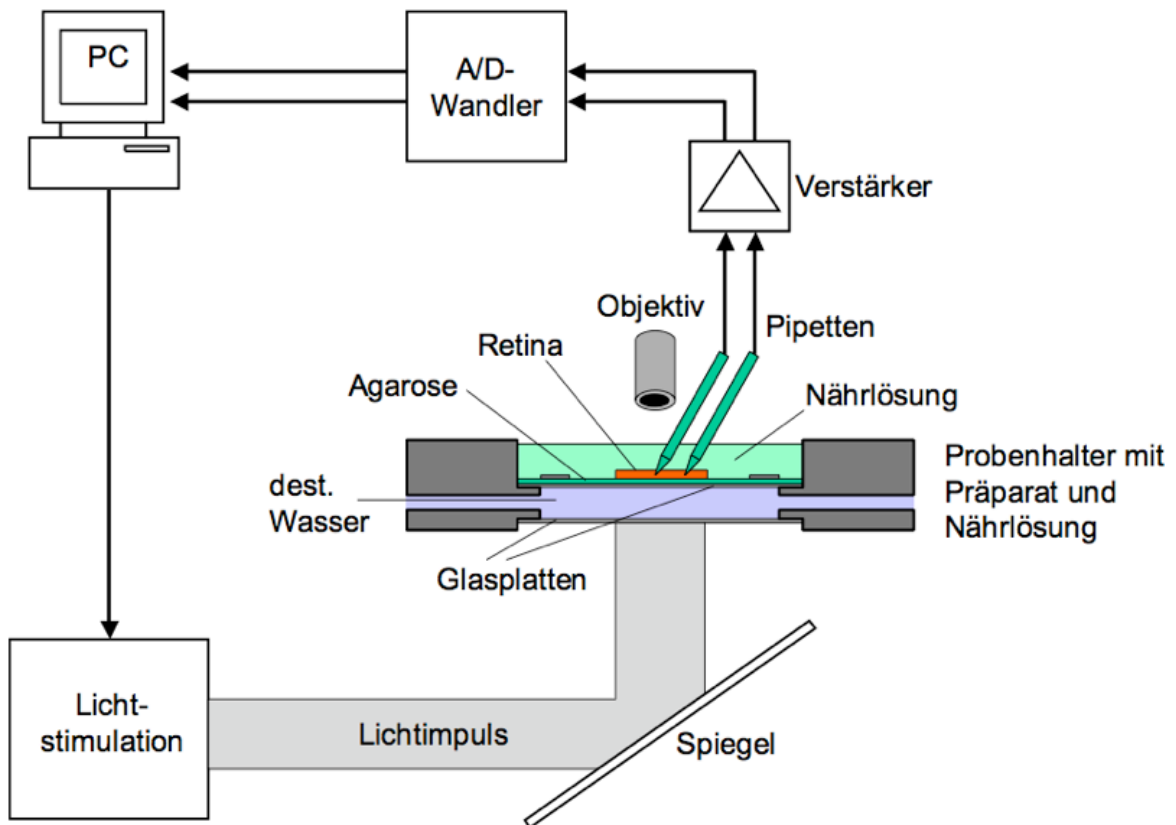
- Bewertende Literaturstudie zu den möglichen Einflüssen von Hochfrequenzfeldern des Mobilfunks auf das Auge von Säugetieren und Menschen und deren Wirkungsmechanismus.
- Untersuchung des Einflusses hochfrequenter elektromagnetischer Felder des Mobilfunks nach:
  - dem GSM 900 MHz
  - dem GSM 1800 MHz
  - dem UMTS Standard

auf die neuronale Aktivität retinaler Ganglienzellen bei definierten SAR Werten (0,02 W/kg; 0,2 W/kg; 2 W/kg; 20 W/kg sowie Scheinbefeldung 0 W/kg).

- In den Untersuchungen sollen Temperatureffekte möglichst ausgeschlossen werden, so dass die Effekte der hochfrequenten Felder separat untersucht werden können.

## 2 Experimentelle Methoden

Durch extrazelluläre Ableitungen kann die elektrische Aktivität (Aktionspotentiale) retinaler Ganglienzellen als Antwort auf Lichtreizung direkt gemessen werden. Dazu wurden zwei mit Extrazellulärlösung gefüllte Glasmikroelektroden verwendet, welche mit Hilfe eines Mikromanipulators in der Ganglienzellschicht isolierter Retinapräparate der Maus platziert wurden (Abb. 2).



**Abb. 2:** Schematischer Versuchsaufbau

Das Präparat wurde dabei mit Nährlösung (Mausringerlösung) definierter Temperatur überströmt. Der Probenhalter mit Präparat und Nährlösung befand sich innerhalb des Hohlraumresonators der Expositionseinrichtung. Die Referenzelektrode befand sich außerhalb des Resonators im Abfluss der Nährlösung.

### 2.1 Expositionseinrichtung

Der Aufbau und die messtechnische Charakterisierung der Expositionseinrichtung im Zusammenhang mit der Messeinrichtung (Probenhalter und Glasmikroelektroden) sind im Detail im Zwischenbericht der Firma IMST beschrieben und im Anhang 2 dargestellt.

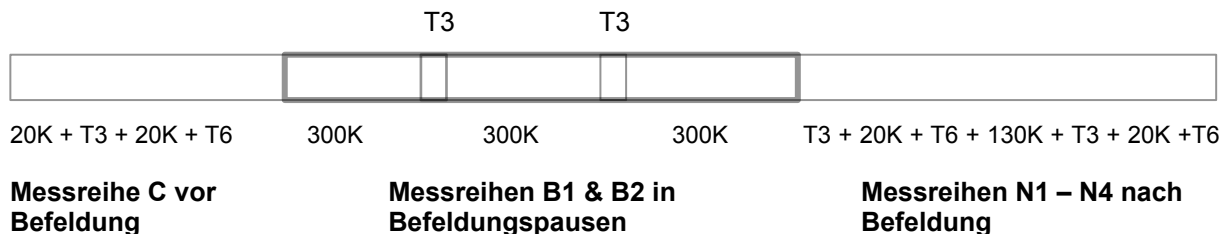
Die Steuerung der Expositionseinrichtung erfolgte verblindet, und die jeweils anliegende Feldstärke wurde mit einer Diode im Resonator kontrolliert. Diese Werte wurden automatisch in ein „log file“ geschrieben und von der Fa. IMST ausgewertet, um eventuelle Befeldungsfehler feststellen zu können.

## 2.2 Präparation

C57 BL/6N Mäuse (Charles River Laboratories Inc.) wurden mit CO<sub>2</sub> betäubt und durch kraniale Translokation getötet. Nach E nukleation der Augen wurde deren Hornhaut und Linse entfernt. In Ringerlösung (117 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 32 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,38 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 mM L-Glutamat, 15 mM Glukose) wurde anschließend die Retina aus dem verbliebenen Augenbecher präpariert und flach, mit der Ganglienzellschicht nach oben, in den Probenhalter platziert wo sie weiter von Ringerlösung umspült wurde. Sämtliche Arbeitsschritte fanden unter schwacher Rotlichtbeleuchtung statt. Nach Einbringen des Probenhalters in die Expositionsapparatur wurde die Retina 30 Minuten dunkeladaptiert bevor die eigentlichen Messungen begannen.

## 2.3 Lichtstimulation und Befeldung

Es wurden die Lichtantworten retinaler Ganglienzellen vor, während und nach Befeldung gemessen und mit den jeweils entsprechenden Lichtantworten der Kontrollgruppe (= Scheinbefeldung) verglichen (Abb. 3).



**Abb. 3:** Versuchsdesign. Grau = Befeldung bzw. Scheinbefeldung. Zur Erläuterung von K und T siehe Text. 300K bedeutet z.B. 300mal Stimulus K appliziert, was einer Gesamtdauer von 10 min entspricht.

Die Lichtstimulation erfolgte über eine LED, deren Licht durch eine Öffnung an der Unterseite des Hohlraumresonators die Photorezeptoren der gesamten Retina reizte (siehe Abb. 2). Die Lichtstimulation gliederte sich in zwei Gruppen: Konstante Stimuli (**K**): 40 ms Lichtblitze, 0,5 Hz, 2,66 lx retinale Beleuchtungsstärke. Diese Blitze konstanter Intensität wurden kontinuierlich appliziert, um eine Veränderung des Adaptationszustandes der Retina während des Versuches zu vermeiden. Beim Aufsetzen der Ableitelektroden auf die Retina dienten sie außerdem zum Auffinden von Ganglienzellantworten. Teststimuli (**T**): 200 ms Lichtblitze (0,5 Hz) aufsteigender Intensitäten zur Bestimmung der Intensitäts – Antwort Kennlinien. Dabei wurden zwei Testreihen verwendet. **T3** bestand aus Lichtblitzen mit 3 aufsteigenden Intensitäten (0,5 lx; 16 lx; 445 lx) wobei diese 10mal wiederholt wurden. **T6** bestand aus Lichtblitzen mit 6 aufsteigenden Intensitäten (0,07 lx; 0,5 lx; 2,66 lx; 16 lx; 83 lx; 445 lx) mit 20maliger Wiederholung.

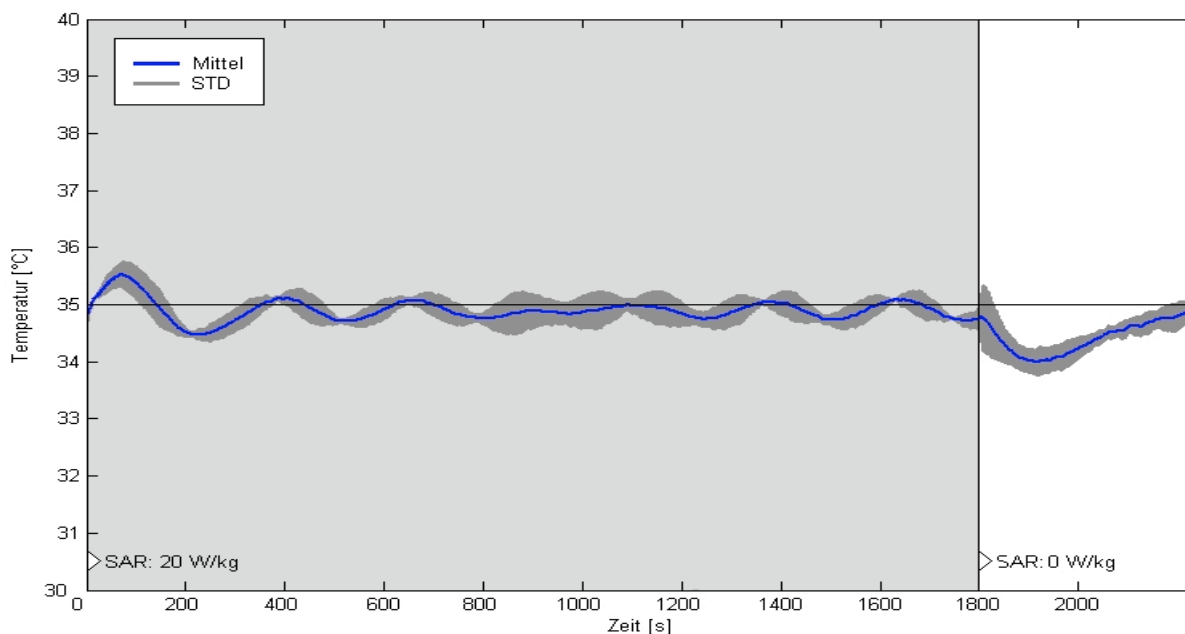
Lichtstimulation und Befeldung liefen automatisiert und standardisiert ab. Nach Start der Messung wurden 20 K Stimuli gefolgt von einer Testreihe T3, gefolgt von 20 K Stimuli, gefolgt von einer Testreihe T6 durchgeführt (Kontrollmessreihe C; siehe Abb. 2). Danach startete automatisch und verblindet die Befeldung (oder Scheinbefeldung), während der kontinuierlich K Stimuli weiter appliziert wurden. Während des Befeldungsblocks wurden in zwei kurzen (je 1 Minute) Befeldungspausen zwei T3 Messreihen durchgeführt (Messreihen B1 und B2). Nach Ende des Befeldungsblocks (30 min Befeldung + 2 min Pause) wurde wieder



automatisch das Standardprogramm (T3 + 20K + T6) weitergeführt, unterbrochen von jeweils 130 K Perioden. Dies wurde viermal wiederholt (Messreihen N1 – N4) so dass insgesamt weitere 35 Minuten nach Befeldung gemessen wurde.

## 2.4 Temperaturregulation

Zur Vermeidung von Temperaturänderungen während der Befeldung sollte das Retinapräparat über eine Temperaturregelung auf möglichst konstanter Temperatur gehalten werden. Die Temperaturmessung geschah dabei über einen fluoroptischen Messfühler (Luxtron) welcher direkt neben der Retina, am Ausfluss des Ringerkreislaufes platziert war (siehe auch Zwischenbericht der Firma IMST; Anlage 2). Die absolute Genauigkeit des verwendeten Sensors lag bei  $\pm 0,3 \text{ }^\circ\text{C}$ .

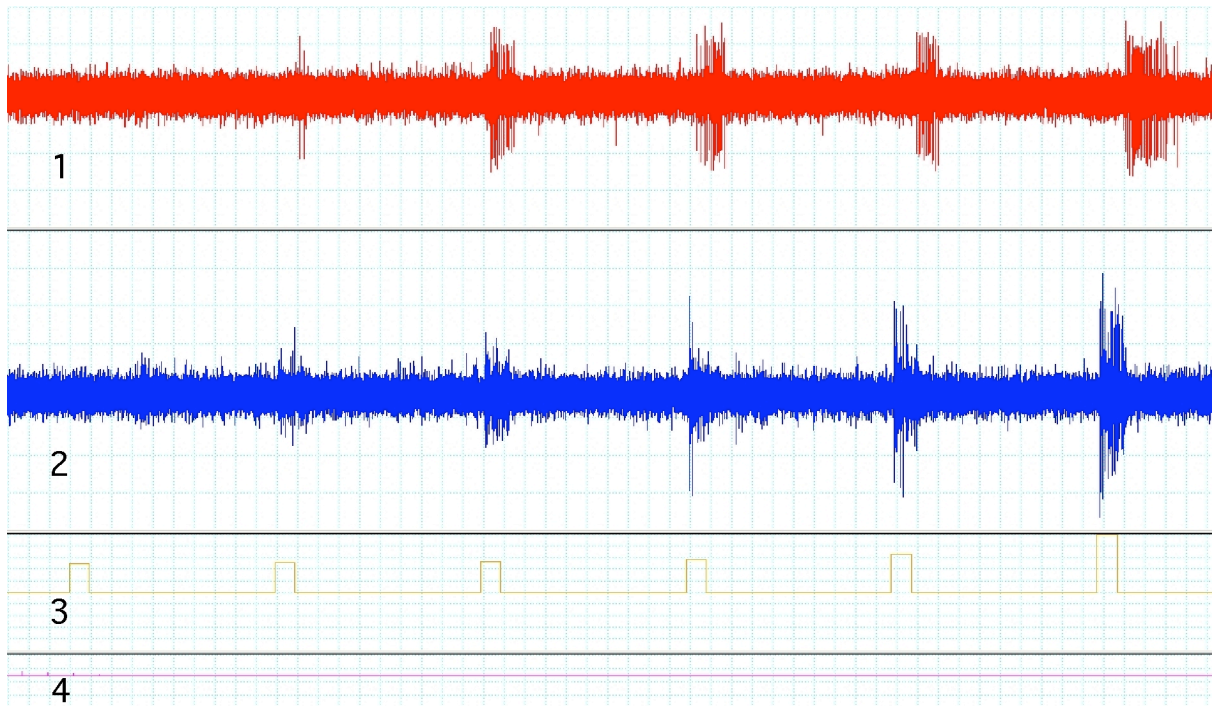


**Abb. 4:** Temperaturverlauf bei GSM 900. (Mittelwert  $\pm$  STD;  $n = 5$ ) beim Ein- und Ausschalten der Exposition mit einem SAR Wert von 20 W/kg. Sollwert = 35  $^\circ\text{C}$ .

Die Regelung geschah über außerhalb des Resonators angebrachte Heizwiderstände welche einen Wasserkreislauf durch den Probenhalter entsprechend dem Sollwert mehr oder weniger aufheizten. Der Wasserkreislauf war durch eine dünne Glasplatte vom Ringerfluss getrennt und heizte Ringer und Retina (siehe Abb. 2). Beim höchsten SAR Wert von 20 W/kg wich die Temperatur im Ringerfluss beim Einschalten von GSM 900 vorübergehend circa  $\pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$  vom Sollwert ab (Abb. 4). Beim Ausschalten waren Abweichungen bis zu 1  $^\circ\text{C}$  zu beobachten. Bei den SAR Werten von 0,02 bis 2 W/kg waren die Abweichungen entsprechend geringer. Die Qualität der Temperaturregulation konnte durch Verbesserung des Regelalgorithmus im Verlauf der Experimente weiter verbessert werden, so dass für GSM 1800 und UMTS bessere Temperaturverläufe erreicht wurden. Die jeweiligen Temperaturverläufe für die verschiedenen Versuchsteile sind im Ergebnisteil dargestellt.

## 2.5 Elektrophysiologische Ableitung

Die extrazelluläre Ableitung der Aktionspotentiale (= Nervenimpulse) geschah wenn möglich an zwei Stellen der Retina gleichzeitig mit zwei Glasmikroelektroden. Diese wurden mit einem Elektrodenziehgerät (Sutter Instruments) auf einen Widerstand von ca. 1 M $\Omega$  gezogen, was einem Spitzendurchmesser von ca. 1  $\mu$ m entspricht, wenn sie mit Ringerlösung gefüllt sind. Zum Suchen von Ganglienzellantworten wurden die Elektroden unter konstanter Reizung der Retina mit Lichtblitz K mit Hilfe eines Stepermotors langsam in die Ganglienzellschicht der Retina gefahren. Die elektrischen Signale wurden mit zwei DAM 50 Extrazellulärverstärkern (WPI Instruments) 1000fach verstärkt und durch einen Bandpassfilter (300 – 3000 Hz) gefiltert. Die gefilterten Signale konnten dann über einen PowerLab A/D Wandler (ADInstruments) digitalisiert und zusammen mit den Lichtreizen und der gemessenen Ringertemperatur im Programm Chart (v. 5.0) kontinuierlich mit 20 kHz Abtastrate digitalisiert und gespeichert werden. Sobald akzeptable Lichtantworten gemessen werden konnten (Abb. 5) wurde das automatisierte Stimulations- und Befeldungsprogramm gestartet.

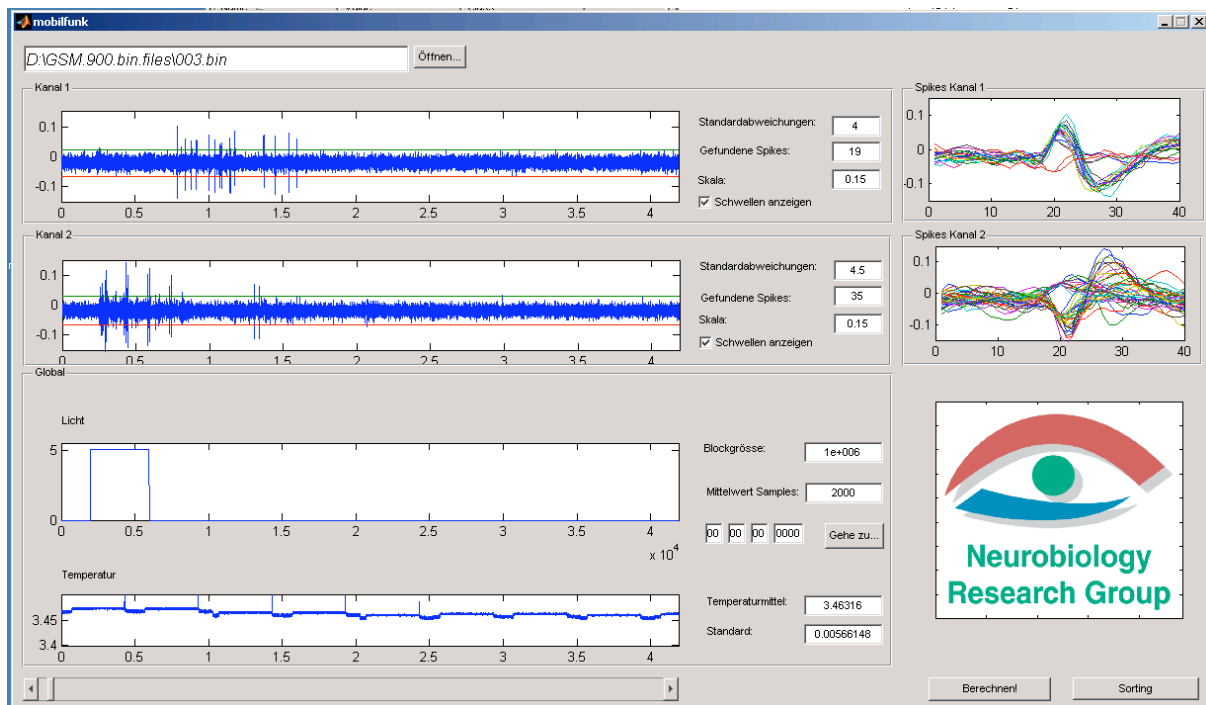


**Abb. 5:** Ableitbeispiel mit zwei Elektroden. Von oben nach unten: Spur 1: Lichtantworten an Elektrode 1; Spur 2: Lichtantworten an Elektrode 2; Spur 3: Lichtreize T6, sechs Lichtblitze mit zunehmender Intensität; Spur 4: Temperatur in der Ringerlösung.

## 2.6 Aufbereitung der Rohdaten

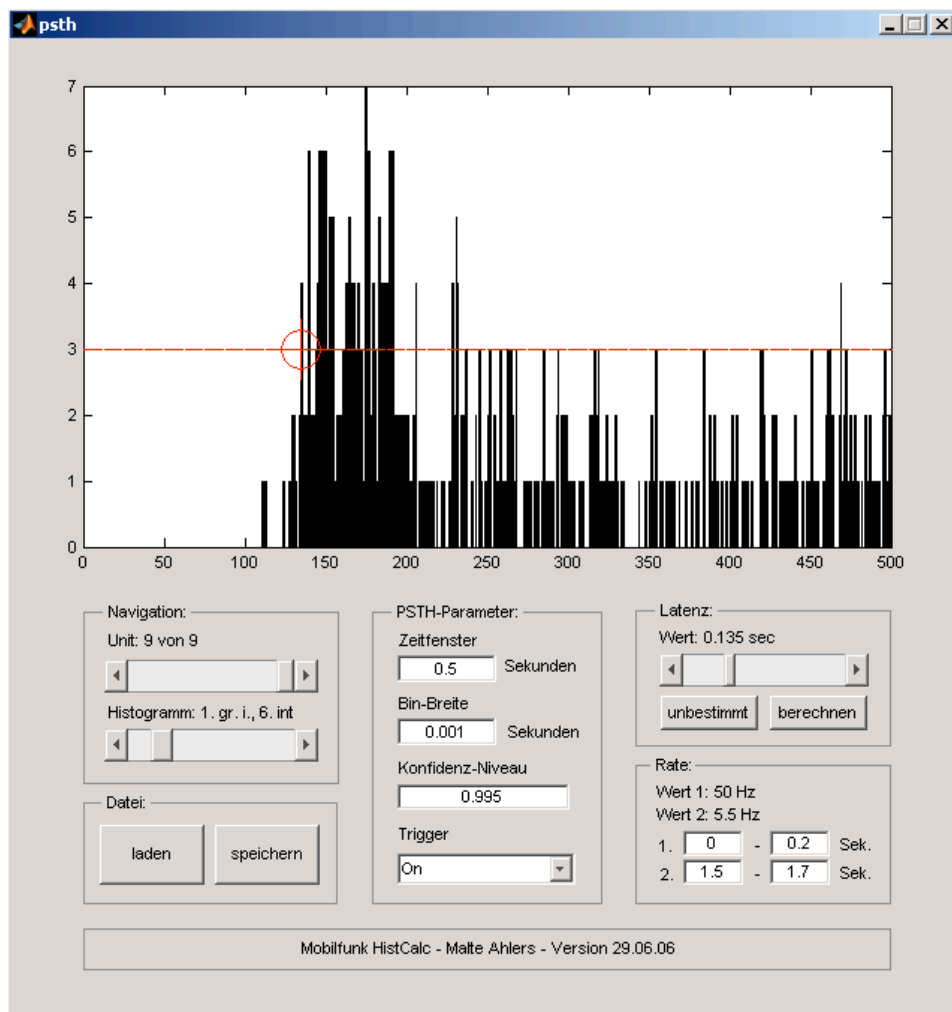
Die Ableitungen mit Extrazellulärelektroden enthalten zum einen unerwünschtes „Rauschen“ der Messkette und der Verstärkerelektronik sowie zum anderen oft Signale von mehreren, benachbarten Ganglienzellen. Letztere lassen sich meist aufgrund der unterschiedlichen Form (Amplitude und Zeitverlauf) der Aktionspotentiale einzelnen Zellen zuordnen. Um diese Zuordnung durchführen zu können wurden als erstes die Aktionspotentiale vom Rauschen getrennt. Dies geschah durch Setzen von Schwellen, bei deren Überschreitung die Signale aus der

kontinuierlichen Ableitung in einem 2 ms Zeitfenster ausgeschnitten wurden (Abb. 6). Wir haben uns für eine adaptive Schwelle entschieden, welche sich dem Grundrauschen automatisch anpasst, da sich dieses im Laufe der langen Ableitungsdauer durchaus ändern konnte.



**Abb. 6:** Aufbereitung der Rohdaten zur Unterscheidung der Aktionspotentiale. Linke Spalte: Spuren 1 und 2: Ableitungen an zwei Elektroden. Die farbigen Linien kennzeichnen die adaptive Schwelle, die jeweils für jeden Analyseblock neu gesetzt wurde. Ein Analyseblock entspricht der Zeit kurz vor bis 2 Sekunden nach einem Lichtblitz. Die adaptive Schwelle wurde aus einem Durchschnittswert des Rauschens und einer einstellbaren Standardabweichung über ein „sliding window“ bestimmt. Die beiden Ausschnitte in der rechten Spalte sind die in diesem Beispiel bei den eingestellten Standardabweichungen (4 bzw. 4,5) ausgeschnittenen Signale in einem 2 ms Fenster (die Einheit auf der x-Achse ist der Messpunkt bei einer Abtastrate von 20 kHz). Die beiden unteren Spuren stellen wiederum den jeweiligen Lichtblitz sowie den Temperaturverlauf dar. Aus dem Temperaturverlauf wurde für die weitere Auswertung jeweils der Mittelwert des Auswerteblocks (= 2 s) gebildet. Die Stufen entstehen durch das Messprinzip der fluoroptischen Temperaturmessung, bei der periodisch zwischen Anregung und Messung gewechselt wird.

Die Zeitfenster mit den überschwelligen Signalen wurden anschließend in ein Separierungsprogramm geladen und wenn möglich nach einzelnen Zellen aufgetrennt. Das verwendete Programm „Wave-cluster“ benutzt dabei einen automatischen Algorithmus der Aktionspotentiale mit ähnlicher Form einer gemeinsamen Gruppe zuordnet (Quian Quiroga et al. 2004). Von den separierten Signalen wurden ab jetzt nur noch die Zeiten des Schwellendurchtritts für die weitere Analyse verwendet. Als erstes wurden für jede Zelle die nach einem Lichtreiz auftretenden Aktionspotentiale als Histogramme über die Zeit aufgetragen (Peristimulus-Zeit Histogramme, PSTH), wobei jeweils die Wiederholungen für jede Intensität (10 Wiederholungen für T3 und 20 Wiederholungen für T6) gemittelt wurden. Aus diesen PSTHs lassen sich dann Latenzen und Antwortraten für jede einzelne Lichtintensität bestimmen (Abb. 7). Zur Kontrolle der Ableitqualität wurden außerdem jeweils 20 Wiederholungen der K Stimuli zu verschiedenen Zeitpunkten des Experimentes gemittelt und ausgewertet. Alle Auswertungen wurden getrennt für ON bzw. OFF Antworten durchgeführt.

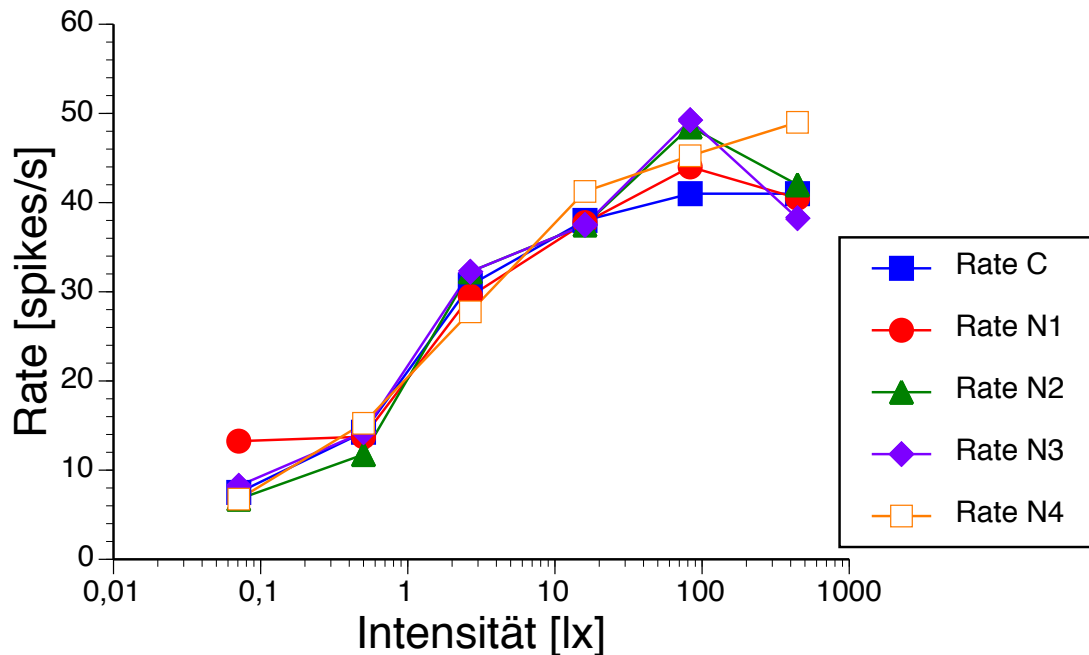


**Abb. 7:** Beispiel für die automatisierte Bestimmung der Latenz und Rate einer ON-Zelle. Der rote Kreis kennzeichnet den Schnittpunkt der Spikerate im PSTH mit einem vorgegebenen Konfidenzniveau (0,995), welches aus der Spontanrate errechnet wird. Somit ist ein Überschreiten dieses Spikeniveaus mit 99,5% Wahrscheinlichkeit nicht zufällig, sondern Folge des Lichtreizes. Die Lichtreizdauer erstreckt sich von 0 – 200 ms (x-Achse). Die Spikerate während Licht-AN beträgt in diesem Beispiel 50 Hz.

Aus den so ermittelten Latenzen und Raten für Licht-AN (ON) bzw. Licht-Aus (OFF) konnten nun die Antworten für jede Intensität ermittelt werden (Abb. 8). Dies geschah wiederum für jede Messreihe (C, B1, B2, N1 – N4) jeweils vor, während und nach Befeldung. Für die Auswertung wurden dann die jeweiligen ON und OFF Antworten gemittelt und getrennt betrachtet.

Da die Lichtantworten verschiedener Ganglienzelltypen auch innerhalb einer Gruppe (z.B. ON Ganglienzellen) in der Retina sehr unterschiedlich sein können führt dies zu relativ großen Standardabweichungen, was eventuelle Befeldungseffekte überdecken könnte (Völgyi et al.,2004). Aus diesem Grund machten wir uns das Vorher – Nachher Design der Versuchsdurchführung zunutze und bestimmten für die statistische Analyse für jede Intensität sowohl die Differenzen ( $\Delta R = R_x - R_c$ ; x steht für die jeweiligen Messreihen C, B1, B2, N1 – N4) als auch die Quotienten ( $R_x/R_c$ ) der Raten bzw. Latenzen ( $\Delta L = L_x - L_c$ ;  $L_x/L_c$ ) relativ zu den Kontrollwerten vor der

Befeldung. Diese Werte wurden ebenfalls gemittelt und statistisch auf Abweichungen von den Werten der Scheinbefeldungen getestet.



**Abb. 8:** Beispiel der Raten-Intensitäts Kennlinien einer ON-Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten eines Experimentes. **a:** Stimuli T6. Rate C = Kennlinie vor Befeldung, Raten N1 – N4 = Kennlinien zu verschiedenen Zeitpunkten nach Befeldung. **b:** Stimuli T3. Zusätzlich sind hier die Raten während des Befeldungsblocks B1 und B2 dargestellt. SAR = 0 W/kg.

## 2.7 Statistische Analyse

Für eine vorläufige statistische Analyse wurde für jede Intensität und Messreihe ermittelt ob sich die Mittelwerte der Raten- bzw. Latenzdifferenzen und Quotienten bei den verschiedenen Befeldungen von den Werten der Scheinbefeldung unterscheiden. Dazu wurde ein Vergleich multipler Mittelwerte mit Kontrolle (Control-Dunnnett Test) durchgeführt. Diese vorläufige Analyse diente nur zum eventuellen Erkennen starker Effekte, die sich auch mit dieser einfachen Analyse zeigen sollten. Die Tests wurden mit JMP (Vers. 5.01; SAS) durchgeführt.

Zur endgültigen statistischen Analyse wurde das Programm SPSS (Vers. 15) verwendet. Als Test wurde ein „General linear mixed model (GLMM)“ Ansatz gewählt. Dabei handelt es sich um eine verallgemeinerte Regressionsanalyse, welche ANOVA vergleichbar ist. GLMM eignet sich allerdings besser für „repeated measures designs“, und ist unempfindlicher gegen fehlende Messwerte („missing values“), welche im vorliegenden Fall vor allem bei niederen Intensitäten des Lichtreizes vorlagen (Cnaan et al. 1997; Krueger & Tian, 2004). Außerdem erlaubt dieser Ansatz die Unterscheidung zwischen multiplen, feste Effekten („fixed effects“) und Zufallseffekten („random effects“), welche zum Beispiel durch die Stichprobenauswahl (hier die gemessenen Mäuse bzw. Retinae und die jeweils dabei gemessenen Zellen) gegeben ist. Als abhängige Variablen wurden die gemessenen Raten und Latenzen (bzw. deren Differenzen und Quotienten) definiert. Als feste experimentelle Effekte wurden die SAR Werte, die Lichtintensität, die Messreihenfolge, und die Temperatur definiert. Als Zufallseffekt wurde die unit

Nummer (= gemessene Ganglienzelle) gewählt. Prinzipiell taucht in einer Regressionsanalyse auch immer ein konstanter Term als fester Effekt auf, der geometrisch betrachtet den Schnittpunkt der Regressionsgerade (falls nur 2 Variablen vorliegen) mit der y-Achse darstellt. Im mehrdimensionalen Fall ist die Situation komplizierter. Da der konstante Term zwar formal bei der statistischen Berechnung eine Rolle spielt, aber keine interpretierbaren experimentellen Variablen repräsentiert, wird er in den folgenden Tabellen vernachlässigt. In einem GLMM Modell können auf relativ einfache Weise neben den Haupteffekten auch Interaktionen bestimmt werden. Interaktionen werden deswegen getestet, da theoretisch Effekte eventuell nur bei bestimmten Variablenkombinationen auftreten könnten. In der vorliegenden Auswertung wurde auf sämtliche mögliche 2-Weg Interaktionen getestet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Literaturstudie

Die Literaturrecherche wurde von August bis Dezember 2004 durchgeführt. Die fertige Studie wurde im Dezember 2004 an das Bundesamt für Strahlenschutz geschickt (siehe Anhang 1).

Die Literaturrecherche zeigte, dass die Untersuchung von isolierten Feldeffekten notwendig ist. Über die zum Teil schädlichen Effekte zu starker Temperaturerhöhung als Folge von sehr hohen SAR Werten besteht grundsätzlich Einigkeit. Widersprüchliche Ergebnisse existieren dagegen bezüglich der Frage ob Feldeffekte alleine das Nervensystem, und damit auch Sinnesorgane schädlich beeinflussen können. Eine Ursache der widersprüchlichen Ergebnisse ist zum Teil die nicht vorhandene oder ungenügende Temperaturkontrolle und/oder ungenügend charakterisierte Feldverteilungen. Dies bedeutet dass auf beides in den geplanten Versuchen besonderes Augenmerk gerichtet wurde.

### 3.2 Experimente GSM 900 MHz

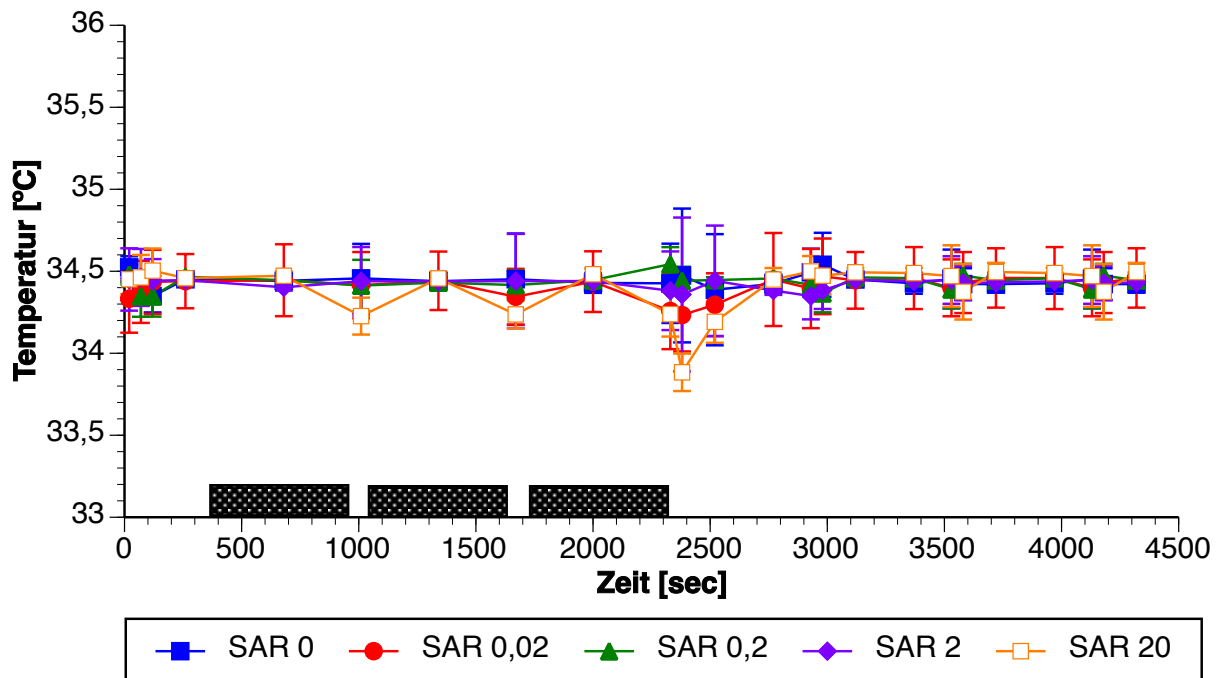
Inklusive aller Vorversuche wurden 141 Experimente durchgeführt, von denen 130 Versuche mit Befeldung oder Scheinbefeldung durchgeführt wurden. 36 Versuche davon wurden verworfen, da entweder das Signal-Rauschverhältnis in den Ableitungen zu schlecht war (dies war vor allem bei den frühen Versuchen der Fall), oder die Ableitungen zu schnell verloren gingen (z. B. schon während der Befeldung). Von den verbliebenen 94 Versuchen mussten weitere 6 nach Bekanntgabe des Befeldungsschlüssels aus der Auswertung entfernt werden, da es zu Befeldungsfehlern gekommen war. Insgesamt wurden somit für GSM 900 MHz die Daten von 88 Retinae, in denen 371 Zellen abgeleitet wurden, ausgewertet. Im Durchschnitt konnten pro Versuch circa 4 Zellen abgeleitet werden. Die Verteilung der Retinae sowie der verschiedenen abgeleiteten Zellen auf die verschiedenen Befeldungen ist in Tabelle 1 dargestellt. Die Zellen sind dabei nach ON und OFF Antworten differenziert. Dabei ist zu beachten dass für die Auswertung bei den verschiedenen Intensitäten das n für die Zellen variieren kann. Insbesondere bei den schwachen Intensitäten (0,07 lx und 0,5 lx) zeigten etliche Zellen noch keine Lichtantworten, so dass bei diesen Intensitäten das n kleiner ist.

SAR [W/KG]	0	0,02	0,2	2	20
Retinae	17	19	17	18	17
ON	52	31	30	34	39
OFF	52	30	30	34	39

**Tabelle 1:** Anzahl der ausgewerteten Retinae und ON und OFF Zellen bei den verschiedenen Befeldungen mit GSM Standard 900 MHz.

### 3.2.1 Temperaturkonstanz GSM 900 MHZ

Da bei jedem Versuch die Temperatur kontinuierlich gemessen wurde kann der Temperaturverlauf über die gesamte Versuchsdauer bestimmt werden.



**Abb. 9:** Temperaturverlauf für GSM 900 MHz direkt an der Retina gemessen für die verschiedenen SAR Befeldungswerte. Der Befeldungsblock mit Befeldungspausen ist durch die grauen Blöcke angedeutet. Jeweils Mittelwerte  $\pm$  S.D. (n siehe Tabelle 1; Anzahl der Retinae für die jeweiligen SAR Werte)

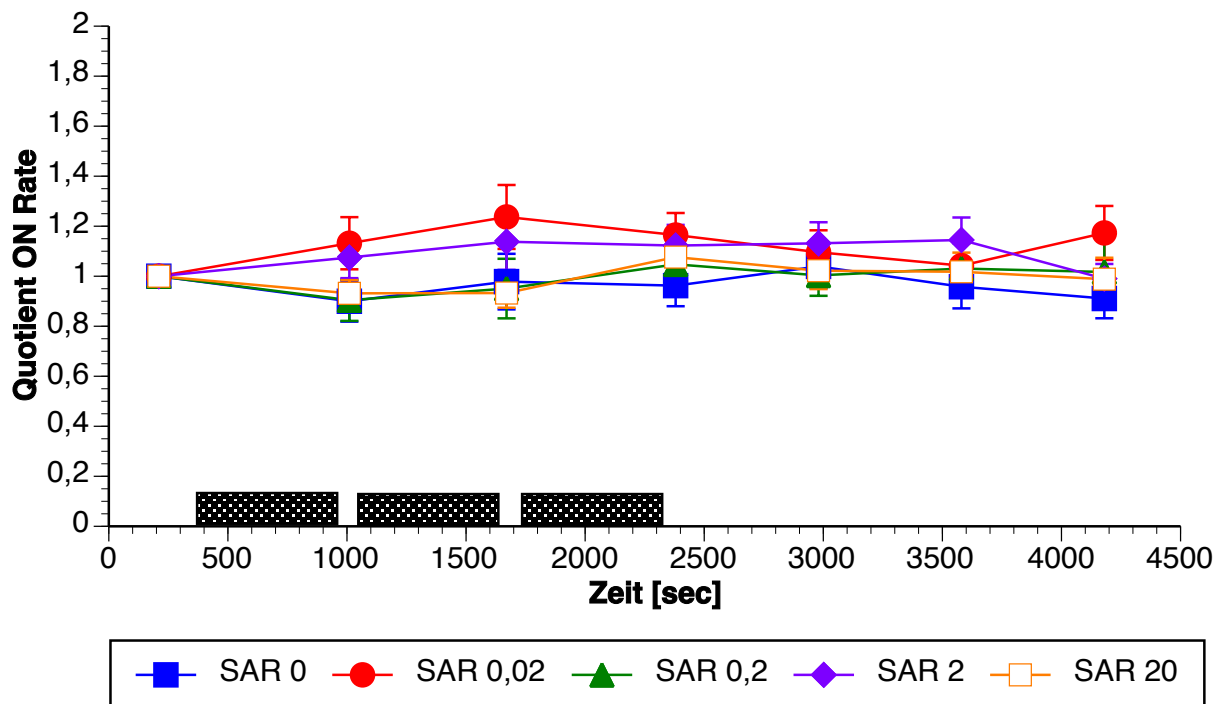
Dies ist in Abbildung 9 getrennt für die verschiedenen SAR Werte dargestellt. Die Messwerte wurden aus allen Versuchen gemittelt ( $n_{\text{gesdamt}} = 88$  Retinae; für die einzelnen SAR Werte siehe Tabelle 1). Die Temperatur bewegt sich dabei für die Befeldungen von 0 bis 2 W/kg in einem engen Bereich von circa  $\pm 0,3$  °C. Nur beim höchsten SAR Wert von 20 W/kg sinkt die Temperatur vorübergehend beim Ausschalten der Befeldung. Das Absinken ist dadurch begründet dass die bei Befeldung entstehende Wärme durch den Temperaturkreislauf abgeführt werden muss, der dadurch etwas kälter als die Ringerlösung wird. Wird die Befeldung ausgeschaltet kühlt der Temperaturkreislauf kurzzeitig das Präparat. In den Befeldungspausen ist dieser Effekt weniger ausgeprägt da dort nach 1 Minute das Feld wieder eingeschaltet wird.



### 3.2.2 Vergleich der Antwortparameter

In den folgenden Abbildungen 10 – 13 wird exemplarisch der Verlauf der Antwortparameter über die gesamte Versuchsdauer dargestellt. Die Beispieldiagramme beschränken sich dabei auf eine Intensität von 16 lx und die Raten- bzw. Latenzquotienten ( $R_x/R_c$  und  $L_x/L_c$ ) für ON und OFF Antworten um das Prinzip der statistischen Auswertung zu verdeutlichen. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden als Fehlerbalken jeweils der Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.) eingetragen.

Abbildung 10 zeigt, dass die Raten der ON Antworten in der Kontrollgruppe (SAR = 0 W/kg) über den gesamten Versuchsverlauf sehr konstant sind. Der Quotient liegt durchgehend nahe 1. Ähnliches gilt für die Raten der ON Antworten bei den verschiedenen Befeldungen. Für die jeweiligen Messzeitpunkte (B1, B2, N1, N2, N3, N4) wurde bei dieser Intensität im multiplen Mittelwertvergleich kein signifikanter Unterschied ( $\alpha = 0,05$ ) zur Kontrollgruppe festgestellt (siehe Anhang 3).



**Abb. 10:** Verlauf des Quotienten der ON Rate  $R_x/R_c$  während des Versuchsverlaufs für die verschiedenen SAR Befeldungen bei GSM 900 MHz. Die grauen Blöcke symbolisieren die Befeldungsdauer. Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. (n siehe Tabelle 1 für die verschiedenen SAR Werte). Intensität = 16 lx. Der Quotient für die Werte der ersten Messreihe C ist definitionsgemäß 1. Die folgenden Werte stammen aus den Messreihen B1, B2, N1, N2, N3 und N4.

Ähnliches gilt für den Quotienten der Latenzen der ON Antworten (Abb. 11), wobei aufgrund des leichten Anstiegs der Messwerte eine Tendenz zu längeren Latenzen im Verlauf des Versuchs festzustellen ist. Da dies aber für alle Befeldungen inklusive Scheinbefeldung zutrifft ist wiederum bei dieser Intensität im multiplen Mittelwertvergleich kein signifikanter Unterschied ( $\alpha = 0,05$ ) zur Kontrollgruppe nachweisbar.

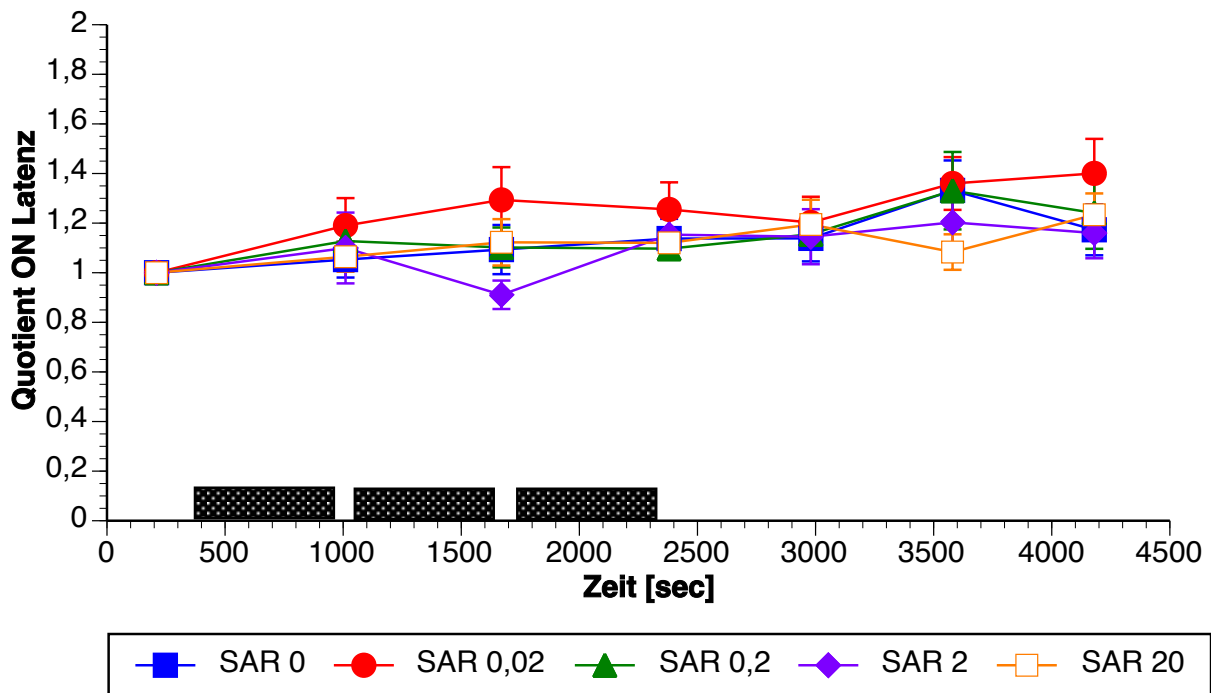


Abb. 11: Verlauf des Quotienten der ON Latenz  $L_x/L_c$  während des Versuchsverlaufs bei GSM 900 MHz. Siehe Abb. 10

Die Quotienten der Antwortraten der OFF Antworten verhalten sich ähnlich wie diejenigen der ON Antworten, wobei die Schwankungen im Versuchsverlauf etwas ausgeprägter sind (Abb. 12). Wiederum existiert bei dieser Intensität auf der Grundlage eines alpha-Niveaus von 0,05 bei den verschiedenen Messzeitpunkten kein signifikanter Unterschied zwischen Befeldung und Scheinbefeldung wenn dies im multiplen Mittelwertvergleich getestet wurde.

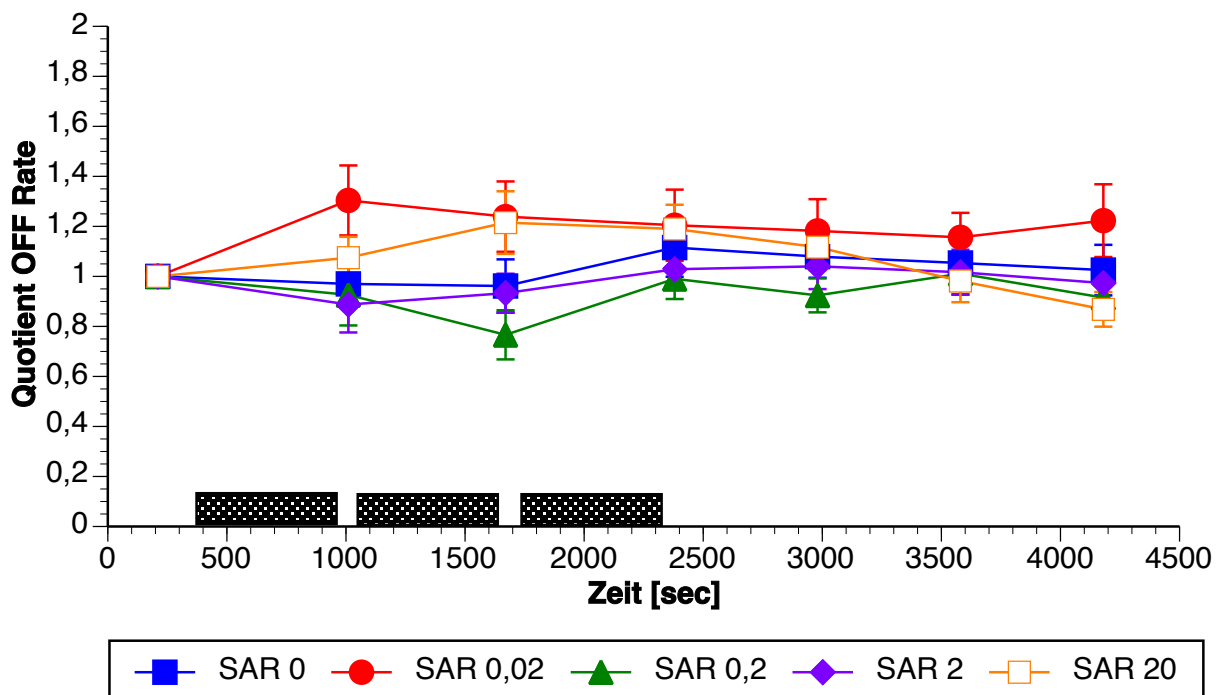


Abb. 12: Verlauf des Quotienten der OFF Rate  $R_x/R_c$  während des Versuchsverlaufs bei GSM 900 MHz. Siehe Abb. 10

Sehr stark schwankt der Quotient der Latenzen in allen Gruppen bei den OFF Antworten (Abb. 13), sowohl in der Kontroll- als auch in den Befeldungsgruppen. Dies ist höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen dass OFF Antworten in der Retina generell zeitlich unpräziser zu sein scheinen als ON Antworten. Dies wird auch durch die zum Teil sehr großen Standardabweichungen (bzw. Standardfehler des Mittelwertes) bestätigt. Dabei ist zu beachten dass die y-Achse im Vergleich zu den vorherigen Abbildungen den doppelten Bereich abdeckt. Auch hier war im multiplen Mittelwertvergleich bei dieser Intensität kein signifikanter Unterschied der Quotienten bei den verschiedenen SAR Werten zur Kontrollgruppe festzustellen ( $\alpha = 0,05$ ).

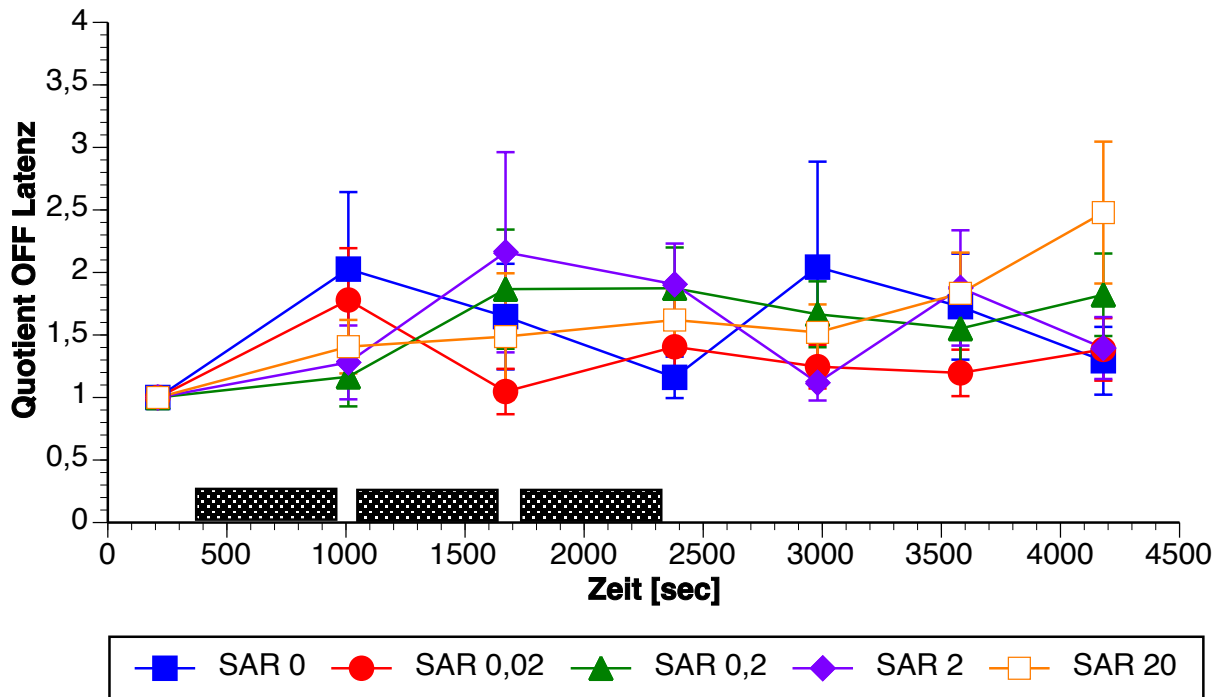


Abb. 13: Verlauf des Quotienten der OFF Latenz  $L_x/L_c$  während des Versuchsverlaufs bei GSM 900 MHz. Siehe Abb. 10

### 3.3 Experimente GSM 1800 MHz

Inklusive aller Vorversuche wurden bei GSM 1800 MHz 120 Experimente durchgeführt, von denen 83 Versuche mit Befeldung oder Scheinbefeldung durchgeführt wurden. 34 Versuche davon mussten für die Auswertung verworfen werden. Der Grund dafür war vor allem das Auftreten von Befeldungsfehlern welche entweder direkt während des Versuchs durch das Befeldungsprogramm gemeldet wurden, oder welche nach Bekanntgabe des Befeldungsschlüssels ersichtlich waren. Da für die Messreihe GSM 1800 durchgehend mit zwei Elektroden gemessen wurde und da die Erfahrung bei den Messungen inzwischen sehr hoch war, erhöhte sich die durchschnittliche Ausbeute an gemessenen Zellen pro Retina auf ca. 7 Zellen. Insgesamt wurden somit die Daten von 49 Retinae verwendet, in denen 344 Zellen abgeleitet werden konnten. Die Verteilung der Retinae sowie der verschiedenen abgeleiteten Zellen auf die verschiedenen Befeldungen ist in Tabelle 2 dargestellt. Die Zellen sind dabei nach ON und OFF Antworten differenziert. Dabei ist wiederum zu beachten dass bei den verschiedenen Intensitäten das n für die Zellen variiert.

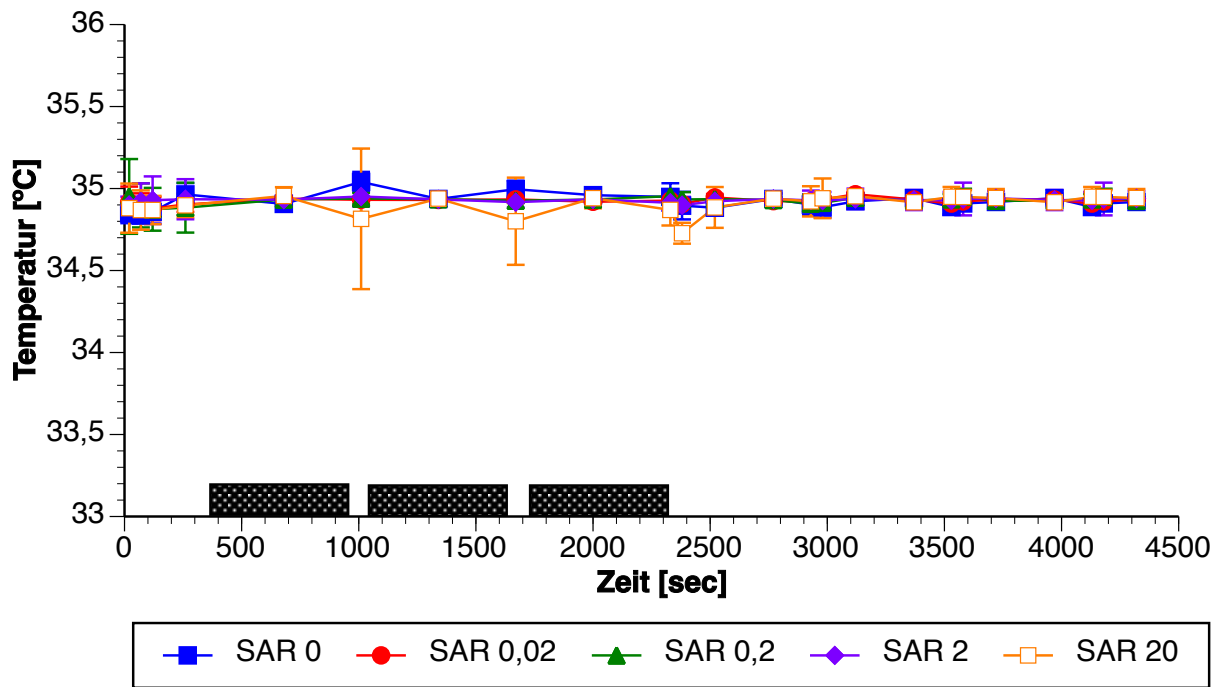
SAR [W/KG]	0	0,02	0,2	2	20
Retinae	10	11	8	11	9
ON	37	39	26	39	32
OFF	37	38	25	41	30

**Tabelle 2:** Anzahl der ausgewerteten Retinae und ON und OFF Zellen bei den verschiedenen Befeldungen mit GSM Standard 1800 MHz.

#### 3.3.1 Temperaturkonstanz GSM 1800 MHz

Der Regelalgorithmus für die Temperaturkontrolle konnte für die Messreihe GSM 1800 MHz verbessert werden, so dass die Temperatur während der Messung weniger Schwankungen aufwies als für GSM 900 MHz.

Dies ist für GSM 1800 MHz in Abbildung 14 getrennt für die verschiedenen SAR Werte dargestellt. Die Temperatur bewegt sich dabei für die Befeldungen von 0 bis 2 W/kg in einem engen Bereich von circa  $\pm 0,1$  °C. Nur beim höchsten SAR Wert von 20 W/kg sinkt die Temperatur vorübergehend (circa 0,2 °C bis 0,3 °C) beim Ausschalten der Befeldung. Das Absinken ist wiederum dadurch begründet dass die bei Befeldung entstehende Wärme durch den Temperaturkreislauf abgeführt werden muss, der dadurch etwas kälter als die Ringerlösung wird. Wird die Befeldung ausgeschaltet kühlt der Temperaturkreislauf kurzzeitig das Präparat. In den Befeldungspausen ist dieser Effekt wiederum etwas weniger ausgeprägt da dort nach 1 Minute das Feld wieder eingeschaltet wird.



**Abb. 14:** Temperaturverlauf für GSM Standard 1800 MHz direkt an der Retina gemessen für die verschiedenen SAR Befeldungswerte. Der Befeldungsblock mit Befeldungspausen ist durch die grauen Blöcke angedeutet. Jeweils Mittelwerte  $\pm$  S.D. (n siehe Tabelle 2; Anzahl der Retinae für die jeweiligen SAR Werte).

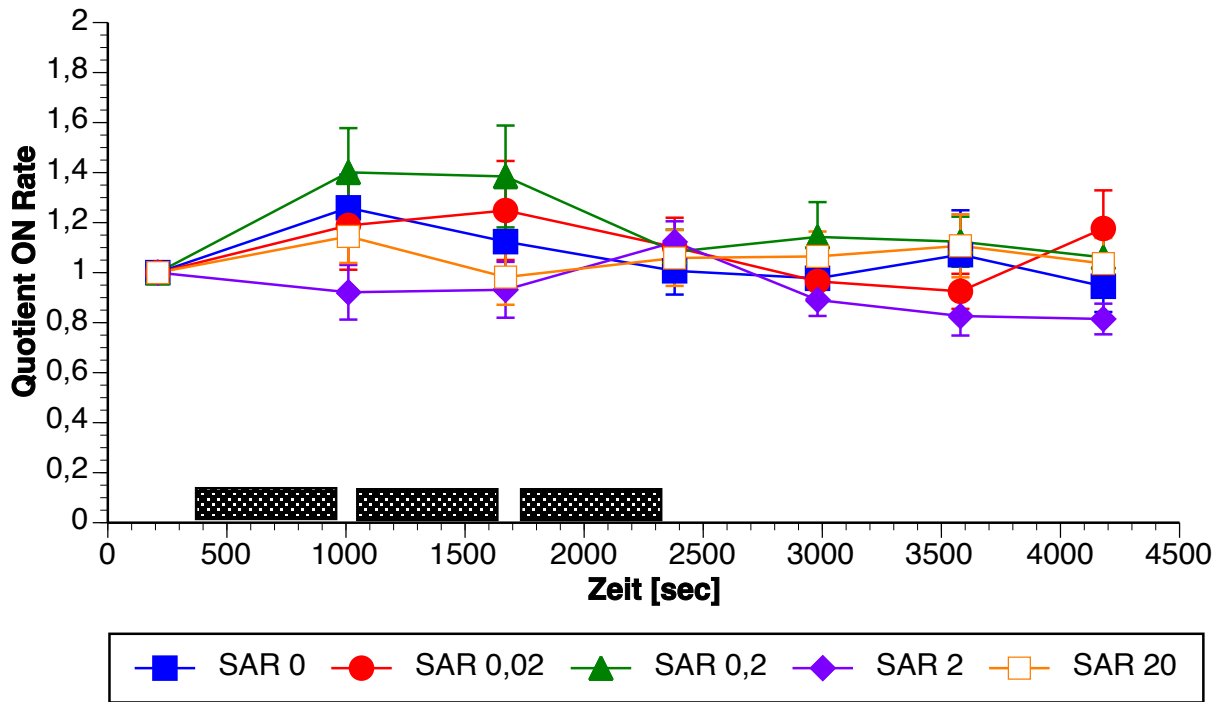
### 3.3.2 Vergleich der Antwortparameter

In den folgenden Abbildungen 15 – 18 wird der Verlauf der Antwortparameter beispielhaft über die gesamte Versuchsdauer dargestellt.

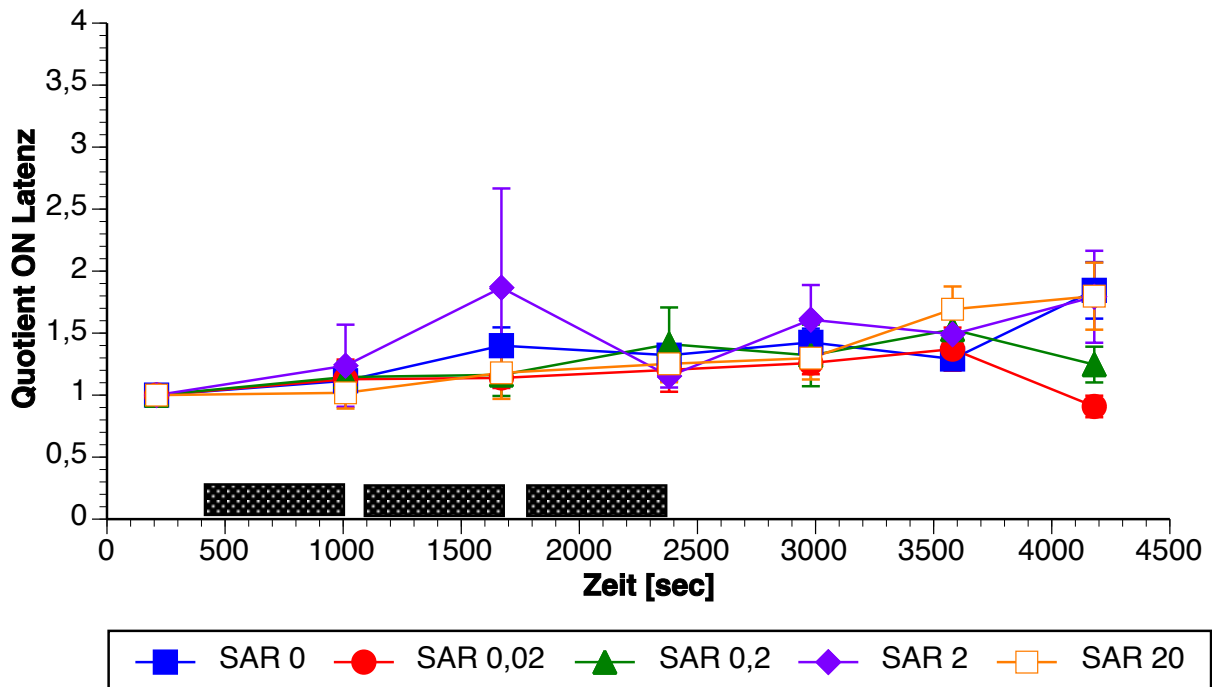
Die Beispieldiagramme beschränken sich dabei wiederum auf eine Intensität von 16 lx und die Raten- bzw. Latenzquotienten ( $R_x/R_c$  und  $L_x/L_c$ ) für ON und OFF Antworten um das Prinzip der Auswertung zu verdeutlichen. Zur Verbesserung der Übersichtlichkeit wurden als Fehlerbalken jeweils der Standardfehler des Mittelwertes (s.e.m.) eingetragen.

Abbildung 15 zeigt, dass die Raten der ON Antworten in der Kontrollgruppe (SAR = 0 W/kg) über den gesamten Versuchsverlauf sehr konstant sind. Der Quotient liegt durchgehend nahe 1. Ähnliches gilt für die Raten der ON Antworten bei den verschiedenen Befeldungen. Die Schwankungen sind bei den Messungen für GSM 1800 MHz etwas größer als bei den Messungen zu GSM 900 MHz. Für die jeweiligen Messzeitpunkte (B1, B2, N1, N2, N3, N4) wurde bei dieser Intensität im multiplen Mittelwertvergleich kein signifikanter Unterschied ( $\alpha = 0,05$ ) zur Kontrollgruppe festgestellt (siehe Anhang 3).

Ähnliches gilt für den Quotienten der Latenzen der ON Antworten (Abb. 16), wobei auch hier wie bei GSM 900 MHz aufgrund des leichten Anstiegs der Messwerte eine Tendenz zu längeren Latenzen im Verlauf des Versuchs festzustellen ist. Da dies aber für alle Befeldungen inklusive Scheinbefeldung zutrifft ist wiederum bei dieser Intensität im multiplen Mittelwertvergleich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe nachweisbar.



**Abb. 15:** Verlauf des Quotienten der ON Rate  $R_x/R_c$  während des Versuchsverlaufs für die verschiedenen SAR Befeldungen bei GSM Standard 1800 MHz. Die grauen Blöcke symbolisieren die Befeldungsdauer. Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. (n siehe Tabelle 2; Anzahl Zellen für die verschiedenen SAR Werte). Intensität = 16 lx. Der Quotient für die Werte der ersten Messreihe C ist definitionsgemäß 1. Die folgenden Werte stammen aus den Messreihen B1, B2, N1, N2, N3 und N4.



**Abb. 16:** Verlauf des Quotienten der ON Latenz  $L_x/L_c$  während des Versuchsverlaufs bei GSM Standard 1800 MHz. Siehe Abb. 15.

Die Quotienten der Antwortraten der OFF Antworten verhalten sich ähnlich wie diejenigen der ON Antworten, wobei die Schwankungen im Versuchsverlauf etwas ausgeprägter erscheinen (Abb. 17). Im gezeigten Beispiel existiert im multiplen

Mittelwertvergleich ein schwach ( $0,5 > p > 0,01$ ) signifikanter Unterschied zwischen Befeldung mit  $0,2 \text{ W/kg}$  und Scheinbefeldung zum Zeitpunkt N2 nach der Befeldung (siehe Anhang 3).

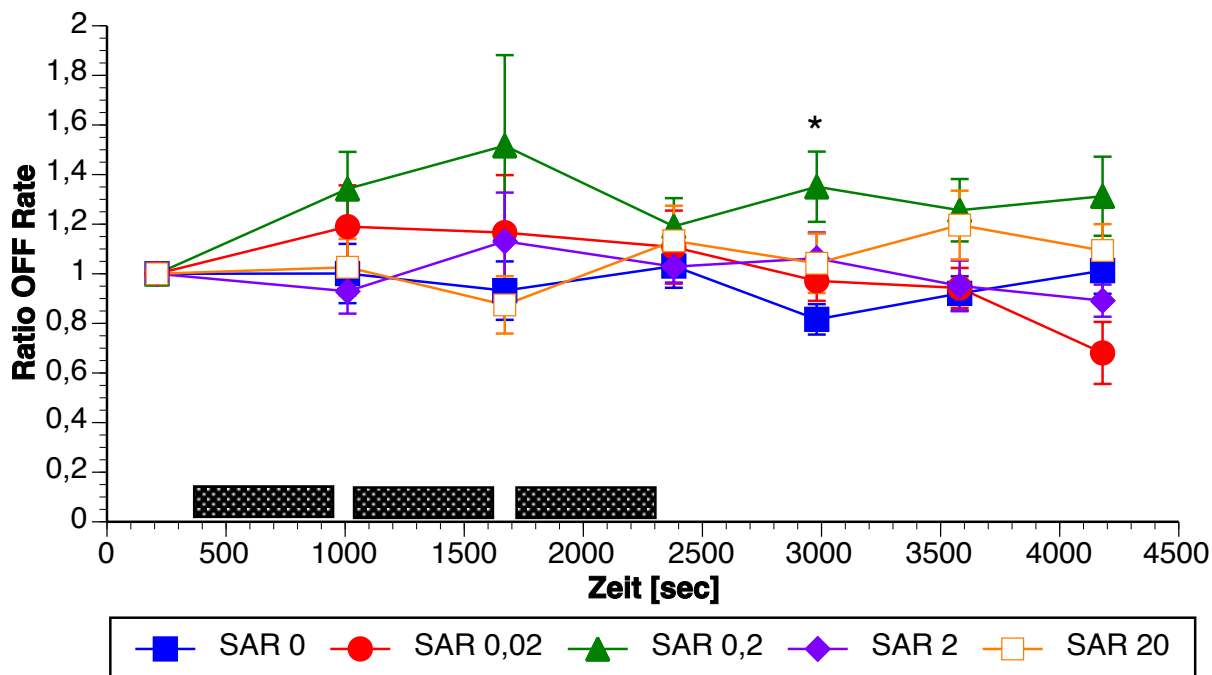


Abb. 17: Verlauf des Quotienten der OFF Rate  $R_x/R_c$  während des Versuchsverlaufs bei GSM Standard 1800 MHz. Siehe Abb. 15.

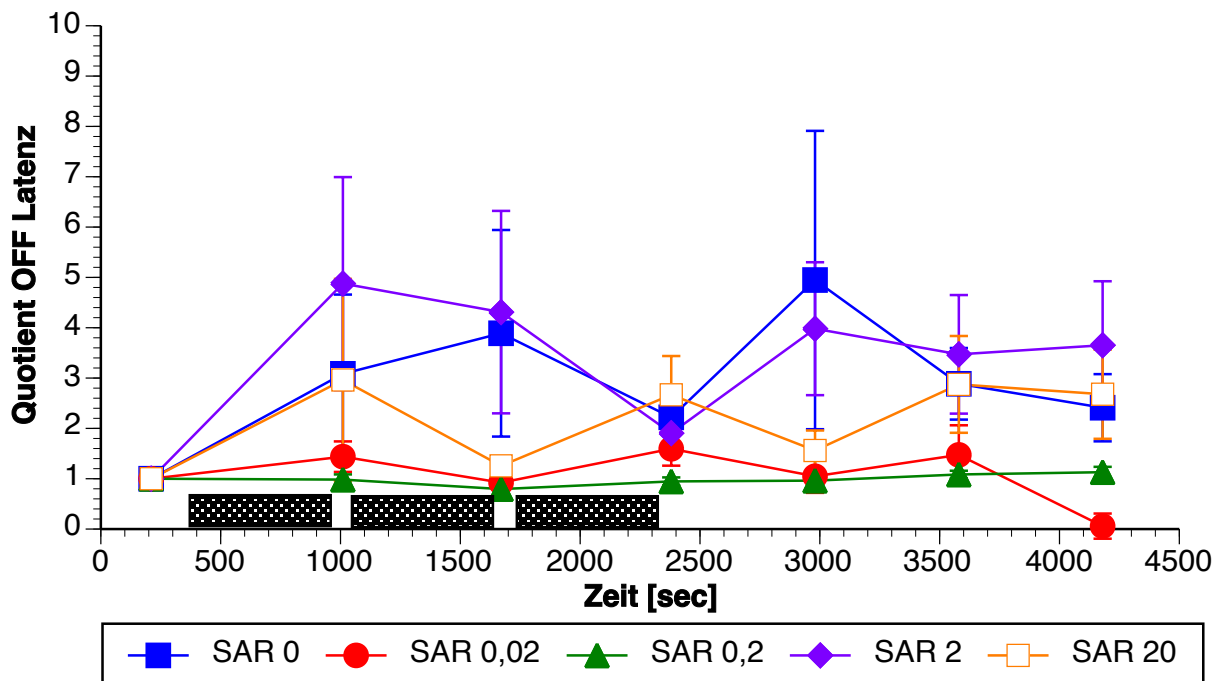


Abb. 18: Verlauf des Quotienten der OFF Latenz  $L_x/L_c$  während des Versuchsverlaufs bei GSM Standard 1800 MHz. Siehe Abb. 15

Sehr stark schwankt der Quotient der Latenzen in allen Gruppen bei den OFF Antworten (Abb. 18), sowohl in der Kontroll- als auch in den Befeldungsgruppen. Dies ist, wie schon bei den Experimenten mit GSM 900 MHz, höchstwahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass OFF Antworten in der Retina generell zeitlich unpräziser zu sein scheinen als ON Antworten. Im multiplen Mittelwertvergleich wurden für das gezeigte Beispiel keine signifikanten Unterschiede zwischen Scheinbefeldung und den verschiedenen SAR Werten festgestellt.

### 3.4 Experimente UMTS

Für UMTS wurden 80 Experimente durchgeführt. 38 Versuche davon mussten für die Auswertung verworfen werden. Der Grund dafür war das Auftreten von Befeldungsfehlern welche direkt durch das Befeldungsprogramm gemeldet wurden, oder welche nach Bekanntgabe des Befeldungsschlüssels ersichtlich waren. Einige Experimente wegen zu kleiner Antworten nicht auswertbar. Da für die Messreihe UMTS wie für GSM 1800 MHz durchgehend mit zwei Elektroden gemessen werden konnte erhöhte sich die durchschnittliche Ausbeute an gemessenen Zellen pro Retina auf ca. 7 Zellen. Insgesamt wurden somit für UMTS die Daten von 42 Retinae verwendet, in denen 286 Zellen abgeleitet werden konnten. Die Verteilung der Retinae sowie der verschiedenen abgeleiteten Zellen auf die verschiedenen Befeldungen ist in Tabelle 3 dargestellt.

<b>SAR [W/KG]</b>	<b>0</b>	<b>0,02</b>	<b>0,2</b>	<b>2</b>	<b>20</b>
Retinae	7	7	8	9	11
ON	26	26	25	30	36
OFF	26	26	25	30	36

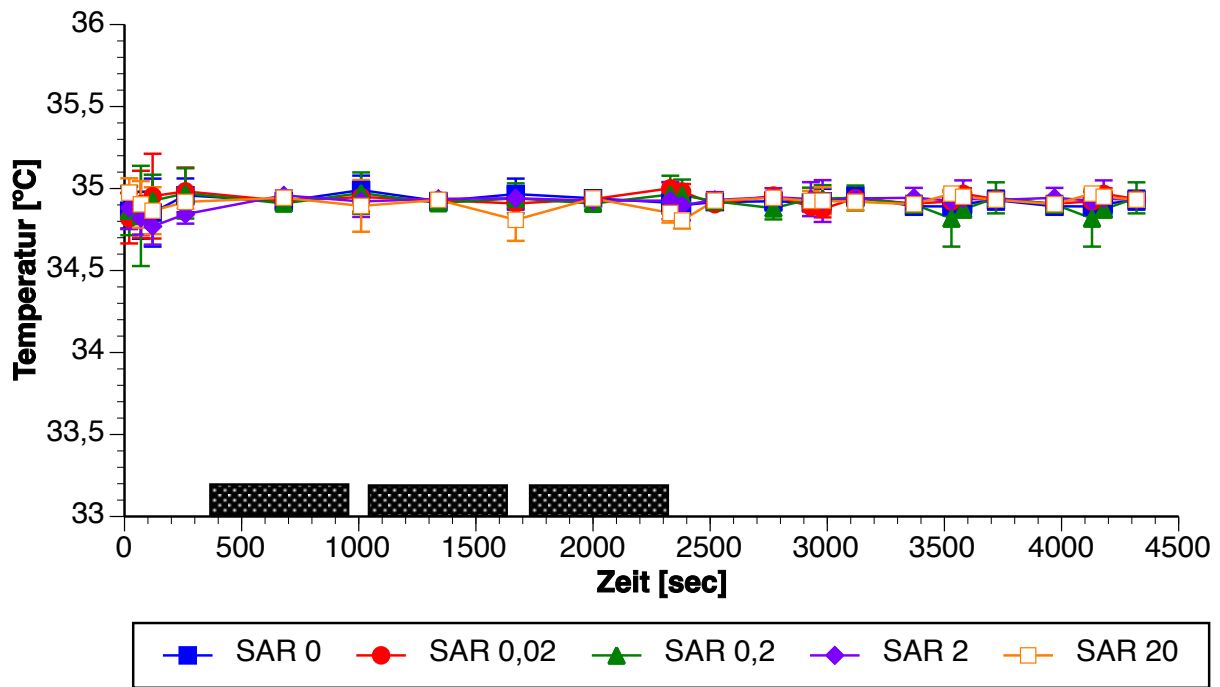
**Tabelle 3:** Anzahl der ausgewerteten Retinae und ON und OFF Zellen bei den verschiedenen Befeldungen mit UMTS Standard.

#### 3.4.1 Temperaturkonstanz UMTS

Der Verlauf der Temperatur ist für UMTS in Abbildung 19 getrennt für die verschiedenen SAR Werte dargestellt. Die Messwerte beruhen auf den Daten von allen 42 Retinae, wobei der Anteil für die jeweiligen SAR Werte Tabelle 3 zu entnehmen ist.

Die Temperatur bewegt sich dabei für die Befeldungen von 0 bis 2 W/kg in einem engen Bereich von circa  $\pm 0,1$  °C. Nur beim höchsten SAR Wert von 20 W/kg sinkt die Temperatur vorübergehend (circa 0,2 °C) jeweils beim Ausschalten der Befeldung zu den Zeitpunkten B1, B2 und N1.





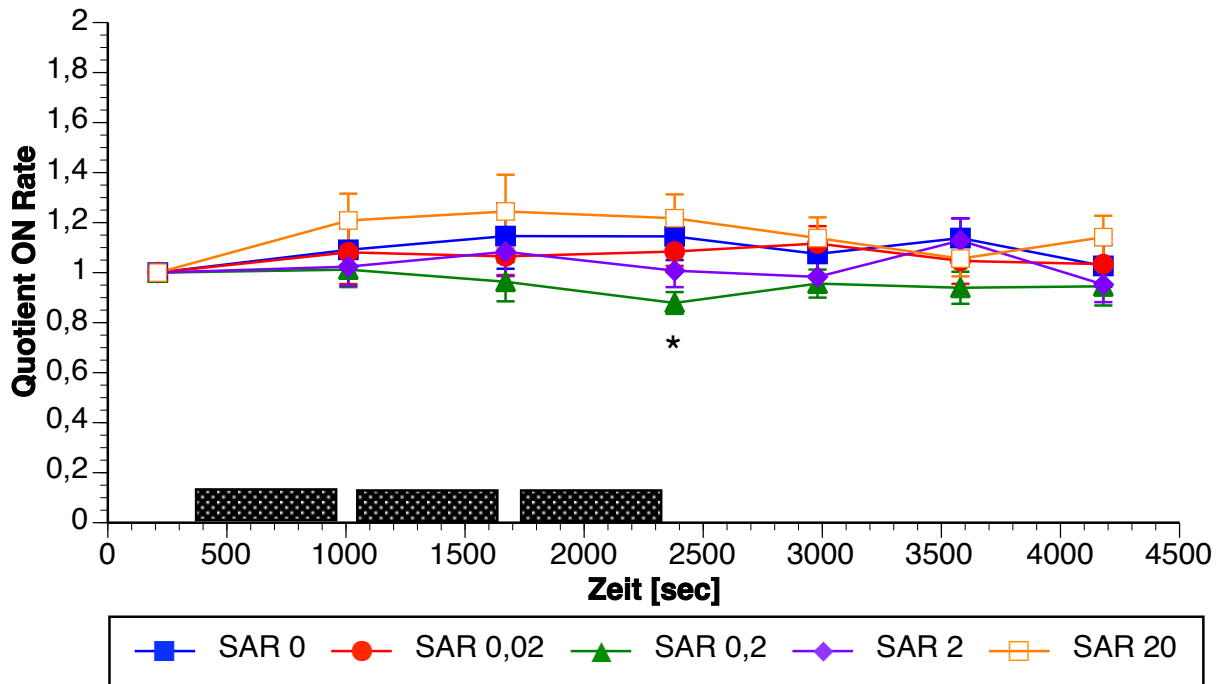
**Abb. 19:** Temperaturverlauf für UMTS direkt an der Retina gemessen für die verschiedenen SAR Befeldungswerte. Der Befeldungsblock mit Befeldungspausen ist durch die grauen Blöcke angedeutet. Jeweils Mittelwerte  $\pm$  S.D. (n siehe Tabelle 3; Anzahl der Retinae für die jeweiligen SAR Werte).

### 3.4.2 Vergleich der Antwortparameter

In den folgenden Abbildungen 20 – 23 wird der Verlauf der Antwortparameter beispielhaft über die gesamte Versuchsdauer dargestellt.

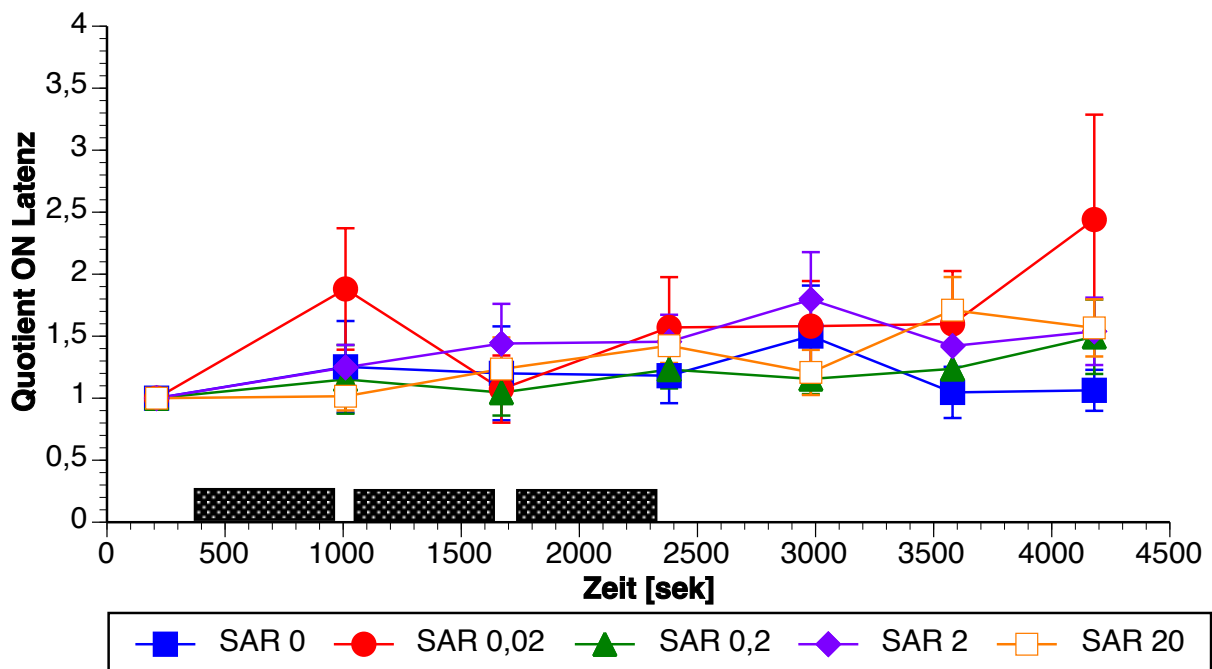
Die Beispieldiagramme beschränken sich dabei wie in den vorhergehenden Messreihen für GSM 900 MHz und GSM 1800 MHz auf eine Intensität von 16 lx und die Raten- bzw. Latenzquotienten ( $R_x/R_c$  und  $L_x/L_c$ ) für ON und OFF Antworten.

Abbildung 20 zeigt, dass die Raten der ON Antworten in der Kontrollgruppe (SAR = 0 W/kg) über den gesamten Versuchsverlauf sehr konstant sind und im Durchschnitt weniger als 20% schwanken. Der Quotient liegt durchgehend nahe 1. Ähnliches gilt für die Raten der ON Antworten bei den verschiedenen Befeldungen. Beim multiplen Mittelwertvergleich für die jeweiligen Messzeitpunkte (B1, B2, N1, N2, N3, N4) wurde bei dieser Intensität für die Befeldung 0,2 W/kg bei N1 ein signifikanter Unterschied ( $\alpha = 0,05$ ) zur Kontrollgruppe festgestellt (siehe Anhang 3).



**Abb. 20:** Verlauf des Quotienten der ON Rate  $R_x/R_c$  während des Versuchsverlaufs für die verschiedenen SAR Befehlungen für UMTS. Die grauen Blöcke symbolisieren die Befeldungsdauer. Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. (n siehe Tabelle 3; Anzahl Zellen für die verschiedenen SAR Werte). Intensität = 16 lx. Der Quotient für die Werte der ersten Messreihe C ist definitionsgemäß 1. Die folgenden Werte stammen aus den Messreihen B1, B2, N1, N2, N3 und N4.

Ähnliches gilt für den Quotienten der Latenzen der ON Antworten (Abb. 21), wobei auch hier wie bei GSM 900 MHz und 1800 MHz aufgrund des leichten Anstiegs der Messwerte eine Tendenz zu längeren Latenzen im Verlauf des Versuchs festzustellen ist. Für den Quotienten der ON Latenzen ist im multiplen Mittelwertvergleich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe bei 16 lx festzustellen (siehe Anhang 3).



**Abb. 21:** Verlauf des Quotienten der ON Latenz  $L_x/L_c$  während des Versuchsverlaufs für UMTS. Siehe Abb. 20

Die Quotienten der Antwortraten der OFF Antworten verhalten sich ähnlich wie diejenigen der ON Antworten, wobei die Schwankungen im Versuchsverlauf wie schon bei GSM 900 MHz und 1800 MHz sehr viel ausgeprägter sind (Abb. 22). Im gezeigten Beispiel existiert im multiplen Mittelwertvergleich ein schwach ( $0,5 > p > 0,01$ ) signifikanter Unterschied zwischen Befeldung mit 20 W/kg und Scheinbefeldung zum Zeitpunkt N3 nach der Befeldung (siehe Anhang 3).

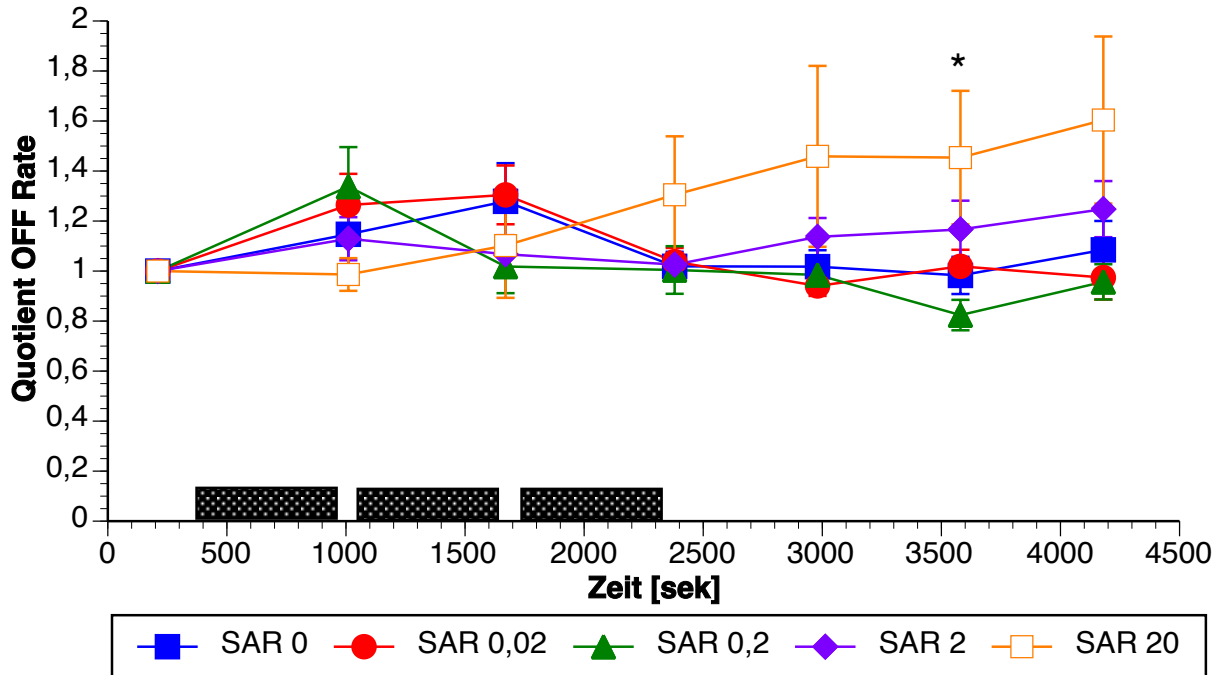


Abb. 22: Verlauf des Quotienten der OFF Rate  $R_x/R_c$  während des Versuchsverlaufs für UMTS. Siehe Abb. 20

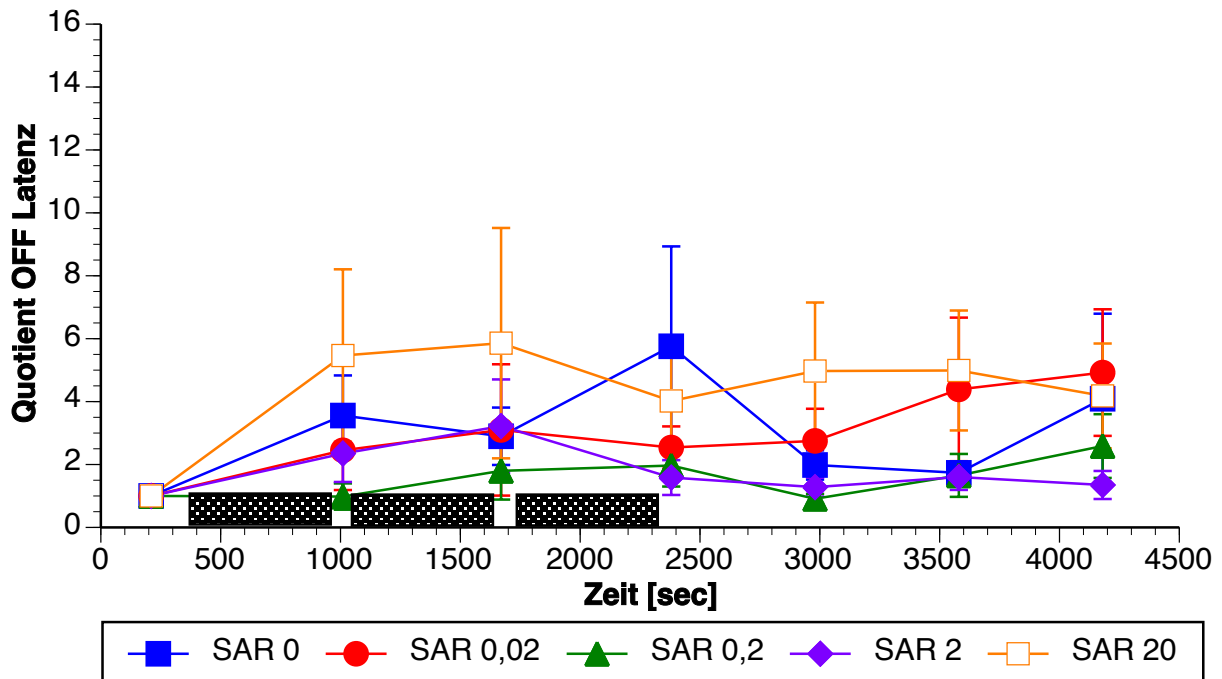


Abb. 23: Verlauf des Quotienten der OFF Latenz  $L_x/L_c$  während des Versuchsverlaufs für UMTS. Siehe Abb. 20

Extrem stark schwankt wiederum der Quotient der Latenzen in allen Gruppen bei den OFF Antworten (Abb. 23), sowohl in der Kontroll- als auch in den Befeldungsgruppen. Dies hat sich damit in allen Experimenten (GSM 900 MHz, 1800 MHz und UMTS) als durchgehender Effekt erwiesen. Für den Quotienten der OFF Latenzen ist im multiplen Mittelwertvergleich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe bei 16 lx festzustellen (siehe Anhang 3).

### **3.4.3 Vergleich der Scheinbefeldungen**

Für die endgültige Auswertung war ursprünglich geplant die Kontrollgruppen (= Scheinbefeldungen) der drei Versuchsreihen (GSM 900 MHz, GSM 1800 MHz, UMTS) zu einer Kontrollgruppe zusammenzufassen um das n für die Kontrollgruppe zu erhöhen. Dies setzt voraus dass sich die Messungen der Kontrollgruppen nicht unterscheiden. Die folgende Tabelle 4 zeigt den statistischen Vergleich der einzelnen Scheinbefeldungen miteinander. Als Test für diesen multiplen Mittelwertvergleich wurde der *Tukey-Kramer* HSD Test verwendet. Die Tabelle gibt an ob sich die Werte der Scheinbefeldungen jeweils voneinander unterscheiden. Dabei wurden die Messreihen T3 und T6 getrennt ausgewertet. Um die Darstellung übersichtlicher zu gestalten werden die Ergebnisse für alle Intensitäten und beide Messreihen (T3 und T6) jeweils in eine Tabelle integriert. Dabei wird nicht mehr zwischen T3 und T6 unterschieden. Für die Angabe eines signifikanten Unterschiedes genügt es wenn entweder in T3 oder T6, oder in beiden Messreihen Unterschiede gefunden wurden. Die Luxwerte in den Zellen bedeuten wiederum bei welchen Intensitäten signifikante Unterschiede gefunden wurden. So bedeutet zum Beispiel beim Vergleich GSM 900 mit GSM 1800 der Wert (\* 16lx) in der Spalte Quotient/ ON Antwort/ Rx/Rc für die Zeile B1, dass bei dieser Lichtintensität die Quotienten der ON Raten für die Intensität von 16 lx in der Befeldungspause B1 schwach signifikant unterschiedlich waren.

Schwach signifikante Unterschiede wurden bei 13 (GSM 900 vs. GSM1800 und UMTS vs. GSM1800) beziehungsweise 14 (GSM900 vs. UMTS) der jeweils 336 möglichen Antwort- und Reizparameterkombinationen gefunden. Dies liegt durchweg im Rahmen der durch die Irrtumswahrscheinlichkeit möglichen Fehler in der statistischen Aussage. Erhöhung des Signifikanzniveaus auf  $0,5 > p > 0,01$  führte zu keinen signifikanten Unterschieden. Auffällig ist allerdings dass sich der überwiegende Teil der gefundenen Unterschiede zu den späteren Zeiten (N1 – N4) findet, was eventuell doch darauf hindeuten könnte dass sich die Retinae bei den Versuchsreihen GSM900 MHz, GSM1800 MHz und UMTS hinsichtlich ihrer Langzeitstabilität unterscheiden könnten.

Auffällig ist wiederum, dass die Unterschiede überwiegend (30 von insgesamt 40; siehe Tabelle 4) in den Latenzdaten gefunden wurden.

Aufgrund dieser möglichen Unterschiede der Kontrollgruppen bei den verschiedenen Messreihen wurden bei der endgültigen Auswertung („GLMM“) die verschiedenen Scheinbefeldungen getrennt behandelt.

Vergleich Scheinbefeldung GSM 900 mit GSM 1800								
Messreihe	Differenz				Quotient			
	On Antwort		OFF Antwort		ON Antwort		OFF Antwort	
	$\Delta R$	$\Delta L$	$\Delta R$	$\Delta L$	Rx/Rc	Lx/Lc	Rx/Rc	Lx/Lc
B1	-	-	-	-	*16lx	-	-	-
B2	-	*445lx	-	-	-	-	-	*445lx
N1	-	*83lx	-	-	-	*83lx	-	-
N2	-	*16lx	-	-	-	-	*16lx	*0,5lx
N3	-	-	-	-	-	-	-	-
N4	-	*0,07lx *16lx	-	*16lx	-	*16lx	-	*0,5lx

Vergleich Scheinbefeldung GSM 900 mit UMTS								
Messreihe	Differenz				Quotient			
	On Antwort		OFF Antwort		ON Antwort		OFF Antwort	
	$\Delta R$	$\Delta L$	$\Delta R$	$\Delta L$	Rx/Rc	Lx/Lc	Rx/Rc	Lx/Lc
B1	-	-	-	-	-	-	-	-
B2	-	-	-	-	-	-	-	-
N1	*0,5lx	*2,66lx	*0,5lx	*16lx	-	-	-	-
N2	*0,5lx *445lx	*2,66lx	-	*0,07lx	-	-	-	-
N3	-	*2,66lx *445lx	-	-	-	*2,66lx *445lx	-	-
N4	-	-	*0,07lx	-	-	*0,07lx	-	-

Vergleich Scheinbefeldung UMTS mit GSM 1800								
Messreihe	Differenz				Quotient			
	On Antwort		OFF Antwort		ON Antwort		OFF Antwort	
	$\Delta R$	$\Delta L$	$\Delta R$	$\Delta L$	Rx/Rc	Lx/Lc	Rx/Rc	Lx/Lc
B1	-	-	-	*0,5lx	-	-	-	-
B2	-	*16lx	-	-	-	-	-	-
N1	-	*2,66lx	*0,5lx	-	-	-	-	-
N2	-	-	*0,5lx	-	-	-	-	-
N3	-	*2,66lx *445lx	-	-	-	*2,66lx *445lx	-	-
N4	-	*16lx	*0,5lx	-	-	*16lx	-	*2,66lx

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse des Vergleichs der Scheinbefeldungen GSM 900, GSM 1800 und UMTS. (-) = nicht signifikant. \* = schwach signifikant ( $\alpha = 0,05$ ). siehe auch Text.

## 4 Statistische Auswertung mit GLMM

Die endgültige statistische Analyse wurde auf der Basis eines „General Linear Mixed Models“ (GLMM) durchgeführt. Wie schon in den Methoden erwähnt wurden als abhängige Variablen die gemessenen Quotienten und Differenzen der Raten und Latenzen definiert. Dabei dienten die Raten beziehungsweise Latenzen der Messreihen vor der Befeldung jeweils als Referenz (Messreihen C vor Befeldung; siehe Abb. 3). Als feste experimentelle Haupteffekte wurden die SAR Werte, die Lichtintensität, die Messreihenfolge, und die Temperatur definiert. Als Zufallseffekt wurde die unit Nummer (= gemessene Ganglienzelle) in der Analyse berücksichtigt. Zusätzlich wurden alle möglichen Zwei-Weg Interaktionen getestet, da es durchaus möglich erscheint dass Effekte nur bei bestimmten Bedingungen auftreten.

Die Ergebnisse für die verschiedenen Frequenzen (GSM 900, GSM 1800, UMTS) sind getrennt für die Quotienten und Differenzen in den Tabellen 5 bis 10 dargestellt. Dabei sind in den Tabellen die Signifikanzen (p-Werte) aller Haupteffekte explizit angegeben, auch wenn keine signifikanten Effekte vorlagen. Für die Interaktionen sind der Übersichtlichkeit halber die p-Werte nur dann angegeben wenn die Signifikanz mindestens  $\leq 0,5$  betrug. Signifikante p-Werte bei denjenigen Haupteffekten und Interaktionen, bei denen SAR beteiligt ist, sind der Übersichtlichkeit halber rot markiert. Signifikante p-Werte bei allen anderen Haupteffekten und Interaktionen sind blau markiert. Interaktionen bei denen überhaupt keine signifikanten Effekte vorlagen wurden sukzessive aus dem Modell entfernt, da prinzipiell bei multiplen Regressionen das Modell so einfach wie möglich sein sollte.

### 4.1 Experimente GSM 900 MHz

Beim Vergleich der Tabellen 5 und 6 für die Quotienten und die Differenzen bei GSM 900 MHz fällt als erstes auf, dass die Zellen mit signifikanten p-Werten nicht immer übereinstimmen. Im Extremfall kann es vorkommen dass ein hochsignifikanter p-Wert in einer Tabelle in der entsprechenden Zelle der anderen Tabelle nicht signifikant ist (z.B.: die Interaktion Intensität\* Temperatur bei der RateOff X/C bzw. RateOff X-C; siehe Tabellen 5 und 6). Dies liegt darin begründet, dass mit Quotienten und Differenzen verschiedene Aspekte der Ganglienzellantworten gemessen werden. Die Quotienten stellen die relative Änderung bezüglich der Kontrollsituation vor der Befeldung dar, die Differenzen die absolute Änderung. Im letzteren Fall hängen die Ergebnisse somit sehr stark von den jeweiligen abgeleiteten Ganglienzellen ab. So kann z. B. eine relative, 10%ige Änderung der ON Rate bei einer Ganglienzelle mit einer Kontrollrate von 10 spikes/sek 1 spike bedeuten, bei einer Zelle mit 100 spikes/sek aber 10 spikes. Auch die Änderung der Mittelwerte (aller gemessenen Ganglienzellen) hängt im Falle der Differenzen sehr stark von den Absolutraten der einzelnen Ganglienzellen ab. Aus diesem Grunde ist es nicht überraschend, dass die statistischen Ergebnisse für diese beiden Aspekte der Ganglienzellantworten unterschiedlich ausfallen.

Bei der Differenz der OFF Raten (RateOff X-C) fällt ein einziger schwach signifikanter Haupteffekt von SAR auf, der bei den Quotienten nicht vorhanden ist.

Erstaunlicherweise stellt auch die Lichtintensität mit einer einzigen Ausnahme durchgehend sowohl bei den Quotienten als auch bei den Differenzen einen signifikanten Haupteffekt dar. Dies bedeutet dass die experimentelle Variable Intensität selbst die Quotienten und Differenzen verändern kann.

Als weiteres zeigt sich dass die angewandte Statistik offensichtlich sehr trennscharf ist. So zeigen die zum Teil hochsignifikanten Haupteffekte bei der Messreihenfolge und der Temperatur dass auch kleinste Änderungen detektiert werden. So wird die Änderung des Quotienten der On Latenz (LatenzON X/C in Tabelle 5) im Verlauf der Versuche zuverlässig als hochsignifikant eingestuft (vergleiche mit Abb. 11). Ebenso führen offensichtlich die leichten Schwankungen der Temperatur beim Ausschalten der Befeldungen zu teilweise signifikanten Haupteffekten der Temperatur.

Auffällig ist in beiden Tabellen 5 und 6 eine fast durchgehende hochsignifikante Interaktion SAR\*Intensität, die bis auf eine Ausnahme (RateOff X/C in Tabelle 5) parallel von signifikanten Interaktionen Intensität\*Temperatur begleitet wird. Weiterhin sind zwei signifikante Interaktionen SAR\*Messreihenfolge zu beobachten, eine davon ebenfalls von einer Interaktion Messreihenfolge\*Temperatur begleitet.

<b>GSM 900 Quotient</b>	<b>RateOnX/C</b>	<b>LatenzOnX/C</b>	<b>RateOffX/C</b>	<b>LatenzOffX/C</b>
<b>SAR</b>	0.492	0.053	0.920	0.177
<b>Intensität</b>	0.614	0.036	0.029	0.024
<b>Messreihenfolge</b>	0.101	0.001	0.091	0.808
<b>Temperatur</b>	0.280	0.135	0.243	0.030
<b>SAR*Intensität</b>	ns	0.001	0.001	0.001
<b>SAR*Messreihenfolge</b>	ns	ns	ns	ns
<b>Intensität*Messreihenfolge</b>	ns	ns	ns	ns
<b>Intensität*Temperatur</b>	ns	0.037	ns	0.023
<b>Messreihenfolge*Temperatur</b>	ns	ns	ns	ns

**Tabelle 5:** Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse des GLMM für die Quotienten der Raten und Latenzen für die ON und OFF Antworten bei GSM 900. In den einzelnen Zellen sind die p-Werte für die jeweiligen getesteten Quotienten und die entsprechenden Haupteffekte und Interaktionen angegeben. Signifikante p-Werte sind farbig dargestellt, wobei bei einer Beteiligung von SAR rot, und für alle anderen signifikanten Effekte blau gewählt wurde.  $p = 0,001$  bedeutet dabei allerdings dass die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p \leq 0,001$  ist, da das Programm Werte kleiner als 0,001 nicht mehr ausgibt.

<b>GSM 900 Differenz</b>	<b>RateOnX-C</b>	<b>LatenzOnX-C</b>	<b>RateOffX-C</b>	<b>LatenzOffX-C</b>
<b>SAR</b>	0.821	0.300	0.032	0.270
<b>Intensität</b>	0.041	0.017	0.001	0.003
<b>Messreihenfolge</b>	0.071	0.018	0.001	0.421
<b>Temperatur</b>	0.004	0.067	0.022	0.281
<b>SAR*Intensität</b>	0.001	0.001	0.001	0.001
<b>SAR*Messreihenfolge</b>	0.045	ns	0.001	ns
<b>Intensität*Messreihenfolge</b>	ns	ns	ns	ns
<b>Intensität*Temperatur</b>	0.043	0.018	0.001	0.003
<b>Messreihenfolge*Temperatur</b>	ns	ns	0.001	ns

**Tabelle 6:** Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse des GLMM für die Differenzen der Raten und Latenzen für die ON und OFF Antworten bei GSM 900. Siehe Tabelle 5.

## 4.2 Experimente GSM 1800 MHz

Beim Vergleich der Tabellen 7 und 8 für die Quotienten und die Differenzen bei GSM 1800 MHz gilt das Gleiche wie bei GSM 900 MHz, nämlich dass die Zellen mit signifikanten p-Werten nicht immer übereinstimmen. Die mögliche Erklärung ist entsprechend.

Im Falle von SAR wurden zwei schwach signifikante Haupteffekte bei den Quotienten von LatenzOn X/C und RateOff X/C detektiert (Tab. 7), die wiederum bei den Differenzen nicht vorhanden sind (Tab. 8).

Ebenso zeigen die signifikanten Haupteffekte bei Intensität, Messreihenfolge und Temperatur wiederum, dass diese Parameter an sich, zum Teil hochsignifikant, die Quotienten und Differenzen beeinflussen.

Auffällig ist wiederum, wie bei GSM 900 MHz, die durchgängig signifikante bis hochsignifikante Interaktion SAR\*Intensität, sowohl bei den Quotienten als auch bei den Differenzen. Der Vergleich mit der Interaktion Intensität\*Temperatur liefert bei GSM 1800 MHz allerdings nur zwei parallele Signifikanzen. Weiterhin ist eine Interaktion SAR\*Messreihenfolge schwach signifikant.



<b>GSM 1800 Quotient</b>	<b>RateOnX/C</b>	<b>LatenzOnX/C</b>	<b>RateOffX/C</b>	<b>LatenzOffX/C</b>
SAR	0.067	0.017	0.038	0.426
Intensität	0.001	0.234	0.001	0.006
Messreihenfolge	0.001	0.001	0.571	0.869
Temperatur	0.946	0.945	0.910	0.698
SAR*Intensität	0.001	0.029	0.001	0.001
SAR*Messreihenfolge	ns	ns	ns	ns
Intensität*Messreihenfolge	ns	ns	ns	ns
Intensität*Temperatur	ns	ns	ns	ns
Messreihenfolge*Temperatur	ns	ns	ns	ns

**Tabelle 7:** Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse des GLMM für die Quotienten der Raten und Latenzen für die ON und OFF Antworten bei GSM 1800. Siehe Tabelle 5.

<b>GSM 1800 Differenz</b>	<b>RateOnX-C</b>	<b>LatenzOnX-C</b>	<b>RateOffX-C</b>	<b>LatenzOffX-C</b>
SAR	0.584	0.165	0.103	0.665
Intensität	0.001	0.058	0.001	0.024
Messreihenfolge	0.001	0.005	0.038	0.501
Temperatur	0.071	0.648	0.005	0.697
SAR*Intensität	0.009	0.007	0.001	0.013
SAR*Messreihenfolge	0.018	ns	ns	ns
Intensität*Messreihenfolge	0.002	ns	ns	ns
Intensität*Temperatur	0.001	ns	0.001	ns
Messreihenfolge*Temperatur	ns	ns	0.039	ns

**Tabelle 8:** Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse des GLMM für die Differenzen der Raten und Latenzen für die ON und OFF Antworten bei GSM 1800. Siehe Tabelle 5

### 4.3 Experimente UMTS

Für die Unterschiede in den Tabellen der Quotienten und Differenzen (Tabellen 9 und 10) gilt entsprechend das für GSM 900 und 1800 MHz bemerkte. Es wurde kein signifikanter Haupteffekt des SAR Wertes gefunden.

Die Intensität und die Messreihenfolge stellen bei den Quotienten (Tab. 9) beziehungsweise bei den Differenzen (Tab. 10) signifikante Haupteffekte dar, ebenso wie die Temperatur in jeweils zwei Fällen, bei den ON Raten und den OFF Raten.

Bezüglich SAR fallen wiederum die hochsignifikanten Interaktionen SAR\*Intensität auf, welche in vier von fünf Fällen mit dem Temperaturhaupteffect parallel laufen. Außerdem sind wiederum zwei Interaktionen SAR\*Messreihenfolge signifikant.

UMTS Quotient	RateOnX/C	LatenzOnX/C	RateOffX/C	LatenzOffX/C
SAR	0.510	0.726	0.131	0.590
Intensität	0.321	0.005	0.018	0.014
Messreihenfolge	0.458	0.258	0.467	0.427
Temperatur	0.003	0.446	0.007	0.722
SAR*Intensität	0.001	ns	0.001	ns
SAR*Messreihenfolge	ns	ns	0.001	ns
Intensität*Messreihenfolge	ns	ns	ns	ns
Intensität*Temperatur	ns	ns	ns	ns
Messreihenfolge*Temperatur	ns	ns	ns	ns

**Tabelle 9:** Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse des GLMM für die Quotienten der Raten und Latenzen für die ON und OFF Antworten bei UMTS. Siehe Tabelle 5.

UMTS Differenz	RateOnX-C	LatenzOnX-C	RateOffX-C	LatenzOffX-C
SAR	0.835	0.495	0.075	0.307
Intensität	0.824	0.733	0.663	0.536
Messreihenfolge	0.001	0.035	0.004	0.536
Temperatur	0.001	0.300	0.001	0.519
SAR*Intensität	0.001	ns	0.001	0.001
SAR*Messreihenfolge	ns	ns	0.018	ns
Intensität*Messreihenfolge	ns	ns	ns	ns
Intensität*Temperatur	ns	ns	ns	ns
Messreihenfolge*Temperatur	ns	ns	ns	ns

**Tabelle 10:** Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse des GLMM für die Differenzen der Raten und Latenzen für die ON und OFF Antworten bei UMTS. Siehe Tabelle 5

#### **4.4 GLMM Gesamtauswertung**

Nur in drei von insgesamt 24 Fällen wurden schwach signifikante p-Werte für den Haupteffekt von SAR gefunden, alle drei bei den beiden GSM Standards (Tabellen 6 und 7). In allen drei Fällen gab es keine Übereinstimmung zwischen den Einflüssen auf Differenzen und Quotienten. Es traten keine hoch signifikanten p-Werte für den Haupteffekt von SAR auf, und es gab keine signifikanten Haupteffekte von SAR bei UMTS.

Zu erwähnen ist außerdem, dass sowohl für die Intensität als auch für die Messreihenfolge und die Temperatur verstreut signifikante bis hochsignifikante p-Werte auftraten. Dies gilt ebenfalls für einige Interaktionen dieser Haupteffekte (siehe Tabellen 5 - 10).

Die Tabellen zeigen dass mit Ausnahme von vier Fällen eine fast durchgängig hochsignifikante Interaktion SAR \* Intensität errechnet wurde (Tab. 5 - 10). Dies bedeutet, dass bei bestimmten SAR - Intensitätskombinationen Effekte auf die Quotienten beziehungsweise Differenzen der Raten respektive Latenzen vorliegen. Eine, beziehungsweise zwei Interaktionen SAR \* Messreihenfolge wurden ebenfalls bei den verschiedenen Frequenzen festgestellt (Tab. 6, 8, 9 und 10).

## 5 Diskussion

Die statistische Auswertung mit GLMM ergibt ein komplexes Bild, das nicht einfach zu interpretieren ist. Als erstes gilt festzuhalten dass die statistische Methode sehr empfindlich gegenüber Änderungen der experimentellen Variablen reagiert. So finden sich in 8 von 24 möglichen Fällen signifikante Haupteffekte der Temperatur, obwohl die Temperaturregulation nur sehr geringe mittlere Schwankungen von maximal  $\pm 0,5$  °C nach den Befeldungen beziehungsweise in den Befeldungspausen zuließ (siehe Abb. 9, 14 und 19). Auch die gefundenen signifikanten Haupteffekte für die Messreihenfolge in 11 von 24 möglichen Fällen lassen diesen allgemeinen Schluss zu. Die schwachen Veränderungen der Quotienten und Differenzen im Verlauf der Versuche (siehe z. B. Abb. 11 und 16) werden zuverlässig detektiert.

Offensichtlich erkennt das GLMM Effekte die an der Grenze des zur Zeit experimentell kontrollierbaren liegen. Kleine Veränderungen des Zustandes von Geweben *in vitro* lassen sich schwer kontrollieren. Im Falle der Temperatur heißt dies andersrum betrachtet allerdings auch, dass Temperaturschwankungen von wenigen zehnteln Grad zu statistisch messbaren Veränderungen in der Aktivität von Nervenzellen führen können. Dabei ist zu bedenken dass Temperaturschwankungen in dieser Größenordnung und darüber hinaus zum Beispiel als Folge der circadianen Rhythmik völlig normal sind und sich das Nervensystem offensichtlich auf entsprechende Änderungen der Aktivität von Neuronen eingestellt hat (Schmidt et al. 2007).

Für die vorliegende Fragestellung bedeutet dies wiederum, dass trotz der ausgefeilten Temperaturregulation nicht völlig eindeutig zwischen direkten Effekten der hochfrequenten Felder und Effekten aufgrund von minimalen Temperaturänderungen unterschieden werden kann. Dies liegt zum einen an der technischen Bedingung dass für jede Regulation eine zumindest vorübergehende, geringe Abweichung vom Sollwert nötig ist. Zum anderen konnte die Temperatur im Gewebe (der Retina) nicht direkt bestimmt werden, sondern der jeweilige Istwert musste direkt neben, aber eben doch außerhalb, der Retina gemessen werden. Es ist zu erwarten dass die Temperaturschwankungen im Gewebe während Befeldung zumindest solange etwas höher als in der umfließenden Ringerlösung sind, bis sich ein neues Temperaturgleichgewicht zwischen Ringerlösung und Retina eingestellt hat. Die Regulation an sich führte wiederum zu einem temporären Absinken der Temperatur (abhängig vom SAR Wert) nach den Befeldungen welche mit einer unbekanntem Zeitkonstante auch auf das Gewebe wirkt. Diese schwachen Temperaturschwankungen überlagern sich unvermeidbar mit eventuellen direkten Wirkungen der hochfrequenten Felder.

Allerdings ergeben sich aus den vorliegenden Daten doch Hinweise dass ein direkter Haupteffekt der hochfrequenten Felder nicht vorhanden, beziehungsweise so schwach ist, dass er an der statistischen Nachweisgrenze liegt. Bei allen 24 Möglichkeiten von Frequenzen und Messreihen wurden drei schwach signifikante Haupteffekte der SAR bei gefunden. Dies ist schon zahlenmäßig weit weniger als im Falle der Haupteffekte von Temperatur und Messreihenfolge. Zum anderen ist zu beachten dass die SAR Haupteffekte alle schwach signifikant waren. Bei einer multiplen Regression wie im Falle der GLMM ist, wie bei allen anderen statistischen

Methoden, aufgrund der Wahrscheinlichkeiten mit Fehlern der 1. und der 2. Art zu rechnen. Bei multiplen Regressionen sind diese Fehler schwerer abzuschätzen als bei einfachen Mittelwertvergleichen, da man nicht immer a priori von unabhängigen Variablen ausgehen kann. Im vorliegenden Fall sind Temperatur und SAR aufgrund der Versuchsdurchführung korreliert. Trotzdem lässt sich grob die Größenordnung des Fehlers 1. Art abschätzen (Grafen & Hails, 2006). Bei Annahme eines Signifikanzniveaus von  $p = 0,05$  ist bei vier Variablen und 24 multiplen Regressionen mit circa 4 - 5 unberechtigten Ablehnungen der Nullhypothese zu rechnen. Bei einem  $p$  von 0,01 sinkt die Zahl auf circa 1, und bei  $p = 0,001$  auf circa 0,1. Dies bedeutet für die Beurteilung der Haupteffekte (nur diese können auf diese Art und Weise betrachtet werden) in den Tabellen, dass signifikante ( $0,01 > p > 0,001$ ) und hochsignifikante ( $p < 0,001$ )  $p$ -Werte höchstwahrscheinlich nicht auf einem Fehler 1. Art beruhen, sondern Effekte der jeweiligen betrachteten Parameter darstellen. Dies gilt für die überwiegende Anzahl der Haupteffekte von Messreihenfolge (8 von 11) und Temperatur (6 von 8). Bei den schwach signifikanten Haupteffekten besteht wie erläutert die Unsicherheit des Fehlers 1. Art. Dies gilt insbesondere für die SAR Haupteffekte, die alle schwach signifikant waren, während bei Temperatur und Messreihenfolge die Überzahl von hochsignifikanten  $p$ -Werten den Umkehrschluss zulässt dass es sich auch bei den signifikanten und schwach signifikanten  $p$ -Werten um wirkliche Effekte handelt.

Überraschend sind die signifikanten Haupteffekte der Lichtintensität auf die Differenzen und Quotienten in 16 von 24 möglichen Fällen. Damit ist der Effekt der Intensität, welche die Antwortaktivität der Ganglienzellen widerspiegelt, deutlicher als der von Messreihenfolge und Temperatur. Dies war ursprünglich nicht zu erwarten, da man theoretisch annehmen muss, dass die Quotienten und Differenzen bei allen Intensitäten bei 1 beziehungsweise 0 liegen. Durch die gleichzeitige Analyse von SAR, Temperatur und Messreihenfolge kann dies auch kein Effekt dieser Variablen sein. Die Ursache dieses Haupteffektes der Intensität bleibt spekulativ. Trotzdem bleibt festzuhalten dass das System Retina durch unbekannte Faktoren ihren Zustand im Vergleich zur Kontrollsituation C verändert hat und auf verschieden intensive Belichtung verändert reagiert.

Die Interaktion SAR\*Intensität zieht sich, oft hochsignifikant, durch fast alle Messreihen und alle Frequenzen (in 20 von 24 möglichen Fällen). Dies bedeutet dass bestimmte Kombinationen von SAR und Intensität signifikant auf die Quotienten und Differenzen von Raten und Latenzen wirken. Die Interpretation dieses Effektes wird durch den Haupteffekt der Intensität und deren unbekannte Ursache stark erschwert. Spekulative Hinweise ergeben sich durch die Betrachtung ob verschiedene signifikante Effekte parallel auftreten.

Dabei ergibt sich in 14 von 20 Fällen dass die Intensität einen signifikanten Effekt hat, wenn auch die Interaktion SAR\*Intensität signifikant ist. Die hohe Zahl von signifikanten Interaktionen SAR\*Intensität korreliert also mit den signifikanten Haupteffekten der Intensität, deren Ursachen aber unbekannt sind. Im Falle der Parallelität von SAR mit SAR\*Intensität ergeben sich lediglich Übereinstimmungen in 3 von 20 Fällen. Höher sind die Übereinstimmungen für die Kombinationen Intensität\*Temperatur mit Intensität (8 von 16 Fällen), SAR\*Intensität mit Temperatur (8 von 20 Fällen) und Temperatur\*Intensität mit SAR\*Intensität (8 von 20 Fällen). Diese Zahlen könnten darauf hindeuten, dass durch SAR bewirkte, lokale

Temperaturveränderungen in der Retina entweder direkt, oder indirekt durch unbekannte Zwischenstufen, mit dem Intensitätseffekt interagieren. Lokale, intraretinale Temperaturänderungen werden eventuell nicht von der externen Temperaturmessung ausreichend registriert, so dass ein direkter Nachweis der Interaktion Temperatur\*Intensität erschwert ist.

Unterstützt wird diese Interpretation durch eine zusätzliche Auswertung mit GLMM unter Ausschluss von SAR 2 W/kg und 20 W/kg. Obwohl die höchsten Feldstärken fehlten traten wiederum drei Haupteffekte bei SAR auf, wobei einer anstatt bei GSM 1800 nun bei UMTS errechnet wurde. Dies deutet stark darauf hin dass dies statistische Fehler der 1.Art sind, da man eine Reduktion der signifikanten Effekte bei Ausschluß der höchsten SAR Werte erwarten sollte. Bei dem Haupteffekten der Intensität trat eine geringe Reduzierung von 16 auf 14 von 24 Fällen auf (87,5%). Stärker war die Reduktion der Haupteffekte der Temperatur von 8 auf 5 von 24 Fällen (62,5%). Dies kann dadurch erklärt werden dass der Ausschluss von 2 W/kg und 20 W/kg schwächere Temperatureffekte nach sich zieht. Die Reduktion des Haupteffektes der Temperatur lief parallel mit einer Reduktion der Interaktionen SAR\*Intensität (von 20 auf 15 von 24 Fällen; 75%) und Intensität\*Temperatur (von 8 auf 4 von 24 Fällen; 50%). Erwähnenswert ist außerdem dass unter diesen Auswertebedingungen die Anzahl der hochsignifikanten Effekte abnahm und proportional mehr signifikante bzw. schwach signifikante Effekte auftraten.

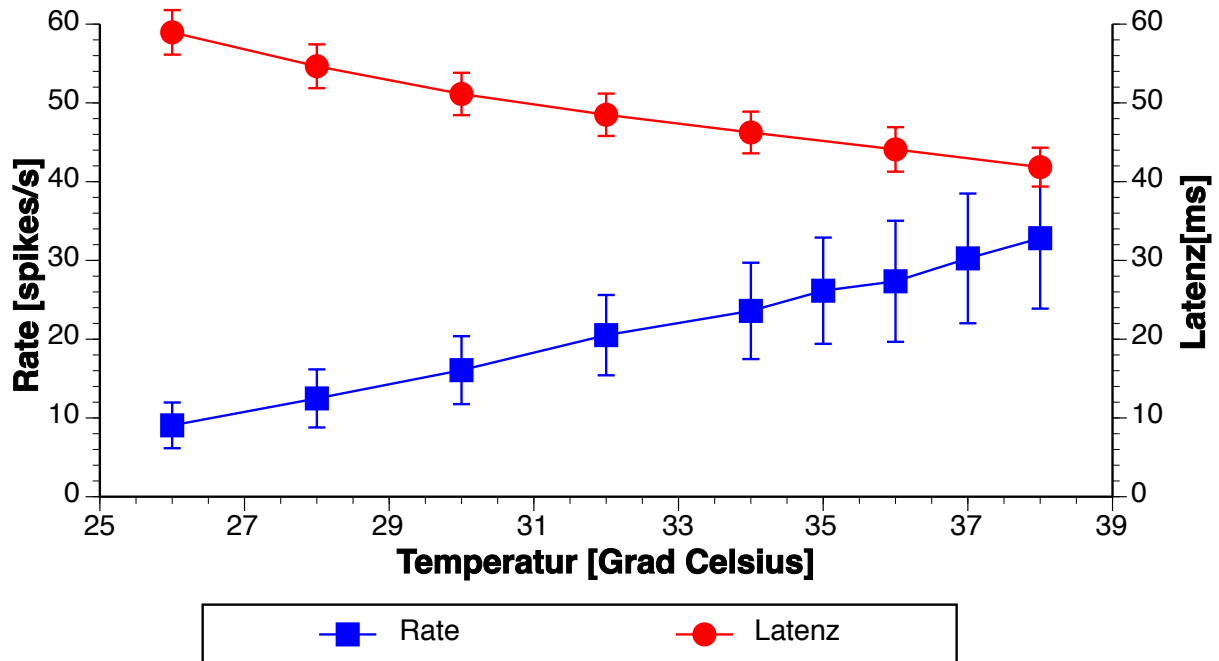
Zusammenfassend lässt sich anhand der statistischen Ergebnisse mit GLMM folgendes aussagen.

- Die stärksten Haupteffekte auf Veränderungen der Quotienten und Differenzen der Antwortraten und Latenzen bei möglichst konstanter Temperatur werden durch Intensität, Messreihenfolge und Temperatur verursacht.
- Der SAR Wert spielt, wenn überhaupt, als Haupteffekt eine untergeordnete Rolle.
- Der fast durchgehend signifikante Effekt der Interaktion SAR \* Intensität könnte durch einen schwachen indirekten, mit Befeldung korrelierenden Temperatureffekt erklärt werden. Diese Erklärung ist zum jetzigen Zeitpunkt allerdings noch spekulativ.

Die vorliegende Untersuchung bestätigt die Schwierigkeit direkte Effekte von hochfrequenten Feldern exakt von indirekten Temperatureffekten zu trennen (Foster & Glaser, 2007). Insbesondere lokale Erwärmung im Gewebe kann zum einen nur schwer gemessen und dann auch nicht sofort kompensiert werden. Dieser Schwierigkeit ist auch die Temperaturregulation des Körpers ständig ausgesetzt. Falls diese Temperaturänderungen mit der Aktivität von Neuronen auf nichtlineare Weise interagieren, wie es für das Nervensystem und die Retina zu erwarten ist (z.B. über die Nichtlinearität der Generierung von Aktionspotentialen über deren Schwellenpotential) könnten signifikante Interaktionen auftreten, die für bestimmte Kombinationen signifikante Aktivitätsänderungen verursachen.

Nervenzellen reagieren aufgrund der physikalisch-chemischen Mechanismen bei der synaptischen Übertragung und der Erregungsbildung grundsätzlich auf Temperaturänderungen. In der Retina zeigen Ganglienzellen im Durchschnitt bei Temperaturerhöhung eine Erhöhung der Antwortrate auf Lichtstimulation begleitet

von einer Erniedrigung der Latenz (Abb. 24). Zusätzlich zu physikalisch-chemischen Temperatureffekten aufgrund der klassischen Thermodynamik existieren in biologischen Systemen temperatursensitive Moleküle, welche in Neuronen Membrankanäle darstellen (sogenannte TRPV Kanäle). TRPV-ähnliche Kanäle wurden unter anderem auch in der Retina nachgewiesen, so dass eine hohe Temperatursensitivität der retinalen Verarbeitung im Bereich von zehnteln Grad durchaus im Bereich des Möglichen liegt (Yazulla & Studholme, 2007).



**Abb. 24:** Abhängigkeit der Antwortrate (blau) und Antwortlatenz (rot) von retinalen ON Ganglienzellen von der Temperatur. Lichtintensität 448 lx. Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. (n = 19)

Abschließend sollte noch betont werden, dass Temperaturänderungen von mehreren zehnteln Grad im Körper und auch im Nervensystem den Regelfall darstellen (Heldmaier & Neuweiler, 2004). Das Nervensystem hat sich offensichtlich auf diese Temperaturschwankungen eingestellt, welche prinzipiell die Aktivität von Nervenzellen beeinflussen. Andererseits sollte natürlich eine künstliche, vor allem auch länger andauernde Erwärmung des Gewebes durch hochfrequente Felder minimiert werden. Die vorliegende Studie zeigt dass Temperaturänderungen im Bereich von  $\pm 0,5$  Grad Celsius durchaus schon zu akuten, statistisch nachweisbaren Änderungen der Aktivität von Nervenzellen führen können. Insofern ist eine möglichst geringe Erwärmung im Nervengewebe erstrebenswert.

## 6 Literatur

- Cnaan A, Laird NM, Slasor P (1997) Using the General Linear Mixed Model to Analyze Unbalanced Repeated Measures and Longitudinal Data. *Statistics in Medicine* 16:2349-2380.
- Dowling J (1987) *The Retina: An Approachable Part of the Brain*. The Belknap Press of Harvard University Press, Cambridge MA.
- Foster KR, Glaser R (2007) Thermal Mechanisms of Interaction of Radiofrequency Energy with Biological Systems with Relevance to Exposure Guidelines. *Health Physics* 92: 609-620.
- Grafen A, Hails R (2006) *Modern Statistics for the Life Sciences*. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Heldmaier G, Neuweiler G (2004) *Vergleichende Tierphysiologie, Band 2*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Krueger C, Tian L (2004) A Comparison of the General Linear Mixed Model and Repeated Measures ANOVA Using a Dataset with multiple missing data points. *Biol Res Nurs* 6:151-157.
- Quian Quiroga R, Nadasdy Z, Ben-Shaul Y (2004) Unsupervised Spike Detection and Sorting with Wavelets and Superparamagnetic Clustering. *Neural Computation* 16:1661–1687.
- Rodieck RW (1998) *The First Steps in Seeing*. Sinauer Associates, Sunderland MA.
- Schmidt RF, Lang F, Thews G (2007) *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Völgyi B, Deans MR, Paul DL, Bloomfield SA (2004) Convergence and Segregation of the Multiple Rod Pathways in Mammalian Retina. *J Neurosci* 24:11182–11192
- Yazulla S, Studholme KM (2007) Vanilloid Receptor Like 1 (VRL1) Immunoreactivity in Mammalian Retina: Colocalization with Somatostatin and Purinergic P2X1 Receptors. *J Comp Neurology* 474:407– 418.