

ABSCHLUSSBERICHT

Forschungsvorhaben des Bundesamts für Strahlenschutz

Thema:

In Vivo – Experimente unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation – A Langzeituntersuchungen.

Vorgelegt vom Forschungsverbund EMVU GbR (ARGE TUM/LMU)
Technische Universität München (TUM)
Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU)
Klinikum rechts der Isar der TUM

Inhalt

Übersicht.....	1
Arbeitsbericht Projektgruppe „Befeldung“.....	7
Tierhaltung, Reproduktion und physische Entwicklung.....	30
Kognition.....	61
Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke und Zahl der CA1-Neuronen.....	113
Untersuchungen zum potentiellen Einfluss auf das Immunsystem und die Stressbelastung.....	161

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

München
Dezember 2007

1 ÜBERSICHT

Bei diesem vom Bundesamt für Strahlenschutz geförderten Forschungsvorhaben handelt es sich um ein Gemeinschaftsprojekt des Forschungsverbundes Elektromagnetische Verträglichkeit, Mensch und Umwelt (EMVU) der Technischen Universität München und der Ludwig-Maximilians-Universität München.

TU/LMU-EMVU Forschungsverbund der Technischen Universität (TU) und der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München (alphabetisch)

Michael Bornhausen¹, Jürgen Detlefsen³, Christine Engmann², Michael Erhard², Tina Gärtner¹⁺, Nina Hettenbach¹⁺, Catrin Kahlfeld²⁺, Christian Kögler⁵, Sabine Okorn^{1*}, Otto Petrowicz⁴, Simon Schelkshorn³, Janine Schneider¹⁺, Judith Schreiner²⁺, Mehdi Shakarami^{1*}, Manfred Stangassinger¹, Manfred Stohrer¹, Simon Tejero^{3*}, Caroline Wöhr²

(Die mit einem Stern [*] gekennzeichneten Personen sind vor dem Ende des Forschungsvorhabens ausgeschieden; die mit einem Pluszeichen [+] gekennzeichneten Personen sind erst nach Beginn des Vorhabens dem Forschungsverbund beigetreten.)

Institutszugehörigkeit

¹Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung und ²Institut für Tierschutz, Tierhygiene und Tierhaltung, Tierärztliche Fakultät, Ludwig-Maximilians-Universität (LMU), München; ³Institut für System- und Schaltungstechnik, Fachgebiet Hochfrequente Felder und Schaltungen (HFS), Technische Universität (TU), München, Germany; ⁴Institut für experimentelle Onkologie und Therapieforchung, Klinikum r.d. Isar, TU München, Germany; ⁵ck3d-IT solutions, Emmering, Germany

1.1 Einleitung

Ziel der Studie war es, den Einfluss langfristiger Befeldung auf Lern- und Gedächtnisleistungen, auf die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS), auf die Zahl der CA1-Neuronen im Hippocampus, auf Immun- und Stressreaktionen sowie auf Reproduktions- und Entwicklungsparameter zu untersuchen. Als Tiermodell dienten Laborratten vom Wistar-Hannover Stamm, welche hierfür über drei Generationen hinweg, von ihrer Zeugung bis zum

Abschluss der Untersuchungen der chronischen Einwirkung von Feldern des GSM -(900 MHz) oder des UMTS- (1966 MHz) Mobilfunksystems ausgesetzt waren.

Befeldet bzw. scheinbefeldet wurde in eigenen Kammern (GSM, UMTS, Sham), die entsprechend den Rahmenbedingungen einer kontrollierten Langzeitbefeldung und den Vorgaben der Experimentatoren (ausreichende Tierzahlen, Klimatisierung etc.) konstruiert wurden. Die für die Exposition der Versuchstiere verwendete spezifische Absorptionsrate (SAR) von 0,4 W/kg entspricht dem Grenzwert für eine berufliche Ganzkörperexposition des Menschen und liegt damit deutlich oberhalb des Grenzwertes von 0,08 W/kg für die Ganzkörperbefeldung der allgemeinen Bevölkerung. Bei Einhaltung dieses Wertes können nach bisherigem Kenntnisstand thermische Effekte auch im Tiermodell sicher ausgeschlossen werden.

Wegen der Empfindlichkeit des ZNS gegenüber schädigenden Einflüssen, insbesondere auch während der vorgeburtlichen Entwicklung, konzentrierte sich ein Teil der Untersuchungen mit der Erfassung von Änderungen bei spezifischen Lern- und Gedächtnisleistungen auf die Darstellung von Einflüssen der chronischen Befeldung auf komplexe Funktionsabläufe im Gehirn, die viele Ansatzmöglichkeiten für schädigende Einflüsse bieten

Spezifische Einflüsse auf die strukturelle Integrität des ZNS sollten darüber hinaus anhand der sehr selektiven Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) sowie anhand der Zahl der CA1-Neuronen im Hippocampus erfasst werden. Die Integrität der BHS ist eine wesentliche Grundbedingung für die uneingeschränkte Funktion des Gehirns, da sie die Nervenzellen vor toxischen Stoffen im Blut abschirmt. Eine Öffnung der BHS kann zum Absterben von Nervenzellen führen.

Die CA1-Neuronen im Hippocampus gehören zu den empfindlichsten Zellen des Gehirns und sind für Lern- und Gedächtnisleistungen essentiell. Für eine Langzeitstudie ist die Darstellung der Zahl dieser Neuronen besonders geeignet, weil über die lange Befeldungszeit bereits eine geringe akute Schädigung zu einer deutlichen Verringerung der verbleibenden Neuronenzahl führen kann.

Das Immunsystem steht als ebenfalls äußerst komplexes körpereigenes Abwehrsystem in ständigem Kontakt mit seiner Umwelt. Die Immunantwort wird dabei von zahlreichen exogenen oder auch von endogenen Faktoren, wie dem Stressgeschehen, nachhaltig beeinflusst. Zwischen Stressreaktionen und dem Immunsystem besteht demnach eine enge wechselseitige

Beziehung. So kann akuter, kurzzeitiger Stress stimulierend auf das Immunsystem wirken, wohingegen chronischer Stress zu einer Immunsuppression führen kann. Die Fähigkeit des Organismus, über spezifische Äußerungen des Immunsystems und/oder vorprogrammierte Stressreaktionen auf unterschiedlichste Umwelteinflüsse spontan aber auch differenziert zu reagieren, gilt als fundamentale Voraussetzung für das Überleben des Organismus in einer sich ständig ändernden Umwelt.

1.2 Zusammenfassung

Ein neues Konzept für die chronische Exposition von Ratten mit elektromagnetischen Feldern (EMFs) des Mobilfunks, das sowohl die Befeldungsvorgaben als auch die tierexperimentellen Bedürfnisse in vollem Umfang ermöglichte, konnte eigeninitiativ mit Hilfe von drei Expositionskammern (GSM, UMTS, Scheinexposition) und einer entsprechenden Anordnung parabolischer Reflektoren mit defokussierten Primärstrahlern umgesetzt werden. Auf diese Weise gelang es, eine ausreichende Anzahl von Tieren (40 Käfige pro Kammer) gleichzeitig durch eine quasi-ebene Welle mit hoher Homogenität zu befelden. Die Unterbringung in geschirmten Kammern schloss Störungen durch externe Felder oder eine gegenseitige elektromagnetische Beeinflussung aus. Variationen in der Stärke der Exposition wurden simulativ und durch Messungen untersucht. Die Anteile der Leistungsdichte, die direkt vom Reflektor erzeugt werden und die, die durch die benachbarten Tiere gestreut werden, wurden getrennt voneinander gemessen. In mehreren Simulationen für unterschiedliche Mehr-Ratten Szenarien wurde die jeweilige Ganzkörper-SAR beschrieben.

Alle biologischen Untersuchungen wurden nach spezifischen tierexperimentellen Vorgaben an drei Rattengenerationen im Doppelblind-Design durchgeführt. Männliche und weibliche Ratten der Generationen F0, F1 und F2 wurden automatisch nachts unter Rechner-Kontrolle mit verschiedenen operanten Verhaltenstests in standardisierten Skinner'schen Testkäfigen zunächst im Alter von 10 Wochen geprüft. Die Ratten der F0-Generation wurden im Alter von 10 Monaten erneut getestet. Aus den nach verschiedenen Verfahren analysierten Untersuchungsergebnissen zu den "kognitiven" Fähigkeiten der Versuchstiere ließ sich nicht ableiten, dass eine chronische Exposition durch GSM- oder UMTS-EMFs des Mobilfunks zu Änderungen der operanten Verhaltensleistung von Ratten führen, die als Beeinträchtigungen der Lernfähigkeit oder der Gedächtnisleistung interpretiert werden könnten.

Reaktionen im Immunsystem bzw. im Stressgeschehen und die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) wurden bei den Generationen F0b und F2 nach 4-monatiger Exposition und bei der Generation F0a nach 11-monatiger Exposition untersucht.

Die spezifische humorale Reaktion des Immunsystems wurde mittels einer Suspension aus den Antigenen Ovalbumin (OVA) und Huhn Immunglobulin Y (IgY), sowie einem Lipopeptid-Adjuvans (Pam3CysSerLys4) getestet. Die Antikörperreaktionen (Gesamt IgG, Anti-OVA, Anti-IgY,) wurden mittels verschiedener spezifischer ELISA-Systeme bestimmt. Im Vergleich der unterschiedlichen Expositionsgruppen (GSM, UMTS, Sham) gab es mit einer Ausnahme (Gesamt IgG, Gruppe F2, GSM > SHAM, $p < 0,05$) keine signifikanten Unterschiede.

Für die Untersuchungen zum Stressgeschehen wurde ein standardisierter und etablierter Stressor (ACTH) eingesetzt. Die Messung des Kortikosterons im Blutserum der Versuchstiere erfolgte mittels eines indirekten kompetitiven ELISA-Systems. Dabei traten nur in der F0b-Gruppe beim Stressgeschehen signifikante Unterschiede auf, die in der analog lang exponierten F2-Gruppe und in der länger exponierten F0a-Gruppe nicht gefunden wurden. Da dieser Unterschied somit ein nicht reproduzierbarer Zufallsbefund war, lassen die Ergebnisse den Schluss zu, dass chronische EMFs mit GSM- bzw. UMTS-Charakteristik bei der Ratte keine Dauerstress-ähnliche Belastung darstellen.

Die quantitative Darstellung der Integrität der BHS erfolgte mit Hilfe der unidirektionalen Influxkonstante (K_{in}) für sieben Hirnareale (*bulbus olfactorius, cerebellum, medulla oblongata, pons, mesencephalon, diencephalon und cortex*) der jeweils linken und rechten Hemisphäre. Dabei wurde als Marker die schnell diffundierende ^{14}C -markierte Saccharose eingesetzt, die eine sehr hohe Nachweisempfindlichkeit ermöglichte. In keiner der untersuchten Tiergenerationen (F0b und F2) traten Unterschiede zwischen den K_{in} -Werten der GSM-, UMTS- und Kontrollgruppe auf. Weder die unterschiedliche Expositionsdauer von vier oder elf Monaten (Vergleich F0a mit F2), noch die kontinuierliche Exposition über mehrere Generationen (Vergleich F0b mit F2) führten zu signifikanten Unterschieden bei der BHS-Integrität.

Die Zahl der CA1-Neuronen im Hippocampus wurde in der Generation F1 nach 7-monatiger Exposition untersucht. Auch hier wurden keine Unterschiede zwischen der GSM-, UMTS- und Kontrollgruppe gefunden.

Die lebenslange Bestrahlung von drei aufeinander folgenden Rattengenerationen mit GSM- und UMTS-EMFs der Mobilfunkkommunikation mit einer SAR von 0,4 W/kg hatte keinen messbaren

Einfluss auf die untersuchten biologischen Parameter. Weder bei der Kognition, dem Immunsystem, den Stresshormonen, der Integrität der BHS noch bei den CA1-Neuronenzahlen konnten systematische Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen gefunden werden.

1.3 Summary

A new setup for long-term exposure of rats in their home-cages to electromagnetic fields (EMFs) of mobile communication was constructed that fulfilled the requirements of exposure specifications and those of the guidelines for animal experiments. It featured defocused parabolic reflectors in three individual exposure chambers (GSM, UMTS, sham) and permitted to expose simultaneously a sufficient number of rats (40 cages per chamber) under quasi-plane wave and high homogeneity conditions. Measurements showed that appropriate shielding provided high isolation levels against external fields and among the individual exposure chambers. Potential variations of the actual exposure levels were determined by measurements and simulations. Power density variations resulting directly from the reflector and those scattered at the neighbouring cages were measured separately. Several simulations of different multi-rat scenarios were characterized to determine specific whole body-SAR levels.

All biological measurements were conducted according to the specific experimental requirements in three rat generations in a double-blind-design.

Coded male and female rats of the generations F0, F1 und F2 were tested for cognitive deficits in standardized operant-behavior test chambers by different nocturnal computer-controlled schedules of reinforcement at the age of 10 weeks. The rats of the F0-generation were tested again at the age of 10 months. A multivariate analysis of the experimental results focused on final scores and on the dynamics of test requirement acquisition. The comparison of the different exposure groups and the three generations, however, did not show any significant EMF-induced changes of learning ability or memory.

Reactions of the immune system and of stress parameters as well as the integrity of the blood-brain-barrier (BBB) were investigated in the rats of the F0b and F2 generations after EMF-exposure of 4 months and in the F0a -group after exposure of 11 months .

The specific humoral reaction of the immune system was tested by injection of the antigens Ovalbumin (OvA) and chicken immunoglobulin Y (IgY) in combination with the lipopeptide adjuvant Pam3CysSerLys4. The corresponding antibodies (total IgG, anti-OVA titer, anti-IgY titer) were determined by different specific ELISA-systems. Comparing the different exposure groups (GSM, UMTS, sham) with one exception (total IgG, group F2, GSM > sham, $p < 0.05$) no significant differences were found.

In order to investigate stress reactions a standardized and well established stressor (ACTH) was applied. Serum corticosterone was measured by an indirect competitive ELISA-system. Only the group F0b showed significantly different stress reactions, which could not be confirmed in the analogously long exposed F2 group and in the longer exposed F0a-group. The results indicate, that chronic exposure with GSM- and UMTS- EMFs does not induce chronic stress.

A quantitative evaluation of the BBB integrity in seven brain areas (*bulbus olfactorius, cerebellum, medulla oblongata, pons, mesencephalon, diencephalon and cortex*) of the left and right hemispheres was ascertained by the use of the radioactive marker ^{14}C -saccharose, allowing a high sensitivity of the method. No differences between the unidirectional influx constants (K_{in}) of the three groups (GSM, UMTS and sham) were found in any of the investigated rat generations (F0b and F2). Neither the longer duration of exposure from four to eleven months (F0a vs. F2), nor the continuous exposure of several generations (F0b vs. F2) did result in significant differences of the of BBB-integrity.

CA1-neurons, a particularly sensitive cell population in the hippocampus, were counted in the F1-generation following an EMF-exposure of seven months. Again, no differences between GSM-, UMTS- or sham-exposed rats were found.

The livelong exposure of three consecutive generations of rats with GSM- and UMTS-EMFs with a SAR of 0.4 W/kg did not change the investigated biological parameters. The data of cognition, the immune system, the stress hormones, the BBB-integrity as well as numbers of CA1-neurons failed to show any systematic differences between the experimental groups.

2 ARBEITSBERICHT PROJEKTGRUPPE „BEFELDUNG“

*Technische Universität München
Lehrstuhl für Hochfrequenztechnik
Fachgebiet Hochfrequente Felder und Schaltungen*

Simon Schelkshorn

Simón Tejero Alfageme

Jürgen Detlefsen

Inhalt

2.1	Einleitung	8
2.2	Ausgangslage	8
2.3	Befeldungsanlage	9
2.3.1	Einleitung	9
2.3.2	Befeldungskonzept	9
2.3.3	Feldsimulation	12
2.3.4	Aufbau	14
2.3.5	Messung der Feldverteilung	15
2.3.6	Sendesignale	18
2.3.7	SAR Simulation	19
2.4	Durchführung	22
2.4.1	Monitoring während der Versuche	22
2.4.2	Befeldungsdauern	22
2.5	Zusammenfassung/Summary	27
	Literatur	28

2.1 Einleitung

Im Rahmen des vom Bundesamt für Strahlenschutz geförderten Forschungsprojektes übernahm das Fachgebiet für Hochfrequenzfelder und Schaltungen (HFS) am Lehrstuhl für Hochfrequenztechnik der Technischen Universität München das Teilprojekt der Befeldungsanlage.

Die Aufgaben umfassten im Detail

- Den Entwurf, Aufbau und Bereitstellung der Befeldungsanlage zur gleichzeitigen Befeldung von drei Versuchsgruppen (GSM, UMTS, Sham),
- die lückenlose Überwachung der Anlage während des gesamten Versuchszeitraumes, sowie
- die Protokollierung aller die Befeldung beeinflussenden Ereignisse.

2.2 Ausgangslage

Im Laufe der Antragstellung wurde dem BfS angeboten, die Exposition der Versuchstiere (Wistar-Ratten) in speziellen Expositionskammern durchzuführen, die von der Deutschen Telekom zur Verfügung gestellt werden sollten. Vorgesehen war vorerst eine Bereitstellung von drei Kammern für die erste Generation F0 und weitere 6 Kammern für die nachfolgenden Tiergenerationen F1 und F2. Die Deutsche Telekom hat die ersten drei Kammern zugesagt und eine spätere Bereitstellung der weiteren Expositionseinrichtungen in Aussicht gestellt. Nach dem Erhalt der ersten drei Kammern wurde dem Forschungsnehmer von Seiten der Deutschen Telekom mitgeteilt, dass zum in Frage kommenden Zeitpunkt keine weiteren Kammern zur Verfügung stehen. Nachdem die Kosten für den Nachbau der benötigten Befeldungskammern die zur Verfügung stehenden Mittel überschritten, wurde entschieden eine eigene Befeldungsanlage zu konzipieren.

2.3 Befeldungsanlage

2.3.1 Einleitung

Die Konzeption und die Realisierung der Befeldungsanlage erfolgt entsprechend dem Forschungsvorhaben unter den Rahmenbedingungen einer kontrollierten Langzeitbefeldung über einen Zeitraum von 20 Monaten mit annähernd 24 Stunden Befeldungsdauer pro Tag. Die Versuchstiere werden in drei Gruppen unterteilt:

- eine Gruppe mit Befeldung nach dem GSM-Standard bei einer Frequenz von 900MHz,
- eine Gruppe mit Befeldung nach dem UMTS-Standard bei 1966MHz, und
- eine Kontrollgruppe (Sham).

Pro Gruppe müssen minimal 100 Tiere gleichzeitig befeldet werden können. Die Anlage muss für alle drei Gruppen identisch aufgebaut sein.

Die oben genannten Anforderungen an den Befeldungszeitraum erzeugen weitere Rahmenbedingungen für die Befeldungsanlage. Die einzelnen Gruppen müssen voneinander getrennt sein. Um gleiche und konstante Bedingungen für alle Gruppen zu erhalten, muss eine entsprechende Klimatisierung vorgesehen sein. Des Weiteren muss ein einfacher Zugang zu allen Käfigen sichergestellt sein um die tägliche Pflege der Tiere zu ermöglichen.

Zum Zweck der Vergleichbarkeit mit anderen Experimenten und einer möglichen Verifikation der Ergebnisse sollen die Tiere mit einer linear polarisierten, ebenen Welle befeldet werden.

2.3.2 Befeldungskonzept

Der gewählte Ansatz entspricht dem Prinzip des „compact range“ das aus dem Bereich der Antennenmesstechnik bekannt ist um eine ebene Welle in relativ kurzen Abständen von der Quelle zu erzeugen. Genutzt wird ein parabolischer Reflektor um eine sphärische Wellenfront ausgehend vom Brennpunkt des Paraboloids in eine ebene Wellenfront zu wandeln. Aufgrund der geringeren Anforderungen bei der Befeldung im Vergleich zur Vermessung von Antennen ist es nicht erforderlich, einen Reflektor mit extrem hoher Genauigkeit zu verwenden. Zum Einsatz kommt daher ein parabolischer Reflektor aus dem Massenmarkt mit einem Durchmesser von 3,20m bei einer Brennweite von 1,12m. Der Einsatz eines herkömmlichen Reflektors reduziert auch deutlich die Kosten für die Befeldungsanlage.

Voraussetzung für die Erzeugung einer ebenen Welle ist, dass der Reflektor durch den Primärstrahler im Brennpunkt gleichmäßig ausgeleuchtet wird. Aufgrund des geringen

Verhältnisses der Brennweite zum Durchmesser des Paraboloids, wäre hierfür ein Öffnungswinkel des Primärstrahlers von 142° erforderlich. Eine gleichmäßige Ausleuchtung des gesamten Reflektors hätte des Weiteren den Nachteil, dass die entstehende ebene Welle durch am Rand des Reflektors gestreute Anteile des einfallenden Feldes gestört werden würde. Der Einfluss des Reflektorrandes alleine könnte mit hohem mechanischem Aufwand durch das Anbringen eines gezackten Randes, sog. „serrations“, reduziert werden (siehe Abb. 2.1).



Abb. 2.1: Serrations am Rand des Reflektors.

Alternativ, und im Befeldungskonzept umgesetzt können beide der oben erwähnten Probleme durch den Einsatz eines defokussierten Primärstrahlers gelöst werden. Der Primärstrahler wird in Richtung des Reflektors verschoben. Die dadurch entstehende Wellenfront ist nun nicht mehr vollständig eben, kann aber im Volumen eines einzelnen Käfigs noch als eben betrachtet werden (Abb. 2.2 und 2.3). Der auszuleuchtende Teil des Spiegels und somit der erforderliche Öffnungswinkel des Primärstrahlers können damit reduziert werden. Durch den geringeren Öffnungswinkel erfolgt auch die Beleuchtung des Reflektorrandes mit geringerer Intensität. Die gestreuten Anteile haben somit ebenfalls einen geringeren Einfluss auf die erzeugte Quasi-Ebene-Welle. Wird darüber hinaus auch der Bereich in dem die befeldeten Käfige untergebracht sind (Expositionsbereich) noch etwas vom Reflektor entfernt, so können Einflüsse durch vom Primärstrahler in Richtung des Expositionsbereichs abgestrahlte Felder weiter verringert werden.

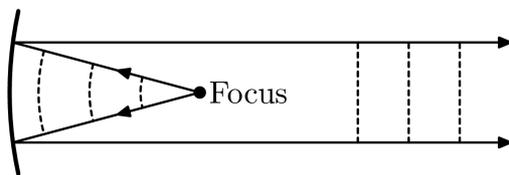


Abb. 2.2: Reflektierte Wellenfront mit fokussiertem Primärstrahler.

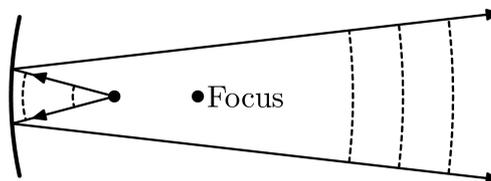


Abb. 2.3: Reflektierte Wellenfront mit defokussiertem Primärstrahler.

Aufgrund der einfachen Realisierung und dem großen erzielbaren Öffnungswinkel wird als Primärstrahler ein im Grundmode TE_{10} betriebener, offener Hohlleiter eingesetzt. Der Hohlleiter wird durch einen Monopol angeregt und besitzt zusätzlich noch eine metallische Fläche um die Apertur um die nach hinten abgestrahlten Anteile des Feldes zu reduzieren.

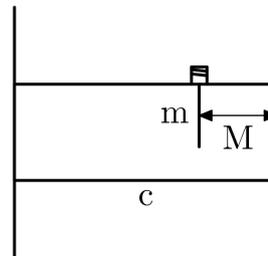
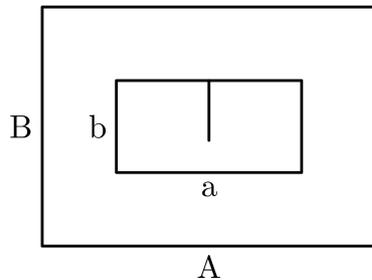


Abb. 2.4: Frontansicht des offenen Hohlleiters mit Bemaßung.

Abb. 2.5: Seitenansicht des offenen Hohlleiters mit Bemaßung.

Die in den Abb. 2.4 und 2.5 eingezeichneten Maße ergeben sich für die beiden genutzten Frequenzen entsprechend Tabelle 2.1 zu

Tab. 2.1: Hohlleiterabmessungen für 900 MHz und 1966 MHz.

	900MHZ	1966MHZ
A	20CM	9,5CM
A	36CM	17,5CM
B	10CM	5CM
B	26CM	13CM
C	27CM	12CM
M	6,5CM	2,9CM
M	8CM	3,4CM

Der optimale Abstand, um den der Primärstrahler vom Brennpunkt aus in Richtung des Reflektors verschoben werden muss, wurde simulativ bestimmt. Hierfür wurde der gesamte Aufbau mithilfe eines Feldsimulators, wie im nachfolgenden Abschnitt beschrieben, simuliert. Im Zuge dieser Simulationen wurde das elektrische Feld in dem für 40 Käfige ausreichendem Befeldungsvolumen für unterschiedliche Defokussierungsabstände d_z berechnet. Aus den

Simulationsergebnissen wurde für den jeweiligen Aufbau (GSM oder UMTS) der Abstand gewählt, der zur geringsten relativen Abweichung der elektrischen Feldstärke geführt hat. Für den GSM-Aufbau muss $d_z = 48\text{cm}$, für den UMTS-Aufbau $d_z = 60\text{cm}$ gewählt werden.

Der gesamte Aufbau der drei Befeldungsanlagen ist in elektromagnetisch geschirmten Kammern untergebracht (vgl. Abb. 2.10 und Abb. 2.11). Die Kammern dienen zur Entkopplung der einzelnen Versuchgruppen voneinander und zur Unterdrückung von externen Einflüssen. Die Innenseiten der Kammern sind mit Absorbermaterial bedeckt um eine Reflexion der sich ausbreitenden ebenen Welle an den Kammerwänden zu verhindern. Die Versuchstiere sind in Käfigen mit einer Größe von $24 \times 28,5 \times 42,5 \text{ cm}^3$ (H x B x L) untergebracht. Diese Käfige werden so auf ein Holzregal gestellt, dass die Vorderseite der Käfige in Richtung des Reflektors zeigt.

2.3.3 Feldsimulation

Vor dem Aufbau der Befeldungskammern wurde die zu erwartende Feldverteilung in den Kammern simuliert.

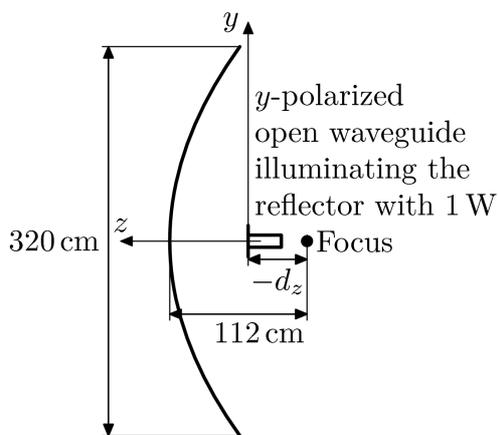


Abb. 2.6: Seitenansicht des simulierten Aufbaus.

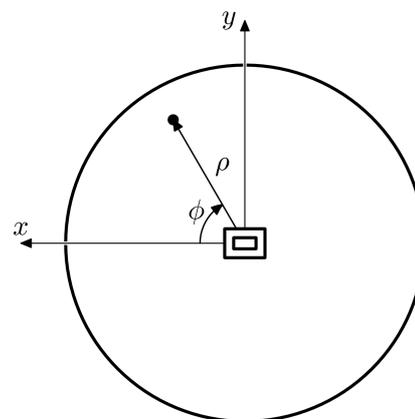


Abb. 2.7: Frontansicht des simulierten Aufbaus.

Das zugrunde liegende Modell wie in den Abb. 2.6 und 2.7 gezeigt, wurde mit dem Softwarepaket FEKO¹ simuliert. FEKO ist ein HF-Feldsolver der auf der Momentenmethode (MoM) basiert. Die Diskretisierung der Struktur war besser als $\lambda_0/12$ für den Hohlleiter ($\lambda_0/15$

¹ Version 4.2

in der Nähe des Speisepunktes) und besser als $\lambda_0/5$ für den Reflektor ($\lambda_0/12$ im Bereich 25cm um den Scheitelpunkt). Die Simulationsergebnisse für die Vorderseite des Regals sowie für die Ebene mit $x=0$ sind in den Abb. 2.8 und Abb. 2.9 zu sehen. Eine Zusammenfassung der wichtigen Ergebnisse zeigt Tab 2.2. Die maximale Phasenabweichung bezogen auf die Ebene Welle im Volumen eines einzelnen Käfigs beträgt 12° . Die Standardabweichung der Leistungsdichte p im gesamten befeldeten Volumen für insgesamt 40 Käfige beträgt 14,9% im GSM Aufbau und 15,5% im UMTS Aufbau.

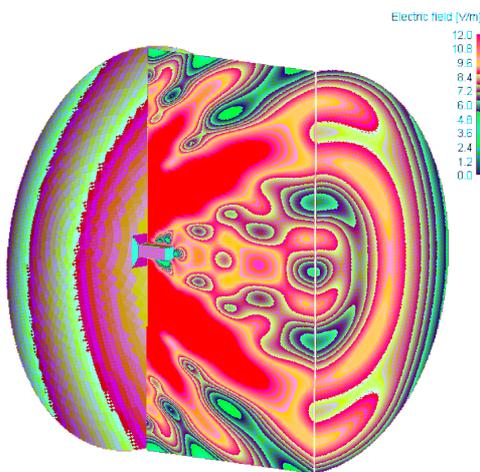


Abb. 2.8: Simulationsergebnisse für das elektrische Feld in der Ebene $x=0$ und $z=-127$ cm, GSM Aufbau.

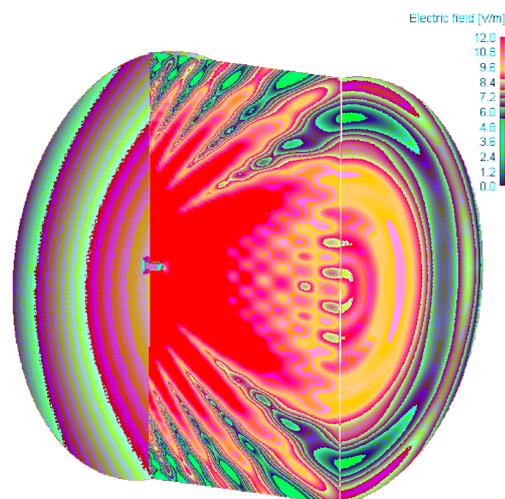


Abb. 2.9: Simulationsergebnisse für das elektrische Feld in der Ebene $x=0$ und $z=-184$ cm, UMTS Aufbau.

Tab. 2.2: Simulationsergebnisse für den GSM und UMTS Aufbau.

Parameter	GSM Aufbau	UMTS Aufbau
Frequenz	900MHz	1966MHz
Befeldungsvolumen	$-222\text{cm} < z < -172\text{cm}$ $15\text{cm} < \rho < 125\text{cm}$	$-234\text{cm} < z < -184\text{cm}$ $15\text{cm} < \rho < 125\text{cm}$
Defokussierungsabstand d_z	48cm	60cm
Mittelwert der el. Feldstärke $ \vec{E} $	7,15 V/m	7,96 V/m
Standardabw. der el. Feldst. $ \vec{E} $	7,50%	7,85%
Standardabw. der Leistungsd.	14,9%	15,5%
Maximaler Phasenfehler bezogen auf ebene Welle	12°	12°
S_{11}	-14dB	-22dB

2.3.4 Aufbau

Der Aufbau der drei Befeldungskammern erfolgte auf dem Gelände der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig Maximilian Universität in München.

Die drei Kammern wurden in einem gemeinsamen Raum aufgebaut. Die Zuführung der HF-Leistung erfolgt aus Gründen der Lärmreduzierung für die Versuchstiere durch Löcher im Boden. Die Klimaanlage ist ebenfalls zentral im Versuchsraum installiert und versorgt alle drei Kammern gemeinsam, sowie die im Nebenraum aufgebauten Versuchsanlagen. Somit wird erreicht, dass das Klima in allen Kammern nur im Rahmen der Einstellgenauigkeit der einzelnen Luftzuführungen voneinander abweicht.

Nach der Fertigstellung der metallischen Kammern, aber vor der Anbringung des Absorbermaterials im Inneren der Kammern wurde die Schirmdämpfung gemessen. Diese lag bei allen Kammern bei Werten größer 100dB. Aus diesem Grund können externe Felder, wie z.B. die von den vom benachbarten Olympiaturm abgestrahlten TV-Sendern, vernachlässigt werden. Das niederfrequente 50Hz Magnetfeld wurde ebenfalls gemessen und liegt innerhalb der Kammern überall unter 100nT. Der s_{11} Parameter am Speisepunkt der beiden befeldeten Kammern beträgt -14dB beim GSM Aufbau und -22dB bei UMTS.

Abb. 2.12 und Abb. 2.13 zeigen Fotos des fertigen Aufbaus.

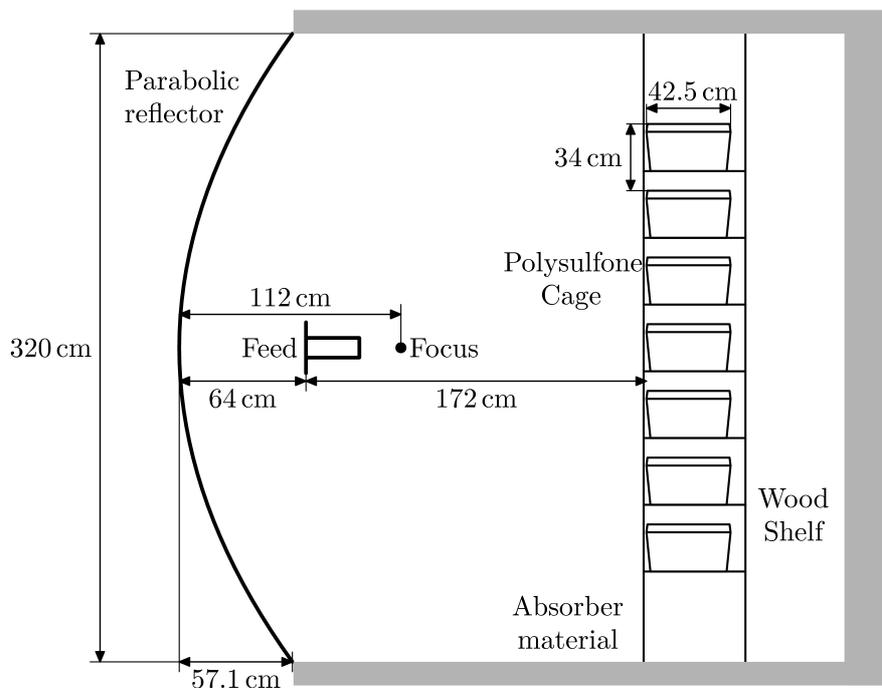


Abb. 2.10: Befeldungsaufbau für GSM bei 900MHz.

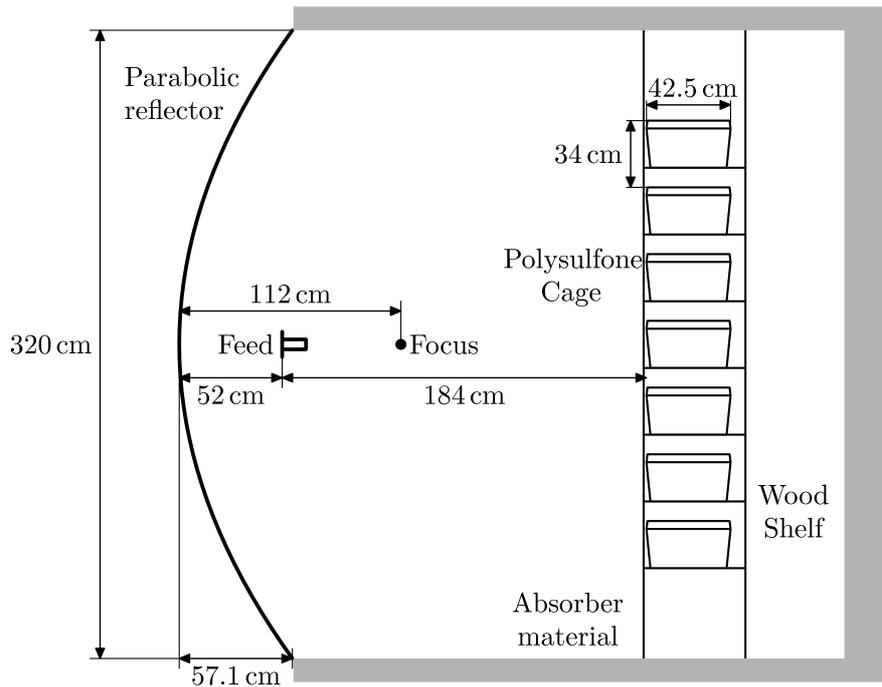


Abb. 2.11: Befeldungsaufbau für UMTS bei 1966MHz.



Abb. 2.12: Außenansicht der Kammern 1 und 2.



Abb. 2.13: Blick in eine Befeldungskammer, links: Regal mit Tierkäfigen, rechts: Reflektor mit Primärstrahler.

2.3.5 Messung der Feldverteilung

Nach Fertigstellung der drei Befeldungskammern wurde eine Messkampagne durchgeführt, um die bisher nur simulativ bestimmten Feldverteilungen in den Befeldungsvolumina zu verifizieren.

Als Messantennen kamen jeweils wieder offene Hohlleiter in ihrem Grundmode TE_{10} zum Einsatz. Die Aperturgrößen waren $20 \times 10\text{cm}^2$ für den Aufbau bei 900MHz sowie $8,6 \times 4,3\text{cm}^2$ für den Aufbau bei 1966MHz. Durch die Nutzung von Aperturantennen ist ein Integrationseffekt bei der Messung der lokalen Feldverteilung zu erwarten. Die Größe der Aperturen sind aber vergleichbar mit der Größe der befeldeten Tiere, somit wird davon ausgegangen, dass die gemessenen Ergebnisse mit der tatsächlichen Exposition der Tiere weitgehend übereinstimmt.

Es wurden pro Kammer zwei Messreihen durchgeführt. Während der ersten Messreihe befanden sich keine Tiere in der Kammer. Die Messantenne wurde nacheinander auf alle möglichen Käfigpositionen im Holzregal gestellt, wobei die Apertur der Antenne an der Vorderseite des Regals in Richtung des Reflektors ausgerichtet war (vgl. Abb. 2.14). So wurde die Leistungsdichte bestimmt, die durch die Befeldungsanlage an sich an den jeweiligen Käfigpositionen erzeugt wird. Die Standardabweichung der gemessenen Leistungsdichte an den 40 besten Käfigpositionen, d.h. diejenigen Positionen mit den höheren Feldstärken, betrug 14% im GSM Aufbau und 27% im UMTS Aufbau. In der zweiten Messkampagne wurden alle zur eigentlichen Messposition benachbarten Käfigpositionen mit voll besetzten Tierkäfigen bestückt. Hier wurden insgesamt vier Messungen durchgeführt. Als erstes wurde die Antenne genauso wie in der ersten Messreihe an der Vorderseite des Regals mit Blickrichtung zum Reflektor ausgerichtet (Messrichtung „vorne“). Dann jeweils eine Messung mit der Apertur in Richtung des linken Käfigs (Messrichtung „links“, vgl. Abb.2.15) bzw. in Richtung des rechten Käfigs (Messrichtung „rechts“). Bei der vierten Messung wurde die Antenne wieder in Richtung zum Reflektor ausgerichtet, dieses mal aber auf der Höhe der Käfigrückseite, also 42cm hinter der Vorderseite des Regals (Messrichtung „hinten“).

Zum Vergleich wurden an einigen Messpunkten Messungen über mehrere Stunden hinweg durchgeführt. Die Mittelwerte der Messungen mit und ohne Tiere für die Messrichtung „vorne“ stimmen überein. Die gesamte Standardabweichung der Exposition aufgrund der benachbarten Tiere wurde durch

$$\sqrt{\sigma_{\text{vorne}}^2 + \sigma_{\text{links}}^2 + \sigma_{\text{rechts}}^2}$$

berechnet und ergab eine Abweichung von 7% bei GSM und 4% bei UMTS (normiert auf die Messungen ohne Tiere).



Abb. 2.14: Messantenne im UMTS Aufbau bei Messung ohne Tiere.



Abb. 2.15: Messantenne im GSM Aufbau bei Messung mit Tieren, Messrichtung „links“.

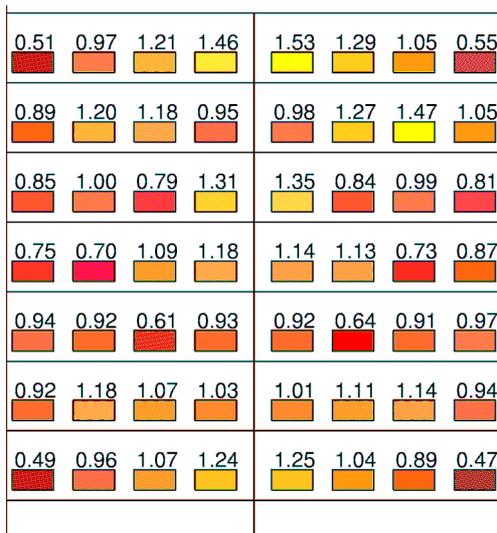


Abb. 2.16: An jeder Käfigposition im Holzregal gemessene Leistungsdichte normiert auf den globalen Mittelwert, GSM Aufbau.

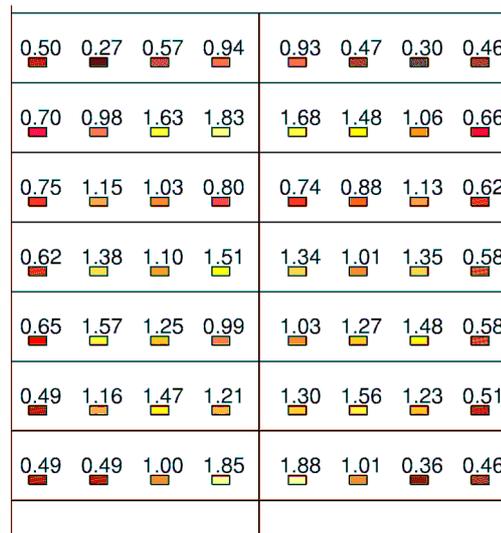


Abb. 2.17: An jeder Käfigposition im Holzregal gemessene Leistungsdichte normiert auf den globalen Mittelwert, UMTS Aufbau.

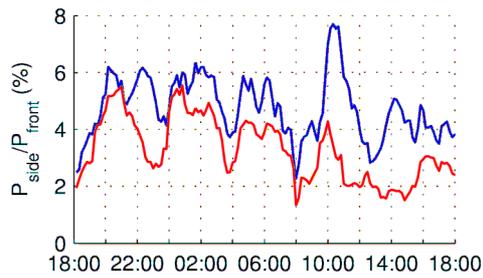


Abb. 2.18: Gemessene Leistungsdichte mit vollbesetzten Tierkäfigen um die Messposition. Statistik auf Basis von Datensätzen der Länge 1h. Normiert auf die Messung ohne Tiere. GSM Aufbau.

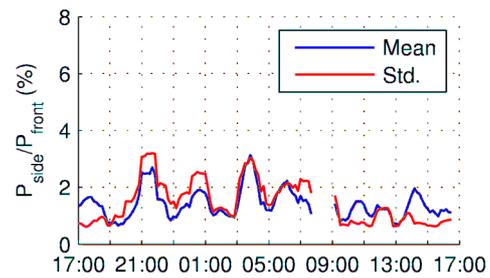


Abb. 2.19: Gemessene Leistungsdichte mit vollbesetzten Tierkäfigen um die Messposition. Statistik auf Basis von Datensätzen der Länge 1h. Normiert auf die Messung ohne Tiere. UMTS Aufbau.

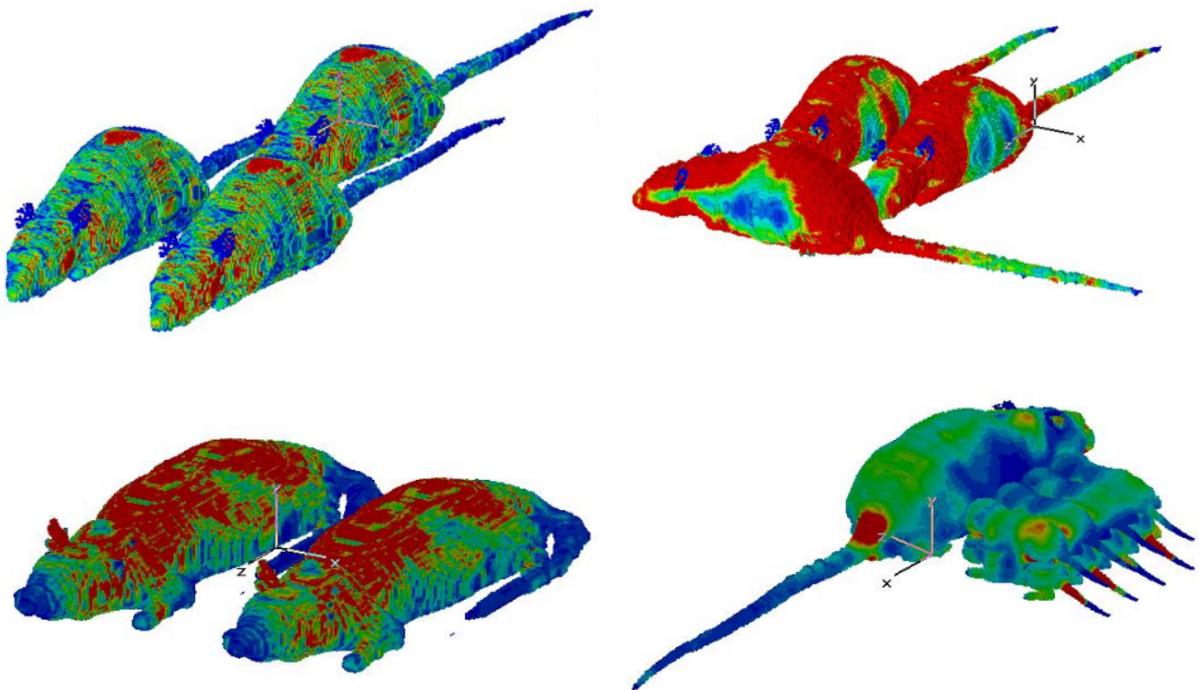


Abb. 2.20: Beispiele der simulierten Anordnungen von Ratten.

2.3.6 Sendesignale

Die Tiere wurden mit standardkonformen GSM und UMTS Signalen exponiert. Zur Erzeugung des GSM Signals kam ein Vektor Signalgenerator SMIQ der Firma Rohde&Schwarz zum

Einsatz. Der Signalgenerator wurde hierfür mit entsprechenden Optionen ausgestattet. Erzeugt wurde eine Standard-GSM-Modulation mit 270,833 kSymbolen/s. Belegt wurden alle 8 Zeitschlitze, wobei das Daten-Feld jeweils mit Pseudo Noise belegt wurde. Für das UMTS Signal stand ein generischer UMTS Signal Generator GUS 6960S der Universität Wuppertal zur Verfügung [1, 2]. Die Mittenfrequenz des GSM Signals wurde auf 900MHz festgelegt, die des UMTS Signals betrug 1966MHz. Die Ausgangssignale der Generatoren wurden mit entsprechenden Leistungsverstärkern der Firma Bonn Elektronik GmbH verstärkt (GSM: BLWA 8996-175, UMTS: BLMA 1921-200) und anschließend den beiden befeldeten Kammern zugeführt.

Da das UMTS Signal keine konstante Signalamplitude besitzt, spielen Nichtlinearitäten des Leistungsverstärkers eine wichtige Rolle. Um Verzerrungen durch den Verstärker zu charakterisieren, wurde der Crestfaktor am Ein- und am Ausgang des Verstärkers verglichen. Im Falle der maximal möglichen Ausgangsleistung wird der Crestfaktor um maximal 3dB reduziert.

Die in beide Kammern eingespeiste Leistung wurde während des gesamten Versuchszeitraumes alle 10 Sekunden gemessen und protokolliert. Details hierzu im entsprechenden Kapitel weiter hinten.

2.3.7 SAR Simulation

Durch die Simulations- und die Messergebnisse besteht die Möglichkeit einen Zusammenhang zwischen der den Befeldungskammern zugeführten Leistungen und den in den Befeldungsbereichen erreichten elektrischen Feldstärken bzw. Leistungsdichten herzustellen. Die allgemein übliche Bezugsgröße für die Beurteilung von Exposition durch elektromagnetische Felder ist aber die sog. Spezifische Absorptionsrate (SAR). Die in diesem Forschungsprojekt angestrebte Ganzkörper SAR, also die über den gesamten Tierkörper gemittelte SAR, beträgt 0,4 W/kg. Der Zusammenhang zwischen der am Ort des Tieres vorhandenen Leistungsdichte und Ganzkörper SAR kann nur simulativ ermittelt werden. Hierfür wurden hochauflösende, inhomogene Voxel-Modelle der Ratten in das Programm CST Microwave Studio², einem numerischen HF Feldsimulator basierend auf der Methode der Finiten Integrationstechnik (FIT), importiert. Es standen insgesamt drei Voxel Modelle von Sprague-Dawley³ Ratten für die Simulationen zur Verfügung: eine ausgewachsene, männliche Ratte, eine ausgewachsene weibliche Ratte und ein 7 Tage altes Ratten-Baby (vgl. Tab. 2.3).

² Version 5.02

³ Rattenmodell identisch mit Wistar Ratten im Bezug auf die SAR Simulation

Auf Basis dieser Modelle wurden eine Vielzahl von Szenarien mit unterschiedlichen Anordnungen von Ratten erstellt: eine einzelne männliche Ratte, eine einzelne weibliche Ratte, ein einzelnes Ratten-Baby, vier unterschiedliche Szenarien mit jeweils drei weiblichen Ratten, zwei Szenarien mit jeweils zwei männlichen Ratten und zwei Szenarien mit jeweils einer weiblichen Ratte zusammen mit acht Ratten-Babys. Einige Beispiele der simulierten Anordnungen zeigt Abb. 2.20. Jedes erstellte Szenario wurde insgesamt 6-mal simuliert, dreimal bei GSM und dreimal bei UMTS. Dabei wurde jeweils eine ebene Welle aus der Richtung einer der drei Koordinatenachsen angenommen. Die Ergebnisse der Ganzkörper SAR Simulationen sind in Tab. 2.4 zusammengefasst. Es kann angemerkt werden, dass die Variation der Ganzkörper SAR selbst unter idealen Bedingungen 45% beträgt. In den Szenarien mit nur einem Tier beträgt die Variation 50% bei GSM und 26% bei UMTS. Somit kann zusammengefasst werden, dass der Hauptgrund für die Variation der Ganzkörper SAR die Bewegung der Tiere in den Käfigen ist. Diese Bewegung ist aber eine zwingende Voraussetzung für Langzeit, *in vivo* Experimente.

Tab. 2.3: Genutzte Voxel Modelle.

Modell	Gewicht / g	Voxelauflösung ($d_x \times d_y \times d_z \text{ mm}^3$)
Sprague-Dawley, männlich	370	0,39 x 0,39 x 0,43
Sprague-Dawley, weiblich	275	0,5 x 0,5 x 0,5
Sprague-Dawley, Baby	15	0,5 x 0,5 x 0,5

Tab. 2.4: Ergebnisse der Ganzkörper SAR Simulationen. Statistik aus den vier Szenarien mit 3 weibl. Ratten und den zwei Szenarien mit 2 männl. Ratten (insgesamt 48 Fälle pro Frequenz).

Parameter	900MHz	1966MHz
Ganzkörper SAR, Mittelwert für $ \vec{E} = 1 \text{ V/m}$	$3,82 \cdot 10^{-5} \text{ W/kg}$	$3,68 \cdot 10^{-5} \text{ W/kg}$
Standardabweichung	41%	45%
Erforderliche $ \vec{E} $ für Ganzk. SAR = 0,4 W/kg	102 V/m	104 V/m
Erforderliche Eingangsleistung	172W	161W
SAR Effizienz	$0,0023 \text{ W} \cdot \text{kg}^{-1}/\text{kg}$	$0,0025 \text{ W} \cdot \text{kg}^{-1}/\text{kg}$

Tab. 2.5: Variation in der Ganzkörper SAR.

Ursache	900MHz	1966MHz
Käfigposition in der Kammer	14%	27%
Benachbarte Tiere	7%	4%
Größe und Ausrichtung der Tiere im Käfig	> 42%	> 45%

Wie bereits erwähnt wurde die Befeldung der Tiere auf eine Ganzkörper-SAR von 0,4 W/kg ausgelegt. Aufgrund der großen Anzahl von möglichen Tierszenarien über die zur Festlegung der dem Aufbau zugeführten HF-Leistung gemittelt wurde, ergeben sich für Einzelfälle, abhängig von der Anordnung der Tiere und deren Ausrichtung bezogen auf das Feld, SAR-Werte, die von den zu erreichenden 0,4 W/kg abweichen.

Nachfolgende Tabelle (Tab. 2.6) gibt einen Überblick über die Minimal- und Maximalwerte der SAR die aus der Gesamtzahl der simulierten Einzelfälle entnommen sind. Da die Ausrichtung der Tiere zum Feld im Experiment nicht festgelegt ist, wurde pro Einzelfall über die drei orthogonalen Einfallrichtungen gemittelt. Die Einzelfälle wurden für die Tabelle in zwei Gruppen zusammengefasst.

- Gruppe A, adulte Tiere: ein einzelnes weibliches Tier, ein einzelnes männliches Tier, drei weibliche Tiere, zwei männliche Tiere
- Gruppe B, Jungtiere: acht Jungtiere mit Abstand zwischen den Tieren, acht Jungtiere ohne Abstand

Tab. 2.6: Minimal- und Maximalwerte der SAR.

Gruppe	SAR minimal, GSM (W/kg)	SAR maximal, GSM (W/kg)	SAR minimal, UMTS (W/kg)	SAR maximal, UMTS (W/kg)
A	0,33	0,51	0,37	0,41
B	0,13	0,27	0,46	0,80

Es wurde auch der Einfluss eines subkutanen Transponders mit den Abmessungen 12 x 2 x 2mm³ auf eine einzelne Ratte untersucht. Die maximale Abweichung der Ganzkörper SAR verursacht durch den Transponder betrug 1,25% bei GSM und 0,6% bei UMTS. Die Transponder können also ohne größere Auswirkungen auf die Gesamtbefeldung zur Identifikation der einzelnen Tiere genutzt werden.

2.4 Durchführung

2.4.1 Monitoring während der Versuche

Während der Durchführung des gesamten Projektes wurde eine andauernde, automatische Überwachung der Befeldungsanlage sowie eine Protokollierung des Anlagenzustandes durchgeführt. Aufgezeichnet wurde die den beiden befeldeten Kammern zugeführte Eingangsleistung und die Statusbits der beiden Leistungsverstärker (Mains, Remote, RF On/Off und Error). Unabhängig davon wurden besondere Ereignisse (z.B. Defekt eines Gerätes) in einer Liste protokolliert.

2.4.2 Befeldungsdauern

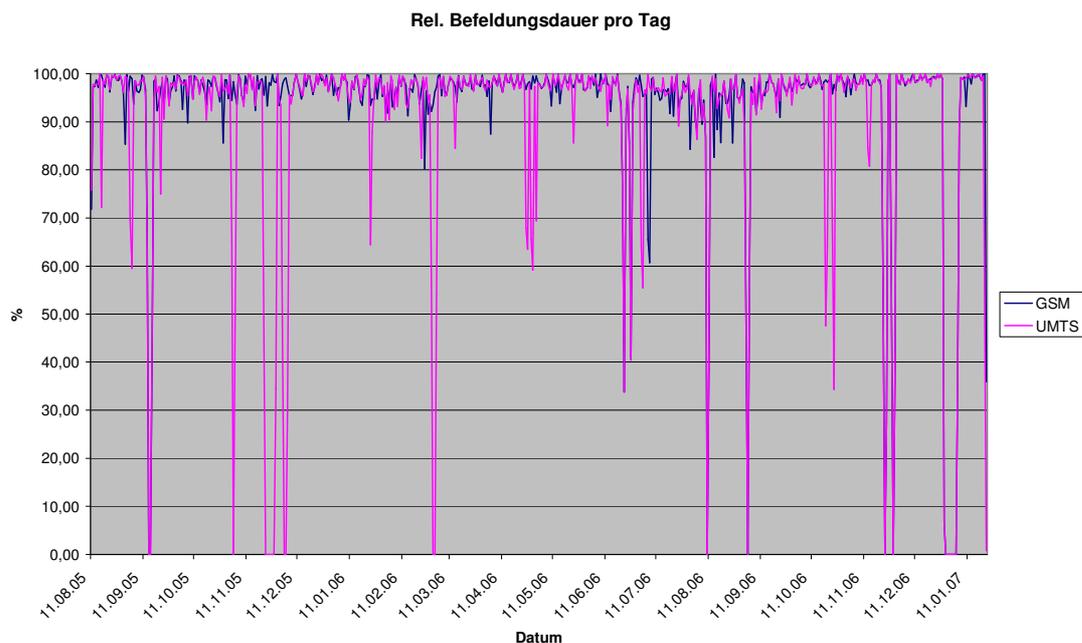
Die Befeldungsdauer der einzelnen Gruppen wird aus dem Statusbit RF On der Verstärker abgeleitet und gibt somit die Zeit an, während der die Leistungsverstärker in Betrieb waren. Die weiter hinten angefügten Diagramme spezifizieren jeweils die rel. Befeldungsdauer. Ein Wert von 100% entspricht also einer Befeldungsdauer von 24 Stunden an dem entsprechenden Tag. Nachfolgende Tabelle 2.7 enthält Mittelwerte dieser rel. Befeldungsdauer, einmal für die gesamte Dauer des Versuchs und einmal aufgeschlüsselt nach den einzelnen Generationen sowie deren Untergruppen. Um die Mittelwerte nicht zu verfälschen sind sowohl der Mittelwert über die gesamte Befeldungszeit, als auch der Mittelwert für die zweite Gruppe der Generation F2 ohne den Zeitraum 28.12.2006 bis 06.01.2007 berechnet. Während dieses Zeitraumes kam es aufgrund des defekten Leistungsmessers zu Ausfällen in der Datenerfassung, die Befeldung während dieses Zeitraumes war aber trotzdem in Betrieb.

Tab. 2.7: Mittlere relative tägliche Befeldungsdauern.

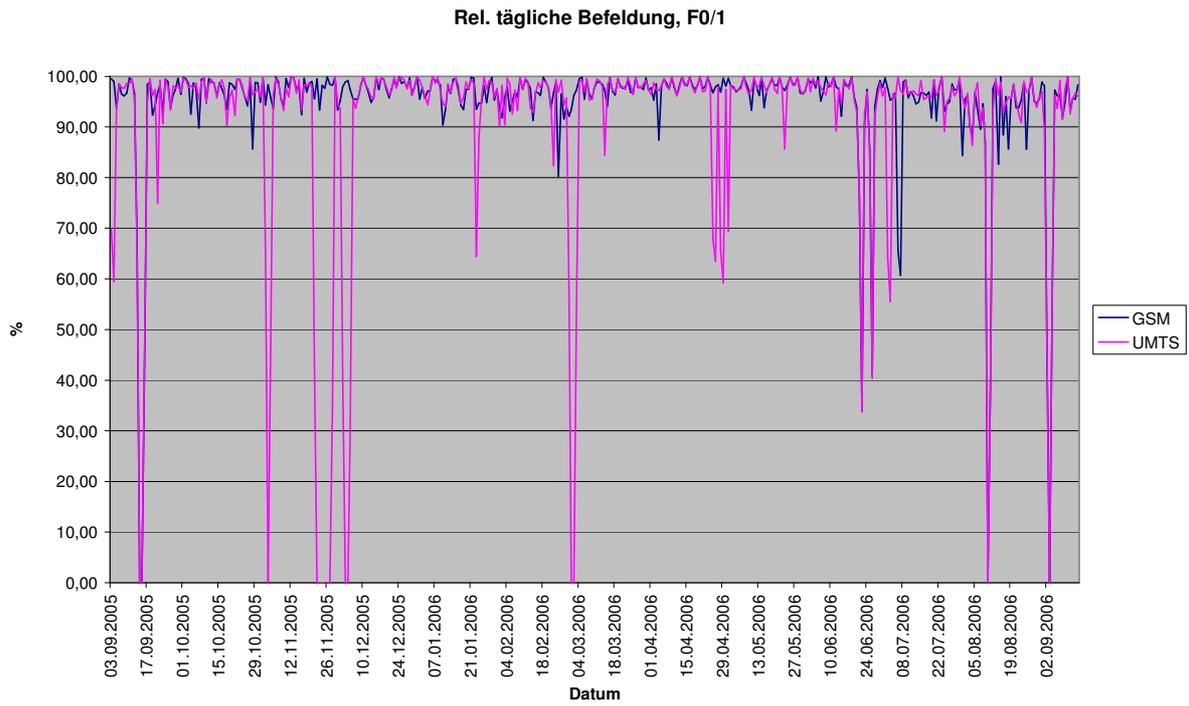
Gruppe	GSM	UMTS
Gesamter Befeldungszeitraum, ohne Defekt NRP	94,68%	90,80%
Generation F0, Gruppe 1	94,65%	90,12%
Generation F0, Gruppe 2	95,50%	90,83%
Generation F1, Gruppe 1	94,90%	92,77%
Generation F1, Gruppe 2	93,93%	93,16%
Generation F2, Gruppe 1	92,20%	91,08%
Generation F2, Gruppe 2, ohne Defekt NRP	93,66%	91,95%

Während der Versuchsdurchführung kam es aufgrund von Problemen mit dem Verstärker im Befeldungsaufbau für die UMTS Gruppe häufiger zu unvorhergesehenen Ausfällen. Im Laufe der vorbereitenden Planungen wurde aber eine Befeldungsdauer von mindestens 20 Stunden pro Tag (entsprechend einer rel. täglichen Befeldungszeit von 83,3%) als kontinuierliche Befeldung betrachtet und angestrebt. Die in Tab. 2.8 angegebenen relativen Befeldungszeiten für den gesamten Befeldungszeitraum entsprechen 22h 43min für GSM und 21h 47min bei UMTS und liegen somit deutlich über den mindestens erforderlichen.

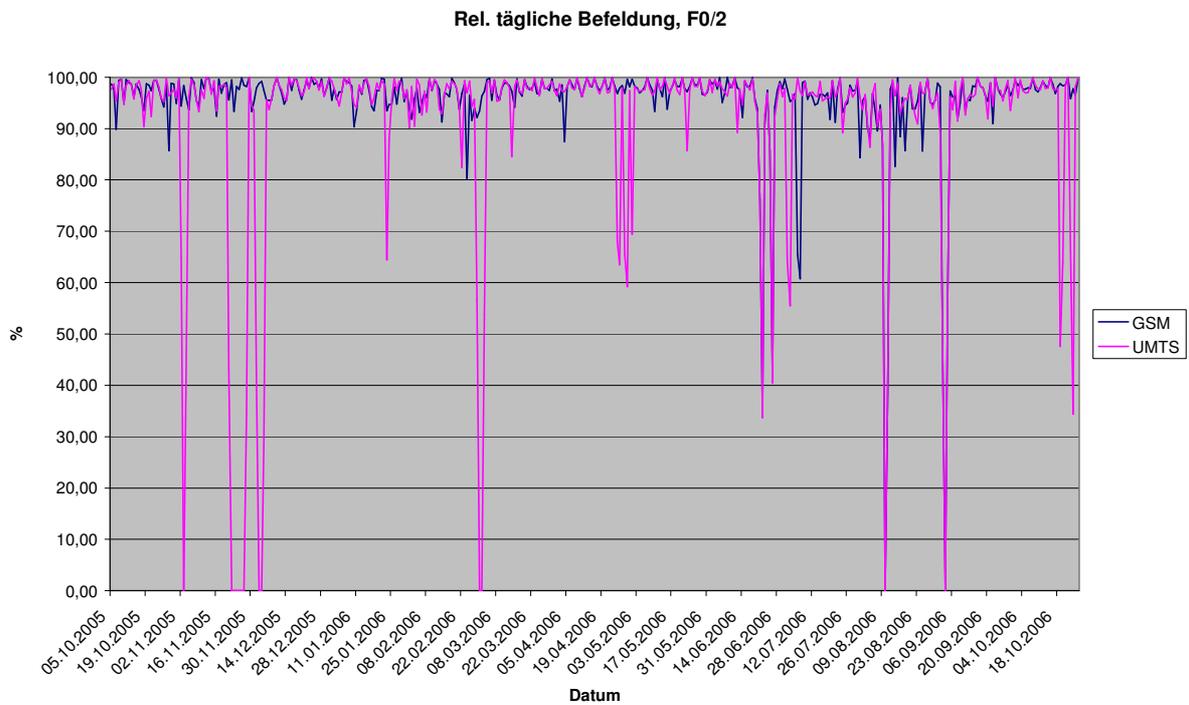
Der Verlauf der täglichen Befeldung ist nachfolgend in Diagrammform dargestellt. Diag. 2.1 zeigt die relative tägliche Befeldungszeit für den gesamten Befeldungszeitraum vom 11.08.2005 bis zum 22.01.2007 (Belegung mit Tieren vom 03.09.2005 bis zum 22.01.2007). Diag. 2.2 und Diag. 2.3 zeigen die tägliche Befeldungszeit für die beiden Gruppen der Generation F0, Diag.2.4 und Diag. 2.5 die entsprechenden Werte der beiden Gruppen der Generation F1 und Diag. 2.6 sowie Diag. 2.7 die der Generation F2.



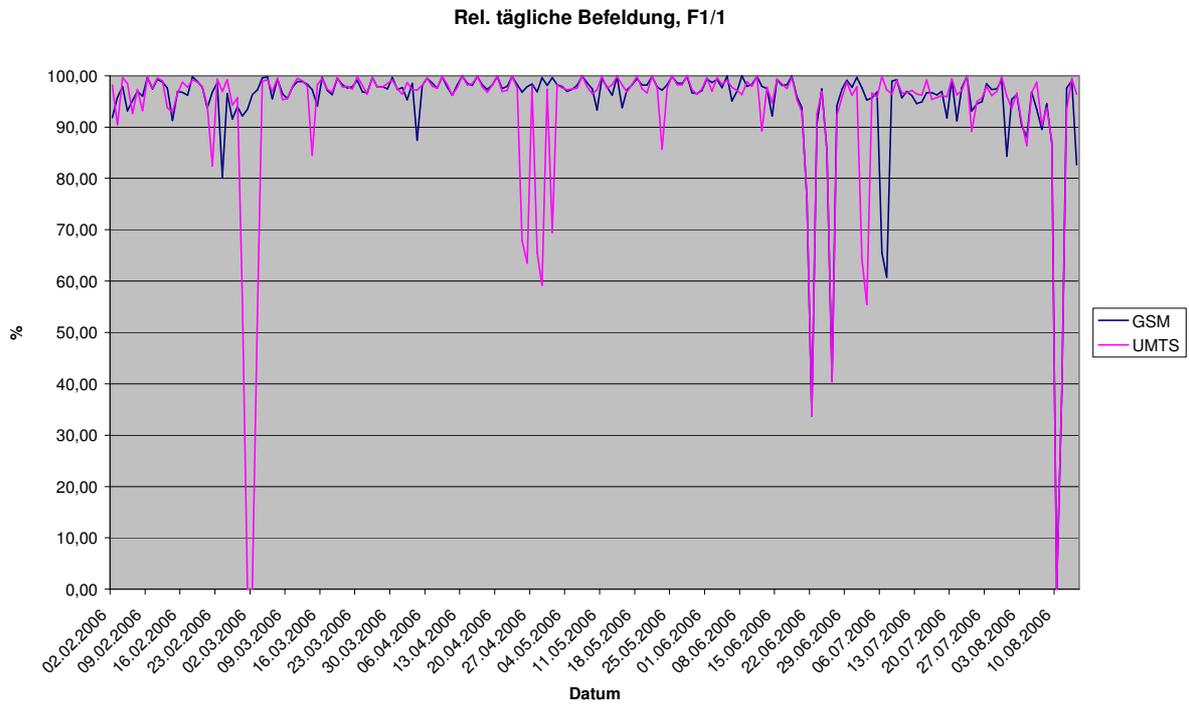
Diag. 2.1: Tägliche relative Befeldungszeit über den gesamten Versuchszeitraum vom 11.8.2005 bis zum 22.1.2007.



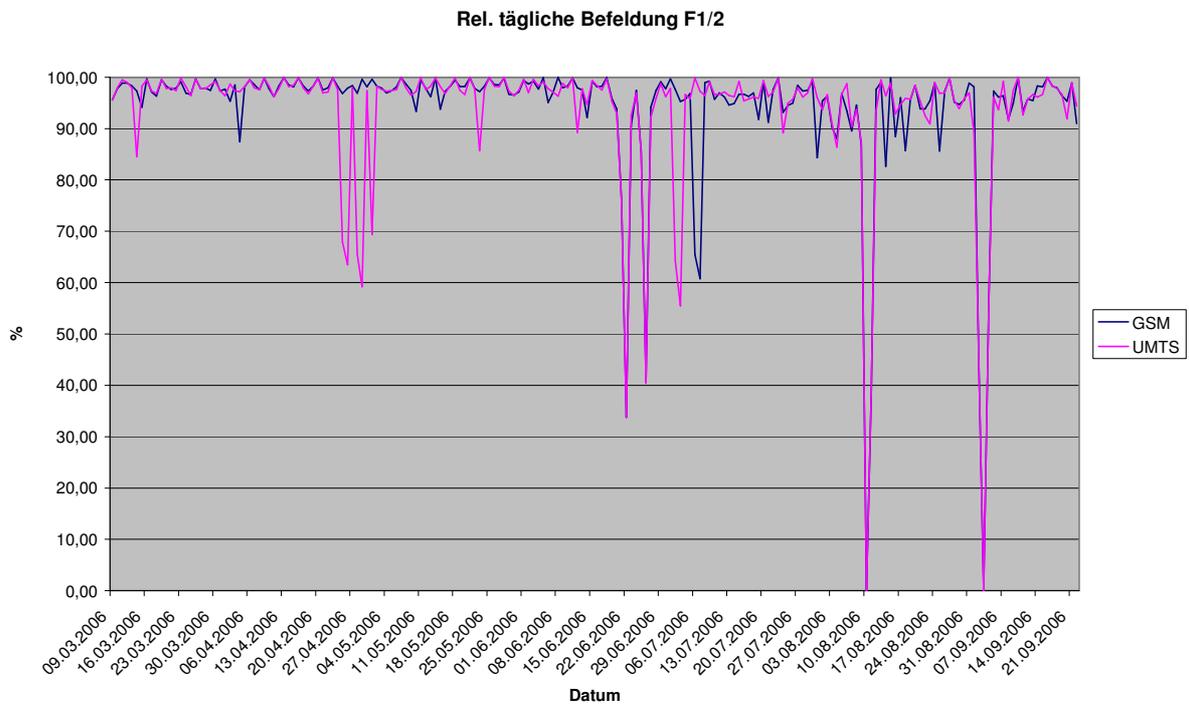
Diag. 2.2: Tägliche relative Befeldungszeit für die Generation F0, erste Gruppe.



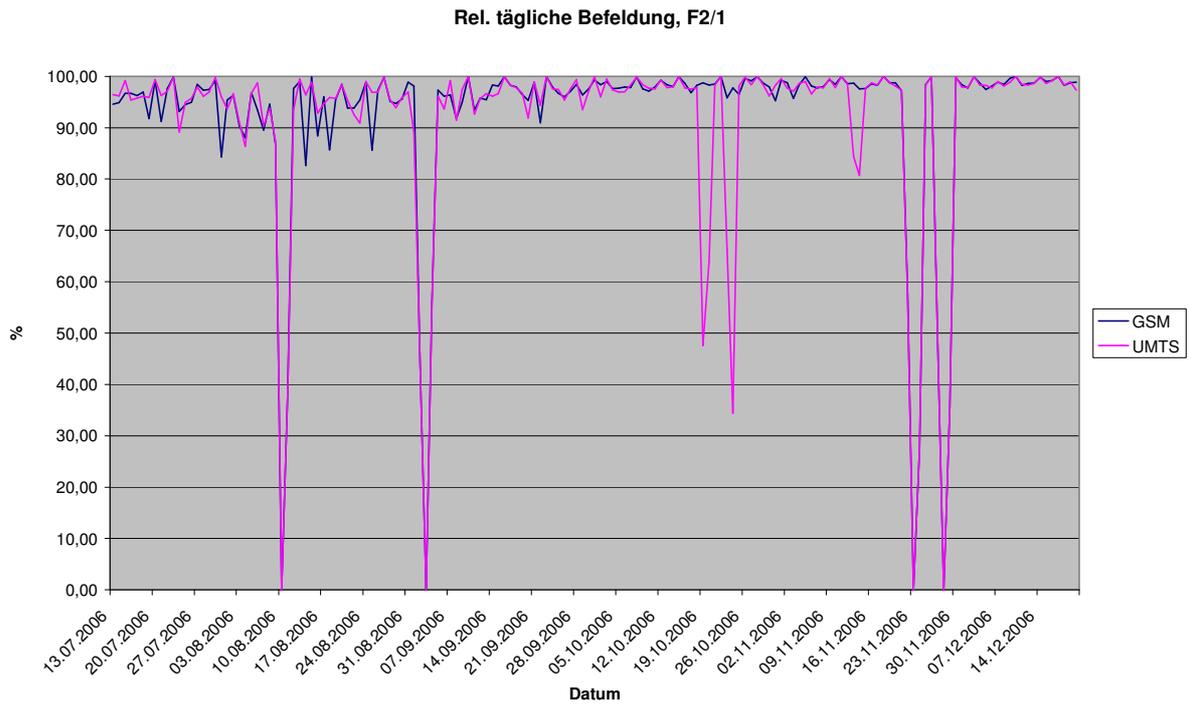
Diag. 2.3: Tägliche relative Befeldungszeit für die Generation F0, zweite Gruppe.



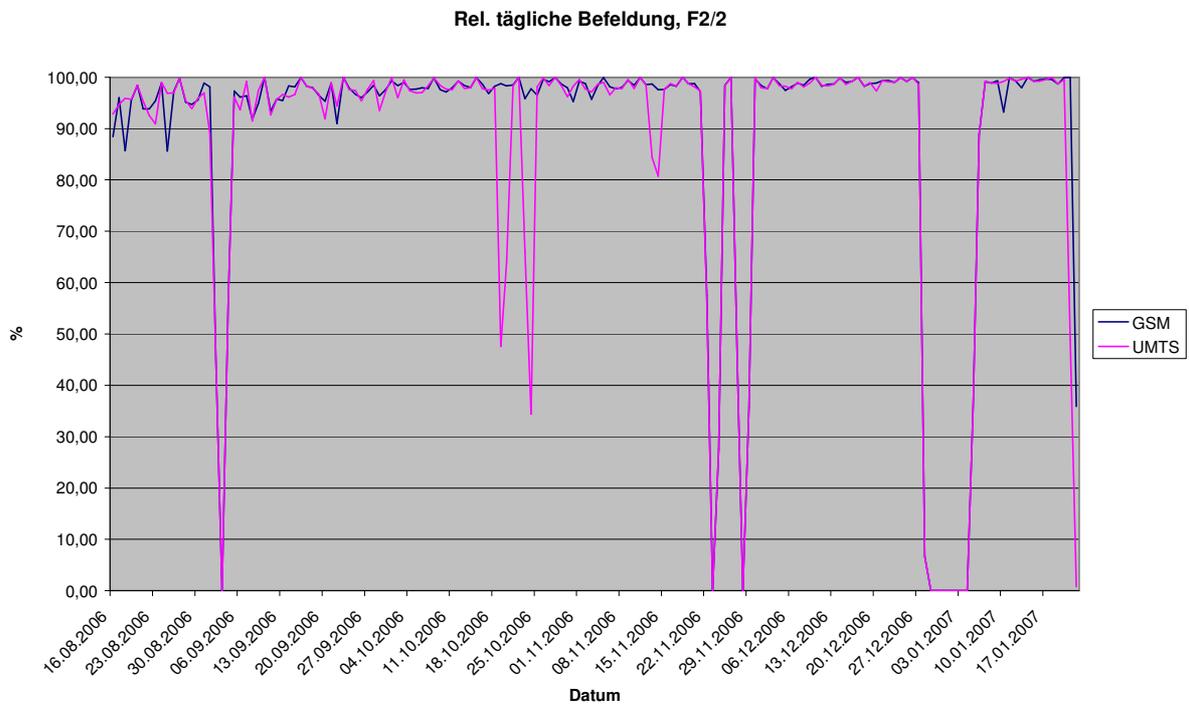
Diag.2.4: Tägliche relative Befeldungszeit für die Generation F1, erste Gruppe.



Diag. 2.5: Tägliche relative Befeldungszeit für die Generation F1, zweite Gruppe.



Diag. 2.6: Tägliche relative Befeldungszeit für die Generation F2, erste Gruppe.



Diag. 2.7: Tägliche relative Befeldungszeit für die Generation F2, zweite Gruppe.

2.5 Zusammenfassung/Summary

Das Expositionskonzept basierend auf einem parabolischen Reflektor mit defokussiertem Primärstrahler ermöglicht eine energieeffiziente und durch den Einsatz eines handelsüblichen Parabolreflektors auch billige Befeldungseinrichtung. Trotz der während der Durchführung des Projektes aufgetretenen, unvorhergesehenen technischen Probleme mit dem Dauereinsatz der Leistungsverstärker konnten alle Anforderungen an die zu erzielende Befeldungsdauer erreicht werden. Eine große Anzahl von Tieren (40 Käfige) können gleichzeitig mit einer Quasi ebenen Welle mit einer hohen Homogenität befeldet werden. Die Anforderungen der Tierhaltung werden erfüllt, d.h. der Aufbau kann für Langzeit *in vivo* Experimente genutzt werden. Durch die Unterbringung des Aufbaus in einer geschirmten Kammer können Störungen durch externe Felder oder eine gegenseitige Beeinflussung der Gruppen ausgeschlossen werden. Die Variationen in der Stärke der Exposition wurden simulativ und durch Messungen untersucht. Die Anteile der Leistungsdichte, die direkt vom Reflektor erzeugt werden und die, die durch die benachbarten Tiere gestreut werden, wurden getrennt voneinander gemessen. Eine Vielzahl von Simulationen wurde durchgeführt um die Ganzkörper SAR in unterschiedlichen Mehr-Ratten Szenarien zu beschreiben. Der Hauptgrund für die Unterschiede in der Ganzkörper SAR ist die freie Bewegung und Ausrichtung der Tiere in den Käfigen. Diese ist aber durch die Art des Experimentes (Langzeit, *in vivo*) bedingt.

The exposure concept using a defocused parabolic reflector results in a low-cost and energy efficient exposure setup. A high number of rats (40 cages) can be exposed simultaneously with quasi-plane wave condition and high homogeneity. The conditions for the animal well-being and care are fulfilled, i. e. the concept is applicable for long-term *in vivo* exposition. The use of a mass production reflector reduces the cost considerably. Shielding measurements show a high isolation from external fields and between the exposed groups. Possible variations in the exposure dose have been characterized by means of measurements and simulations. The power density coming from the reflector and scattered at the neighbor cages have been measured separately. Several simulations have been carried out to characterize the WB-SAR in different multi-rat scenarios. The standard deviation of the WB-SAR in the rats is mainly due to the changes in size and attitude of the rats, which is mandatory because of the long-term, *in vivo* characteristic of the experiment.

Literatur

- [1] H. Ndoumbè Mbonjo Mbonjo, J. R. Streckert, A. K. Bitz, V. W. Hansen, A. Glasmachers, S. Gencol, and D. Rozic: *A generic UMTS test signal for RF bioelectromagnetic studies*. *Bioelectromagnetics*, 25:415-425, September 2004
- [2] Steckert, J. R., H. Ndoumbè Mbonjo Mbonjo, A. K. Bitz, and V. W. Hansen: *Ein UMTS-Testsignal für bio-elektromagnetische Experimente*. Newsletter Forschungsgemeinschaft Funk, Seiten 11-17, März 2001
- [3] Tejero, S., S. Schelkshorn, and J. Detlefsen: Internal Report HFS 0504-01 "UTD analysis of the electromagnetic near field of a parabolic reflector". Technical report, Institute for Highfrequency Engineering, Technische Universität München, Munich, Germany, May 2004.
- [4] Tejero, S., S. Schelkshorn, and J. Detlefsen: Internal Report HFS 0904-01 "Field distribution for a parabolic reflector illuminated by an axially defocussed open waveguide". Technical report, Institute for Highfrequency Engineering, Technische Universität München, Munich, Germany, September 2004.
- [5] Tejero, S., S. Schelkshorn, and J. Detlefsen: Report HFS 0504-02 "Concept for the RF exposure using a plane-wave field generated by a parabolic reflector". Technical report, Institute for Highfrequency Engineering, Technische Universität München, Munich, Germany, May 2004.
- [6] Tejero, S., S. Schelkshorn, and J. Detlefsen: Report HFS 1004-01 "Concept for the controlled plane wave exposure for long-term *in vivo* experiments using an axially defocussed parabolic reflector". Technical report, Institute for Highfrequency Engineering, Technische Universität München, Munich, Germany, October 2004.
- [7] Tejero, S., S. Schelkshorn, and J. Detlefsen: Concept for the controlled plane wave exposure for animal experiments using a parabolic reflector. *Advances in Radio Science*, 3:233-238, 2005.
- [8] Tejero, S., S. Schelkshorn, and J. Detlefsen: Internal Report HFS 0405-01 "Field distribution for a parabolic reflector illuminated by an axially defocussed open waveguide". Technical report, Institute for Highfrequency Engineering, Technische Universität München, Munich, Germany, April 2005.
- [9] Tejero, S., S. Schelkshorn, and J. Detlefsen: Internal Report HFS 0405-02 "Measurement of the electromagnetic shielding of three RF exposition chambers and the electromagnetic fields

presnet in the environment". Technical report, Institute for Highfrequency Engineering, Technische Universität München, Munich, Germany, April 2005.

[10] Tejero, S., S. Schelkshorn, and J. Detlefsen: Internal Report HFS 1205-01 "Measurement of the field homogeneity and its perturbation in an exposure chamber for GSM and UMTS bands". Technical report, Institute for Highfrequency Engineering, Technische Universität München, Munich, Germany, December 2005.

[11] Tejero, S., S. Schelkshorn, and J. Detlefsen: Internal Report HFS 1205-02 "Simulative assessment of the Specific Absorption Rate in Wistar rats exposed by a plane wave at GSM and UMTS bands". Technical report, Institute for Highfrequency Engineering, Technische Universität München, Munich, Germany, December 2005.

[12] Tejero, S., S. Schelkshorn, and J. Detlefsen: Internal Report HFS 1205-03 "Crest factor measurement in an UMTS Signal". Technical report, Institute for Highfrequency Engineering, Technische Universität München, Munich, Germany, December 2005.

3 TIERHALTUNG, REPRODUKTION UND PHYSISCHE ENTWICKLUNG

Tierhaltung, Reproduktion und die Untersuchungen zur physischen Entwicklung wurden schwerpunktmäßig am Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene der Tierärztlichen Fakultät der LMU – Direktor Univ. Prof. Dr. med. vet. M. Erhard - , in Arbeitsteilung mit dem Institut für Physiologie, physiologische Chemie und Tierernährung der Tierärztlichen Fakultät der LMU – Direktor Univ.-Prof. Dr. med. vet. M. Stangassinger – durchgeführt.

Federführend waren folgende wissenschaftliche Mitarbeiter mit den Untersuchungen befasst:

Dr. med. vet. Christine Engmann

Dr. med. vet. Manfred Stohrer

Dr. med. vet. Sabine Okorn

Judith Schreiner

Dipl. Biol. Janine Schneider

Catrin Kahlfeld

Dr. med. vet. Mehdi Shakarami

Inhalt

3	TIERHALTUNG, REPRODUKTION UND PHYSISCHE ENTWICKLUNG	30
3.1	Material und Methode	31
3.1.1	Tierhaltung	31
3.1.2	Versuchstiere	34
3.1.3	Paarung der F0a-Generation	36
3.1.4	F1-Generation: Untersuchung zur physischen Entwicklung	37
3.1.5	Paarung der F1-Generation.....	39
3.1.6	Expositionszeiträume.....	40
3.2	Ergebnisse der Reproduktionsuntersuchungen	41
3.2.1	Ergebnisse der Reproduktion der F0a-Generation.....	41
3.2.2	Graphische Darstellungen der Tabellen zu Generation F0a	46
3.2.3	Ergebnisse der Untersuchungen zur physischen Entwicklung der F1-Generation	49
3.2.4	Ergebnisse der Untersuchungen zur Reproduktionsfähigkeit der F1-Generation.....	52
3.2.5	Ergebnisse der Untersuchungen zur physischen Entwicklung der F2-Generation	54
3.3	Diskussion der Haltungsbedingungen, der Reproduktions- und physischen Entwicklungsparameter	56
3.3.1	Entwurmung	56
3.3.2	Messung der Schadgasentwicklung in den Tierkäfigen und des Klimas in den Kammern	57
	Literatur	60

3.1 Material und Methode

Die Regierung von Oberbayern hat das Tierversuchsvorhaben „*in vivo*-Langzeituntersuchungen des Einflusses elektromagnetischer Felder der Mobilfunkkommunikation im Rattenmodell“ (Vor- und Hauptversuch) unter dem Aktenzeichen Az: 55.2-1-54-2531-91-04 genehmigt.

3.1.1 Tierhaltung

3.1.1.1 Standard-Tierkäfige

Die Wannen der Standard-Tierkäfige des Typs 4 der Fa. Tecniplast, Hohenpeissenberg, waren aus Makrolon, hatten die Abmessungen L 425 x B 266 x H 185 mm³ und nahmen jeweils entweder zwei Männchen oder drei Weibchen auf. Die Käfige waren mit einem Makrolon-Deckel der selben Fa. verschlossen, der zahlreiche gitterartige Öffnungen zum Luftaustausch und eine Vertiefung zur Aufnahme der Makrolon-Wasserflasche aufwies. Im Verlauf der Untersuchungen (Ende Juni-Anfang Juli 2006) mussten die Stirnseiten der Wannen nachträglich mit zusätzlichen Luftlöchern versehen werden, um den Luftdurchsatz zu erhöhen.



A

Abb. 3.1 A und B:

A: Standard Macrolon-Käfig Typ IV.

B: Die Metallgitterdeckel wurden durch Makrolon-Deckel ausgetauscht, der zahlreiche gitterartige Öffnungen zum Luftaustausch und eine Vertiefung zur Aufnahme der Makrolon-Wasserflasche aufwies.



B

Alle Käfige trugen an der vorderen Stirnseite Plastik-Schilder mit relevanten, aber codierten Daten, um sie während der regelmässigen Wartung für das Personal leichter identifizierbar zu machen.

Vom Zeitpunkt der Geburt bis zum Absatzalter der Jungtiere mit 21 Tagen wurde je ein Muttertier mit den Jungtieren in einem Käfig gehalten. Anschließend wurden jeweils drei nicht verwandte weibliche bzw. zwei nicht verwandte männliche Tiere in einem Käfig gehalten. Die Separierung der Muttertiere erfolgte einige Tage vor dem angenommenen Geburtstermin.

3.1.1.2 Vermeidung von Nageschäden

Den Tieren in allen Käfigen wurde zusätzlich zur Einstreu und entsprechendem Trockenfutter so genannte Nagehölzer der Fa. Abedd, Wien, angeboten, um Nageschäden, insbesondere an den Plastik-Käfigdeckeln zu vermeiden. Diese Makrolon-Käfigdeckel mit ihrer gitterförmigen Struktur der Luftöffnungen waren aber auf Dauer den Nagezähnen der Ratten nicht gewachsen. Einigen Tieren, insbesondere Weibchen, war es allmählich gelungen, die Gitterstäbe derart anzunagen, dass ein eventuelles Entkommen aus den Standard-Käfigen immer wahrscheinlicher wurde. Als Ausweg bot sich an, über der Gitterstruktur der Käfigdeckel eine weitere Platte aus Plastik mit solchen Luftöffnungen anzubringen, die ein Benagen verhindern würden. Im Sommer 2005 wurden entsprechende Platten für 200 Käfigdeckel aus Polyäthylen gefertigt, mit zahlreichen Luftlöchern (\varnothing 10 mm) versehen, der Form des Käfigdeckels angepasst und mit Kunststoffschrauben befestigt.

3.1.1.3 Trinkwasser- und Futtermittellversorgung

In den drei Expositionskammern stand den Ratten in jedem Standard-Käfig Leitungswasser *ad libitum* zur Verfügung. Das Wasser wurde in Makrolonflaschen à 400 ml (Fa. Tecniplast, Hohenpeissenberg, mit Gummistopfen und Glaspipette) in einer entsprechenden Vertiefung des Käfigdeckels angeboten und regelmässig erneuert. Unter Berücksichtigung der regelmässigen Wartung vieler Käfige, musste auf eine zentrale Wasserversorgung in den Kammern verzichtet werden. Frisches pelletiertes Trockenfutter (Altromin # 1324) und Zucht-Diät (Altromin # 1314) wurde den Tieren bei jedem Käfigwechsel auf der neuen Einstreu (Altromin Weichholzgranulat) angeboten und bei Bedarf ergänzt (Vergleich der Altromin-Produkte siehe Tab. 3.1). Futterraufen aus Metall durften wegen der Beeinflussung der EM-Feldhomogenität nicht verwendet werden.

Tab. 3.1: Inhaltsstoffe altromin 1324 und altromin 1314

altromin 1324	Anteil (%)	Inhalt je kg	altromin 1314	Anteil (%)	Inhalt je kg
Rohprotein	19		Rohprotein	22,3	
Rohfett	4		Rohfett	5	
Rohfaser	6		Rohfaser	4,5	
Rohasche	7		Rohasche	6,5	
Ca	0,9		Ca	0,9	
P	0,7		P	0,7	
Vitamin A		15000 I.E.	Vitamin A		15000 I.E.
Vitamin D3		600 I.E.	Vitamin D3		600 I.E.
Vitamin D		75 mg	Vitamin D		75 mg
Cu		5 mg	Cu		5 mg

Die Wasserversorgung erfolgte ad libitum über metallfreie Nippeltränken (Fassungsvermögen 500 ml) mit kommunalem Leitungswasser. Die Flaschen wurden durch Gummistopfen mit Glasnippel (Länge: 70 mm, Durchmesser der Glasnippel: 7 mm, Nippelöffnung: 2,5 mm) verschlossen.

Als Einstreu wurde Weichholzgranulat verwendet (altromin Animal Bedding Granulat, Altromin GmbH, Lage-Lippe, Deutschland). Als Beschäftigungsmaterial befand sich in jedem Käfig, wie bereits erwähnt, pro Tier ein Nageholz (Material: Espenholz, Größe S 4 x 1,6 x 1 cm, Fa. Abedd Lab und Vet Service GmbH, Wien, Österreich), pro Käfig eine autoklavierte Papprohre und pro Käfig einige Streifen Zellstoff (Zellstoff in Ballen, ungebleichte Qualität, 40 x 60 cm, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen, Deutschland).

3.1.1.4 Haltungsbedingungen

Klima

Die Versuchstiere wurden in den Expositionskammern unter Standardbedingungen bei einer Raumtemperatur von 20 °C (± 3 °C) und einer Luftfeuchte von 55 % (± 10 %) gehalten.

Lichtprogramm

Das Lichtregime hatte einen Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 h, wobei das Licht um 07:00 Uhr MEZ an- und um 19:00 Uhr MEZ ausgeschaltet wurde. Tagsüber betrug die durchschnittliche Beleuchtungsstärke 65 ± 15 Lux und nachts null Lux.

Pflege und Gesundheit

Die Tierpflege wurde bis März 2006 dreimal, danach viermal wöchentlich durchgeführt. Davon wurden dreimal die Käfige entleert und sofort wieder mit neuer Einstreu befüllt. Beim vierten Mal erhielten die Tiere jeweils vollständig gereinigte, neue Käfige. Ein Wasserwechsel fand dreimal pro Woche statt.

Es erfolgte eine tägliche, adspektorische Kontrolle der Versuchstiere, des zur Verfügung stehenden Futters und des Trinkwasservorrates.

Zur Überprüfung und Dokumentation des Gesundheitszustandes wurden die Tiere einmal pro Woche gewogen, auf klinisch sichtbare Krankheitszeichen und in ihrem allgemeinen Gesundheitszustand beurteilt (Ernährungs- und Pflegezustand, Verhalten, Atemfrequenz, Futter- und Wasserverbrauch) überprüft. Es wurden monatliche Kotuntersuchungen durchgeführt. Bei positivem Ergebnis erfolgte eine Entwurmung mit Flubenol als Futtermittelzusatz.

Der Umgang mit den Versuchstieren erfolgte unter standardisierten Hygienemaßnahmen (Schuhwechsel, Händereinigung und -desinfektion, Tragen desinfizierter Latexhandschuhe, Schutzkleidung inklusive Mundschutz und OP-Haube).

3.1.2 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Albino-Ratten vom Stamm WISTAR, RjHAN. Die für den Hauptversuch relevanten Tiere wurden als institutseigene Nachzucht in den Expositions-kammern geboren.

Die Ausgangstiere des Versuches wurden im Alter von neun Wochen am 10.05.2005 vom Züchter (Janvier, Le Genest-St-Isle, Frankreich) geliefert.

Aus den ursprünglich gelieferten Tieren wurden im Zeitraum vom 11.07.2005 bis 04.08.2005 über Selektionsverfahren die Tiere der Parentalgeneration (F₋₁) ausgewählt. Nach Auswahl der F₋₁-Generation erfolgte eine randomisierte Zuteilung zu den Expositions-kammern (UMTS, GSM,

SHAM). Aus diesen Tieren wurden in der jeweiligen Expositionskammer nach dem Zufallsprinzip Reproduktionspaare festgelegt.

Aus arbeitstechnischen Gründen waren alle Generationen in je 2 Gruppen unterteilt, die im Abstand von 4 Wochen gezeugt, geboren, sowie untersucht wurden. Somit waren die Tiere beider Gruppen zu Versuchsbeginn sowohl gleich alt, als auch gleich lange exponiert

Zur Verpaarung wurden jeweils eine männliche und eine weibliche Ratte in einem Käfig mit Gittereinsatz für sieben Tage zusammengesetzt. Der Paarungserfolg wurde durch die tägliche Kontrolle des Auftretens postkoitaler Plaques (eingetrockneter Vaginalpfropfs) dokumentiert. Nach Ablauf der sieben Tage wurden die Reproduktionspaare separiert. Die Gewichtskontrolle wurde zur weiteren Trächtigkeitskontrolle herangezogen. Die Trächtigkeitsdauer betrug durchschnittlich 21-22 Tage.

Das Resultat der Verpaarung der Tiere der F₋₁-Generation war die Generation F₀. Aus versuchstechnischen Gründen erfolgte eine zusätzliche Aufteilung der Generation F₀ in die Untergruppen F_{0a} und F_{0b}. Es ergaben sich hieraus vier Versuchsgruppen: F_{0a} Gruppe 1, F_{0b} Gruppe 1, F_{0a} Gruppe 2 und F_{0b} Gruppe 2. Die Tiere der Versuchsgruppen F_{0a} Gruppe 1 und 2 waren der Exposition im Schnitt ein Jahr, die Tiere der Versuchsgruppen F_{0b} Gruppe 1 und 2 im Schnitt fünf Monate ausgesetzt. Die weiteren Verpaarungen waren im Ablauf identisch. Die Verpaarungen der Generation F₀ führten zur Generation F₁. Für die Nachzucht der Generation F₀ wurden ausschließlich Tiere der Versuchsgruppe F_{0a} verwendet, die Versuchsgruppe F_{0b} wurde nicht reproduziert. Aus der Verpaarung von F₁ ging die Generation F₂ hervor.

Um eine eindeutige Identifizierung des Einzeltieres zu gewährleisten, erfolgte die Kennzeichnung der Tiere mittels eines Mikrochip-Transponder-Systems (Alvic-Transponder, ALVETRA GmbH, Neumünster, Deutschland). Die Transponder wurden am 21. Lebenstag subcutan (s.c.) appliziert. Jeder Transpondernummer wurde eine laufende Versuchstiernummer zugeteilt. Zusätzlich erhielt jedes Versuchstier bei Eintritt in den Versuch eine laufende Labornummer.

In die Untersuchungen zum potentiellen Einfluss des chronischen Stressgeschehens wurden ausschließlich weibliche Tiere einbezogen, um bekannte Geschlechtseinflüsse auf die Kortikosteronkonzentration auszuschließen.

3.1.3 Paarung der F0a-Generation

Für die Reproduktion der F0-Generation wurden insgesamt N= 42 männliche und N= 42 weibliche F0a-Versuchstiere der Tiergruppen 1 und 2 innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen GSM, UMTS und SHAM randomisiert zu insgesamt N=42 Zuchtpaaren (1m:1f) gruppiert (Tab. 3.2)

Tabelle 3.2: F0a-Generation: Anzahl (N) der pro Versuchsgruppe für die Reproduktion eingesetzten Zuchtpaare

Tiergruppe	F0a-Generation: Anzahl der Zuchtpaare (N) pro Versuchsgruppe		
	GSM	UMTS	SHAM
1	7	7	7
2	7	7	7
Insgesamt	14	14	14

Am 10.01.2006 (Tiergruppe 1) bzw. 14.02.2006 (Tiergruppe 2) im Alter von jeweils ca. 18 Wochen konnte die Reproduktion der F0a-Generation begonnen werden. Die Zuchtpaare der F0a-Generation wurden vor der Paarung (1:1-Paarung primiparer Weibchen) gewogen (Tab. 3.3) und anschließend in Käfige mit Bodengittereinsatz gesetzt.

Tabelle 3.3: F0a-Generation: Mittleres Körpergewicht (g) der männlichen und weiblichen Versuchstiere bei Paarungsbeginn

F0a-Generation: Mittleres Körpergewicht (g) bei Paarungsbeginn			
	GSM (N=14 m bzw. f)	UMTS (N=14 m bzw. f)	SHAM (N=14 m bzw. f)
Männchen (m)	502,09 ± 43,15	498,64 ± 30,68	492,23 ± 46,44
Weibchen (f)	275,39 ± 33,39	277,81 ± 19,95	280,16 ± 16,04

Zur Kontrolle des Paarungserfolges wurden morgendliche und abendliche Vaginalplaquekontrollen über einen maximalen Paarungszeitraum von sieben Tagen durchgeführt. Zuchtpaare, bei denen bis zum 7. Paarungstag kein Plaque am Käfigboden festgestellt werden konnte, wurden durch ein neues Zuchtpaar, bestehend aus Reservetieren, ersetzt.

3.1.4 F1-Generation: Untersuchung zur physischen Entwicklung

Während der Aufzucht der seit dem Zeitpunkt der Zeugung sowohl pränatal als auch postpartum kontinuierlich exponierten F1-Generation wurden bei allen Nachkommen von N=12 F0a-Zuchtpaaren pro Versuchsgruppe (GSM, UMTS, SHAM) ab dem 7. bis maximal dem 21. Lebensstag täglich die drei folgenden Entwicklungsparameter bestimmt:

1. Incisor eruption (IE) = Durchbruch beider oberer Schneidezähne durch das Zahnfleisch (Abb. 3.2, Abb. 3.3)



Abb. 3.2:

Lebenstag 7: Vor Durchbruch der oberen Incisivi.



Abb. 3.3:

Lebenstag 8: Nach Durchbruch der oberen Incisivi.

2. Ear opening (EAO) = Öffnung beider äußerer Gehörgänge (Abb. 3.4, Abb. 3.5)



Abb. 3.4:

Lebenstag 9: Vor Öffnung des äußeren Gehörgangs.



Abb. 3.5:

Lebenstag 11: Nach Öffnung des äußeren Gehörgangs.

3. Eye opening (EO) = Öffnung beider Augen (Abb. 3.6, Abb. 3.7)



Abb. 3.6:

Lebenstag 12: Vor Öffnung der Augen.



Abb. 3.7:

Lebenstag 14: Nach Öffnung der Augen.

Für jeden Nachkommen eines Wurfes wurde der Tag des Erreichens des jeweiligen Kriteriums zusammen mit dem aktuellen Körpergewicht aufgezeichnet. Anschließend wurden die Werte über die jeweiligen Würfe gemittelt und hieraus ein Mittelwert für die jeweilige Versuchsgruppe errechnet.

Bei allen Versuchstieren der F1-Generation wurde ab dem 21. Lebenstag einmal wöchentlich eine Körpergewichtsbestimmung durchgeführt.

3.1.5 Paarung der F1-Generation

Für die Reproduktion der F1-Generation wurden insgesamt N=42 männliche und N=42 weibliche Versuchstiere der Tiergruppen 1 und 2 verpaart und somit 42 1m:1f Zuchtpaare in den Versuchsgruppen GSM, UMTS und SHAM gebildet (Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: F1-Generation: Anzahl (N) der pro Versuchsgruppe für die Reproduktion eingesetzten Zuchtpaare

Tiergruppe	F1-Generation: Anzahl der Zuchtpaare (N) pro Versuchsgruppe		
	GSM	UMTS	SHAM
1	7	7	7
2	7	7	7
Insgesamt	14	14	14

Am 20.06.2006 (Tiergruppe 1) bzw. 24.07.2006 (Tiergruppe 2) im Alter von circa 19 Wochen wurde mit der Verpaarung begonnen. Die Zuchttiere der Tiergruppe 1 wurden vor der Verpaarung gewogen (Tabelle 3.5). Bei Tiergruppe 2 wurde darauf verzichtet.

Der maximale Paarungszeitraum betrug sieben Tage an denen jeden Morgen eine Vaginalplaquekontrolle durchgeführt wurde bis eine erfolgreiche Verpaarung nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 3.5: F1-Generation Gruppe 1: Mittleres Körpergewicht (g) der männlichen und weiblichen Versuchstiere bei Paarungsbeginn.

F1-Generation Gruppe 1: Mittleres Körpergewicht (g) bei Paarungsbeginn			
	GSM (N=7 m bzw. f)	UMTS (N=7 m bzw. f)	SHAM (N=7 m bzw. f)
Männchen (m)	509,97 ± 63,19	515,04 ± 51,08	500,49 ± 28,57
Weibchen (f)	287,74 ± 19,13	280,97 ± 15,11	291,50 ± 21,71

Auf eine Untersuchung der physischen Entwicklung der Nachkommen (F2-Generation) wurde weitestgehend verzichtet.

3.1.6 Expositionszeiträume

Die durchschnittliche Tagesbefeldung in % ist einer Aufstellung in Projektteil 3, Punkt 2.42 zu entnehmen. Dieser Wert resultierte aus dem Abschalten der Befeldung bei Betreten und während des Aufenthaltes von Personen in den Expositions-kammern zur Durchführung von Routinemaßnahmen wie Tierpflege, zur Entnahme von Tieren für die Versuchsdurchführung als auch durch technische Ausfälle.

Zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Befeldung und Beleuchtung aller Käfige, erfolgte einmal pro Woche eine Rotation der Käfige, wobei jeder Käfig einen Stellplatz nach rechts und der letzte Käfig einer Etage nach unten bewegt wurde. Der Käfig in der untersten Etage rechts außen wurde in die oberste Etage links außen gestellt.

Die einzelnen Expositionszeiträume sind Tab. 3.6 zu entnehmen. Die Reihenfolge beruht auf der Länge der Exposition.

Tabelle 3.6: Expositionszeiträume

Generation	Expositionsszeitraum	Generation	Expositionsszeitraum
F0b / Gr. 1	12.08.2005 - 18.01.2006	F1 /Gr. 1	11.01.2006 – 06.08.2006
F0b / Gr. 2	13.09.2005 - 22.02.2006	F1 /Gr. 2	15.02.2006 – 10.09.2006
F0a / Gr. 1	12.08.2005 - 28.08.2006	F2 / Gr. 1	18.06.2006 - 27.11.2006
F0a / Gr. 2	13.09.2005 - 02.10.2006	F2 / Gr. 2	23.07.2006 -02.01.2007

3.2 Ergebnisse der Reproduktionsuntersuchungen

In die Untersuchungen zur Reproduktionsfähigkeit (Tab. 3.7) gingen pro Versuchsgruppe (GSM, UTMS, SHAM) jeweils N=14 Zuchtpaare ein.

Die Parameter Kopulationsindex (%), Fertilitätsindex (%), Trächtigkeitsrate (%), Paarungsdauer (d), Trächtigkeitsdauer (d), durchschnittliches Körpergewicht während der Trächtigkeit (g), durchschnittliche Körpergewichtsveränderung während der Trächtigkeit (g), Frühgeburtenrate (%), verlängerte Tragzeit (%), Gestationsindex (5), Wurfgröße (n), durchschnittliche Wurfgröße (n), Vitalität der Würfe (%), durchschnittliches Geburtsgewicht (g), Geschlechterverhältnis der lebenden Nachkommen (m:f), durchschnittliches Körpergewicht der Muttertiere während der Laktation (g) und durchschnittliches Körpergewicht (g) der Nachkommen während der Aufzucht wurden erhoben. Zusätzlich wurden die Missbildungsrate (%), der Überlebens-Index I (%) sowie der Überlebens-Index II (%) erfasst (siehe Tabelle 3.7 und Abbildungen 3.8 – 3.13).

Unter der Missbildungsrate ist die Anzahl der lebenden Nachkommen (NK) mit äußerlich sichtbaren morphologischen Defekten $\times 100/\text{Anzahl der lebenden NK}$ (z.B. Knickschwanz, Mikrophthalmos, Anophthalmos, permanent geschlossener äußerer Gehörgang...) zu verstehen. Der Überlebensindex I ist die Anzahl der lebenden NK am 4. Lebenstag $\times 100/\text{Anzahl der lebenden NK am Wurfstag}$. Der Überlebens-Index II (%) beschreibt die Anzahl der lebenden NK am 4. Lebenstag $\times 100/\text{Anzahl der lebenden NK am Wurfstag}$.

3.2.1 Ergebnisse der Reproduktion der F0a-Generation

Die Tabelle 3.7 und die entsprechenden Abbildungen 3.8 bis 3.13 zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen zur Reproduktionsfähigkeit der F0a-Generation.

Tabelle 3.7: F0a-Generation: Ergebnisse der Untersuchungen zur Reproduktionsfähigkeit (Ergebnisse in % oder arithm. Mittelw. \pm SD)

Untersuchungsparameter	GSM (N=14)	UMTS (N=14)	SHAM (N=14)
Kopulations-Index (%) = Anzahl der Zuchtpaare mit positiver Plaquekontrolle x 100/Anzahl der zur Paarung eingesetzten Zuchtpaare	100	100	100
Fertilitäts-Index (%) = Anzahl der Weibchen mit positiver Trächtigkeitskontrolle am Tag 14 der Gravidität x 100/Anzahl der zur Paarung eingesetzten Zuchtpaare	92,86	92,86	100
Trächtigkeitsrate (%) = Anzahl der trächtigen Weibchen x 100/Anzahl der besamten Weibchen	92,86	92,86	100
Paarungsdauer (d) = durchschnittliche Paarungsdauer in Tagen	2,57 \pm 0,85	2,93 \pm 1,21	2,36 \pm 1,15
	GSM (N=13)	UMTS (N=13)	SHAM (N=14)
Trächtigkeitsdauer (d) = durchschnittliche Trächtigkeitsdauer in Tagen	22,15 \pm 0,38	22,38 \pm 0,51	22,00 \pm 0,00
Durchschnittliches Körpergewicht während der Trächtigkeit (g) (Abb. 3.8):			
Tag 0 der Trächtigkeit	268,68 \pm 20,54	277,18 \pm 18,40	283,74 \pm 16,31
Tag 7 der Trächtigkeit	290,04 \pm 20,34	299,53 \pm 17,31	302,44 \pm 17,35
Tag 14 der Trächtigkeit	328,84 \pm 33,12	330,88 \pm 21,55	336,30 \pm 18,23
Tag 20 der Trächtigkeit	402,58 \pm 34,47	416,28 \pm 33,13	422,79 \pm 25,20
Durchschnittliche Körpergewichtsveränderung während der Trächtigkeit (g) (Abb. 3.9):			
Tag 0 bis Tag 7	21,35 \pm 6,52	22,35 \pm 4,57	18,69 \pm 11,91
Tag 7 bis Tag 14	32,43 \pm 6,16	32,06 \pm 7,03	33,86 \pm 6,80
Tag 14 bis Tag 20	80,12 \pm 14,33	84,96 \pm 14,70	86,49 \pm 13,07
Tag 0 bis Tag 20	133,90 \pm 19,63	139,10 \pm 18,77	139,04 \pm 23,72
Frühgeburtenrate (%) = Anzahl der Frühgeburten x 100/Anzahl der trächtigen Muttertiere (Frühgeburt = Geburt vor dem 20. Trächtigkeitstag)	0	0	0

Untersuchungsparameter	GSM (N=13)	UMTS (N=13)	SHAM (N=14)
Verlängerte Tragzeit (%) = Anzahl der trächtigen Muttertiere, die nicht innerhalb von 2 Tagen nach dem errechneten Wurftermin (Trächtigkeitstag 21) gebären x 100/Anzahl der trächtigen Muttertiere	0	0	0
Gestations-Index (%) Muttertiere	100	100	100
Anzahl der trächtigen Muttertiere mit Geburtsproblemen (N)/Anzahl der trächtigen Muttertiere (z.B. Geburtsverhaltung, Tod während der Geburt, Gebärmuttervorfall....)	0/13	1/13	0/14
	GSM (N=13)	UMTS (N=12)	SHAM (N=14)
Wurfgröße (N)			
Gesamtzahl der lebend geborenen Nachkommen (NK)	160	143	178
Anzahl der lebend geborenen männlichen NK	84	75	94
Anzahl der lebend geborenen weiblichen NK	76	68	84
Anzahl tot geborener NK	4	5	8
Durchschnittliche Wurfgröße (N) = durchschnittliche Anzahl der pro Wurf lebend geborenen Nachkommen (NK)	12,31 ± 2,87	11,92 ± 2,43	12,71 ± 2,61
Durchschnittliche Anzahl der lebend geborenen männlichen NK	6,46 ± 2,07	6,25 ± 1,36	6,71 ± 2,37
Durchschnittliche Anzahl der lebend geborenen weiblichen NK	5,85 ± 1,63	5,67 ± 2,31	6,00 ± 1,96
Durchschnittliche Anzahl der tot geborenen NK	1,33 ± 0,58	1,67 ± 0,58	1,60 ± 0,89
Vitalität der Würfe (%) = Anzahl der lebend geborenen NK x 100/Anzahl der lebend und tot geborenen NK	97,56	96,62	95,70
Durchschnittliches Geburtsgewicht (g) = durchschnittliches Geburtsgewicht der lebend geborenen NK	6,40 ± 0,73	6,51 ± 0,72	6,41 ± 0,69
Durchschnittliches Geburtsgewicht (g) der lebend geborenen männlichen NK	6,49 ± 0,74	6,66 ± 0,71	6,66 ± 0,66
Durchschnittliches Geburtsgewicht (g) der lebend geborenen weiblichen NK	6,30 ± 0,71	6,36 ± 0,70	6,13 ± 0,62
Geschlechterverhältnis der lebenden NK (m:f)	1:0,90	1:0,90	1:0,89

Untersuchungsparameter	GSM (N=12)	UMTS (N=12)	SHAM (N=14)
Durchschnittliches Körpergewicht der Muttertiere während der Laktation (g) (Abb. 3.10):			
Tag 0 der Laktation (Wurftag)	295,09 ± 25,49	305,71 ± 22,40	313,05 ± 19,96
Tag 4 der Laktation	315,88 ± 22,93	323,34 ± 18,80	331,21 ± 24,74
Tag 7 der Laktation	336,77 ± 27,88	338,03 ± 20,95	352,08 ± 21,89
Tag 11 der Laktation	333,08 ± 23,30	347,28 ± 22,57	353,29 ± 21,39
Tag 14 der Laktation	330,57 ± 16,83	345,56 ± 23,41	352,83 ± 19,60
Tag 17 der Laktation	325,92 ± 17,90	339,02 ± 24,00	355,26 ± 16,96
Tag 21 der Laktation	313,36 ± 24,19	327,76 ± 18,26	343,34 ± 21,86
Durchschnittliche Körpergewichtsveränderung der Muttertiere während der Laktation (g) (Abb. 3.11):			
Tag 0-7	41,68 ± 19,68	34,03 ± 17,49	39,03 ± 21,64
Tag 7-14	-6,21 ± 17,65	7,79 ± 12,00	0,75 ± 12,57
Tag 14-21	-17,21 ± 15,98	-17,04 ± 14,50	-9,49 ± 16,10
Tag 0-21	18,27 ± 20,14	24,78 ± 18,01	30,29 ± 19,73
Durchschnittliches Körpergewicht (g) der Nachkommen während der Aufzucht (g) (Abb. 3.12):			
Lebenstag 4	11,32 ± 1,57	11,65 ± 1,82	11,23 ± 1,48
Lebenstag 7	16,83 ± 2,43	17,28 ± 2,95	16,66 ± 2,28
Lebenstag 11	25,50 ± 3,93	25,68 ± 4,53	25,35 ± 3,57
Lebenstag 14	30,98 ± 4,91	32,08 ± 5,83	31,14 ± 4,42
Lebenstag 17	36,36 ± 6,06	38,26 ± 7,39	36,84 ± 5,48
Lebenstag 21	52,17 ± 8,65	54,06 ± 9,83	51,63 ± 7,21

Durchschnittliche Zunahmen der NK während der Aufzucht (g) (3.13):			
Lebenstag 4-7	5,51 ± 1,07	5,62 ± 1,34	5,43 ± 1,04
Lebenstag 7-11	8,60 ± 1,77	8,34 ± 2,05	8,69 ± 1,72
Lebenstag 11-14	5,45 ± 1,48	6,41 ± 1,62	5,79 ± 1,53
Lebenstag 14-17	5,31 ± 1,93	6,13 ± 2,27	5,70 ± 1,92
Lebenstag 17-21	15,71 ± 2,93	15,68 ± 3,34	14,79 ± 2,60
Lebenstag 4-21	40,63 ± 7,34	42,10 ± 9,04	40,41 ± 6,04

Untersuchungsparameter	GSM (N=13)	UMTS (N=12)	SHAM (N=14)
Missbildungsrate (%) = Anzahl der lebenden Nachkommen (NK) mit äußerlich sichtbaren morphologischen Defekten x 100/Anzahl der lebenden NK (z.B. Knickschwanz, Mikrophthalmos, Anophthalmos, permanent geschlossener äußerer Gehörgang...)	0	0	1,72
Überlebens-Index I (%) = Anzahl der lebenden NK am 4. Lebenstag x 100/Anzahl der lebenden NK am Wurfstag	96,87	99,30	99,43
Überlebens-Index II (%) = Anzahl der lebenden NK am 21. Lebenstag x 100/Anzahl der lebenden NK am 4. Lebenstag	99,35	100	98,30

3.2.2 Graphische Darstellungen der Tabellen zu Generation F0a

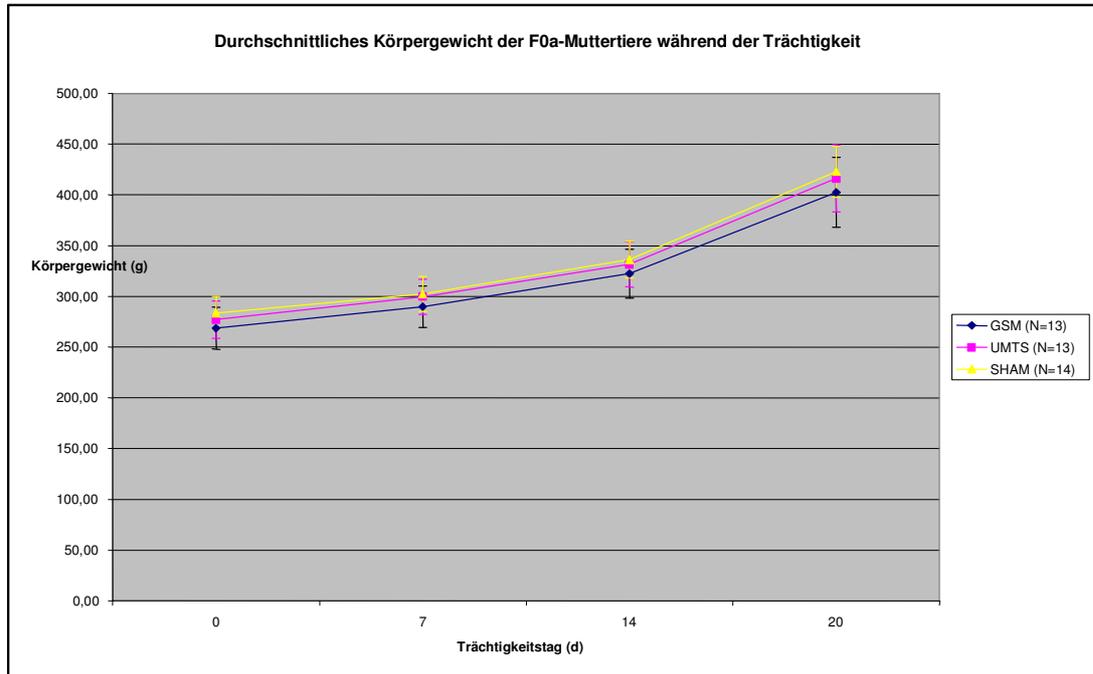


Abb. 3.8: F0a-Generation: Durchschnittliches Körpergewicht der Muttertiere während der Trächtigkeit (Mean \pm SD).

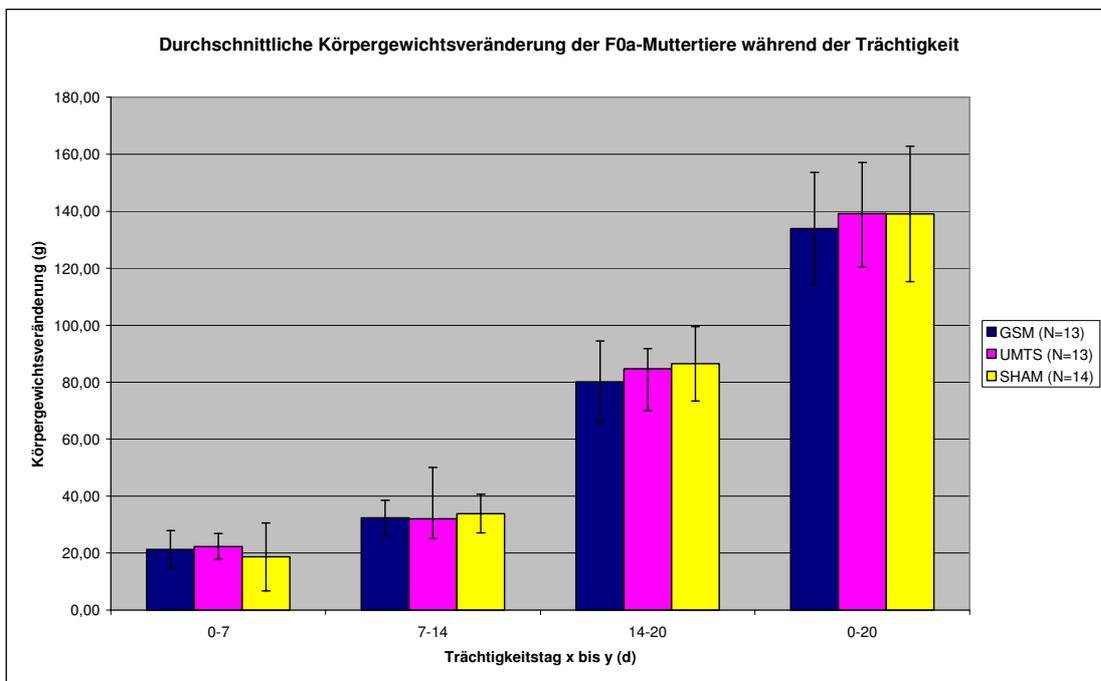


Abb. 3.9: F0a-Generation: Durchschnittliche Körpergewichtsveränderung der Muttertiere während der Trächtigkeit (Mean \pm SD).

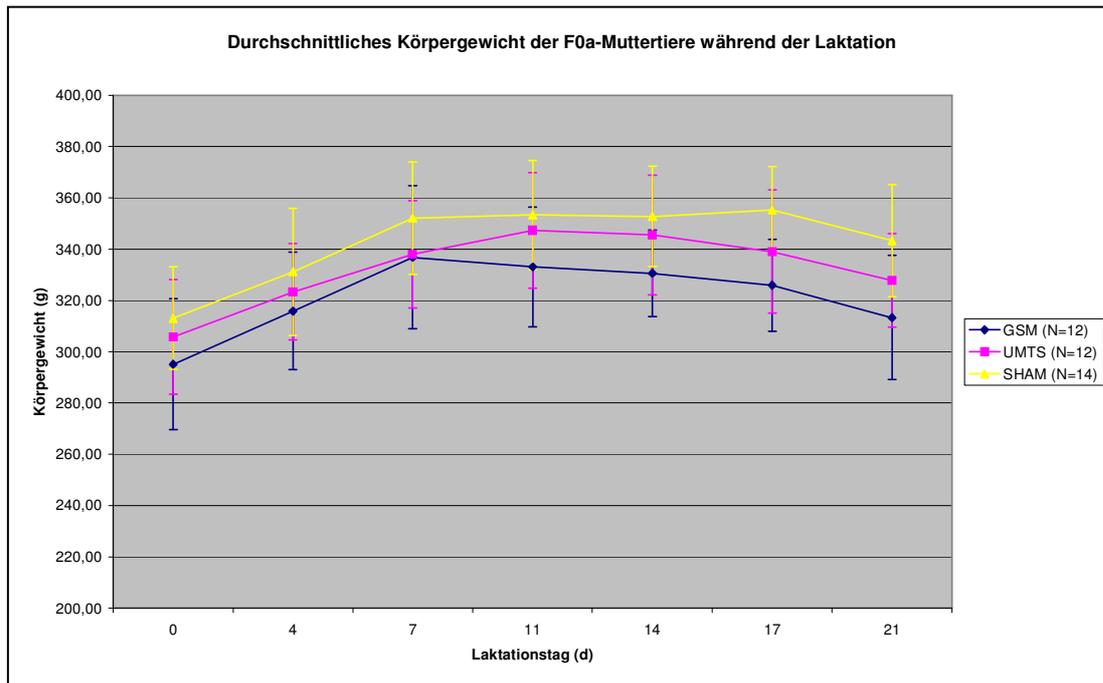


Abb. 3.10: F0a-Generation: Durchschnittliches Körpergewicht der Muttertiere während der Laktation (Mean \pm SD).

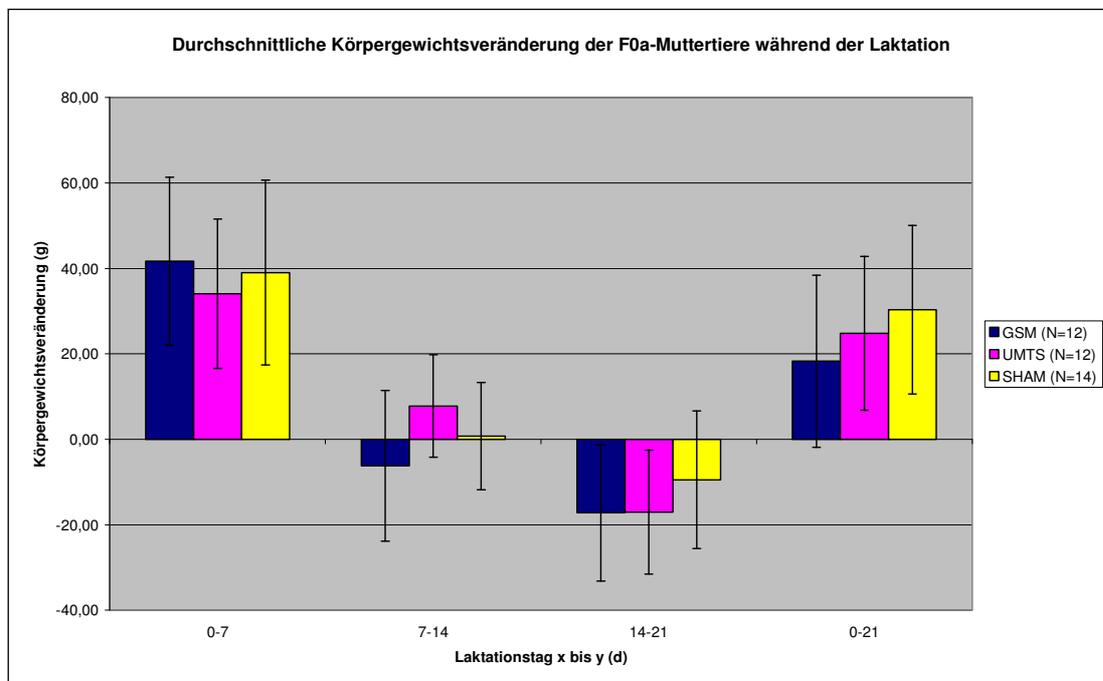


Abb.3.11: F0a-Generation: Durchschnittliche Körpergewichtsveränderung der Muttertiere während der Laktation (Mean \pm SD).

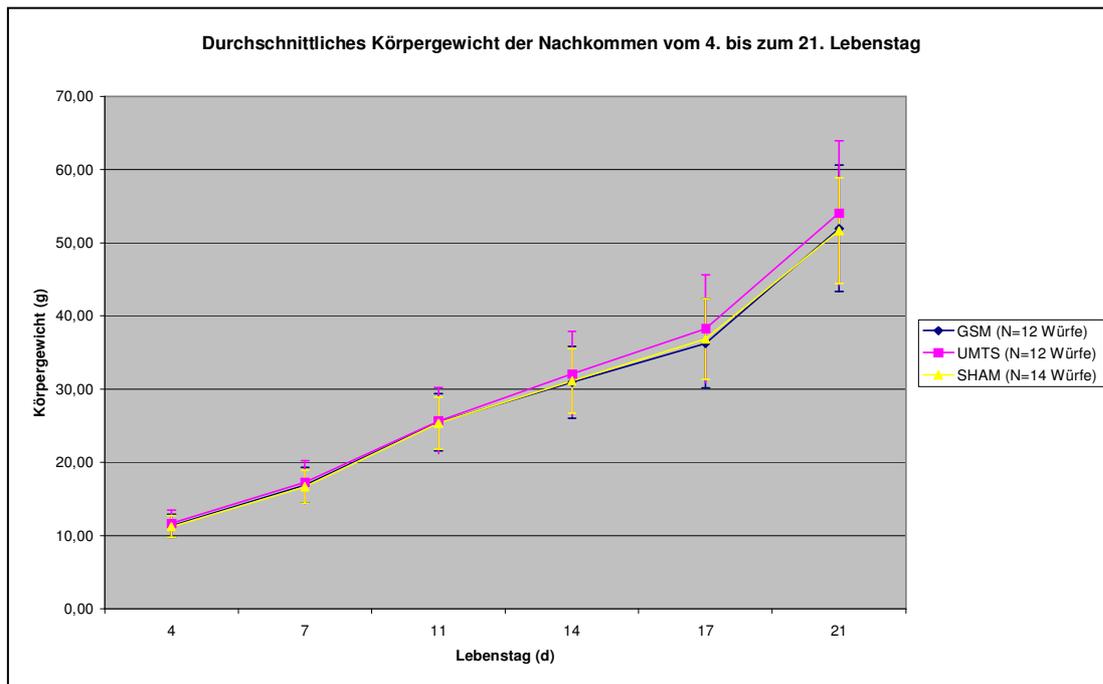


Abb. 3.12: F0a-Generation: Durchschnittliches Körpergewicht der Nachkommen vom 4. bis zum 21. Lebenstag (Mean \pm SD).

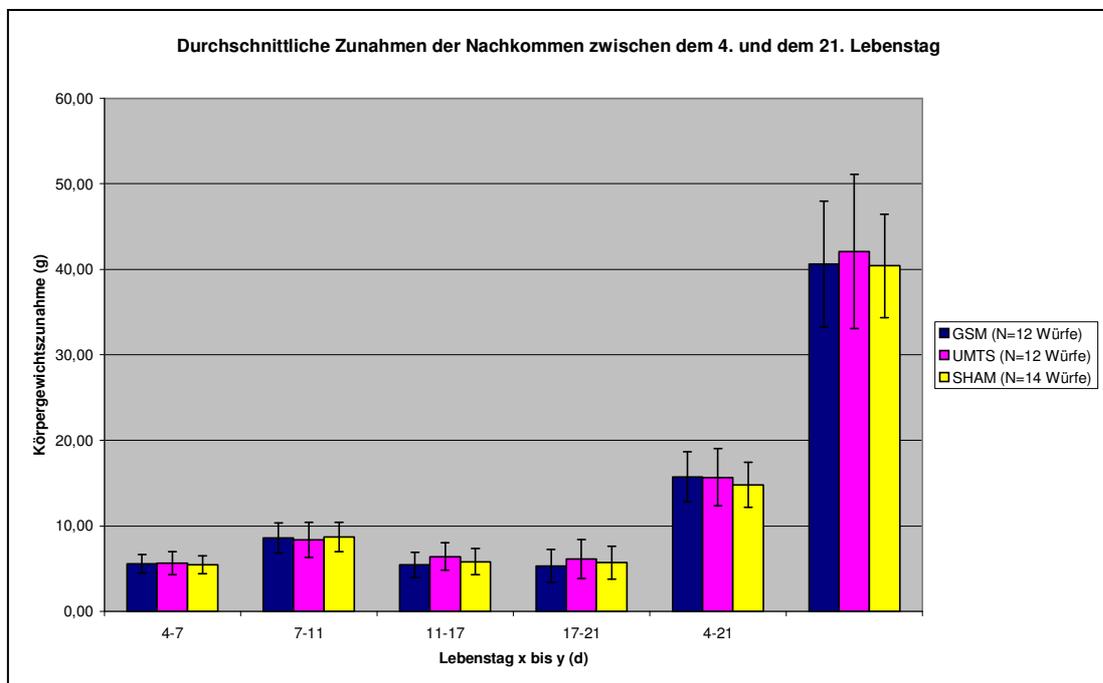


Abb. 3.13: F0a-Generation: Durchschnittliche Zunahmen der Nachkommen zwischen dem 4. und dem 21. Lebenstag (Mean \pm SD).

3.2.3 Ergebnisse der Untersuchungen zur physischen Entwicklung der F1-Generation

In der Tabelle 3.8 sind die Entwicklungsparameter 'Incisor eruption', 'Ear opening' und 'Eye opening' dargestellt. Aus der Tabelle 3.9 ist die Entwicklung des Körpergewichts in Abhängigkeit vom Geschlecht und der Expositionsart (GSM, UMTS, SHAM) ersichtlich (Abb. 3.14 und 3.15).

Tabelle 3.8: F1-Generation: Mittleres Lebensalter in Tagen (d) und mittleres Körpergewicht (g) der F1-Jungtiere bei Erreichen der drei Entwicklungsparameter incisor eruption (IE), ear opening (EAO) und eye opening (EO).

Entwicklungsparameter	F1-Generation: Mittleres Lebensalter in Tagen und mittleres Körpergewicht (KG) bei Erreichen des jeweiligen Entwicklungsparameters					
	GSM (N=12 Würfe)		UMTS (N=12 Würfe)		SHAM (N=12 Würfe)	
	Lebensalter (d)	KG (g)	Lebensalter (d)	KG (g)	Lebensalter (d)	KG (g)
Incisor eruption (IE)	8,62 ± 2,82	20,73 ± 6,95	8,96 ± 0,75	22,04 ± 3,10	9,43 ± 0,77	22,27 ± 2,48
Ear opening (EAO)	11,39 ± 3,92	26,88 ± 8,85	12,01 ± 2,21	27,27 ± 3,28	11,63 ± 0,40	26,88 ± 3,28
Eye opening (EO)	14,61 ± 5,10	32,87 ± 11,38	14,35 ± 1,03	33,85 ± 4,72	14,66 ± 0,29	33,15 ± 4,71

Tabelle 3.9: F1-Generation: Körpergewicht (g) männlicher und weiblicher Versuchstiere von der 3. bis zur 12. Lebenswoche.

Versuchsgruppe			F1-Generation: Mittleres Körpergewicht (g) 3. bis 12. Lebenswoche (LW)									
			3. LW	4. LW	5. LW	6. LW	7. LW	8. LW	9. LW	10. LW	11. LW	12. LW
GSM	m (N=14)	MW	55,97	79,84	127,38	175,98	231,04	291,28	329,55	371,30	397,76	428,79
		SD	6,97	13,28	17,58	17,41	20,20	24,22	25,91	29,00	34,80	37,61
	f (N=14)	MW	55,07	74,84	113,54	148,61	176,79	200,16	215,81	234,09	241,27	253,59
		SD	8,76	12,73	13,82	13,94	16,27	15,47	16,65	16,17	15,75	15,83
UMTS	m (N=14)	MW	56,83	74,58	117,60	164,57	217,36	278,30	315,36	354,24	383,99	409,04
		SD	10,45	12,60	15,37	21,04	25,13	33,70	33,73	36,08	42,26	49,31
	f (N=14)	MW	53,43	67,28	103,79	137,57	167,95	189,73	207,44	219,38	229,83	242,24
		SD	9,88	9,87	10,91	12,98	13,27	11,91	12,50	15,25	16,02	13,85
SHAM	m (N=14)	MW	54,08	76,16	121,51	167,76	220,01	280,34	320,26	359,38	387,29	407,52
		SD	9,73	15,84	20,03	21,45	25,75	31,54	23,42	30,25	32,17	31,72
	f (N=14)	MW	51,69	70,00	108,71	138,15	169,50	199,11	213,43	225,89	241,11	248,87
		SD	7,43	10,51	12,38	13,70	12,47	17,08	13,73	14,00	17,33	15,78

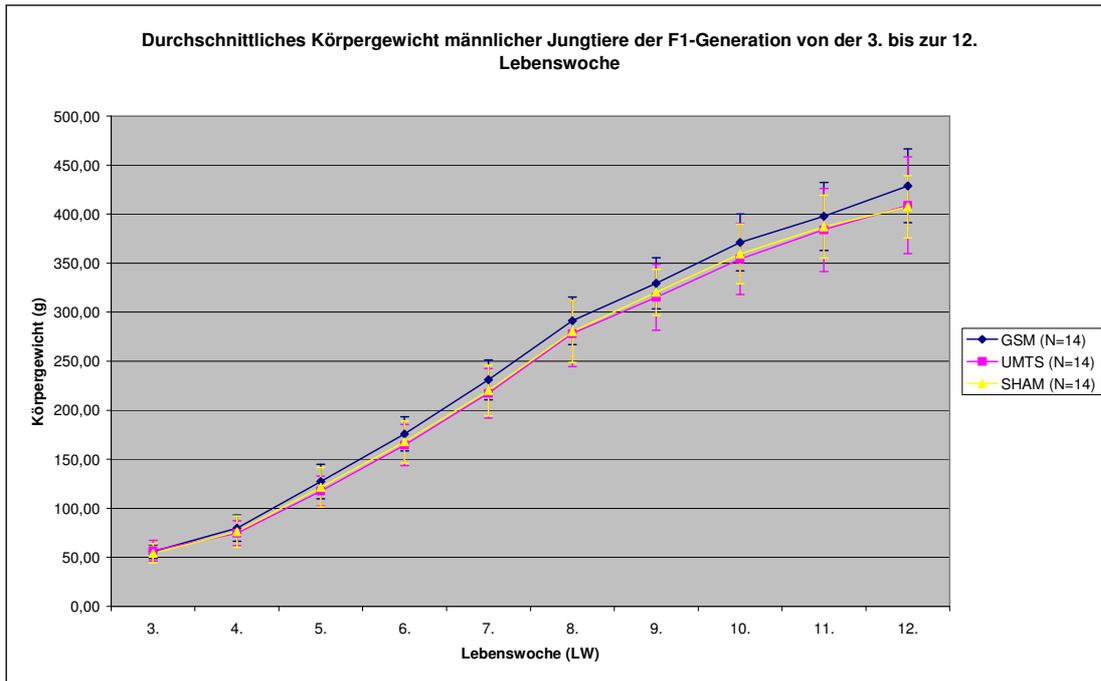


Abb. 3.14: F1-Generation: Durchschnittliches Körpergewicht männlicher bzw. weiblicher Jungtiere von der 3. bis zur 12. Lebenswoche (Mean \pm SD).

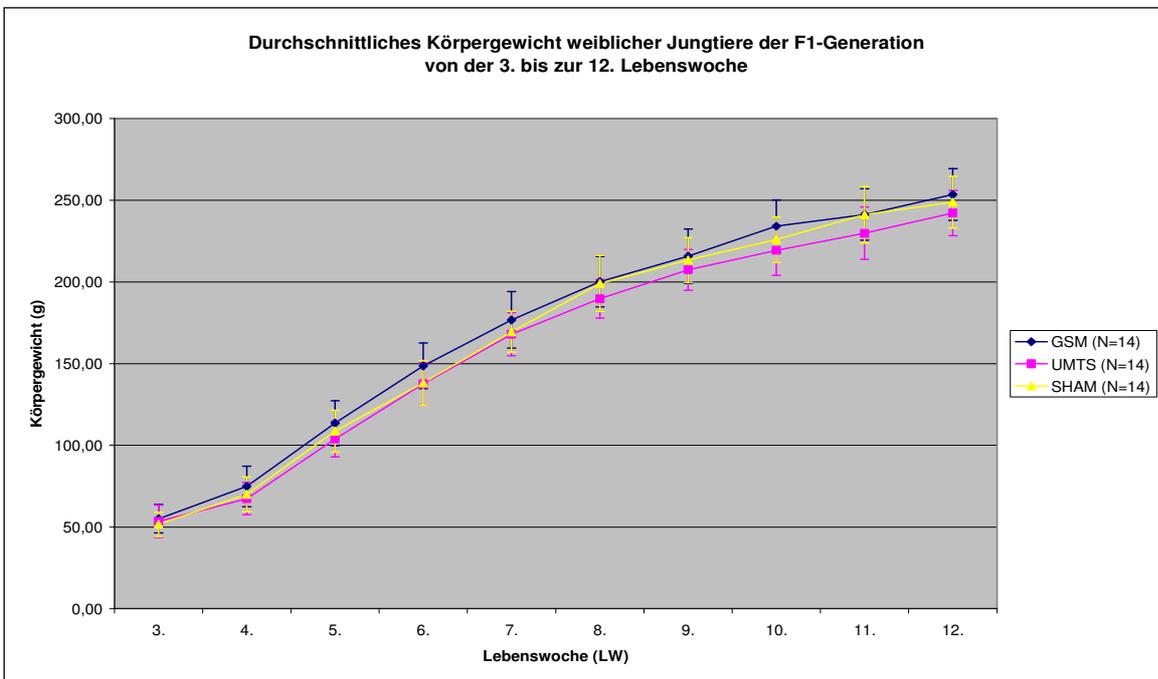


Abb. 3.15: F2-Generation: Durchschnittliches Körpergewicht weiblicher Jungtiere von der 3. bis zur 12. Lebenswoche (Mean \pm SD).

3.2.4 Ergebnisse der Untersuchungen zur Reproduktionsfähigkeit der F1-Generation

Tabelle 3.10: F1-Generation: Ergebnisse der Untersuchungen zur Reproduktionsfähigkeit

F1-Generation: Ergebnisse der Reproduktionsuntersuchungen			
Untersuchungsparameter	GSM (N=14)	UMTS (N=14)	SHAM (N=14)
Kopulations-Index (%) = Anzahl der Zuchtpaare mit positiver Plaquekontrolle x 100/Anzahl der zur Paarung eingesetzten Zuchtpaare	92,86	100	100
Fertilitäts-Index (%) = Anzahl der Weibchen mit positiver Trächtigkeitskontrolle am Tag 14 der Gravidität x 100/Anzahl der zur Paarung eingesetzten Zuchtpaare	92,86	100	100
Trächtigkeitsrate (%) = Anzahl der trächtigen Weibchen x 100/Anzahl der besamten Weibchen	100	100	100
	GSM (N=13)	UMTS (N=14)	SHAM (N=14)
Paarungsdauer (d) = durchschnittliche Paarungsdauer in Tagen	2,38 ± 1,12	3,21 ± 1,37	2,64 ± 1,39
Trächtigkeitsdauer (d) = durchschnittliche Trächtigkeitsdauer in Tagen	22,15 ± 0,38	22,00 ± 0,00	21,93 ± 0,27
Frühgeburtenrate (%) = Anzahl der Frühgeburten x 100/Anzahl der trächtigen Muttertiere (Frühgeburt = Geburt vor dem 20. Trächtigkeitstag)	0	0	0
Verlängerte Tragzeit (%) = Anzahl der trächtigen Muttertiere, die nicht innerhalb von 2 Tagen nach dem errechneten Wurftermin (Trächtigkeitstag 21) gebären x 100/Anzahl der trächtigen Muttertiere	0	0	0
Gestations-Index (%) = Anzahl der trächtigen Muttertiere mit lebenden Nachkommen x 100/Anzahl der trächtigen Muttertiere	100	100	100

Anzahl der trächtigen Muttertiere mit Geburtsproblemen (N)/Anzahl der trächtigen Muttertiere (z.B. Geburtsverhaltung, Tod während der Geburt, Gebärmuttervorfall....)	1/13	0/14	0/14
Untersuchungsparameter	GSM (N=13)	UMTS (N=14)	SHAM (N=14)
Wurfgröße (N)			
Gesamtzahl der lebend geborenen Nachkommen (NK)	167	143	172
Anzahl tot geborener NK	9	5	11
Durchschnittliche Wurfgröße (N) = durchschnittliche Anzahl der pro Wurf lebend geborenen Nachkommen (NK)	12,85 ± 2,27	10,21 ± 2,52	12,29 ± 2,73
Durchschnittliche Anzahl der lebend geborenen weiblichen NK (Tag 4)	5,00 ± 2,27	5,43 ± 2,14	5,57 ± 2,28
Durchschnittliche Anzahl der lebend geborenen männlichen NK (Tag 4)	5,77 ± 3,09	4,50 ± 1,70	6,07 ± 2,16
Durchschnittliche Anzahl der tot geborenen NK	0,69 ± 1,03	0,36 ± 0,84	0,79 ± 1,89
Vitalität der Würfe (%) = Anzahl der lebend geborenen NK x 100/Anzahl der lebend und tot geborenen NK	94,89	96,62	93,99
Geschlechterverhältnis der lebenden NK (m:f) (Tag 4)	1:0,87	1:1,21	1:0,92
Missbildungsrate (%) = Anzahl der lebenden Nachkommen (NK) mit äußerlich sichtbaren morphologischen Defekten x 100/Anzahl der lebenden NK (z.B. Knickschwanz, Mikrophthalmos, Anophthalmos, permanent geschlossener äußerer Gehörgang...)	0	0	0,58
Überlebens-Index I (%) = Anzahl der lebenden NK am 4. Lebenstag x 100/Anzahl der lebenden NK am Wurfstag	83,83	97,20	95,35
Überlebens-Index II (%) = Anzahl der lebenden NK am 21. Lebenstag x 100/Anzahl der lebenden NK am 4. Lebenstag	98,57	100	100

3.2.5 Ergebnisse der Untersuchungen zur physischen Entwicklung der F2-Generation

Aus der Tabelle 3.11 ist die Entwicklung des Körpergewichts in Abhängigkeit von Geschlecht und der Expositionsart (GSM, UMTS, SHAM) ersichtlich (Abb. 3.16 und 3.17).

Tabelle 3.11: F2-Generation: Körpergewicht (g) männlicher und weiblicher Versuchstiere von der 3. bis zur 12. Lebenswoche

Versuchsgruppe			F2-Generation: Mittleres Körpergewicht (g) 3. bis 12. Lebenswoche (LW)									
			3. LW	4. LW	5. LW	6. LW	7. LW	8. LW	9. LW	10. LW	11. LW	12. LW
GSM	m (N=28)	MW	44,06	60,91	109,60	153,13	211,26	253,45	296,48	322,44	351,41	366,19
		SD	5,24	9,71	12,29	18,39	28,82	29,3	33,78	34,92	43,89	40,95
	f (N=42)	MW	41,59	55,93	95,52	126,05	156,45	174,86	192,22	204,48	215,78	223,51
		SD	5,64	9,30	11,34	14,01	19,51	19,98	22,47	21,40	21,20	23,70
UMTS	m (N=28)	MW	47,76	64,17	111,37	152,39	210,45	253,41	298,41	325,55	352,00	368,20
		SD	6,63	11,74	16,08	18,25	24,45	26,10	25,17	30,08	31,11	33,14
	f (N=42)	MW	45,60	59,79	98,20	125,10	159,60	179,31	196,12	209,46	221,15	227,96
		SD	7,20	11,04	12,72	22,74	16,16	13,67	14,98	15,06	16,04	17,99
SHAM	m (N=27)	MW	41,67	60,52	108,41	150,30	205,49	245,33	289,56	320,08	346,09	367,13
		SD	6,05	9,85	13,59	12,60	16,61	19,22	22,77	26,35	30,74	37,12
	f (N=43)	MW	40,26	56,60	97,48	129,02	158,65	180,28	197,37	210,96	222,32	236,22
		SD	5,79	7,48	9,28	8,75	11,56	13,75	15,23	18,22	19,93	35,62

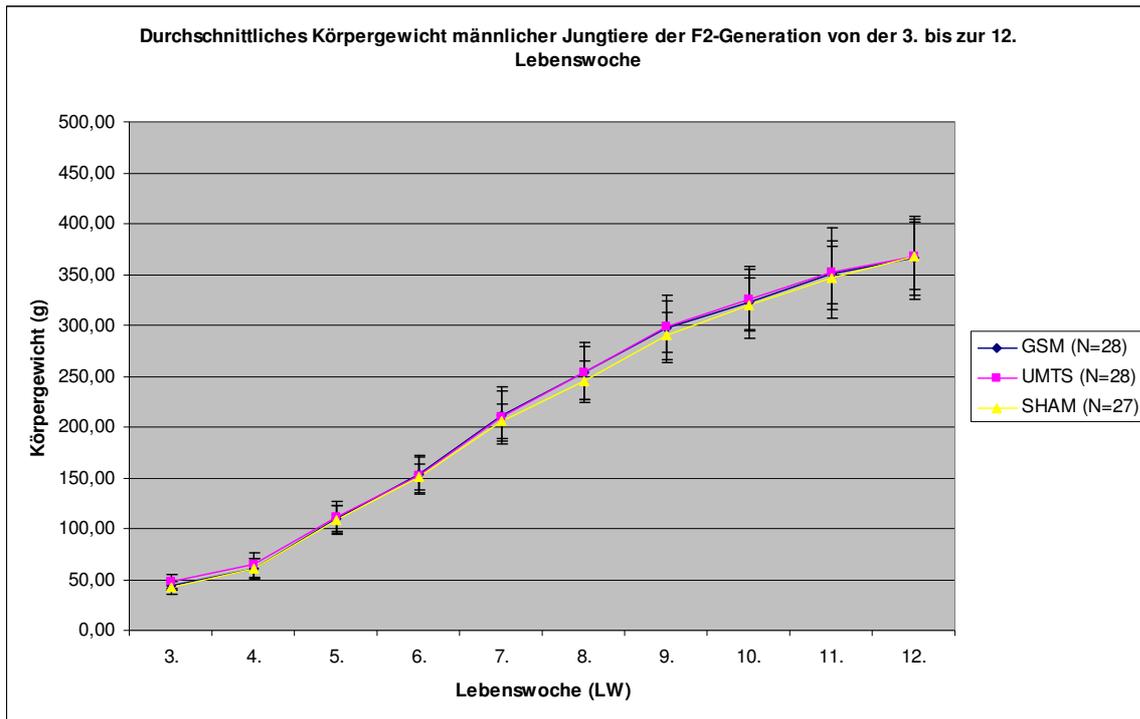


Abbildung 3.16: F2-Generation: Durchschnittliches Körpergewicht männlicher Jungtiere von der 3. bis zur 12. Lebenswoche (Mean \pm SD).

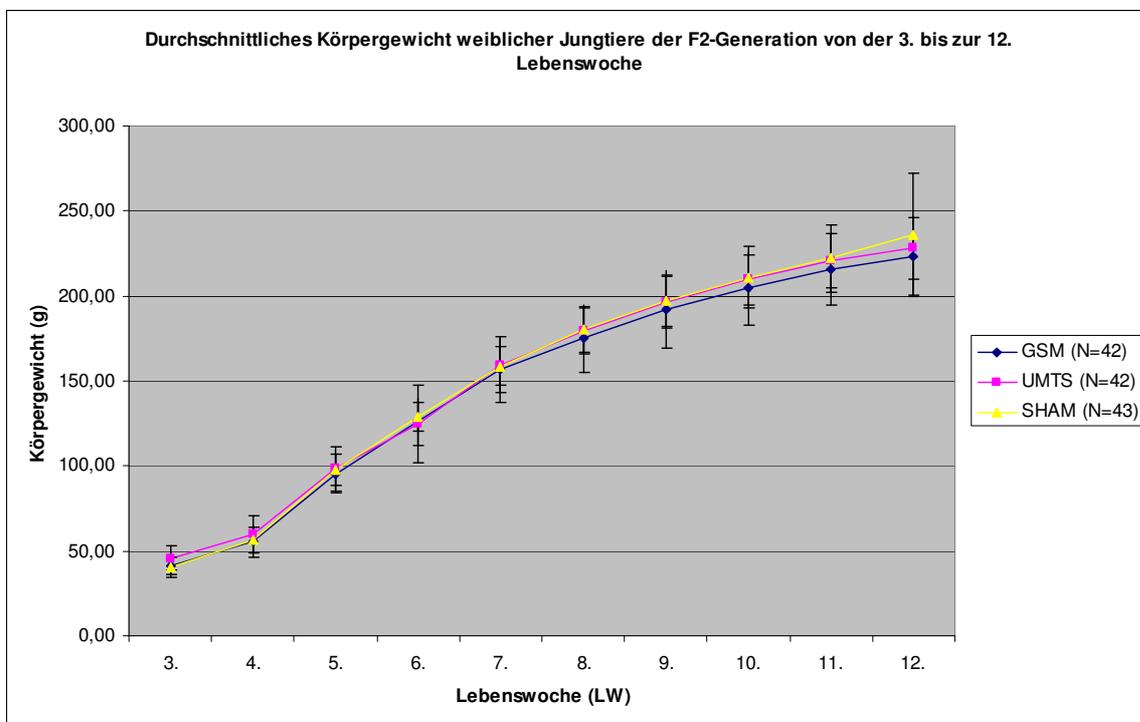


Abbildung 3.17: F2-Generation: Durchschnittliches Körpergewicht weiblicher Jungtiere von der 3. bis zur 12. Lebenswoche (Mean \pm SD).

3.3 Diskussion der Haltungsbedingungen, der Reproduktions- und physischen Entwicklungsparameter

Die Reproduktions- und Entwicklungsdaten wurden systematisch in der F0a-Generation untersucht. Da es keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den Expositionsgruppen (GSM, UMTS, SHAM) gab, wurde bei den weiteren Generationen auf eine systematische Untersuchung dieser Parameter weitgehend verzichtet. Am Beispiel der dargestellten F1-Generartion wurde nochmals die Körpergewichtsentwicklung gegenübergestellt. Dabei konnten ebenfalls keinerlei Unterschiede festgestellt werden. Die weitere F2 Generation wurde zwar routinemäßig überwacht, aber die Ergebnisse im Bericht nicht mehr dargestellt. Zusammenfassend kann aber festgestellt werden, dass in keiner Generation signifikante Unterschiede aufgrund der Expositionen gefunden werden konnten.

Im Rahmen der regelmäßigen tierärztlichen Kontrollen der Versuchstiere wurden stichprobenartig Kotproben zur Prüfung auf Parasitenbefall entnommen sowie die Haltungsbedingungen der Tiere kontrolliert.

3.3.1 Entwurmung

Im April 2006 wurde bei einer routinemäßigen Kotprobenuntersuchung ein schwach positiver Befund an Syphacea ssp. festgestellt. Daraufhin erfolgte eine dreiwöchige Fütterung aller Versuchstiere mit speziell dafür gemischtem Entwurmungsfutter (Altromin 1324 mit Flubenol 5%ig, Altromin® GmbH, Lage-Lippe). Im Anschluss an die Entwurmung wurde der Behandlungserfolg kontrolliert. Es waren keine Wurmeier mehr nachweisbar.

Im weiteren Verlauf des Versuches wurden später zwei weitere schwach positive Syphacea Kotproben (Käfigsammelproben) gefunden und daraufhin wurde erneut über einen kürzeren Zeitraum entwurmt. Obwohl die Wurmbehandlung keine gesundheitliche Relevanz hatte, wurde dennoch angestrebt die Entwurmung in wenig sensiblen Versuchsphasen durchzuführen.

Flubenol mit dem Wirkstoff Flubendazol ist ein synthetisches Anthelmintikum der Gruppe der Benzimidazole. Es hemmt selektiv und irreversibel den Aufbau der Mikrotubuli im Absorptionsgewebe von Rund- und Bandwürmern. Damit sind die Absorption von Nährstoffen und die Verdauung der Würmer gestört, die betroffenen Zellen sterben ab und es kommt zum Tod des Parasiten. Die ovizide Wirkung der Benzimidazole beruht auf der Hemmung der

Spindelbildung und Störung des Metabolismus während der Embryogenese (Ungemach 1994). Voraussetzung für die volle Wirksamkeit ist eine genügend lange Kontaktzeit mit den Parasiten (Lanusse 1993).

Die kurze Darmpassagezeit bedingt eine vernachlässigbar niedrigere Bioverfügbarkeit im Organismus des Wirts. Selbst in erheblicher mehrfacher Überdosierung verursacht Flubendazol keine Nebenwirkungen bei den Ratten (Cieslicki 1988). Die LD₅₀ in Labortieren nach oraler Aufnahme liegt bei über 2560 mg/kg (Thienpont 1978). Daher kann eine gesundheitliche Beeinträchtigung der Tiere durch die Behandlung ausgeschlossen werden. Demzufolge wurden auch keine teratogenen und embryotoxischen Wirkungen bei Ratten, die zwischen dem 6. und 15. Trächtigkeitstag 2,5 - 40 mg/kg/Tag Flubendazol erhielten, beobachtet (Thienpont 1978).

Auf Grund der Spezifität für die Parasiten und der sehr guten Verträglichkeit von Flubendazol für die Versuchstiere, ist mit keiner Auswirkung der Entwurmung auf alle Ergebnisse aller Teilversuche zu rechnen. Auch der vereinzelt aufgetretene sehr geringe Parasitenbefall mit Syphacea ssp. hatte keine gesundheitlichen Auswirkungen und ist ebenfalls für alle durchgeführten Messungen irrelevant.

3.3.2 Messung der Schadgasentwicklung in den Tierkäfigen und des Klimas in den Kammern

Die erste unverfälschte, genaue und umfangreiche Messung des Ammoniak-, Kohlenstoffdioxid- und Wassergehalts erfolgte im Juni 2006 in allen Rattenkäfigen und in allen drei Expositionskammern. Für diesen Zweck wurde nach einer Literaturrecherche Kontakt mit dem Lehrstuhl für Landwirtschaft und Landtechnik der Universität Weihenstephan aufgenommen und die notwendigen Messungen geplant. Dankeswerterweise wurden uns sehr sensitive Messgeräte zur Verfügung gestellt, mit deren Hilfe Konzentrationen im ppm-Bereich nachweisbar sind. Mit Hilfe eines Schlauchsystems wurde das Klima innerhalb der Käfige gemessen, ohne den Deckel zu öffnen und die Zusammensetzung der Gase zu beeinflussen. Die Messzeitpunkte wurden so gewählt, dass die größtmögliche Schadgasentwicklung gemessen werden konnte, d.h. alle Messungen wurden kurz vor der Käfigreinigung (Entmistung) durchgeführt. Daher ist davon auszugehen, dass die gemessenen Werte die erreichten Maximalwerte beschreiben.

Bei dieser ersten Messung wurden leicht erhöhte CO₂- und H₂O-Werte sowohl innerhalb der Käfige, als auch innerhalb der Kammern gefunden (vergleiche Tabelle 3.12). Da Ammoniak

leichter als Luft ist, konnte es aufsteigen und über die durchbohrten Käfigdeckel entweichen. Im Gegensatz dazu hat sich das CO₂, da es schwerer als Luft ist, am Käfigboden angereichert. Die Werte geben zwar keinen Anlass zu gesundheitlichen Bedenken, sind aber ein Hinweis auf einen nicht optimalen Luftaustausch zwischen der einströmenden Frischluft und der Kammerluft. Daher wurde das Strömungsverhalten der zugeführten Frischluft mit Hilfe eines Verneblers (dabei trat auch keinerlei Belastung für die Versuchstiere auf) untersucht und festgestellt, dass auf Grund der hohen Temperaturdifferenz von einströmender Luft (ca. 16°C) zu Kammerluft (22°C), ein Großteil der Frischluft direkt zu Boden fiel und von dort nur unzureichend in der Kammer verwirbelt wurde. Um das Raumklima zu optimieren, wurden verschiedene Maßnahmen ergriffen. Die Temperaturdifferenz von Frischluft und Kammerluft wurde durch den Austausch der konventionellen Lampen durch Energiesparlampen erheblich gesenkt, ohne jedoch die Beleuchtung (gemessene Luxzahl) der einzelnen Käfigstellplätze zu verändern. Mit Hilfe von Brettern wurde die einströmende Luft durch die Regalebene, auf welchen die Tierkäfige platziert waren, geleitet.

Tabelle 3.12: Ergebnisse der Klimamessungen in der Luft aller Rattenkäfige (GSM-Käfige n = 40, UMTS-Käfige n = 40, Kontroll-Käfige n = 47) und in der Luft der gesamten Kammern (GSM- und UMTS-Kammer: je 6 Einzelmessungen, Kontroll-Kammer: 9 Einzelmessungen) vor und nach den Maßnahmen zur Klima-verbesserung Juni 2006 und Aug. 2006 (Mean ± SD).

Messort	Messung	MW NH ₃ [ppm]	MW CO ₂ [ppm]	MW H ₂ O [ppm]
Käfige GSM	vorher	3,45 ± 2,13	5024 ± 1262	24661 ± 3002
	nachher	4,35 ± 0,61	2323 ± 1520	19410 ± 2540
Käfige UMTS	vorher	3,41 ± 0,57	4978 ± 1013	23651 ± 1418
	nachher	5,58 ± 1,35	2827 ± 1215	18542 ± 2207
Käfige Kontrolle	vorher	3,64 ± 1,65	5467 ± 1422	23598 ± 1297
	nachher	3,31 ± 0,67	2162 ± 826	19404 ± 2623
Kammer GSM	vorher	1,00 ± 0,27	1048 ± 26	16200 ± 566
	nachher	5,66 ± 0,36	679 ± 32	12783 ± 75
Kammer UMTS	vorher	2,22 ± 0,42	917 ± 93	14950 ± 321
	nachher	6,29 ± 0,60	686 ± 22	12280 ± 181
Kammer Kontrolle	vorher	1,93 ± 1,13	791 ± 45	17466 ± 4982
	nachher	4,28 ± 1,12	499 ± 29	12980 ± 475

Zusätzlich wurden die Tierkäfige auf beiden Stirnseiten jeweils mit neun Belüftungsöffnungen versehen, um den Luftaustausch zwischen den Käfigen und den Kammern zu verbessern. Direkt im Anschluss an diese Maßnahmen wurde eine zweite Messung im August 2006 durchgeführt und dabei wurden deutlich niedrigere CO_2 und H_2O -Werte gemessen (Tabelle 3.12).

Der normale Gehalt an CO_2 in der Luft ist 381 ppm (0,0381 %). Die direkte Schädigung auf Tier und Mensch beruht auf der Verdrängung des Sauerstoffes in der Luft. Darüber hinaus aktiviert im Blut gelöstes CO_2 in physiologischer (physiologische Atemregulation) und leicht gesteigerter Konzentration das Atemzentrum des Gehirns. In deutlich höherer Konzentration führt es jedoch zur Verminderung oder sogar Aufhebung des reflektorischen Atemanreizes (Atemdepression, Atemstillstand). Diese Wirkungen treten viel rascher ein als eine Erstickung. Ab etwa 1,5 Prozent CO_2 (15.000 ppm) in der eingeatmeten Luft kommt es zu einer Zunahme des Atemzeitvolumens um etwa 40 %.

In unseren Messungen traten jedoch nur - und diese wahrscheinlich auch nur kurzfristig - CO_2 -Konzentrationen von 0,5 % (5.000 ppm) auf, die der maximalen Arbeitsplatzkonzentration entsprechen und noch unschädlich sind. Nach der Verbesserung der Klimabedingungen konnte dieser Gehalt jedoch sowohl in den Tierkäfigen als auch in den ganzen Kammern deutlich gesenkt werden.

Literatur

Roberson EL und Burke TM (1982). Evaluation of granulated fenbendazole as a treatment for helminth infections in dogs. J Am Vet Med Assoc 180: 53-55.

Clayton HM (1983): The management and treatment of respiratory nematode infection in small animals. Vet Annu 23: 254-259.

McKellar QA et al (1990): Pharmacokinetics of fenbendazole in dogs. J Vet Pharmacol Ther 13: 386-392.

Ungemach FR (1994): Antiparasitika. In: Grundlagen der Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren (W Löscher, FR Ungemach & R Kroker, eds), Parey, Berlin (D); 243-283.

Lanusse CE und Prichard RK (1993): Relationship between pharmacological properties and clinical efficacy of ruminant anthelmintics. Vet Parasitol 49: 123-158.

Cieslicki M (1988): Flubenol P, ein neues Anthelminthikum für Hund und Katze. Prakt Tierarzt 69: 16-22, 1988.

Thienpont D, Vanparijs O, Niemegeers C, Marsboom (1978): Biological and pharmacological properties of flubendazole. Arzneimittelforschung 28: 605-612.

BfS-Forschungsvorhaben:

"*in vivo*-Experimente unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation – Langzeituntersuchungen"

Abschlussbericht an das BfS

Teilbereich:

Operante Verhaltensuntersuchungen zur Lern- und Gedächtnisleistung von Ratten

vorgelegt von Dr. med. Michael Bornhausen

Zu den anderen Teilbereichen des BfS-Forschungsvorhabens mit Parallel-Untersuchungen zur Blut-Hirn-Schranke und Immunologie bei Wurfgeschwistern der Versuchstiere werden eigene Berichte vorgelegt.

INHALTSVERZEICHNIS	Seite	62
ABBILDUNGSVERZEICHNIS		64
ZUSAMMENFASSUNG		65
Summary		
Ziel		
EINFÜHRUNG		66
Chronik des Aufbaus der Untersuchungseinrichtungen sowie Erarbeitung wesentlicher Entscheidungen für das BfS-Forschungsvorhaben		
Begründung für operante Verhaltensuntersuchungen		
MATERIAL UND METHODEN		70
Aufbau der Expositions- und Untersuchungseinrichtungen		70
Exposition		70
Voraussetzungen		
Logistik		71
Käfige		71
Vermeidung von Nageschäden		
Tiere		72
SPRAGUE-DAWLEY- vs. WISTAR-Ratten		
Vorversuche		72
Selektion der F-1-Ratten		
Ratten der F0-, F1- und F2-Generationen		72
Skinner'sche Testkäfige		73
"intelligence panel"		
Überboxen		
Raumbeleuchtung		
Trinkwasserversorgung		
Hauslicht		
Hebel		
Signallichter		
Futterautomaten		
Überwachung		
Steuerung und Datenregistrierung		76
OBC-GUI, Datensicherung		
Prüfung "kognitiver" Leistungen von Ratten		
Erläuterung der methodischen Vorgehensweise		
Testsequenz		
Testsitzung		
Konventionelle Auswertung		
"Mikrostrukturen" und "points"		78
Operantes Testverfahren " <u>D</u> iff. <u>R</u> einforcement of <u>L</u> ow Rate" (DRL)		
"scatter plots"		
Mathematische Bewertungsmethode		
IRI-Struktur (" <u>i</u> nter- <u>r</u> esponse <u>i</u> ntervals")		
Histogramm Pointfit		79
S-Kurven-Fit		
Mikrostruktur-Analyse der DRL-Testsitzungen mit Hilfe von "points"		
"Lernen" und "Gedächtnis":		
Auswertung der <u>ersten</u> bzw.		
der <u>zweiten</u> DRL-Testsitzung		
Beispiele für die Mikrostruktur-Analyse		81
Statistische Berechnungen		85
ERGEBNISSE		86
Operante Verhaltensuntersuchungen der F0-, F1- und F2-Ratten		89
Anmerkungen		
Normierungen der Parameter		
Korrelationen		
Zusammenfassung "rel. performance" und "points"		96

Wiederholungsuntersuchungen bei den F0-Ratten	98
Anmerkungen	
Normierungen der Parameter	
Korrelationen	
Zusammenfassung "rel. performance" und "points"	104
DISKUSSION	107
SCHLUSSFOLGERUNG	108
LITERATURVERZEICHNIS	109
Vorträge und Veröffentlichungen seit 2003	

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb.	1	Skinner'sche Testkäfige
	2	intelligence panel
	3	Überwachungsdatei
	4	IRI-Datei
	5	screenshot
	6	scatter plot
	7	histogram pointfit
	8a	scatter
	8b	S-Kurve (learner)
	9a	scatter
	9b	S-Kurve (non-learner)
	10	Lernfähigkeit
	11	Gedächtnis

Normierungen (F0, F1, F2)

	12	activity
	13	reinforcements
	14	rel. performance
	15	points

Korrelationen

	16	activity vs. reinforcements
	17	activity vs. rel. performance
	18	reinforcements vs. rel. performance (resp. efficiency)
	19	activity vs. points
	20	reinforcements vs. points
	21	rel. performance vs. points

Zusammenfassung (Säulen-Diagramm)

	22	rel. performance
	23	points

Normierungen (F0-Wiederholung)

	24	activity, reinforcements, rel. performance, points
--	----	--

Korrelationen

	25	activity vs. reinforcements
	26	activity vs. rel. performance
	27	reinforcements vs. rel. performance (resp. efficiency)
	28	activity vs. points
	29	reinforcements vs. points
	30	rel. performance vs. points

Zusammenfassung (Säulen-Diagramm)

	31	rel. performance
	32	points

ZUSAMMENFASSUNG

Die Kompetenz verschiedener wissenschaftlicher Institute der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) und der Technischen Universität München (TUM) wurde gebündelt, um gemeinsam ein Forschungsvorhaben des Bundesamts für Strahlenschutz (BfS) durchzuführen. Dieses Vorhaben sollte ein eventuelles gesundheitliches Risiko aufdecken und gegebenenfalls analysieren, das nach chronischer Exposition durch elektromagnetische Felder (EMFs) der mobilen Kommunikationssysteme GSM (900 MHz) und UMTS (1966 MHz) entstehen könnte. Drei aufeinander folgende Generationen (F0, F1, F2) von männlichen und weiblichen Wistar-Ratten wurden hierzu codiert und in einer GSM- oder in einer UMTS-Kammer (je 400x400x400 cm³) kontinuierlich einem EMF mit einer Spezifischen Absorptionsrate (SAR) von 0.4 W/kg ausgesetzt und mit Tieren verglichen, die in einer identischen Kammer scheinexponiert worden waren. Der gewählte SAR-Wert ist von der International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP) als Grenzwert für beruflich exponierte Menschen empfohlen.

Unter Berücksichtigung der besonderen Empfindlichkeit des Zentralen Nervensystems (ZNS) konzentrierte sich unser experimenteller Ansatz auf Untersuchungen des Lernvermögens und des Gedächtnis. Im Rahmen einer Doppelt-Blind-Untersuchung wurde hierzu systematisch die operante Lernleistung von codierten männlichen und weiblichen Ratten aus den verschiedenen Generationen in standardisierten Skinner'schen Testkäfigen geprüft. Die Tiere mussten hierbei lernen, einen Hebel zu drücken, um Belohnungen (Futterkügelchen à 45 mg) zu erhalten. Nach Erlernen dieser Aufgabe wurden die Bedingungen für eine Belohnung allmählich erschwert und die Dynamik des Lernvorgangs während der anschließenden Testsitzungen analysiert. Die Testsitzungen wurden unter Rechner-Kontrolle automatisch während der Nacht (16:00 – 07:00 Uhr MEZ) durchgeführt. Zur Vermeidung einer vorschnellen Sättigung des Versuchstiers wurde eine Testsitzung unterteilt in 10 Zyklen mit alternierenden 30 min dauernden ON- und 60 min dauernden OFF-Phasen. Eine Belohnung war nur während der ON-Phasen erhältlich.

Als Parameter des individuellen Lerngeschehens standen sowohl die Hebeldrücke und die Belohnungen als auch die Zeit-Intervalle zwischen aufeinander folgenden Hebeldrücken ("inter-response intervals", IRIs) zur Verfügung. IRIs wurden mit einer Auflösung von 1 msec registriert. Besondere Bedeutung für die Bewertung hatte das Testverfahren Differential Reinforcement of Low Rate (DRL 1/16), das von den Versuchstieren nach einer Belohnung die Berücksichtigung eines Sperrintervalls von 16 sec forderte. Als Ergänzung der konventionellen Berechnung des Verhältnisses von richtigen zu falschen Reaktionen am Ende der Testsitzung konnte mit Hilfe eines neuen Verfahrens auch die Dynamik des Lernvorgangs während der Sitzung kontinuierlich erfasst und bei der Bewertung der Untersuchungsergebnisse berücksichtigt werden.

Im Vergleich mit den scheinexponierten Kontrolltieren dieses Langzeit-Experiments über drei Generationen konnten durch diese Analysetechnik aber weder bei den GSM- noch bei den UMTS-exponierten Ratten signifikante EMF-induzierte Abweichungen der operanten Verhaltens- oder der Gedächtnisleistung festgestellt werden.

Die hier beschriebenen Untersuchungen sind eine Fortführung früherer Experimente, die im Institut für Toxikologie des GSF-Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, München-Neuherberg, durchgeführt und veröffentlicht wurden (M. Bornhausen and H. Scheingraber: Prenatal exposure to 900 MHz, cell-phone electromagnetic fields had no effect on operant-behavior performances of adult rats. *Bioelectromagnetics* 21:566-574, 2000).

Die technischen Details der homogenen EMF-Exposition von bis zu 120 Versuchstieren in ca. 40 Käfigen innerhalb einer Kammer mit Hilfe entsprechender Parabolspiegel (Ø 320 cm) sind Gegenstand eines eigenen Berichts. Das gleiche gilt für die eingehende Beschreibung der Haltungs- und Aufzuchtbedingungen für die Versuchstiere, die Erfassung der Entwicklungsmerkmale, sowie für die parallel durchgeführten Untersuchungen der Blut-Hirn-Schranke und der Immun- bzw. Stressreaktion.

Summary

The competence of several institutes of the Ludwig-Maximilians-University (LMU) and the Technical University of Munich (TUM) were combined to run a research project of the German Federal Office of Radiation Protection (Bundesamt für Strahlenschutz, BfS) to detect and analyze potential health effects – if any – of chronic exposure to electromagnetic fields (EMFs) of mobile communication. Three consecutive generations (F0, F1, F2) of WISTAR rats were continuously exposed to either GSM (900 MHz)- or UMTS (1966 MHz)-EMFs in HF-exposure chambers (400x400x400 cm³) and – within the framework of a double-blind study – compared to controls. SAR (specific absorption rate) values for GSM- and UMTS-exposure were identical to occupational exposure levels tolerated in human subjects (0.4 W/kg).

Regarding the particular sensitivity of the central nervous system (CNS) our experiment focused on a computer-controlled assessment of eventual cognitive or learning ability deficits. For that purpose the rats of the three generations were confronted with a sequence of different operant-behavior performance tests (i.e. "differential reinforcement of high resp. low rate") with increasing learning demand. 15-hour test sessions were run automatically during night and subdivided into alternating 30-min ON- and 60-min OFF-periods. Reinforcements (food pellets à 45 mg) were available only during ON-periods. Number of lever presses, food reinforcements, and test efficiency of each animal were stored and related to the occurrence of test-specific microstructures, i.e. distribution of time intervals between consecutive lever presses during the 10 ON-periods of a test session. The pattern of these inter-response intervals (IRIs) and parameters of appropriate S-curve fits were found to be representative of operant-behavior task acquisition dynamics ["points"] and differentiated between "learners" and "non-learners".

The analysis of the results of this experiment in 3 consecutive generations of WISTAR rats, however, did not show any significant deviations of operant-behavior performance or memory in continuously either GSM- or UMTS-exposed rats when compared to sham-exposed animals.

Part of our experiment replicated previous work by M. Bornhausen and H. Scheingraber published in *Bioelectromagnetics* 21:566-574, 2000, where a prenatal EMF exposure (GSM, SAR 17.5-75 mW/kg) did not induce any changes of operant-behavior performance.

Technical details of the homogenous EMF-exposure of up to 120 subjects in about 40 cages by a parabolic mirror (Ø 320 cm) in HF-shielded exposure chambers, animal care and breeding, records of developmental landmarks, investigations of the blood-brain-barrier, as well as of immunological and stress reaction parameters in litter mates were described in separate reports.

Ziel

Übergeordnetes Ziel des gesamten Forschungsvorhabens war die Aufdeckung und Analyse eventueller gesundheitsrelevanter Änderungen der Funktionen des Zentralen Nervensystems (Lernen und Gedächtnis), der Blut-Hirn-Schranke sowie des Immun- bzw. Stressantwortsystems bei drei aufeinander folgenden Rattengenerationen nach chronischer Einwirkung elektromagnetischer Felder des GSM- oder des UMTS-Mobilfunksystems (SAR 0.4 W/kg).

EINFÜHRUNG

Die mobilen Kommunikationssysteme Global System of Mobile Communication (GSM) und Universal Mobile Telecommunication System (UMTS) haben einen nicht zu vernachlässigenden Anteil an der Exposition des Menschen durch elektromagnetische Felder (EMFs) mit nicht-ionisierender Energie. Trotz erheblicher Bemühungen ist es der unter den Kriterien des "peer review" veröffentlichten Wissenschaft bislang aber nicht gelungen, eindeutige Dosis-Wirkungsbeziehungen zwischen angegebenen gesundheitlichen Störungen und der Einwirkung

von Hochfrequenzfeldern unterhalb thermischer Intensitäten nachzuweisen (ANSI/IEEE 1992; FDA 2005; FCC 1996; Foster et al. 2000; Health Council of the Netherlands 2002; ICRP 1992; ICNIRP 1998a, 1998b; IEEE 1999; NRPB 2004, 2005; Silny 2002; Zmirou et al. 2001).

Die offenkundige weltweite Akzeptanz der neuen Technologie für mobile Kommunikation steht im Widerspruch zu der – gelegentlich auch von den Medien geschürten – Besorgnis, dass gesundheitliche Risiken durch EMFs, insbesondere nach ständiger Einwirkung, noch immer nicht auszuschließen seien. Nicht zuletzt wegen ihres technischen Charakters seien auch EMFs mit sehr geringen Intensitäten als riskant zu betrachten, solange nicht das Gegenteil bewiesen sei (siehe auch Foster et al. 2000).

Das öffentliche Interesse an dieser Diskussion ist offensichtlich weder durch erkenntnistheoretische Überlegungen noch durch den Hinweis auf die normative Kraft des Faktischen (mehr als 80 Millionen "Handys" in Deutschland) zu beeinflussen. Die Behörden beziehen sich auf internationale und nationale Gremien wie die World Health Organization (WHO), die deutsche Strahlenschutzkommission (SSK), die International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP), etc., die sich mit dem Schutz der Bevölkerung vor gesundheitlichen Gefahren durch EMFs befassen, und versichern, dass – insbesondere im Vergleich zu den sonstigen Risiken der modernen Welt – nach neuesten wissenschaftlich fundierten Ergebnissen das nie ganz auszuschließende "Restrisiko" einer Mobilfunkkommunikation – falls es ein solches wirklich geben würde – wenn überhaupt, dann nur vernachlässigbar klein sei. Dies minderte jedoch die persistierende Beunruhigung einiger Bevölkerungsgruppen nicht, wenn es z.B. um die Errichtung von Mobilfunkmasten in ihrer Umgebung ging, und führte zu teilweise erbitterten Auseinandersetzungen in betroffenen Gemeinden.

Mit Recht verlangte die Öffentlichkeit daher nach weiteren wissenschaftlichen Anstrengungen, um auch letzte Zweifel an der Unschädlichkeit der modernen Kommunikationstechnologien beseitigen zu können. Repacholi wies bereits 1998 darauf hin, dass Wissenslücken z.B. zur Langzeit-Wirkung von typischen EMFs des Mobilfunks auf Säugetiere bestünden. Es war daher nur folgerichtig, dass das BfS im Rahmen des nationalen Mobilfunk-Forschungsprogramms u.a. auch ein Forschungsvorhaben ausschrieb, das relevante experimentelle Daten nach andauernder Einwirkung entsprechender Felder des Mobilfunks über mehrere aufeinander folgende Versuchstier-Generationen erarbeiten sollte.

Um die wissenschaftliche Kompetenz verschiedener Hochschulinstitute (siehe oben, Institutszugehörigkeit) der beiden Münchner Universitäten LMU und TU zu bündeln, wurde der Forschungsverbund TU/LMU-EMVU (Elektromagnetische Verträglichkeit/Umwelt) gegründet.

Wegen der Empfindlichkeit des Gehirns gegenüber schädlichen Einflüssen, insbesondere auch während der vorgeburtlichen Entwicklung, sollte das Forschungsvorhaben vornehmlich auf Änderungen der Kognition, die unter Umständen durch die chronische Einwirkung von Mobilfunk-EMFs ausgelöst werden könnten, achten. Zur Abrundung des gesetzten Forschungsziels und zur optimalen Nutzung des Tiermaterials sollten an den zur Verfügung stehenden Versuchstieren aber auch weitere Untersuchungen vorgenommen werden. Unter Berücksichtigung von aktuellen und kontrovers diskutierten Veröffentlichungen von u.a. Salford et al. (2003) und des bereits innerhalb des Forschungsverbunds vorhandenen methodischen "know-how's" wurden als weitere herausragende Ziele die Blut-Hirn-Schranke sowie immunologische bzw. Reaktionen des Stress-Systems definiert.

Hinweise auf relevante Arbeiten zu EMF-induzierten Störungen der operanten Verhaltensleistung von Ratten liessen sich allerdings weder in den "abstracts" der letzten BEMS- oder EBFA-Kongresse noch in den Datenbanken des EMF-Portals oder des EU-COST 281-Projekts finden. Auch in der für das BfS-Forschungsvorhaben sicherlich besonders relevanten Zeitschrift *Bioelectromagnetics*, die von der International Bioelectromagnetics Society (BEMS) monatlich herausgegeben wird, fanden sich keine neueren Arbeiten, auf die sich unsere Untersuchungen zu eventuellen Kognitionsstörungen nach Einwirkung von EMFs

stützen könnten. Die für das Konzept des Forschungsvorhabens und dessen Ausschreibung durch das BfS mitentscheidenden Arbeiten und Übersichten von u.a. Cobb et al. (2000, 2004), d'Andrea et al. (1999, 2003), Jensch et al. (1979, 1983, 1984), Juutilainen (2005), Sienkiewicz et al. (1998, 2000, 2001), Pakhomov et al. (1998) waren bereits vor einigen Jahren veröffentlicht worden (siehe auch die vom Forschungsverbund dem BfS bereits vorgelegte Übersicht zur Literatur).

Frühere Arbeiten am Institut für Toxikologie des GSF-Forschungszentrums (FZ) für Umwelt und Gesundheit, München-Neuherberg, hatten gezeigt, dass Veränderungen der Leistungsfähigkeit des Gehirns nach Einwirkung von umweltrelevanten Schwermetallkonzentrationen oder EMFs mit Rechner-kontrollierten Untersuchungen des operanten Verhaltens von Ratten deutlich gemacht werden können (Bornhausen et al. 1980; Bornhausen and Scheingraber 2000). Es lag daher nahe, dass das Forschungsvorhaben des BfS sich darauf konzentrieren würde, mit den dort erarbeiteten Untersuchungsmethoden Lern- und Gedächtnisleistungen von Ratten auch nach einer chronischen Einwirkung von EMFs des Mobilfunks zu prüfen. Es gelang, die entsprechenden Untersuchungseinrichtungen für das Forschungsvorhaben zu gewinnen und in den Laborräumen des LMU-Instituts für Tierphysiologie auf dem Oberwiesenfeld (OWF) neu aufzubauen.

Bei den männlichen und weiblichen Ratten der drei Generationen wurde die individuelle Verhaltensleistung und ihre Test-spezifische Entwicklung in insgesamt ca. 1200 Dateien (3 Expositionsbedingungen, 20 Tiere pro Generation, 2 x F0-Generation, 5 Testsitzungen) dokumentiert. Der experimentelle Teil dieser Untersuchungen konnte Ende 2006 abgeschlossen werden.

(Anmerkung: Ausdrücke wie "Lernen" und "Gedächtnis" wurden in "Anführungszeichen" gesetzt, da sie eine eigentlich unzulässige anthropomorphe Vor-Interpretation des Verhaltens des Versuchstiers beinhalten.)

Chronik des Aufbaus der Untersuchungseinrichtungen sowie Erarbeitung wesentlicher Entscheidungen für das BfS-Forschungsvorhaben

Nach mehreren Umzügen wurden die Versuchseinrichtungen für operante Verhaltensuntersuchungen schliesslich in Räume der Tierärztlichen Fakultät der LMU auf dem Oberwiesenfeld (OWF) verlegt.

Die eigentlichen Testeinrichtungen zur Prüfung des operanten Verhaltens von Ratten (i.e. 10 Skinner'sche Testkäfige) und das dazugehörige Kontroll- und Registriersystem konnten anlässlich des Wiederaufbaus entscheidend verbessert werden. In Zusammenarbeit mit Praktikanten der Universität der Bundeswehr (UniBW) wurde unter LINUX ein modernes Hard- und Software-Paket entwickelt, das das bisherige Steuer- und Registriersystem ersetzte.

Das neue OBC-GUI-System (Operant Behavior Control-Graphic User Interface) kontrollierte die einzelnen Testkäfige über je einen Mikro-Prozessor. Selbstverständlich standen nach wie vor alle klassischen Skinner'schen Testverfahren zur Verfügung wie Fixed Ratio (FR), Fixed Interval (FI), Variable Ratio (VR), Variable Interval (VI), Differential Reinforcement of Zero Rate (DR0), Differential Reinforcement of High Rate (DRH), Differential Reinforcement of Low Rate (DRL), Avoidance/Escape (A/E), etc (siehe Skinner 1938, 1957). Darüberhinaus war aber nun auch gewährleistet, dass während der automatisch nachts ablaufenden Testverfahren zeitliche Mikrostrukturen der operanten Verhaltensleistung einzelner Versuchstiere kontinuierlich registriert werden konnten.

Die im Auftrag des BfS durchzuführenden, umfangreichen Verhaltensuntersuchungen durften nach diesem Neuanfang selbstverständlich nicht ohne gründliche Vorbereitungen und Erprobungen der gesamten mechanischen und elektrischen Voraussetzungen für dieses Langzeit-Experiment begonnen werden. Zahlreiche Versuche wurden von Hand und mit einigen Ratten aus dem Bestand des Instituts vorgenommen. Nach dem Einbau der neuen Motoren musste die verlässliche Funktion der Futterautomaten neu eingestellt werden. Ausserdem

wurden sämtliche Daten- und Steuerleitungen zu den Testkäfigen und die Mikroschalter an den Hebeln ausgetauscht. Die Betätigungskraft für die Hebel wurde neu justiert.

Besondere Anstrengungen forderten auch unsere Bemühungen um eine Verkürzung der Sequenz von bislang 10 einzelnen Testsitzungen pro Tiergruppe. Selbstverständlich mussten theoretische Überlegungen hierzu jeweils durch *in vivo*-Tests bestätigt werden, bevor sie für das BfS-Vorhaben routinemässig eingesetzt werden konnten. Nach langjährigen Erfahrungen auf diesem Gebiet durfte die Gefahr nicht unterschätzt werden, die Kooperationsbereitschaft der Ratten (i.e. Hebeldrücken für Futterbelohnung) gegebenenfalls durch eine zu schnelle Steigerung der Lernanforderungen zu hemmen. Die Lerntests zur Wirkung von DHA sollten hier weitere Erkenntnisse bringen.

Mit Hilfe dieser Untersuchungen sollten darüberhinaus auch Einzelheiten für die beabsichtigte Vorauswahl unserer Tiere für den BFS-Langzeit-Versuch festgelegt werden. Wie in unserem Antrag geschildert, sollten die Tiere, die unsere F0-Generation gebären würden, ursprünglich aus einem doppelt so grossen Kollektiv selektiert werden. Selektionskriterium war hierbei der Durchschnitt der jeweiligen Verhaltensleistung einer Gruppe. 25 % der Tiere oberhalb und 25 % unterhalb dieses mittleren Wertes sollten verworfen werden. Die Verhaltensleistung sollte hierbei nach dem oben geschilderten Verfahren gemessen werden. Aus nachvollziehbaren Gründen, die eine Ersparnis von Zeit, Geld und Tiermaterial beabsichtigten, musste dieses Konzept aber überarbeitet werden. Nach intensiver Diskussion innerhalb des Forschungsverbands wurde vereinbart, statt der geplanten Vorauswahl der F-1-Ratten-Generation mit einer Selektion von 2 x 25 % schliesslich nur noch ca. 2 x 5 % der männlichen und weiblichen Ratten der F-1-Eltern-Generation von einer Weiterzucht auszuschliessen.

Begründung für operante Verhaltensuntersuchungen

Die Wahl des Untersuchungsverfahrens und die Bewertung der zahlreichen Aufzeichnungen durften sich auf die folgenden Tatsachen beziehen:

- Unsere automatisierten Tests standen unter Rechner-Kontrolle, d.h. ohne direkte Einflussnahme des Experimentators. Im Vergleich dazu sind Beobachtungen des Verhaltens im Labyrinth ("maze"), "open field", etc. trotz Infrarot-Lichtschranken und insbesondere die Aufzeichnung von Entwicklungsmerkmalen ("developmental landmarks") bei vielen Ratten-Nachkommen von der Einschätzung, Aufmerksamkeit und Geschicklichkeit des jeweiligen Versuchsleiters abhängig (*cave*: "personal bias", siehe Jensch et al. 1979; 1983; 1984).
- Die Versuchstiere generieren ihre eigenen Daten. Damit entfiel die sonst notwendige Skalierung von Beobachtungswerten (siehe Skinner 1938; 1957).
- Das Erlernen der Indikator-Tätigkeit (Hebeldrücken für Futterbelohnung) erfolgte während unserer Tests automatisch mit Hilfe des DR0 (5 min)-Trainingsverfahrens. Hierbei wird jeder Hebeldruck belohnt. Alle 5 min erhält das Versuchstier aber auch eine Belohnung ohne Hebeldruck. Mit nur wenigen Ausnahmen führte dieses Verfahren bei allen Tieren zum Erlernen des Hebeldrückens während einer Testsitzung. Damit konnte das sonst übliche "shaping"-Verfahren, das jede einzelne Ratte mit Hilfe der "successive approximation" trainiert und vom jeweiligen Versuchsleiter besondere Geschicklichkeit fordert, entfallen (siehe Skinner 1938; 1957).
- Im Vergleich zu anderen Verhaltenstests oder -beobachtungen haben automatisierte operante Tests eine eindeutig geringere inter-individuelle Variabilität (Annau 1990, Weiss and Laties 1975).
- Die operanten Verhaltenstests fanden während der Nacht statt, d.h. zur Zeit des Aktivitätsmaximums von Nacht-aktiven Ratten. Viele nicht-automatisierte Verhaltenstests müssen dagegen aus naheliegenden Gründen tagsüber durchgeführt werden (siehe Jensch et al. 1979; 1983; 1984).
- Identische Tests wurden gleichzeitig bei 10 Tieren durchgeführt. Alle Tiere wurden im selben Alter untersucht. Somit entfiel ein sonst schwer einzuschätzender Zeitfaktor.

- Die Unterteilung der nächtlichen Testsitzungen in alternierende ON- und OFF-Phasen war erfolgreich. Nur während der ON-Phasen führte richtiges Verhalten zu Belohnungen. Dazwischen liegende Ruhepausen erhielten die Versuchstiere.
- Bei den selben Tieren wurden verschiedene Testverfahren eingesetzt. Auf diese Weise konnte z.B. eine Aktivitäts-betonte Verhaltensleistung von einer Aufmerksamkeit fordernden Verhaltensleistung unterschieden werden.
- Registrierung dynamischer Daten der Verhaltensleistung: Als Ergebnis lag nicht nur das statische Verhältnis von Hebeldrücken zu Belohnungen am Ende einer Testsitzung vor, sondern es wurden auch kontinuierlich Zwischenergebnisse sämtlicher Daten während der Sitzung registriert (siehe auch Weiss et al. 1989).
- Steigerung der Testanforderungen ("challenge"): Die Sequenz der einzelnen Testverfahren und die allmählich ansteigenden Testanforderungen sollten die Abhängigkeit irgendwelcher Ergebnisse von der Wahl eines einzelnen Verfahrens mindern. Gleichzeitig sollte aber eine zunehmende Herausforderung der Tiere ("challenge") die Wahrscheinlichkeit für das Auffinden von Unterschieden zwischen Kontroll- und *Verum*-Gruppe erhöhen (Annau 1990, Weiss and Laties 1975).
- "know how": Planung, Aufbau, Datenanalyse und Validierung der mechanischen, elektrischen sowie "hard- and software"-Voraussetzungen für automatisierte operante Verhaltenstests sind abhängig von einschlägiger Erfahrung.

MATERIAL UND METHODEN

Aufbau der Expositions- und Untersuchungseinrichtungen

Die Laborräume auf dem OWF wurden zur Aufnahme der drei Expositions-kammern und einer zusätzlichen Kammer in einem Nebenraum zur Aufnahme der Skinner'schen Testkammern vorbereitet. Zur Einsparung von Finanzmitteln wurde versucht, unter Anleitung kompetenter Angehöriger der entsprechenden Firmen alle mechanischen Arbeiten durch technische Mitarbeiter der Institute des TU/LMU-EMVU-Forschungsverbands durchzuführen. Alle vier Kammern waren an einer gemeinsamen Klima-Anlage angeschlossen, die an der Decke über den Expositions-kammern # 1 (GSM) und # 2 (UMTS) befestigt wurde. Die drei Kammern (à 400x400x400 cm³) für die GSM-, UMTS-, bzw. Schein-Exposition waren in einem gemeinsamen Raum, die zusätzliche Kammer mit den Untersuchungseinrichtungen für die operante Konditionierung (L380 x B210 x H240 cm³) war in einem angrenzenden Nebenraum untergebracht.

Dem Forschungsverbund standen darüber hinaus auf dem OWF-Gelände weitere Räume für Büro- und Laborarbeiten zur Verfügung.

Die Skinner'schen Testkäfige wurden vor jeder Testsitzung gereinigt, die Oberflächen desinfiziert und mit neuer Einstreu versorgt. Diese Hygiene-Massnahmen sowie weitere mikrobiologische Kontrolluntersuchungen zum Gesundheitszustand der Versuchstiere wurden in einem gesonderten Bericht dargestellt.

Exposition

Als Voraussetzungen einer für das Forschungsvorhaben hinreichenden Exposition waren die folgenden Punkte erarbeitet worden:

- Für alle frei beweglichen Versuchstiere unseres Experiments war unter Berücksichtigung der einschlägigen internationalen Literatur zu diesem Thema eine EMF-Exposition in der geplanten Intensität mit möglichst geringen Abweichungen zu fordern.
- Identische Bedingungen in den drei Expositions-kammern mit der einzigen Ausnahme, dass in der Kammer mit den Kontrolltieren kein EMF anliegen würde.

- Unter Berücksichtigung des Tierbedarfs für die Parallel-Untersuchungen musste jede der drei Expositionskammern in der Lage sein, ca. 120 Tiere gleichzeitig aufzunehmen.
- Gesetzliche Auflagen forderten ausserdem, nicht mehr als zwei Männchen bzw. drei Weibchen in einem Standard-Käfig (300x200x250 mm³) unterzubringen.
- Eine Langzeit-Exposition über einen Zeitraum von ca. drei Jahren verlangte nach verlässlichen und geprüften HF-Geräten, die sowohl in ihrer Leistung als auch in ihrer Betriebssicherheit unserem experimentellen Konzept entsprachen.
- Aus Gründen des Strahlenschutzes musste das Öffnen der Kammertüren die EMF-Exposition automatisch unterbrechen.
- Wichtige Parameter der Exposition und evtl. Unterbrechungen mussten automatisch protokolliert werden.
- Metallteile, die sonst bei der Haltung von Ratten in ihren Standard-Käfigen Nageschäden verhindern, durften während der EMF-Exposition keine Verwendung finden, da sie die Homogenität des EMFs beeinträchtigen würden.
- Unter Berücksichtigung des Aufwands bei den regelmässigen Käfigwechseln musste auf eine zentrale Wasserversorgung in den Kammern verzichtet und jedem Standard-Käfig eine eigene Makrolon-Wasserflasche mit Gummistopfen und Glaspipette zur Verfügung gestellt werden.
- Lärmbelästigung durch Lüfter-Geräusche der Verstärker, etc. musste vermieden werden.

Nach dem Aufbau der Kammern wurden deren Innenwände mit entsprechendem Absorbermaterial ausgekleidet und mit Beleuchtungskörpern versehen, die eine hinreichende Ausleuchtung aller Käfige gewährleistete. Die Strahler wurden automatisch in einem Wechsel um 07:00 und 19:00 MEZ ein- und ausgeschaltet. Die Zeitumstellung während der Sommerzeit wurde nicht berücksichtigt. Zur weiteren Verbesserung der Expositionshomogenität und um eine gleiche Beleuchtungsstärke für alle Tiere zu erreichen, wurde die Position aller Käfige innerhalb einer Kammer regelmässig gegeneinander vertauscht. Wegen des Lärmpegels der Lüfter der Hochfrequenz-Verstärker, mussten diese in Kellerräume unterhalb der Expositionskammern verlegt werden. Die Konstanz der Parameter des GSM- und des UMTS-EMFs, der Klimaanlage sowie die Öffnungszeiten der drei Kammertüren während der täglichen Wartung wurden mit Hilfe eines Computer-Programms protokolliert. In der Kontroll-Kammer (# 3) mit den scheinexponierten Versuchstieren und in der Kammer mit den Untersuchungseinrichtungen für die operanten Verhaltenstests dienten darüberhinaus ein Min/Max-Thermometer und ein Klima-Monitor zur zusätzlichen Überwachung der eingestellten Werte.

Logistik

Die Logistik aller experimenteller Untersuchungen musste mehrmals überarbeitet werden, um zu vergleichbaren Ergebnissen bei den drei Ratten-Generationen und bei den drei Hauptparametern des Forschungsvorhabens (Verhaltenstests, Blut-Hirn-Schranke, Immunologie) gelangen zu können. Besondere Aufmerksamkeit musste einer genügenden Tierzahl bei den auf einander folgenden Generationen für die einzelnen Untersuchungsschritte und dem jeweils identischen Alter der zu untersuchenden Tiere gelten. Aus diesen Gründen war es erforderlich, die Untersuchungen bei den drei Ratten-Generationen in zwei Hauptgruppen zu unterteilen.

Vermeidung von Nageschäden

Zusätzlich zur Einstreu und entsprechendem Trockenfutter waren den Tieren in allen Käfigen sogenannte Nagehölzer der Fa. Abedd, Wien, angeboten worden, um Nageschäden, insbesondere an den Plastik-Käfigdeckeln zu vermeiden. Diese Käfigdeckel mit ihrer gitterförmigen Struktur der Luftöffnungen waren aber auf Dauer den Nagezähnen unserer Ratten offensichtlich nicht gewachsen. Einigen Tieren, insbesondere Weibchen, war es allmählich gelungen, die Gitterstäbe derart anzunagen, dass ein eventuelles Entkommen aus den Standard-Käfigen immer wahrscheinlicher wurde. Als Ausweg bot sich an, über der

Gitterstruktur der Käfigdeckel eine weitere Platte aus Plastik mit solchen Luftöffnungen anzubringen, die ein Benagen verhindern würden. Im Sommer 2005 wurden entsprechende Platten für 200 Käfigdeckel aus Polyäthylen gefertigt, mit zahlreichen Luftlöchern (\varnothing 10 mm) versehen, der Form des Käfigdeckels angepasst und mit Kunststoffschrauben befestigt. Leider ergab sich hierdurch in den Standard-Käfigen eine nicht zu vermeidende Verminderung des Frischluftdurchsatzes.

Tiere

SPRAGUE-DAWLEY- vs. WISTAR-Ratten

Operante Verhaltenstests werden mit unterschiedlichen Rattenstämmen durchgeführt. Aus Gründen der Verfügbarkeit und des Preises werden oft SPRAGUE-DAWLEY-Ratten eingesetzt. Unter Berücksichtigung der Erfahrungen mit Spezifisch-Pathogen-Freien (SPF) WISTAR-Laborratten des GSF-FZ wurden nicht SPRAGUE-DAWLEY- sondern WISTAR-Ratten als besonders geeignete Versuchstiere für das Forschungsvorhaben ausgewählt. Von den verschiedenen vertrauenswürdigen Anbietern von in- bzw. ausgezüchteten SPF-Laborratten erhielt schliesslich die Fa. Robert Janvier, F-53940 Le Genest-St. Isle in Frankreich den Zuschlag. 120 Ratten (60 Männchen und 60 Weibchen der Eltern-Generation F-1) kamen am 10.05.2005 in München an und wurden in Standard-Käfigen untergebracht.

Selektion der F-1-Ratten

Der EMVU-Forschungsverbund hatte es sich zur Aufgabe gemacht, die Untersuchungen mit vorausgewählten ("selektierten") Versuchstieren durchzuführen. Statt üblicher morphologischer Parameter wie Gewicht, Alter, etc. sollten aber "kognitive" Leistungen als Selektionskriterium eingesetzt werden. Um eine möglichst homogene Zusammensetzung der Versuchstiergruppe zu erhalten, waren insgesamt ca. 10 % derjenigen Tiere von der Weiterzucht auszuschließen, die in den Verhaltenstests im Vergleich zu den Durchschnittswerten entweder zu "gut" oder zu "schlecht" abschnitten.

Hierzu waren diese Ratten in den Skinner'schen Testkäfigen mit Hilfe des selben Verfahrens getestet worden, das später auch für ihre Nachkommen (F0, F1, F2) eingesetzt wurde. Als Selektionskriterium dienten Mikrostrukturen der operanten Verhaltensleistung. Nach Skalierung der registrierten Mikrostrukturen wurden von allen geprüften F-1-Ratten auf Grund ihrer spezifischen DRL-Testleistung insgesamt 26 (13 Männchen, 13 Weibchen) "besonders schlechte" und "besonders gute" von einer Paarung ausgeschlossen (siehe unten).

Ratten der F0-, F1- und F2-Generationen

Die zwei Gruppen (Gr1 und Gr2) der F0-Ratten-Generation wurden im September bzw. Oktober 2005 geboren. Die erste Prüfung der operanten Verhaltensleistung dieser Tiere erfolgte im November bzw. Dezember 2005 jeweils im Alter von 10 Wochen. Der Zeitrahmen der folgenden Generationen wird unten angegeben. Alle Versuchstiergruppen, die gleichzeitig in den 10 Skinner'schen Testkäfigen geprüft wurden, setzten sich aus fünf codierten Weibchen und fünf codierten Männchen zusammen. Die Untersuchungen wurden somit unter "verblindeten" Bedingungen durchgeführt. Den Leitern der Verhaltensuntersuchungen war nicht bekannt, aus welcher der drei Kammern (GSM, UMTS, "sham") die jeweiligen Tiere stammten. Die Sequenz der Untersuchungen folgte dem Schema der Untersuchungen bei den F-1-Ratten. Während der verschiedenen nächtlichen 15-stündigen Testsitzungen wurde bei allen Tieren die spezifische operante Verhaltensleistung mit Hilfe der oben beschriebenen Testsequenz registriert. Um eventuelle Lernleistungs- oder Gedächtnisstörungen besser erfassen zu können, wurden diese Tieren aber nach jeweils sechs Tagen noch einmal mit einer weiteren nächtlichen DRL1/16-Testsitzung geprüft (DRL 1/16 rep.). Diese Vorgehensweise wurde bei allen Versuchstiergruppen des Forschungsvorhabens eingehalten. Die Daten der beiden DRL 1/16-Testsitzungen wurden darüber hinaus eingesetzt, um Mikrostrukturen der Akquisition der jeweiligen Testaufgabe (i.e. "Lernen" bzw. "Gedächtnis") aufzuzeichnen.

Die beiden Gruppen der F0-Generation wurden im Alter von ca. 10 Monaten noch einmal mit der selben Testsequenz geprüft, um eventuelle altersabhängige Veränderungen des Gedächtnisses unter dem Einfluss des GSM- oder UMTS-EMFs aufspüren zu können. Die durchschnittliche Lebenserwartung der von uns eingesetzten WISTAR-Ratten liegt zwischen 2.5 und 3 Jahren.

Skinner'sche Testkäfige und "intelligence panel"

Für die Prüfung der operanten Verhaltensleistung wurden 10 standardisierte und identische Skinner'sche Testkäfige eingesetzt, die vom Institut für Toxikologie des GSF-Forschungszentrums in München-Neuherberg übernommen werden konnten. Diese Käfige sind aus Plexiglas und hatten die Innen-Abmessungen von L40 x B30 x H50 cm³ (siehe Abb. 1). Die Käfige waren unten und oben durch metallische Gitter verschlossen. Vor jeder Testsitzung wurde in die Wanne unter dem unteren Gitter neue Einstreu eingefüllt und die Innenwände des Testkäfigs mit einem Desinfektionsmittel ("Bacillol AF") gereinigt. Das sogenannte "intelligence panel" befand sich an der Stirnseite des Testkäfigs. Es bot dem Versuchstier zwei parallel geschaltete Hebel und zwischen ihnen einen Trog zur Aufnahme der Futterkügelchen sowie einen "Nerz-Nippel" für die Wasserversorgung an. Über jedem Hebel befanden sich jeweils drei Signallichter (grün, weiss, rot). Die Halterungen für Futterautomat, Wasserflasche und Hauslicht sowie des Steckverbinders für die Steuerung waren an der Außenseite dieser Stirnseite montiert (siehe Abb. 2).



Abb. 1

Skinner'sche Testkäfige (links)

Die Batterie von 10 identischen und simultan betriebenen Skinner'schen Testkäfige ("Skinner Boxen") war in einer zusätzlichen klimatisierten Kammer (# 4), die in einem Nebenraum des Laborraums mit den drei Expositionskammern lag, untergebracht. Die Testkäfige befanden sich in Überboxen mit Ventilatoren, die die einzelnen Versuchstiere optisch und akustisch voneinander trennten.



Abb. 2

"intelligence panel" (rechts)

Das sogen. "intelligence panel" an einer der Stirnseiten des Skinner'schen Testkäfigs ist bei operanten Verhaltensuntersuchungen das Bindeglied zwischen Versuchstier und Experimentator. Es bietet: 2 Hebel incl. Mikroschalter mit jeweils 3 Signallichtern, Futterautomat, Trog zur Aufnahme der Futterkügelchen, Wasserflasche incl. Schlauch zum Nerz-Nippel und das Hauslicht. Auf dem Photo zu erkennen sind weiterhin die elektrischen Leitungen und Steckverbindungen. Die zur Ansteuerung der Tests und Registrierung der individuellen Testdaten eingesetzten Mikroprozessoren befanden sich jeweils hinter den Testkäfigen innerhalb der Überboxen.

Überboxen

Die 10 Skinner'schen Testkäfige waren in Überboxen aus Holz und Dämmmaterial mit entsprechenden Luftzuführungen untergebracht, die die einzelnen Versuchstiere optisch und akustisch voneinander trennten (siehe Abb.1). Die Überbox jedes Testkäfigs hatte einen 220 V-

Ventilator (ca. 120 x 120 x 30 mm³), der die Luft über den Tieren absaugte und gleichzeitig ein maskierendes Geräusch von ca. 55 dB(A) erzeugte.

Raumbeleuchtung

Die automatische Steuerung des Raumlichts für diese Untersuchungseinrichtungen erfolgte durch eine Schaltuhr mit Gangreserve (Legrand # 03753). Während der Testsitzungen wurde das Raumlicht von 16:00 bis 07:00 MEZ ausgeschaltet. Eine Umstellung auf die Sommerzeit wurde nicht vorgenommen.

Trinkwasserversorgung

In jedem Testkäfig wurde den Ratten Leitungswasser *ad libitum* angeboten. Das Wasser wurde in Makrolon-Wasserflaschen (à 700 ml) gespeichert und von dort über einen Silikongummischlauch zu einem sogen. Nerz-Nippel geleitet, der in den Testkäfig hineinragte. Eine Berührung des Stempels dieses Nippels ließ das Wasser jeweils tropfenweise fließen. Das Wasser wurde einmal pro Woche erneuert. (Während der nächtlichen Testsitzungen stand den Versuchstieren kein zusätzliches Futter zur Verfügung.)

Hauslicht

Die 10 Testkäfige konnten während der nächtlichen Testsitzungen von Hauslichtern beleuchtet werden. In jeder Kammer zeigten jeweils zwei parallel geschaltete LED-Lämpchen (Signallichter mit weißem bzw. rötlichem Licht) an der oberen Kante des sogen. "intelligence panels" den Versuchstieren während der nächtlichen Testsitzungen die ON-Phasen an.

Hebel

Zur Sicherheit, insbesondere um mechanischen Behinderungen der Bewegung des Mikroschalters durch Einstreu, etc. vorzubeugen, standen dem Versuchstier in jedem Testkäfig zwei parallel geschaltete Hebel zur Verfügung. Das Manipulandum jedes Hebels ragte ca. 5 cm in den Käfig hinein und verlangte von dem Versuchstier eine Kraft von ca. 0.3 N, um den dort befestigten Mikroschalter (Omron # SS-01D) zu betätigen. Die Betätigung des Mikroschalters wurde dem Tier signalisiert sowohl durch die somatosensorische Empfindung in seiner Pfote (mechanisches Knacken des Mikroschalter-Stößels) als auch durch einen Lichtblitz von 10 msec im weißen LED-Signallicht über dem jeweiligen Hebel. Durch Veränderung der Hebellänge wurde der Druck für das Durchschalten des Mikroschalters bei allen 20 Hebeln mit Hilfe eines Schleppzeiger-Manometers auf 0.3 ± 0.02 N eingestellt.

Signallichter

Über jedem Hebel befanden sich jeweils drei Signallichter in den Farben grün, weiß und rot. Um während der unbeaufsichtigten nächtlichen Testsitzungen einen evtl. Ausfall eines wichtigen Signallichts zu vermeiden, wurden Lämpchen mit jeweils einem Bündel von 6 LEDs eingesetzt (Lamp Technology, Syracuse, NY, USA).

Futterautomaten

In jedem Testkäfig wurde das Modell # 1530 der Fa. Gerbrands, Arlington, MA, USA, als Futterautomat eingesetzt. Die Geräte waren zuvor modifiziert worden, um mit elektronisch angesteuerten Schrittmotoren (Crouzet, # 82.940.0) betrieben werden zu können. Als Belohnung für erfolgreiches Hebeldrücken wurden Futterkügelchen à 45 mg der Fa. Bioserv Dustless Precision Food Pellets, Frenchtown, NJ, USA, eingesetzt. Den Versuchstieren war vor Beginn der nächtlichen Verhaltenstests weder Futterentzug noch Gewichtsreduktion zugemutet worden.

Überwachung

Das in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. (FH) Chr. Kögler neu entwickelte LINUX-kontrollierte Überwachungssystem für die operanten Verhaltenstesteinrichtungen hatte sich während der vorbereitenden Untersuchungen bewährt. Es überwachte und dokumentierte die Konstanz der Umgebungsbedingungen während der nächtlichen Testsitzungen und auch die Verlässlichkeit des jeweiligen Versuchsleiters bei deren Vorbereitung. Es sollte sicherstellen, dass die

mehrfach wiederholten Verhaltenstests mit allmählich schwieriger werdenden Bedingungen bei den selben Tieren stets unter identischen Bedingungen durchgeführt und eventuelle Störungen oder Änderungen der Umgebungsbedingungen während der nächtlichen Testsitzungen erkannt werden. Nach dem Umzug der Untersuchungseinrichtungen zum OWF registrierte dieses System über entsprechende Sensoren sekundengenau eventuelle Stromausfälle, Ein- und Ausschaltzeiten des Raumlichts und der Ventilatoren, den ordnungsgemäßen Verschluss der die Skinner-Boxen einschließenden Überboxen, die Öffnung aller angrenzenden Türen, Geräusche > 60 dB, etc. Es bot darüber hinaus ein blinkendes Warnlicht an der Tür zum Testraum an, das während der Testsitzungen eingeschaltet blieb. Die Überwachung war am LINUX-Server für das OBC-GUI-System implementiert und unabhängig von anderen Überwachungseinrichtungen, die für die Befeldung und Klimatisierung der Versuchstiere erforderlich waren. Jede Testsitzung wurde ausserdem von einem zusätzlichen handschriftlichen Protokoll begleitet, in dem vom Versuchsleiter wichtige Einzelheiten wie Funktionsstörungen einzelner Elemente und deren Reparatur festgehalten wurden.

Nächtliche Testsitzung	20-08-2005 08:47:06 : T4 Deckel offen
19-08-2005 07:56:35 : Licht an	20-08-2005 08:47:38 : T1 Testraumtuer offen
19-08-2005 08:32:37 : T2 Gangtuer offen	20-08-2005 16:53:03 : T4 Deckel geschlossen
19-08-2005 08:32:58 : T2 Gangtuer geschlossen	20-08-2005 16:53:09 : Ventilatoren an
19-08-2005 08:46:57 : T1 Testraumtuer offen	20-08-2005 16:53:16 : T1 Testraumtuer geschlossen
19-08-2005 08:47:02 : Ventilatoren aus	20-08-2005 16:57:51 : Licht aus
19-08-2005 08:47:04 : T4 Deckel offen	Nächtliche Testsitzung
19-08-2005 15:14:24 : T2 Gangtuer offen	20-08-2005 16:59:54 : T2 Gangtuer offen
19-08-2005 15:14:29 : T2 Gangtuer geschlossen	20-08-2005 17:00:03 : T2 Gangtuer geschlossen
19-08-2005 15:15:37 : T1 Testraumtuer offen	21-08-2005 07:56:34 : Licht an
19-08-2005 15:31:23 : T3 Expotuer geschlossen	21-08-2005 09:05:33 : T2 Gangtuer offen
19-08-2005 15:33:49 : T4 Deckel geschlossen	21-08-2005 09:06:17 : T2 Gangtuer geschlossen
19-08-2005 15:33:54 : Ventilatoren an	21-08-2005 09:12:18 : T1 Testraumtuer offen
19-08-2005 15:34:11 : T1 Testraumtuer geschlossen	21-08-2005 09:12:24 : Ventilatoren aus
19-08-2005 15:36:38 : T2 Gangtuer offen	21-08-2005 09:12:27 : T4 Deckel offen
19-08-2005 15:36:44 : T2 Gangtuer geschlossen	21-08-2005 09:12:55 : T1 Testraumtuer geschlossen
19-08-2005 16:57:48 : Licht aus	21-08-2005 16:36:57 : T4 Deckel geschlossen
Nächtliche Testsitzung	21-08-2005 16:37:02 : Ventilatoren an
20-08-2005 07:56:39 : Licht an	21-08-2005 16:39:11 : T1 Testraumtuer geschlossen
20-08-2005 08:39:31 : T2 Gangtuer offen	21-08-2005 16:57:58 : Licht aus
20-08-2005 08:40:08 : T2 Gangtuer geschlossen	Nächtliche Testsitzung
20-08-2005 08:43:17 : T3 Expotuer offen	21-08-2005 17:02:03 : T2 Gangtuer offen
20-08-2005 08:46:55 : T1 Testraumtuer offen	21-08-2005 17:02:12 : T2 Gangtuer geschlossen
20-08-2005 08:46:58 : T1 Testraumtuer geschlossen	22-08-2005 07:56:17 : Licht an
20-08-2005 08:47:03 : Ventilatoren aus	

Abb. 3 Überwachungsdatei vom 19.-22.08.2005 (gekürzt)

Mit Hilfe eines LINUX-Programms und geeigneter Sensoren wurde die ordnungsgemässe Durchführung der Testsitzungen mit einer Auflösung von 1 sec überwacht. Aufgezeichnet wurden: Stromausfälle, Ein- und Ausschaltzeiten des Raumlichts und der Ventilatoren, der ordnungsgemäße Verschluss der die Skinner-Boxen einschließenden Überboxen, die Öffnung aller angrenzenden Türen, Geräusche > 60 dB, etc.

```
# ja                               15.11.06 15:59:59
# EMVU
# F2a Gr.2
#
# boxNr(2) group(f) name(196002) OBC v1.2.6
# white led(10ms)
#
#     || cycles(10) ||
#
# / phase1(30min) /.
# .-./-----
# |L| DRL hold(16s) signal(G) |
# |R| SAME |
# '-'\-----
#
# / phase2(1h) /.
# .-./-----
# |L| OFF |
# |R| SAME |
# '-'\-----
# hostname(controller2) IP(192.168.0.202) MAC(0:6:3b:0:16:9)
```

#	by CK3D						
1 P -	0	1 - R	709608	2 - L	1918630	2 - L	7204110
1 + L	189253	1 - L	718640	
1 - L	201881	...		2 - R	2316263	1 + L	49712400
1 - L	206281	1 - L	1747588	2 - L	2364153	1 + L	49729135
1 - L	210970	1 - L	1752483	2 - L	4344794	1 - L	49733657
1 + L	242735	1 + L	1770696	2 - L	4354902	1 + L	49750731
1 - L	248542	1 + L	1790597	...		1 + L	49767281
1 - L	255765	2 P -	1800000	1 - L	7153621	1 - L	49773541
1 - L	256048	2 - L	1801298	1 + L	7171092	1 + L	49790234
1 - L	256317	2 - L	1820047	1 - L	7184142	1 - L	49791108
1 - L	257044	2 - L	1824082	2 P -	7200000	1 - L	49804810
1 - L	261381	2 - L	1824524	2 - L	7201009	1 + L	49977874
1 + L	278587	2 - L	1842664	2 - L	7201357	1 + L	50070418
1 - L	280143	2 - L	1851991	2 - L	7201771	2 P -	50400000
1 + L	697321	2 - L	1856691	2 - L	7202390	...	
1 - L	707548	2 - L	1867580	2 - L	7203282	1 E -	54000000

Abb. 4

Zusammenfassung einer individuellen IRI-Datei (gekürzt)

Für jedes einzelne Versuchstier wurde eine individuelle Datei angelegt. Der Kopf dieser Datei fasste die jeweiligen Parameter für die entsprechende Testsitzung zusammen. Diese waren: das Namenskürzel des Versuchsleiters, die Bezeichnung des Experiments (hier: EMVU), die Versuchstiergruppe, die Nummer des Testkäfigs, die Untergruppe, die RF-IDs, die OBC-Version, die Anzahl der Zyklen mit den alternierenden ON- und OFF-Phasen und deren Dauer, sowie das jeweilige Testverfahren (hier: DRL) mit der Dauer des Sperrintervalls (hier: 16 sec), das durch das grüne ("G") Signallicht angezeigt wird.

Die Aufzeichnungen begannen zum Zeitpunkt des ersten Phasenwechsels ("P") mit der Zeit 00 000 000. Im weiteren Verlauf wurden die Zeiten für das Auftreten der folg. Ereignisse in 8-stelligen Spalten kontinuierlich mit einer Auflösung von 1 msec registriert (von links nach rechts):

- ON-Phase = 1, OFF-Phase = 2
- Hebeldruck ohne Belohnung = - , Belohnung (reinforcement) = +
- linker Hebel (L) oder rechter Hebel (R), aus der Sicht des Versuchstiers

Die Aufzeichnungen endeten nach 15 Stunden, d.h. nach 54 000 000 Millisekunden (E). Während der nächtlichen DRL 1/16-Testsitzung nimmt bei diesem Versuchstier (RF-ID # 196002) die Zahl der Belohnungen (+) stetig zu und die Zahl der vergeblichen Hebeldrücke (-), insbesondere während der OFF-Phasen, die doppelt so lang waren wie die ON-Phasen, allmählich ab.

Steuerung und Datenregistrierung OBC-GUI, Datensicherung

In den Jahren 2003/2004 war in Zusammenarbeit mit Praktikanten der UniBW, Neubiberg, insbesondere mit Oberleutnant Chr. Kögler, ein neues Kontrollsystem "Operant Behavior Control-Graphic User Interface" (OBC-GUI) entwickelt und aufgebaut worden, das im Rahmen des BfS-Vorhabens die Steuerung der operanten Verhaltensuntersuchungen bei Ratten übernehmen sollte. Für unsere 10 simultan betriebenen, standardisierten Testkäfige, in denen die Versuchstiere unter allmählich schwieriger werdenden Bedingungen einen Hebel drücken müssen, um eine Futterbelohnung zu erhalten, standen schließlich wieder die klassischen operanten Konditionierungsprogramme nach B.F. Skinner (1904-1990) zur Verfügung. Die vorgesehenen Untersuchungen konnten bei den nachtaktiven Labornagern automatisch auch während der Nacht durchgeführt werden. Das OBC-GUI-System basiert auf LINUX und setzt Mikroprozessoren zur Steuerung der operanten Konditionierungsprogramme und zur kontinuierlichen Erfassung aller Daten, insbesondere der Zeiten zwischen aufeinander folgenden Hebeldrücken ("inter-response intervals", IRIs), ein. Mit Hilfe dieser Mikrostrukturen der individuellen Verhaltensleistung sollten die Dynamik der jeweiligen Testsitzung und somit Lernvorgänge besser als bisher erfasst werden.

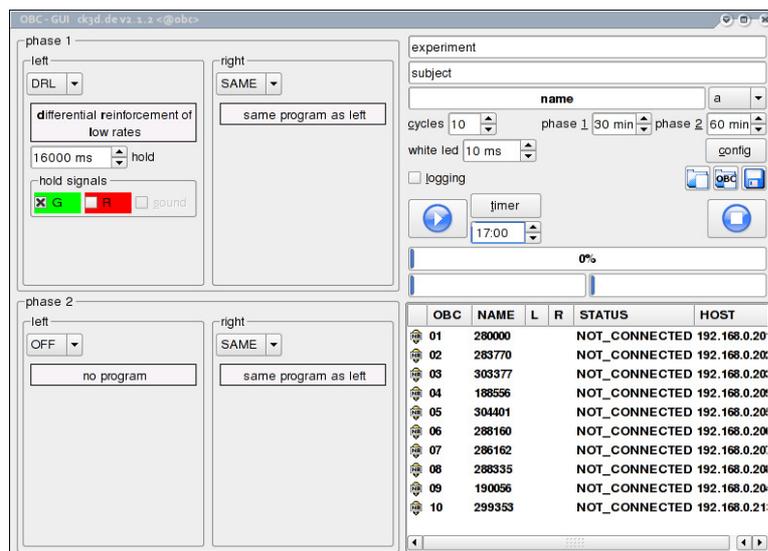


Abb. 5
"screenshot" der Testprogramm-Steuerung

Zur Steuerung und Datenregistrierung der in unserem Forschungsvorhaben eingesetzten operanten Verhaltensuntersuchungen (DR0, DRH, DRL) mußten gegebenenfalls die folg. Parameter eingestellt werden:

- die Dauer der ON- bzw. der OFF-Phasen (30 bzw. 60 min),
 - die Dauer des weißen LED-Hebellichts (10 msec),
 - Datum und Zeit des Testsitzungsbeginns
 - und der Befehl für eine Registrierung der während der Testsitzung anfallenden Daten ("logging").
- Die IP-Nummern der eingesetzten Mikroprozessoren,
 - die Bezeichnungen für das jeweilige Experiment, die Versuchstiergruppe und den Versuchsleiter,
 - die RF-IDs der Versuchstiere,
 - das jeweilige Testverfahren,
 - das grüne Signallicht (nur bei DRL),

Linker und rechter Hebel wurden während unseres Forschungsvorhabens zur Erhöhung der Betriebssicherheit stets parallel geschaltet. Eine Belohnung (Futterkügelchen à 45 mg) war nur während der ON-Phasen erhältlich. Die Mikroprozessoren waren vor Beginn der Testsitzung "not_connected".

Zur redundanten Absicherung der Rohdaten wurden die entsprechenden Dateien während der Testsitzung automatisch auf zwei gespiegelten Festplatten des Servers gespeichert. Am folgenden Tag wurden diese Dateien zusätzlich in ZIP-komprimierter Form beim Leibniz-Rechenzentrum (LRZ) hinterlegt.

Prüfung "kognitiver" Leistungen von Ratten Erläuterung der methodischen Vorgehensweise

Die kognitiven Leistungen der Versuchstiere wurden mit Hilfe verschiedener operanter Verhaltenstests mit allmählich ansteigenden Lernanforderungen in standardisierten Testkammern ("Skinner-Boxen") überprüft. Die Tests wurden gleichzeitig mit 10 Tieren unter Rechner-Kontrolle in 10 simultan betriebenen Testkammern während der Nacht durchgeführt. Um eine Belohnung ("reinforcement", Futterkügelchen à 45 mg) zu erhalten, mussten die Versuchstiere in unserer Versuchsanordnung entweder besonders schnell ("differential reinforcement of high rate", DRH) oder aber unter Berücksichtigung von Sperrintervallen ("differential reinforcement of low rate", DRL) einen Hebel drücken.

Testsequenz

Frühere Untersuchungsserien am GSF-Institut für Toxikologie, an denen sich die vom BfS initiierten Untersuchungen zur Lernfähigkeit orientieren sollten, sahen für jede einzelne Rattengruppe insgesamt 10 Testnächte (DR0, 3 x DRH, 3 x DRL, 3 x COM) vor. In Anbetracht des voraussichtlichen Zeitaufwands für die Untersuchung männlicher und weiblicher Ratten von drei Generationen war erprobt worden, ob eine differenzierte Aussage zur individuellen Verhaltensleistung bereits nach einer geringeren Zahl von Testnächten zu erzielen sei. Dies gelang. Die im Auftrag des BfS durchgeführten Prüfungen der operanten Verhaltensleistung aller Gruppen wurden daher schliesslich mit Hilfe der folgenden Testsequenz von insgesamt nur fünf nächtlichen Sitzungen durchgeführt:

- Differential Reinforcement of Zero Rate (DR0 5 min): Trainingssitzung, die den Versuchstieren zeigt, dass Hebeldrücken zu Futterbelohnung führt. Jeder Hebeldruck wird belohnt. Alle fünf Minuten wird zusätzlich automatisch belohnt.

- Differential Reinforcement of High Rate (DRH 2/1): Belohnung, wenn innerhalb von einer Sekunde zweimal der Hebel gedrückt wird.
- Differential Reinforcement of High Rate (DRH 4/2): Belohnung, wenn innerhalb von zwei Sekunden der Hebel vier mal gedrückt wird.
- Differential Reinforcement of Low Rate (DRL 1/16): Belohnung, wenn ein Sperrintervall von 16 Sekunden nach einer Belohnung berücksichtigt wird. Das Sperrintervall wurde durch das grüne Signallicht angezeigt. Ein vorzeitiger Hebeldruck liess das Sperrintervall von neuem beginnen.
- Die letzte DRL-Sitzung wurde im Abstand von sechs Tagen wiederholt, um Daten zur "Gedächtnisleistung" zu gewinnen.

Testsitzung

Eine nächtliche Testsitzung dauerte jeweils 15 Stunden. Sie begann um 16:00 Uhr und endete um 07:00 Uhr MEZ. Die Sommerzeit-Umstellung wurde nicht berücksichtigt. Zur Vermeidung einer vorzeitigen Sättigung des Versuchstiers wurden die Sitzungen unterteilt in 10 Zyklen à 90 min mit alternierenden 30 min dauernden ON- und 60 min dauernden OFF-Phasen. ON-Phasen wurden den Tieren durch das Hauslicht signalisiert. Belohnungen waren nur während der ON-Phasen erhältlich.

Konventionelle Auswertung

Die konventionelle Auswertung der Ergebnisse operanter Tests begnügt sich meist mit der Berechnung der Effizienz, d.h. des Verhältnisses richtiger (erfolgreicher) Hebeldrücke zu deren Gesamtzahl am Ende einer Testsitzung.

"Mikrostrukturen" und "points"

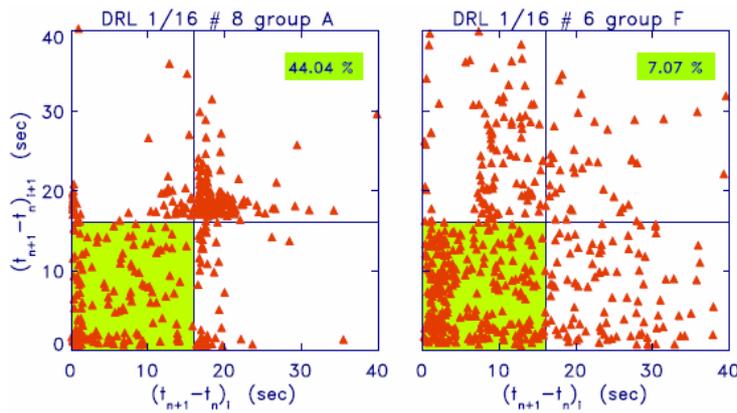
Um die Entwicklung der Hebeldruck-Effizienz eines Versuchstieres auch während der Testsitzung kontinuierlich verfolgen, analysieren und nach mathematischen Kriterien bewerten zu können, wurden während der ON- und OFF-Phasen jeder Testsitzung die zwischen aufeinander folgenden Hebeldrücken auftretenden Zeitintervalle ("inter-response intervals", IRIs) mit einer Auflösung von einer Millisekunde registriert. Während der DRL-Testsitzungen wurde dann jedes IRI auf Übereinstimmung mit einem Standard-IRI (siehe unten) verglichen und durch "points" bewertet.

Operantes Testverfahren "Differential Reinforcement of Low rate" (DRL)

Die Analyse von Mikrostrukturen der operanten Verhaltensleistung erfolgte in unserer Versuchsanordnung mit Hilfe des Testverfahrens DRL 1/16. Nach den zwei DRH-Testschritten zuvor, bei denen häufiges Hebeldrücken verlangt worden war, verlangte dieses Verfahren nunmehr von den Versuchstieren die Berücksichtigung eines Sperrintervalls von 16 Sekunden nach einer Belohnung. Die Dauer des Intervalls wurde durch das grüne Signallicht angezeigt. Vorschnelle Hebeldrücke ließen das Sperrintervall von neuem beginnen. Bei allen Versuchstieren wurde das DRL-Verfahren zweimal durchgeführt.

"scatter plots"

In Zusammenarbeit mit dem Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik (MPE), Garching, war zuvor eine Methode entwickelt worden, die bei der Lösung operanter Verhaltenstestaufgaben "Lerner" von "Nicht-Lernern" unterscheiden kann (Bornhausen and Scheingraber, *Bioelectromagnetics* 2000). Hierzu wurden die während der 10 ON-Phasen einer Testsitzung registrierten IRI-Muster übereinander projiziert und als sogenannte "scatter plots" abgebildet (Abb. 6). Diese "scatter plots" konnten aber bislang nur qualitativ mit Hilfe der visuellen Diskriminationsfähigkeit des jeweiligen Experimentators bewertet werden.



projiziert.

Abb. 6
"scatter plots"

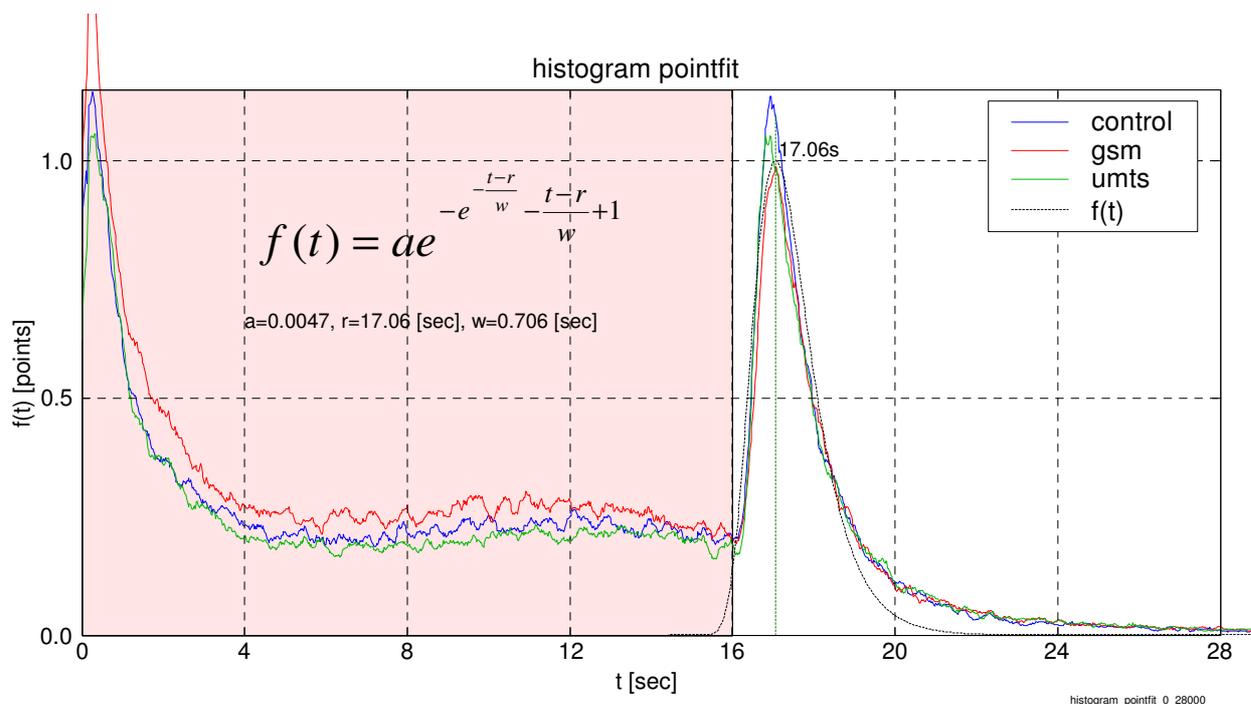
Dargestellt sind die während der ersten 40 sec auftretenden IRIs im Verlauf der 10 ON-Phasen der Testsitzung DRL 1/16. Die Ratte # 8 aus Gruppe A (links) hatte das Sperrintervall von 16 sec offensichtlich "gelernt"; 44.04 % der IRIs sind außerhalb des Sperrintervalls. Die Ratte # 6 aus Gruppe F (rechts) hatte diese Testaufgabe nicht "gelernt". Hier befinden sich nur 7.07 % der IRIs außerhalb der 16 sec. In beiden Abbildungen sind die IRIs aller 10 ON-Phasen jeweils übereinander

Mathematische Bewertungsmethode

Ziel der weiter unten beschriebenen Vorgehensweise war es nun, die visuelle Bewertung dieser "scatter plots", die ja die 10 ON-Phasen einer Testsitzung nur übereinander projiziert darstellen, durch eine reproduzierbare mathematische Bewertungsmethode zu ergänzen, die eine Skalierung der Dynamik der individuellen operanten Verhaltensleistung erlauben würde.

IRI-Struktur

Während der DRL 1/16-Testsitzung wurde daher jedes einzelne IRI unter Berücksichtigung einer empirisch gewonnenen IRI-"Normal"-Verteilung (von 0-1 normiert) bewertet. Nach ersten Erfahrungen lag das Maximum der testspezifischen IRI-Verteilung bei diesem Testverfahren ca. 0.7 sec nach dem Ende des Sperrintervalls von 16 sec (siehe Zwischenbericht 2005). Im Verlauf der Auswertung aller DRL 1/16-Dateien des Forschungsvorhabens konnte die IRI-Häufigkeitsverteilung verfeinert werden. Entsprechend dieser Verteilung wurde nun jedem IRI ein spezifischer Wert in "points" zugewiesen. Die unten aufgeführten Ergebnisse zur Dynamik der Verhaltensleistung (i.e. "points") und ihre graphische Darstellung beziehen sich auf diese revidierte Häufigkeitsverteilung.



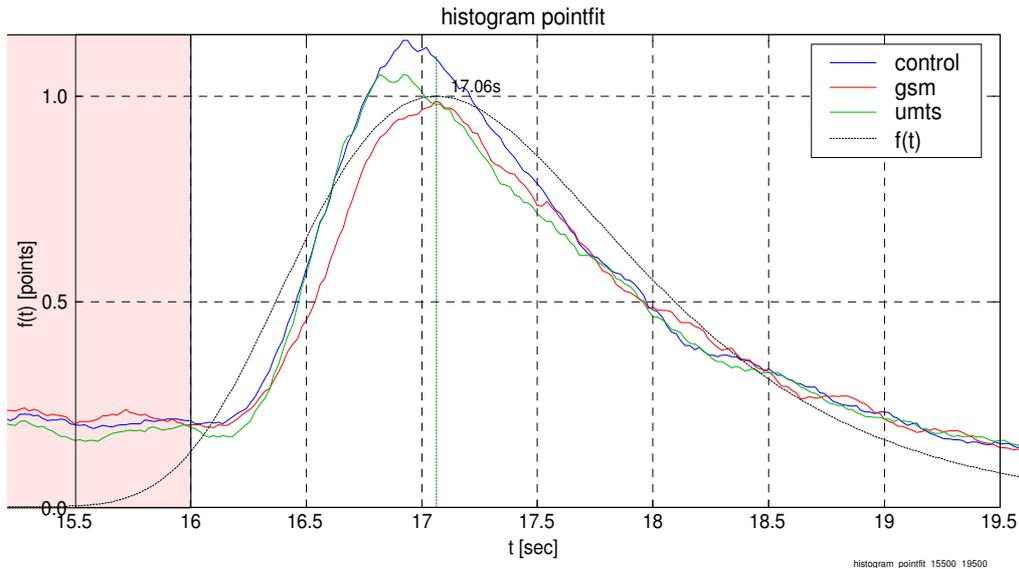


Abb. 7
Histogramm
"pointfit"

Mit Hilfe der in der Abb. aufgeführten Funktion $f(t)$ wurde für die GSM-, die UMTS- und die "sham"-exponierten Tiere das jeweilige Maximum für die "points" (i.e. Mass für die Übereinstimmung zwischen einzelnen IRIs und normiertem Standard-IRI) bestimmt. Das

Maximum des für die "points" ermittelten Fits lag bei allen exponierten und Kontroll-Tieren 1,06 sec nach der Dauer des Sperrintervalls (16 sec). Auch in der Vergrößerung dieser Abb. (unten) liess sich kein Unterschied zwischen exponierten und scheinexponierten Tieren feststellen.

Die hier angeführte "Normal"-Verteilung der "points" resp. IRIs war Grundlage für die Berechnungen der Lern- und Gedächtnisleistung.

Der Unterschied zwischen diesem aktuellen Histogramm und dem früher im Zwischenbericht dargestellten Histogramm ist durch den Fit-Algorithmus begründet. Zur Definition des normierten Standard-IRIs wurden die Werte der Kontrolltiere der F0-, F1- und F2-Generation während des zweiten DRL-Testverfahrens (DRL rep.) genommen. Die Werte aus den Wiederholungstests mit den Tieren der F0-Generation im Alter von 10 Monaten wurden hierfür nicht berücksichtigt.

S-Kurven-Fit

Natürliche Lernvorgänge werden durch eine S-Kurve abgebildet. Die Lernfähigkeit eines einzelnen Versuchstiers sollte also nicht nur durch die Effizienz seiner Hebeldrucktätigkeit (i.e. Verhältnis von richtigen zu falschen Reaktionen) am Ende einer Testsitzung sondern auch durch die Dynamik des Lernprozesses selbst ausgedrückt werden. In Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. (FH) C. Kögler war es gelungen, die zwischen aufeinander folgenden Hebeldrücken auftretenden Zeitintervalle ("inter-response intervals", IRIs) mit einer Auflösung von 1 msec kontinuierlich zu registrieren und mit Hilfe entsprechender Algorithmen einer S-Kurve anzupassen. Der Vergleich eines "scatter plots" mit dem dazugehörigen S-Kurven-Fit (siehe die folg. Abbildungen) machte deutlich, dass dieses neue Verfahren eine numerische Erfassung der individuellen Lerndynamik ("acquisition of test requirement") und damit eine Skalierung der Versuchsergebnisse erlauben würde.

Mikrostruktur-Analyse der DRL-Testsitzungen mit Hilfe von "points"

Zur Erkennung der Dynamik des Lernvorgangs mit Hilfe der Mikrostruktur-Analyse unserer Untersuchungsergebnisse wurde folgendermaßen vorgegangen:

Statische Analyse

Unter der Bezeichnung "points" (Anzahl von dimensionslosen Punkten, Wertebereich zwischen 0 und 1) wurde die Übereinstimmung erfaßt zwischen jedem einzelnen IRI und der empirisch gewonnenen IRI-Häufigkeitsverteilung während der 10 ON-Phasen einer DRL 1/16-Testsitzung (siehe Abb. 6).

Dynamische Analyse

In der dynamischen Analyse wurde die Entwicklung der "points" über die Zeit betrachtet. Zur Bewertung dieser Entwicklung wurde ein S-Kurven-Fit durchgeführt (blaue Linie in Abb. 8b und 9b).

Lernkurve

Wie bereits erwähnt, werden Lernvorgänge durch eine S-Kurve abgebildet. Sobald das Tier die gestellte Aufgabe erfaßt ("erlernt") hat, springt der "points"-Wert in testspezifischer Weise auf ein höheres Niveau. Die S-Kurve ist somit gekennzeichnet durch:

- Ausgangsniveau
- Sättigungsniveau
- Wendepunkt
 - Steigung im Wendepunkt
 - Zeitpunkt des Wendepunktes

In welcher Zeit die Ratte gelernt hatte, wurde aus der Differenz zwischen Testbeginn (empirisch gesetzt auf den Zeitpunkt des Erreichens von 5 % aller Hebelldrücke der Testsitzung, grüne Linie in Abb. 8b und 9b) und Wendepunkt errechnet. Die durch den Fit gewonnenen Parameter waren somit:

- Sättigung (erreichter Endwert in "points")
- Lerndauer (Differenz aus Testbeginn und Wendepunkt in min.)
- Lerngeschwindigkeit (Steigung in "points"/h).

"Lernen" und "Gedächtnis"

Auswertung der ersten bzw. der zweiten DRL-Testsitzung

Nach Abschluß der "doppelt-blind"-durchgeführten Untersuchungsserien wurde während der Auswertung aller Dateien allerdings beobachtet, dass es offensichtlich einigen Versuchstieren in der ihnen zur Verfügung stehenden Zeit nicht gelungen war, die in unserem Experiment entscheidende Testaufgabe DRL 1/16 (die Berücksichtigung eines Sperrintervalls von 16 sec nach einer Belohnung) zu "erlernen". Ein S-Kurven-Fit der IRI-"points" wurde damit unmöglich. Um alle Tiere dennoch nach übereinstimmenden Kriterien bewerten zu können, wurde daher die Entwicklung der IRI-"points" während der ersten der beiden DRL-Testsitzungen schließlich nicht mehr mit S-Kurven-Fits sondern mit Hilfe einer Geraden als Ausgleichsfunktion für die Point-Kurve dargestellt. Die Steigung der Geraden bewertete die "Lernfähigkeit". Als Bewertungseinheit diente der Wert für ["points"/session] (siehe Abb. 10)

Bei der zweiten DRL-Sitzung (DRL 1/16 rep.) konnte aber davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Wiederholung dieser Testanforderung nicht mehr um einen "Lernvorgang" sondern vielmehr um die Prüfung einer "Gedächtnisleistung" handelte. Diesem Umstand entsprechend wurde hier daher der Mittelwert aller "points" als Ausgleichsfunktion für die Bewertung der "Gedächtnisleistung" eingesetzt. Als Bewertungseinheit diente der Wert ["points"] (siehe Abb. 11).

Beispiele für die Mikrostruktur-Analyse

Die Abbildungen 8-11 sollten die Entwicklung und allmähliche Verfeinerung des von uns für das Forschungsvorhaben erarbeiteten, neuen Analyseverfahrens dokumentieren. Im Vergleich zwischen den "scatter plots" (oben) und den S-Kurven-Fits der darauf basierenden IRI-"points" (unten) ließen sich im Verlauf der Arbeiten immer bessere quantitative Aussagen zu dem unterschiedlichen Lernvermögen der einzelnen Tiere und zu deren Gedächtnisleistung machen. Bei allen Versuchstieren der F-1-, F0-, F1- und F2-Generationen wurden derartige Dateien während der 10 ON-Phasen der DRL-Testsitzungen einmal registriert und analysiert, für die Tiere der F0-Generation zweimal.

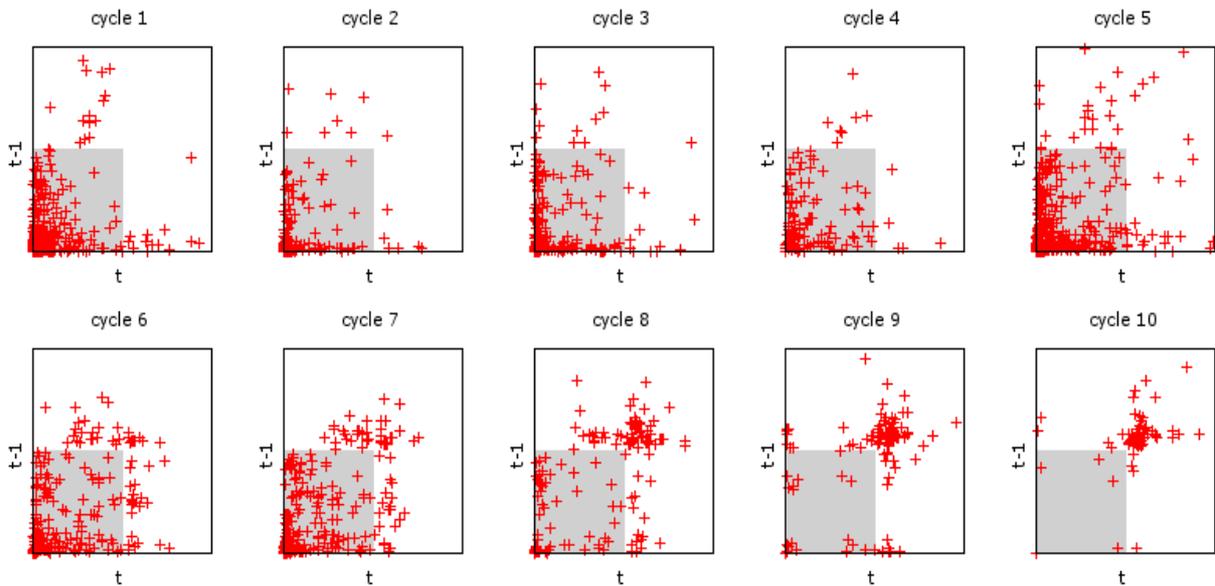


Abb. 8a
"scatter plots"

Dargestellt sind IRI-"scatter plots" der 10 ON-Phasen (cycles 1-10) der DRL 1/16-Testsitzung vom 29.08.2005. Die Ratte in Box # 01 (Transponder Nr. 266033) berücksichtigte in den letzten ON-Phasen zunehmend das Sperrintervall von 16 sec und machte damit immer weniger Fehler. (Abszissen und Ordinaten dieser Abb. sind identisch mit denen der Abb.6)

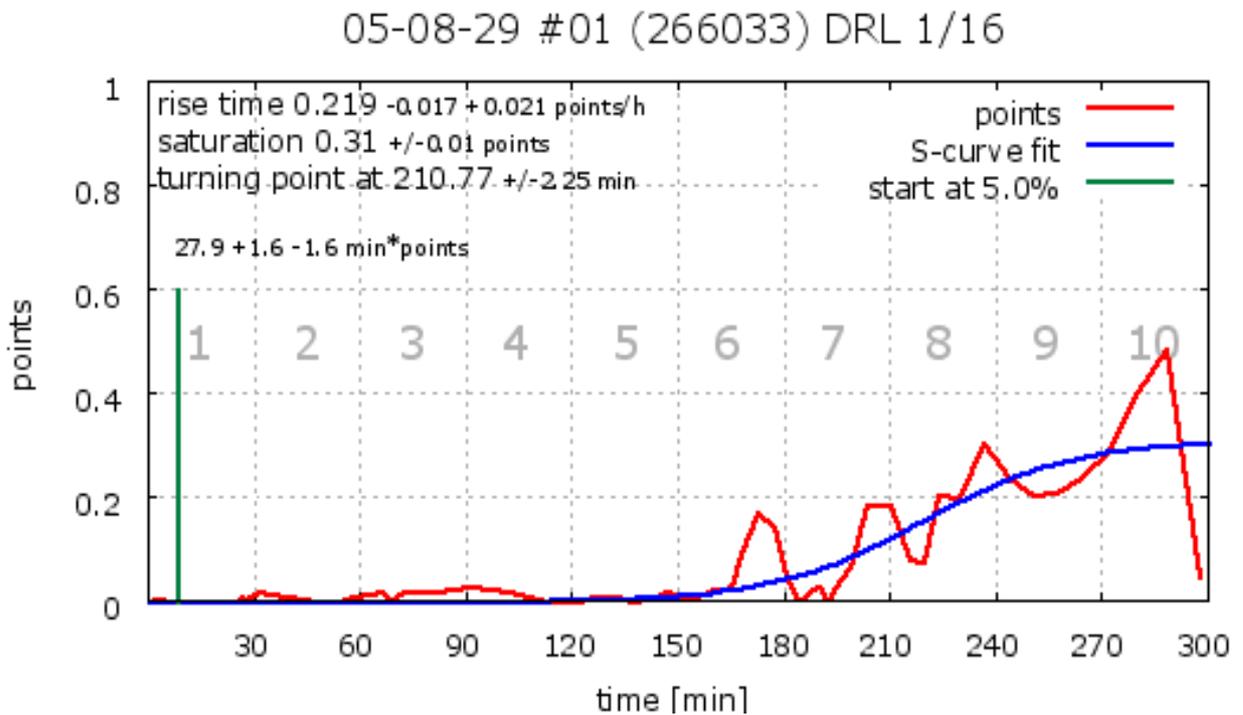


Abb. 8b
S-Kurven-Fit

S-Kurven-Fit der in Abb. 11a dargestellten Verteilung der IRI-"points" während der 10 ON-Phasen à 30 min der DRL 1/16-Testsitzung vom 29.08.2005. Eingezeichnet sind die berechneten Werte für Steigung (rise time), Sättigung (saturation), Wendepunkt (turning point), etc. nebst den dazugehörigen Abweichungen und ein daraus resultierender Skalierungsfaktor von $27.9 \pm 1.6 \text{ min} \times \text{"points"}$. Der S-Kurven-Fit (blaue Linie) zeigt den Verlauf der Lernleistung dieses Tiers während der 15-stündigen Testsitzung.

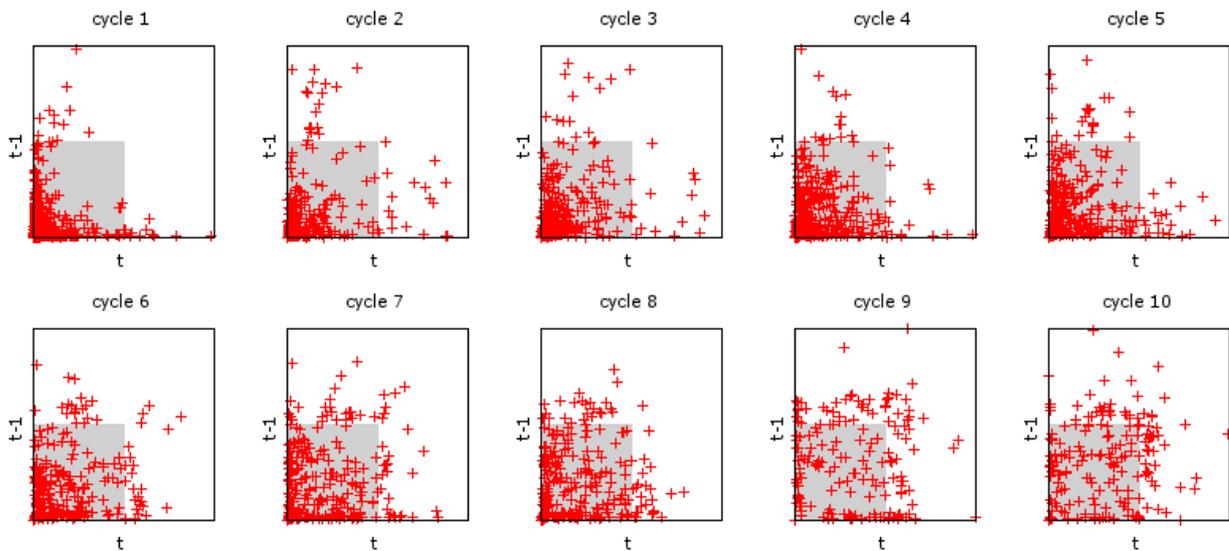


Abb. 9a
"scatter plot"

Dargestellt sind IRI-"scatter plots" der 10 ON-Phasen (cycles 1-10) der DRL 1/16-Testsitzung vom 02.09.2005. Die Ratte in Box # 05 (Transponder Nr. 273934) hatte offensichtlich die Testaufgabe nicht "erlernt". Auch in den letzten ON-Phasen der Testsitzung zeigten die IRI-Verteilungsmuster keine Änderung. (Abszissen und Ordinaten dieser Abb. sind identisch mit denen der Abb. 6)

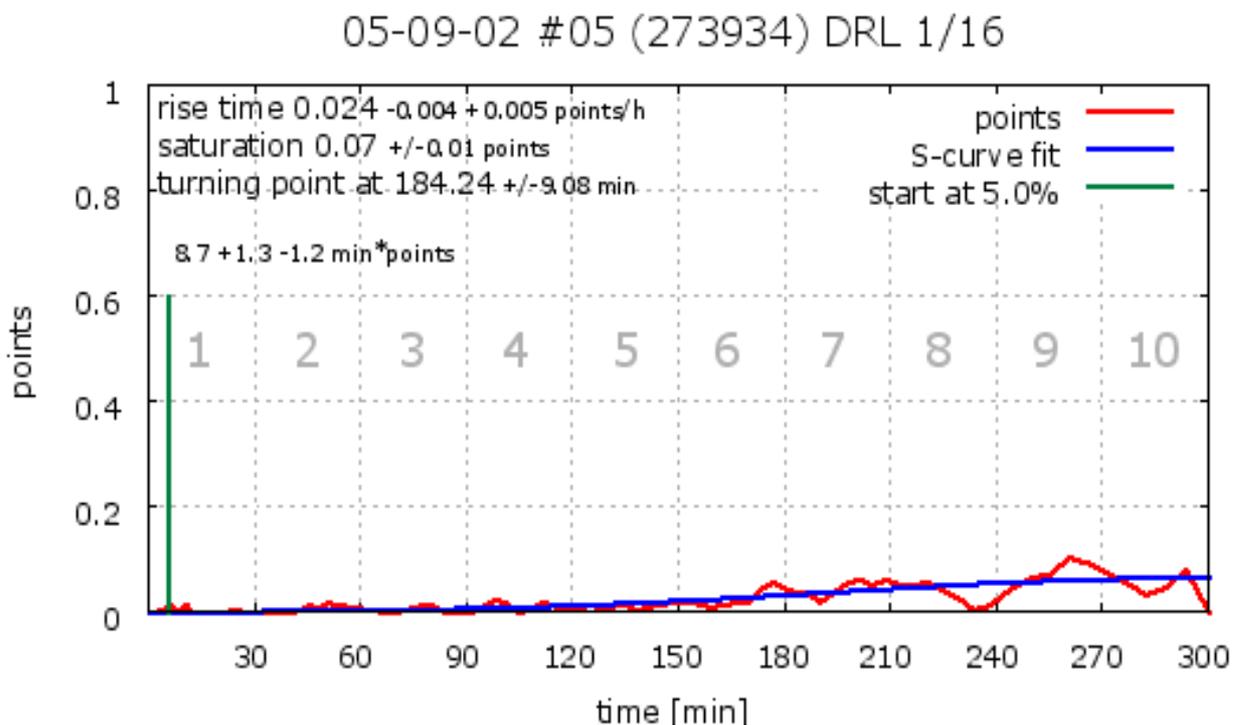


Abb. 9b
S-Kurven-Fit

S-Kurven-Fit der in Abb. 12a dargestellten Verteilung der IRI-"points" während der 10 ON-Phasen der DRL 1/16-Testsitzung. Eingezeichnet sind die berechneten Werte für Steigung (rise time), Sättigung (saturation), Wendepunkt (turning point), etc. nebst den dazugehörigen Abweichungen und ein daraus resultierender Skalierungsfaktor von hier nur 8.7 min x "points" (+1.3, -1.2). Der Verlauf des S-Kurven-Fits (blaue Linie) macht deutlich, dass diese Ratte während der Testsitzung nicht "gelernt" hat.

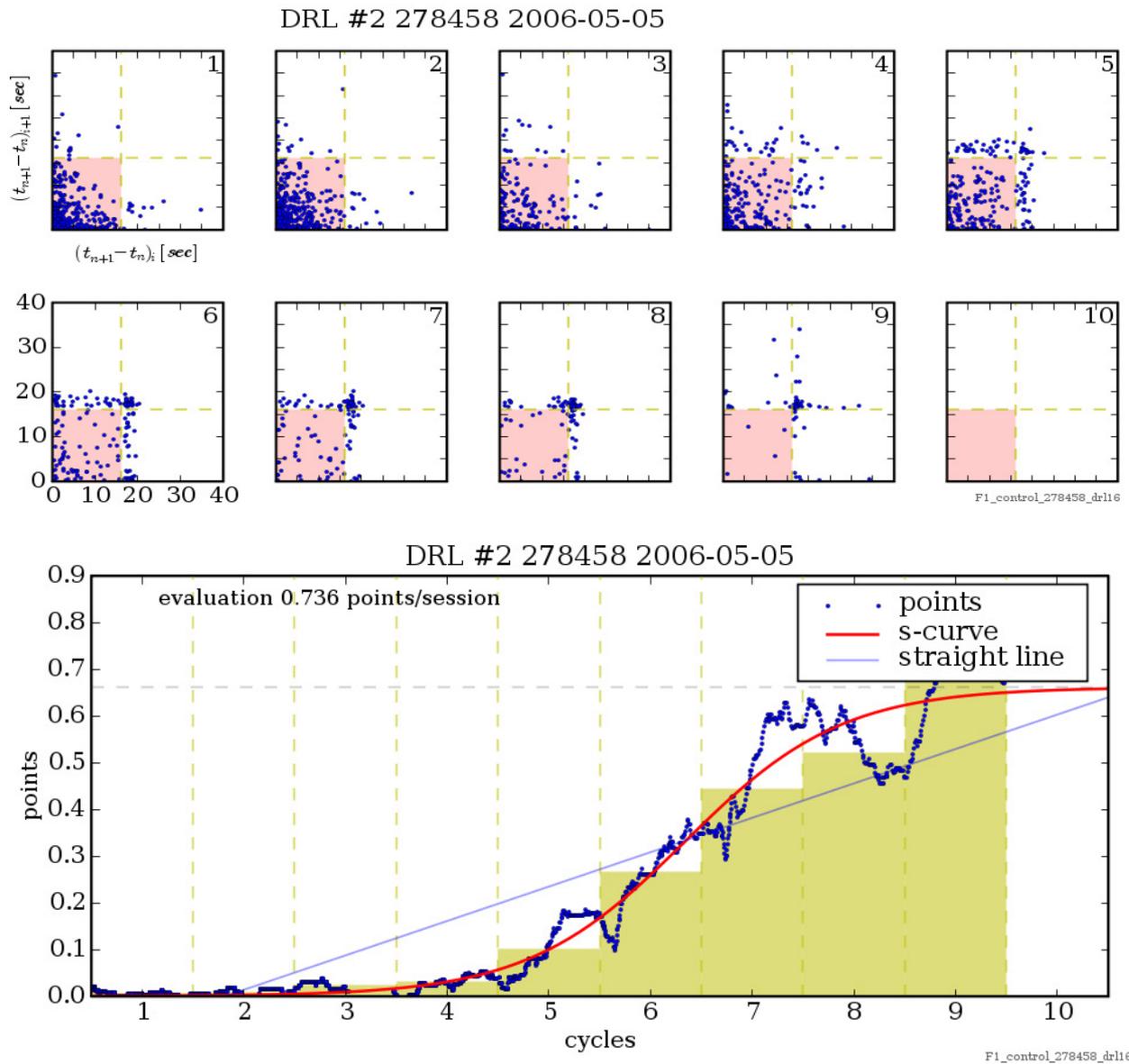


Abb. 10

Beispiel zur Erfassung der "Lernfähigkeit"

Während der ersten der beiden DRL-Testsitzungen wurde die Fähigkeit der Ratte (# 278458 im Testkäfig # 2, F1-Generation, Kontrolle) ermittelt, während der 10 ON-Phasen (cycles) des Testprogramms DRL 1/16 die Berücksichtigung des Sperrintervalls von 16 sec allmählich zu "erlernen".

Im oberen Teil der Abb. werden die 10 dazugehörigen "IRI-scatter plots" der Testsitzung vom 05.05.2006 dargestellt. (Abszisse und Ordinate dieser Abb. sind identisch mit denen der Abb. 6)

Der untere Teil der Abb. zeigt den Verlauf der "points" (blaue Punkte) während dieser 10 ON-Phasen, den S-Kurven-Fit (rote Linie) und die über die "points" gemittelte Gerade (straight line).

Um die stark streuenden Pointwerte zu glätten, wurde ein "sliding average"-Prozess eingesetzt. Zur Definition eines Punktes wurde dabei über 50 Punkte (± 25) gemittelt. Der für dieses Tier ermittelte Skalierungswert (evaluation) betrug 0.736 points/session. Die gelben Säulen repräsentieren den Mittelwert der points/Phase.

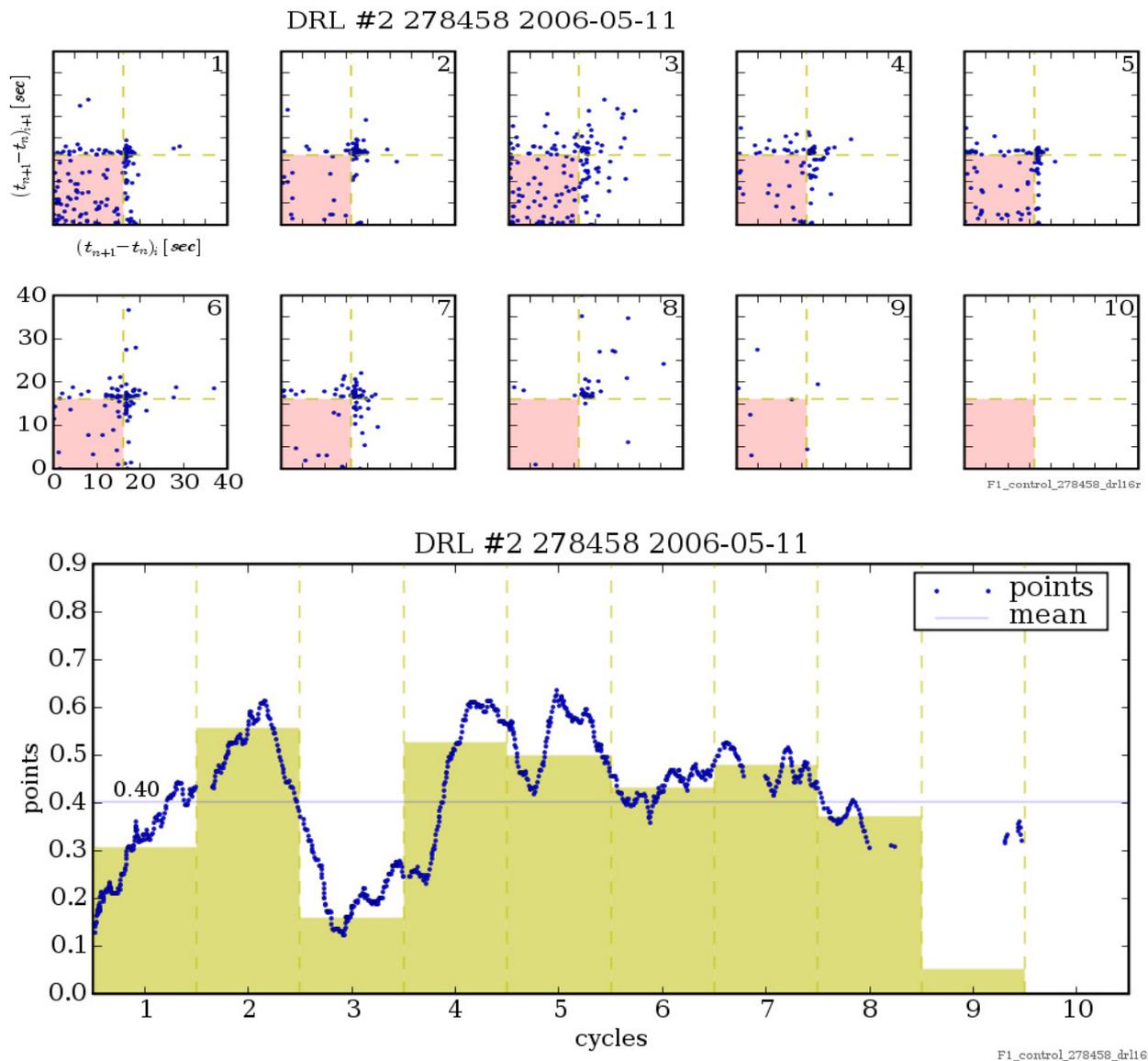


Abb. 11

Beispiel zur Erfassung der "Gedächtnisleistung"

Während der zweiten der beiden DRL-Testsitzungen (DRL 1/16 rep.) wurde die Fähigkeit der Ratte (# 278458 im Testkäfig # 2, F1-Generation, Kontrolle) ermittelt, sich während der 10 ON-Phasen (cycles) des Testprogramms DRL 1/16r an die Berücksichtigung des Sperrintervalls von 16 sec zu "erinnern".

Im oberen Teil der Abb. werden die 10 dazugehörigen "IRI-scatter plots" der Testsitzung vom 11.05.2006 dargestellt. (Abszisse und Ordinate dieser Abb. sind identisch mit denen der Abb. 6)

Der untere Teil der Abb. zeigt den Verlauf der "points" (blaue Punkte) während dieser 10 ON-Phasen und deren Mittelwert (mean). Der für dieses Tier ermittelte Skalierungswert für die "Gedächtnisleistung" betrug demnach 0.40.

Statistische Berechnungen

Die zusätzliche statistische Auswertung wurde mit dem Programm Graphpad InStat (Fa. Graphpad Inc.) unter Verwendung der u.a. von Siegel (1956) veröffentlichten Formeln, i.e. Kruskal-Wallis (non-parametric ANOVA), Dunn's multiple comparisons test und Friedman Test (non-parametric repeated measures ANOVA), von Dr. M. Stohrer, LMU-Institut für Tierphysiologie, vorgenommen (siehe Tab. 1 auf Seite 105). Nicht-parametrische Testverfahren wurden gewählt, weil die Versuchsergebnisse wegen nicht-hinreichender Tierzahlen nicht als normal-verteilt betrachtet werden konnten. Beim Vergleich zwischen Kontrollen und befehdeten Gruppen (GSM, UMTS) wurde zunächst mit Hilfe einer Varianzanalyse (Kruskal-Wallis, non-parametric ANOVA) geprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden waren. Traten signifikante Unterschiede auf, wurden diese post-hoc mit Hilfe des Dunn's multiple comparisons test (und Bonferroni Korrektur des Signifikanzniveaus) geprüft. Nach diesem Verfahren wurden auch die in der Abb. 22

dargestellten Vergleiche zwischen den Kontrollgruppen (F0, F1, F2) der weiblichen Tiere im Test DRH 4/2 sowie den F2-Gruppen im selben Test (F2 control, F2 GSM, F2 UMTS) durchgeführt. Die Vergleiche zwischen den F0-Gruppen nach kurzer bzw. längerer Befeldungszeit wurden zunächst mit Hilfe einer Varianzanalyse (Friedman Test, non-parametric repeated measures ANOVA) geprüft. Wenn signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen vorhanden waren, wurden diese post hoc mit Hilfe des Dunn's multiple comparisons test (und Bonferroni-Korrektur des Signifikanzniveaus) geprüft.

ERGEBNISSE

Zur Erhöhung der statistischen Aussagekraft wurden die Ergebnisse der verschiedenen Gruppen folgendermassen unterteilt bzw. zusammengefasst:

- Pro Generation standen insgesamt 60 Tiere zur Verfügung.
- 20 Tiere pro GSM-, UMTS- und "sham"-Exposition.
- Hiervon waren 10 männl. und 10 weibl. Geschlechts.
- Die beiden Hauptgruppen 1 und 2 wurden zusammengefaßt.
- Testgruppen in den simultan betriebenen Skinner'schen Testkäfigen bestanden stets aus 5 männlichen und 5 weiblichen Tieren.
- Die Ratten der jeweiligen Testgruppen wurden bei den aufeinander folgenden Tests stets in die selben Skinner'schen Testkäfige gesetzt.
- Getrennte Berechnung und Darstellung der operanten Verhaltensleistung ("rel. performance") nach Geschlecht (Säulen) mit Angabe der Standard-Abweichung.
- In die jeweilige Auswertungsfolge wurde die Bewertung der Dynamik der Verhaltensleistung mit Hilfe der "points" einbezogen.

Unter Berücksichtigung der im Abschlussbericht von Dr. Bornhausen an die Dt. Telekom AG (1998) vorgenommenen Reihenfolge wurden zunächst Normierungen für die Werte in den verschiedenen Testverfahren und schließlich Korrelationen zwischen den Parametern der operanten Verhaltensleistung ("activity" = Hebeldrücke; "reinforcements" = Belohnungen; "rel. performance" = operante Test-spezifische Verhaltensleistung) aufgeführt. Die Position jedes einzelnen Versuchstiers in den Normierungen wurde zufällig bestimmt und dann für alle weiteren Auswertungen beibehalten. Als Parameter zur Erfassung der Dynamik des "Lernvorgangs" einerseits bzw. der "Gedächtnisleistung" andererseits bei den entscheidenden DRL-Tests wurden zusätzlich jeweils die "points" berechnet und graphisch dargestellt.

Die Berechnungen und graphischen Darstellungen wurden mit Hilfe der Programme "matplotlib" und "python" vorgenommen, die kostenlos aus dem Internet unter matplotlib.sourceforge.net bzw. python.org bezogen werden können. Die senkrechten Klammern über den Säulen in den Abb. 25 und 26 sowie 34 und 35 repräsentierten die Standard-Abweichungen. Damit sollten signifikante Unterschiede bereits in den Graphiken deutlich gemacht werden können. Zusätzliche statistische Berechnungen wurden gegebenenfalls unter Verwendung der von Siegel (1956) veröffentlichten Formeln vorgenommen. Herausragenden Anteil an der Erfassung, Analyse und Darstellung der Ergebnisse dieses Teils des Forschungsvorhabens hatten die Kenntnisse, das Können und die Bemühungen von Herrn Oberleutnant Dipl.-Ing. (FH) Christian Kögler.

Um Mißverständnisse bei den einzelnen Analysen, z.B. bei der Unterscheidung zwischen "performance" und "rel. performance" zu vermeiden, wurden im Gegensatz zu den Untersuchungen von Dr. Bornhausen am GSF-FZ (siehe Abschlussbericht an die Dt. Telekom 1998) die Belohnungen, die früher verständlicherweise als "performance" betrachtet worden waren, nun als "reinforcements" definiert. Die Parameter für die Bewertung der Verhaltensleistung in den vier DRH- und DRL-Tests wurden somit folgendermaßen definiert:

- "activity" = Hebeldrücke während der ON-Phasen
- "reinforcements" = Belohnungen während der ON-Phasen

- "rel. performance" = operante Test-spezifische Verhaltensleistung
- "points" = Maß für die Berechnung der Dynamik des "Erlernens" der DRL-Testanforderung im ersten DRL-Testschritt bzw. der "Gedächtnisleistung" im zweiten DRL-Testschritt (siehe oben)

In den beiden verschiedenen Testverfahren DRH und DRL wurde die "rel. performance" nach den folgenden Formeln berechnet:

- DRH-"rel. performance" in % =
$$\frac{\text{Zahl der Belohnungen} \times 100 \times \text{DRH-Zahl}}{\text{Zahl der Hebeldrücke während der ON-Phasen}}$$

(DRH-Zahl: 2 oder 4)
- DRL-"rel. performance" in % =
$$\frac{\text{Zahl der Belohnungen} \times 100}{\text{DRL-Zahl} \times \text{Zahl der ON-Phasen}}$$

(DRL-Zahl: maximal erhältliche Zahl von Belohnungen unter Berücksichtigung der jeweiligen Sperrintervall-Dauer in einer ON-Phase)

Unter Berücksichtigung des linearen Zusammenhangs zwischen "reinforcements" und "rel. performance" bei den DRL-Tests, der zu undifferenzierten Aussagen (i.e. Anordnung aller Werte längs einer Diagonalen) führen würde, musste für die Berechnung der entsprechenden Korrelation in den beiden DRL-Test Sitzungen (siehe Abb. 21 und 30) statt der "rel. performance" die "efficiency" (norm.) nach folgender Formel bestimmt werden:

- "efficiency" in % =
$$\frac{\text{Zahl der Belohnungen} \times 100}{\text{Zahl der Hebeldrücke während der ON-Phasen}}$$

Auf die unterschiedliche Bewertung der "Lernfähigkeit" (1. DRL-Test) bzw. der "Gedächtnisleistung" (2. DRL-Test) wurde bereits hingewiesen (siehe Abb. 10 und 11).

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zur Lernleistung wurden sowohl auf konventionelle Art – mit Betonung des jeweiligen Endergebnis (u.a. Verhältnis von Hebeldrücken zu Belohnungen am Ende einer Testsitzung) – als auch mit Hilfe der von uns neu entwickelten Methode zur Erfassung dynamischer Parameter (IRIs und "points") analysiert und skaliert. Normierungen dienen dazu, Ergebnisse mit unterschiedlicher Grundlage vergleichbar zu machen. Als Voraussetzung für einen Vergleich der verschiedenen Parameter des operanten Verhaltens bei den unterschiedlichen Testaufgaben wurden die entsprechenden Ergebnisse daher unter Berücksichtigung des jeweiligen Mittelwerts für den entsprechenden Testschritt normiert. Bei den Parametern "activity" und "reinforcements" konnten die Werte über alle vier Testschritte hinweg einheitlich normiert werden. Die Werte des Parameters "rel. performance" wurden dagegen unter Berücksichtigung des jeweiligen Mittelwerts für jeden Testschritt getrennt (blasse Linien) normiert. Zur Optimierung der graphischen Darstellung wurden bei den daran anschließenden Korrelationen die Maxima der Ergebnisse des jeweiligen Testschritts den x- und y-Achsen jeweils angepasst. Die Werte für die Dynamik des Erlernens der - bzw. des Gedächtnis an die DRL-Testaufgabe ("points", Berücksichtigung des Sperrintervalls von 16 sec) wurden diesen Darstellungen angefügt.

Anmerkungen

Von den vielen zum Teil mehrfach geprüften Versuchstieren mußte lediglich ein Tier (F2Gr1, RF-ID # 286806) wegen extrem hoher Aktivität im DRL-Testverfahren als "Ausreisser" definiert und von einer Berücksichtigung ausgeschlossen werden.

Fehler des technischen Systems oder des jeweils verantwortlichen Leiters der operanten Verhaltensuntersuchungen führten zum Ausfall der unten aufgelisteten Daten, die somit für die Analyse nicht oder nur unvollständig zur Verfügung standen. Eventuell unvollständige Aufzeichnungen bei den DR0-Trainingssitzungen wurden für die Einschätzung der Verhaltensleistungen nicht bewertet und daher in dieser Liste auch nicht berücksichtigt.

```

Einzeltiere
  F0 Gr1 drh42 296091 05-11-21 no obc-file
  F0 Gr2 drh42 152976 05-12-26 corrupted obc-file
  F2 Gr1 drl16 286806 06-10-06 filtered
  F2 Gr1 drl16 286806 06-10-12 filtered
  F0r Gr2 drh21 297141 06-08-08 corrupted obc-file
Testgruppen
  F0r Gr1 drh42 190234 06-07-08 no obc-file
  F0r Gr1 drh42 291148 06-07-08 no obc-file
  F0r Gr1 drh42 296668 06-07-08 no obc-file
  F0r Gr1 drh42 275285 06-07-08 no obc-file
  F0r Gr1 drh42 301853 06-07-08 no obc-file
  F0r Gr1 drh42 281811 06-07-08 no obc-file
  F0r Gr1 drh42 293236 06-07-08 no obc-file
  F0r Gr1 drh42 263606 06-07-08 no obc-file
  F0r Gr1 drh42 301731 06-07-08 no obc-file
  F0r Gr1 drh42 265206 06-07-08 no obc-file

  F2 Gr1 drh21 184319 06-09-29 no obc-file
  F2 Gr1 drh21 186958 06-09-29 no obc-file
  F2 Gr1 drh21 282836 06-09-29 no obc-file
  F2 Gr1 drh21 283999 06-09-29 no obc-file
  F2 Gr1 drh21 183395 06-09-29 no obc-file
  F2 Gr1 drh21 185115 06-09-29 no obc-file
  F2 Gr1 drh21 183663 06-09-29 no obc-file
  F2 Gr1 drh21 293111 06-09-29 no obc-file
  F2 Gr1 drh21 189932 06-09-29 no obc-file
  F2 Gr1 drh21 196680 06-09-29 no obc-file

```

Die Liste zeigt, dass ein kompletter Datenverlust nur bei zwei Testgruppen (F0r Gr1 und F2 Gr1) in den Tests DRH 4/2 (08.07.2006) und DRH 2/1 (29.09.2006), die häufiges Hebeldrücken verlangten, auftrat. In den entscheidenden Tests, die für die Dynamik-Analyse herangezogen wurden, kam es aber nur bei einem einzelnen Tier (RF-ID: 286806) im ersten und dem zweiten DRL 1/16-Test zu unvollständigen Aufzeichnungen, die auch aus anderen Gründen (siehe oben) zur Elimination der entsprechenden individuellen Daten führten. Störungen des Umfelds während der Untersuchungen zur operanten Verhaltensleistung traten laut Überwachungsprotokoll nicht auf.

Nach Abschluss der Analysen der Verhaltensleistungen konnte erkannt werden, dass weitere Untersuchungen der Details wie z.B. die ON/OFF-Diskrimination, die Links-Rechts-Präferenz des Hebels, etc. keinen größeren Erkenntnisgewinn zum Thema des Forschungsvorhabens versprochen. Zur Einschränkung des Berichtsumfangs mußte daher auch auf eine detaillierte Auswertung der Trainingssitzungen (DR0 5 min), in denen die Ratten das Hebeldrücken für Futterbelohnung erlernt hatten, verzichtet werden. Zur Erleichterung eventueller nachträglicher Auswertungen und Kontrollen wurde den jeweiligen Darstellungen unten rechts der jeweilige Dateiname angefügt.

Mit nur sehr wenigen Ausnahmen hatten die Ratten aller Gruppen die Indikator-tätigkeit von operanten Verhaltenstests (Hebeldrücken für Futterbelohnung) im Verlauf einer einzigen nächtlichen DR0 5 min-Trainingssitzung erlernt. Der Einfluss eines eventuell unzureichenden Trainings auf das Ergebnis der anschließenden Verhaltenstests wird in einem eigenen Vorhaben untersucht (Promotionsarbeit von Dipl.-Biol. J. Schneider).

Als Zusammenfassung unserer Ergebnisse wurden Säulen-Diagramme gezeigt, die die operante Verhaltensleistung der männlichen und weiblichen Tiere der drei Ratten-Generationen (F0, F1, F2) unter dem Einfluß des GSM- bzw. des UMTS-EMFs darstellen und mit derjenigen der Kontrolltiere vergleichen.

In unseren Untersuchungen wurde zur besseren Übersicht die jeweilige Standard-Abweichung ("standard deviation") und nicht der sonst übliche Mittlere Fehler ("standard error of means", SEM) angegeben. Die damit bei den Säulen-Graphiken der "rel. performance" (Test-spezifische Verhaltensleistung) deutlich werdende inter-individuelle Streuung der einzelnen Werte mußte

bei der Interpretation dieser Befunde Berücksichtigung finden. Im Vergleich mit historischen Kontrollen war es offensichtlich der Vorauswahl der F-1-Generation nicht gelungen, die Variabilität der individuellen operanten Verhaltensleistung bei den Nachkommen deutlich zu minimieren.

Operante Verhaltensuntersuchungen der F0-, F1- und F2-Ratten

Alle Tiere der F0-, F1- und F2-Generationen wurden zunächst im Alter von ca. 10 Wochen untersucht. Die Ratten der F0-Generation wurden im Alter von ca. 10 Monaten erneut geprüft. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen zur Lern- und Gedächtnisleistung wurden in den folgenden Abbildungen zusammengefasst.

Für alle Abbildungen galt: Blaue Marken kennzeichneten die Kontrollen, rote Marken die GSM- und grüne Marken die UMTS-Tiere.

Normierungen

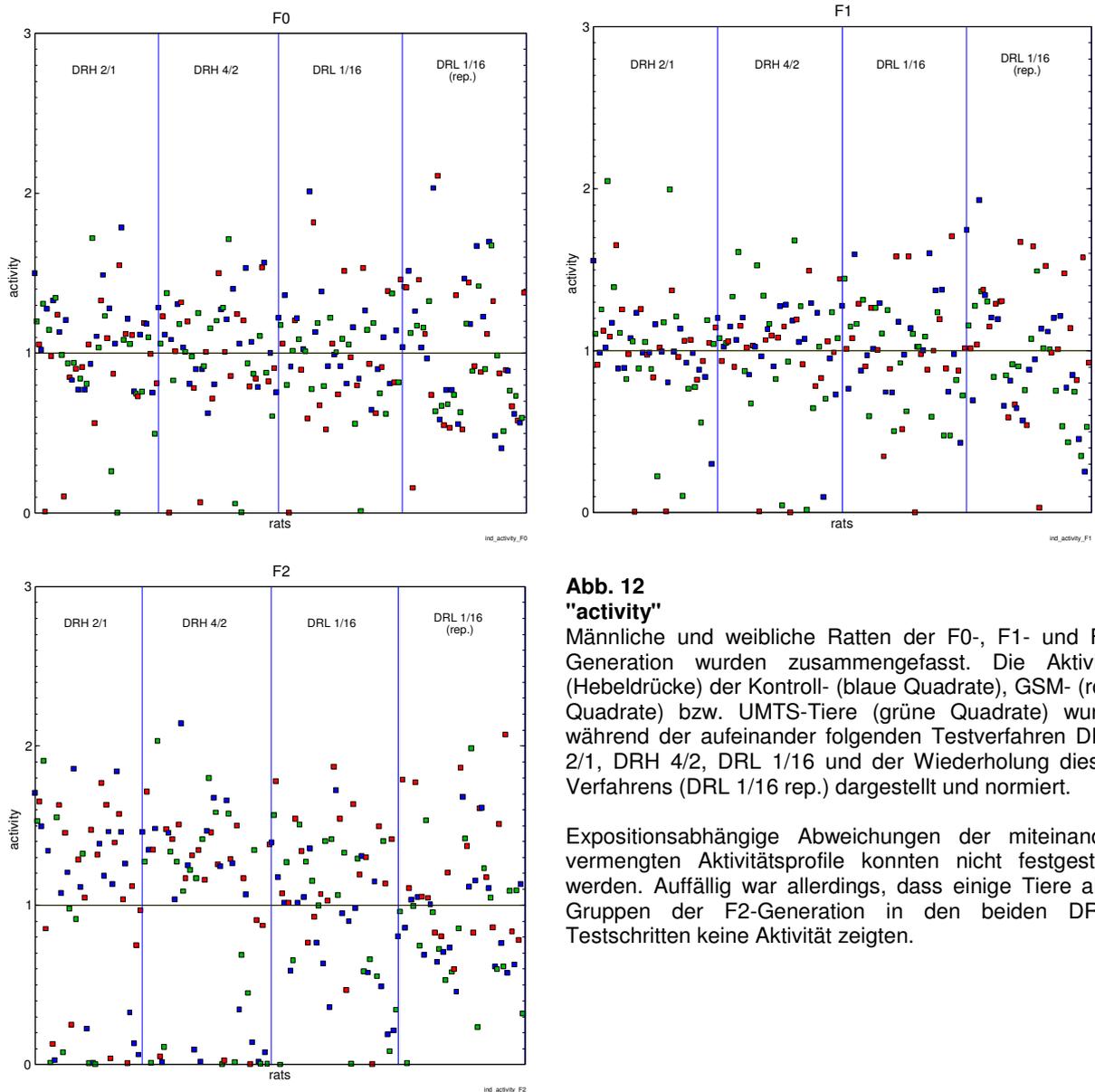


Abb. 12
"activity"

Männliche und weibliche Ratten der F0-, F1- und F2-Generation wurden zusammengefasst. Die Aktivität (Hebeldrücke) der Kontroll- (blaue Quadrate), GSM- (rote Quadrate) bzw. UMTS-Tiere (grüne Quadrate) wurde während der aufeinander folgenden Testverfahren DRH 2/1, DRH 4/2, DRL 1/16 und der Wiederholung dieses Verfahrens (DRL 1/16 rep.) dargestellt und normiert.

Expositionsabhängige Abweichungen der miteinander vermengten Aktivitätsprofile konnten nicht festgestellt werden. Auffällig war allerdings, dass einige Tiere aller Gruppen der F2-Generation in den beiden DRH-Testschritten keine Aktivität zeigten.

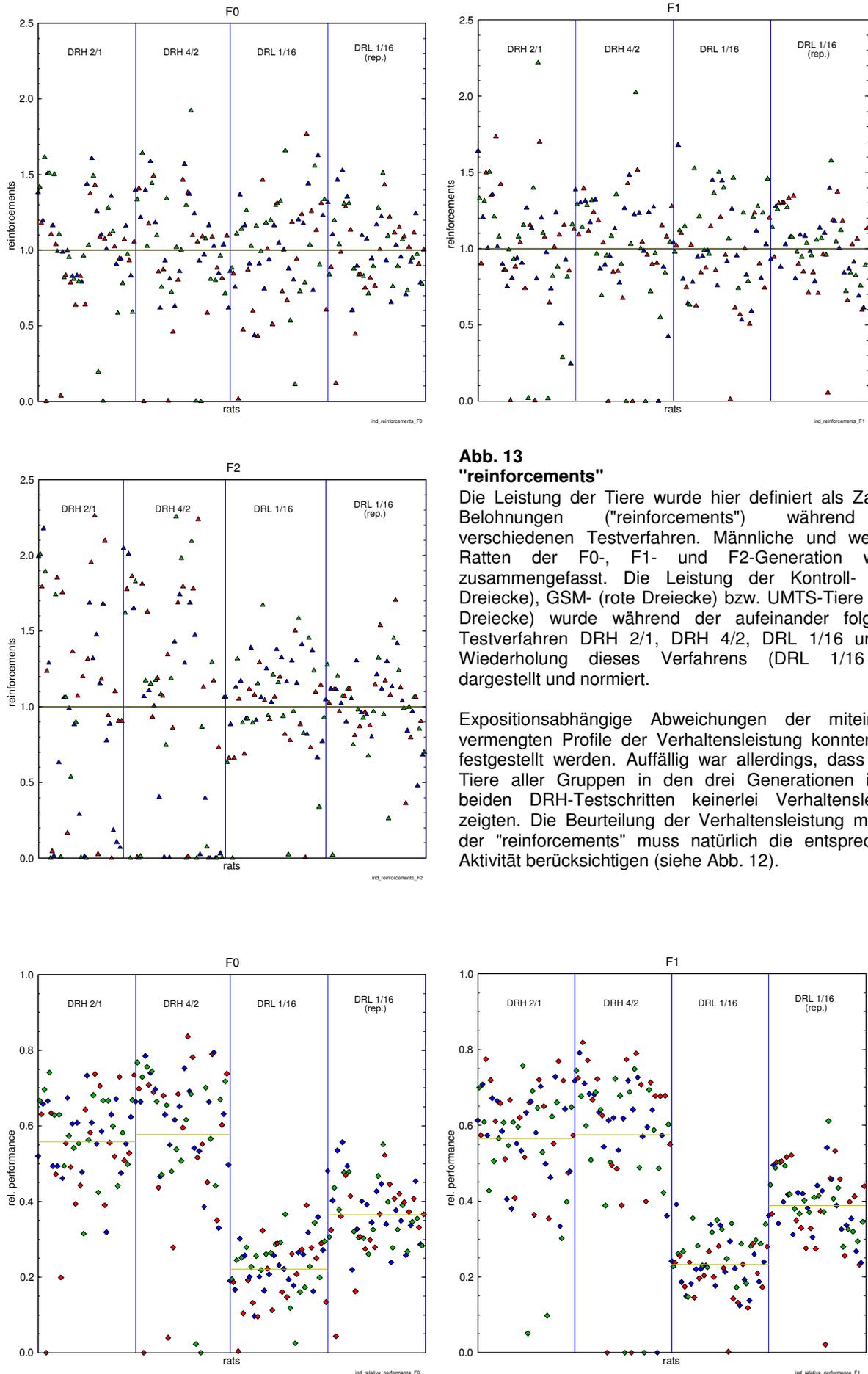


Abb. 13
"reinforcements"

Die Leistung der Tiere wurde hier definiert als Zahl der Belohnungen ("reinforcements") während der verschiedenen Testverfahren. Männliche und weibliche Ratten der F0-, F1- und F2-Generation wurden zusammengefasst. Die Leistung der Kontroll- (blaue Dreiecke), GSM- (rote Dreiecke) bzw. UMTS-Tiere (grüne Dreiecke) wurde während der aufeinander folgenden Testverfahren DRH 2/1, DRH 4/2, DRL 1/16 und der Wiederholung dieses Verfahrens (DRL 1/16 rep.) dargestellt und normiert.

Expositionsabhängige Abweichungen der miteinander vermengten Profile der Verhaltensleistung konnten nicht festgestellt werden. Auffällig war allerdings, dass einige Tiere aller Gruppen in den drei Generationen in den beiden DRH-Testschritten keinerlei Verhaltensleistung zeigten. Die Beurteilung der Verhaltensleistung mit Hilfe der "reinforcements" muss natürlich die entsprechende Aktivität berücksichtigen (siehe Abb. 12).

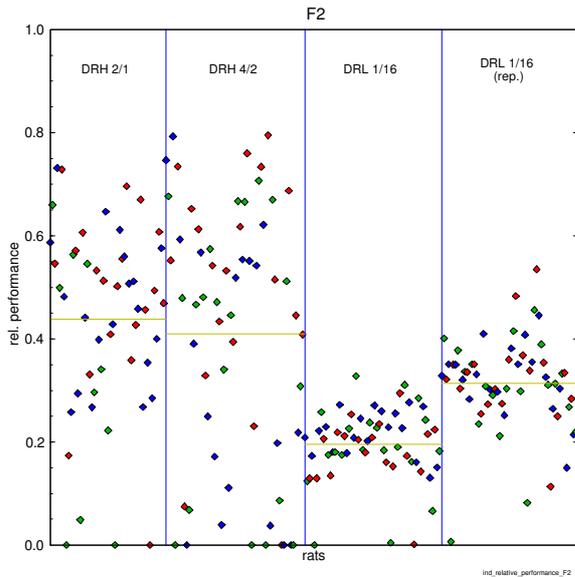


Abb. 14
"rel. performance"

Die "rel. performance" (Test-spezifische operante Verhaltensleistung) wurde hier definiert als Zahl der Belohnungen ("reinforcements") unter Berücksichtigung der spezifischen Testanforderung während der verschiedenen Testverfahren. Männliche und weibliche Ratten der F0-, F1- und F2-Generation wurden zusammengefasst. Die unterschiedliche Verhaltensleistung der Kontroll- (blaue Rauten), GSM- (rote Rauten) bzw. UMTS-Tiere (grüne Rauten) und die dazugehörigen Mittelwerte (blasse Linien) wurden während der aufeinander folgenden Testverfahren DRH 2/1, DRH 4/2, DRL 1/16 und der Wiederholung dieses letzten Verfahrens (DRL 1/16 rep.) dargestellt. Die Werte der unterschiedlichen Tiergruppen waren unter Berücksichtigung des jeweiligen Mittelwerts für die einzelnen Testschritte von 0 bis 1 normiert worden.

Expositionsabhängige Abweichungen bei den in allen Gruppen miteinander vermengten Werten ("scores") der spezifischen Verhaltensleistung konnten nicht festgestellt

werden. Auffällig war der deutliche Einbruch der Test-spezifischen Verhaltensleistung aller Gruppen beim Übergang von den Aktivitäts-betonten DRH-Testschritten zum ersten der beiden DRL-Verfahren, die ja nun eine Aufmerksamkeit-fordernde Tätigkeit der Tiere verlangten.

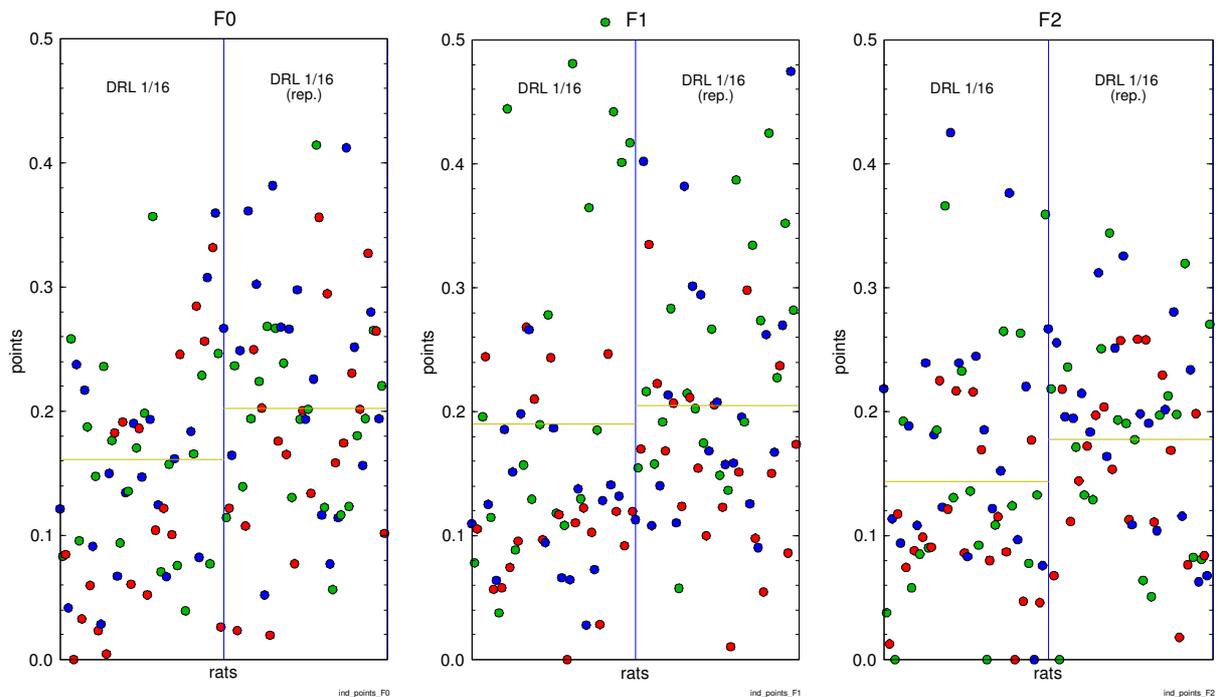


Abb. 15
"points"

Die Dynamik des "Erlernens" der - bzw. des "Erinnerns" an die DRL-Testaufgabe (Berücksichtigung des Sperrintervalls von 16 sec) wurde hier mit Hilfe der "points" erfasst. Männliche und weibliche Ratten der F0-, F1- und F2-Generation wurden zusammengefasst. Die "points" der Kontroll- (blaue Kreise), GSM- (rote Kreise) bzw. UMTS-Tiere (grüne Kreise) wurden während der ersten DRL 1/16 und der Wiederholung dieses Verfahrens (DRL 1/16 rep.) dargestellt. In der ersten DRL-Sitzung wurde bei den drei experimentellen Gruppen nach dem "Lernvermögen" und in der zweiten DRL-Sitzung nach der "Gedächtnisleistung" gefragt. Die jeweiligen Mittelwerte hierfür sind als blasse Linien dargestellt. Die Werte der unterschiedlichen Tiergruppen waren unter Berücksichtigung des jeweiligen Mittelwerts für die einzelnen Testschritte von 0.0 bis 0,5 normiert worden.

Die Durchmischung der Werte für alle experimentellen Gruppen liess gegenüber den Kontrolltieren keine EMF-induzierten Änderungen erkennen.

Korrelationen

Die Ergebnisse der Korrelation der einzelnen normierten Parameter der operanten Verhaltenstests wurden in den nachfolg. Abbildungen dargestellt.

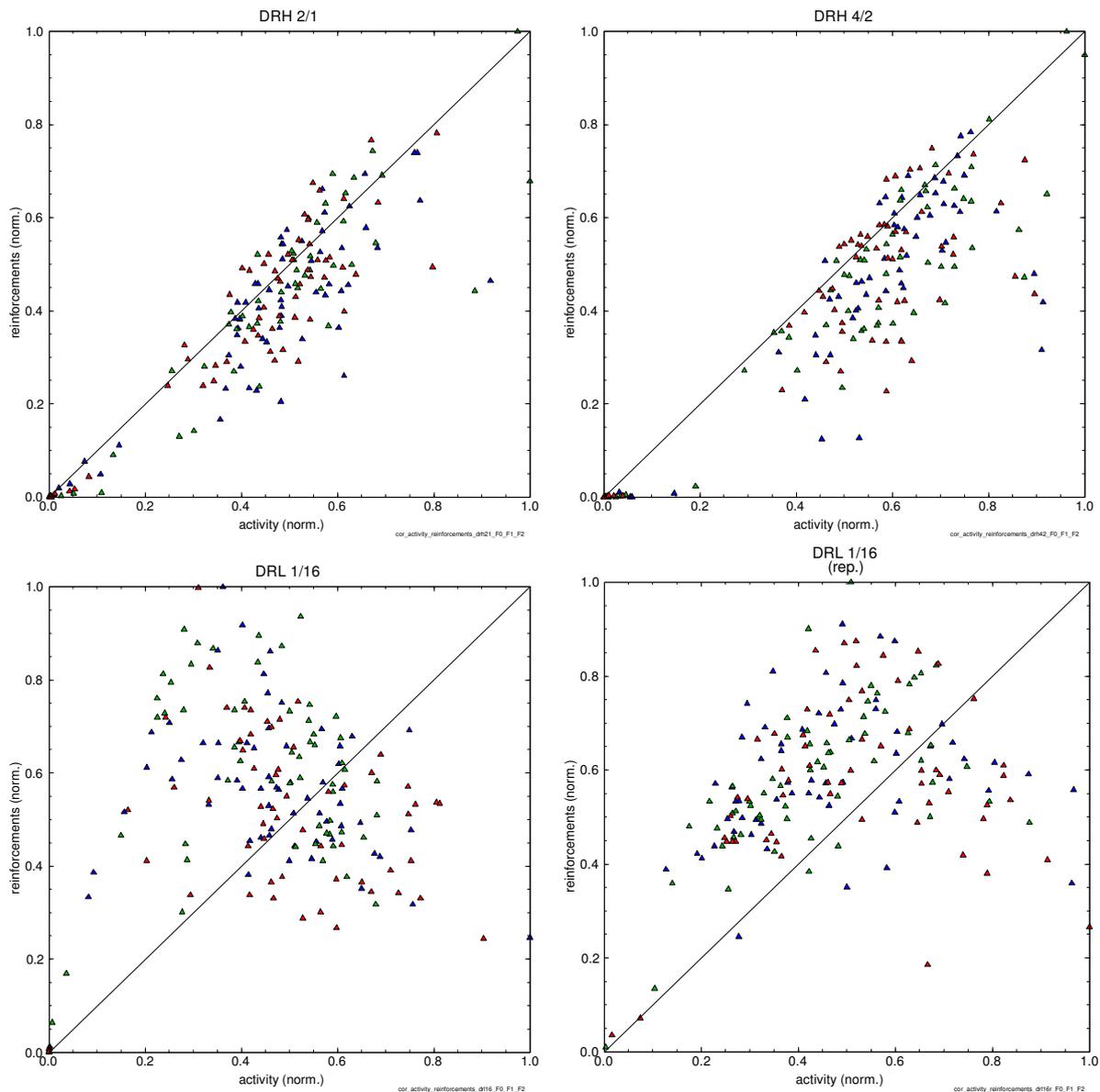


Abb. 16

Korrelation "activity" vs. "reinforcements"

Die normierten Werte für Aktivität (Hebeldrücke) und "reinforcements" (Belohnungen) wurden miteinander korreliert und für die vier aufeinander folgenden Testverfahren DRH 2/1, DRH 4/2, DRL 1/16 und DRL 1/16 rep. dargestellt. Männliche und weibliche Ratten der F0-, F1- und F2-Generation wurden zusammengefasst. Blaue Dreiecke repräsentierten die Kontroll-, rote Dreiecke die GSM-, grüne Dreiecke die UMTS-Tiere.

Die Durchmischung der Werte für alle experimentellen Gruppen liess gegenüber den Kontrolltieren keine EMF-induzierten Änderungen erkennen. Auffällig war die Abweichung des Schwerpunkts der Punktwolke nach einer Seite bei der jeweils zweiten Durchführung der beiden unterschiedlichen Testverfahren DRH und DRL.

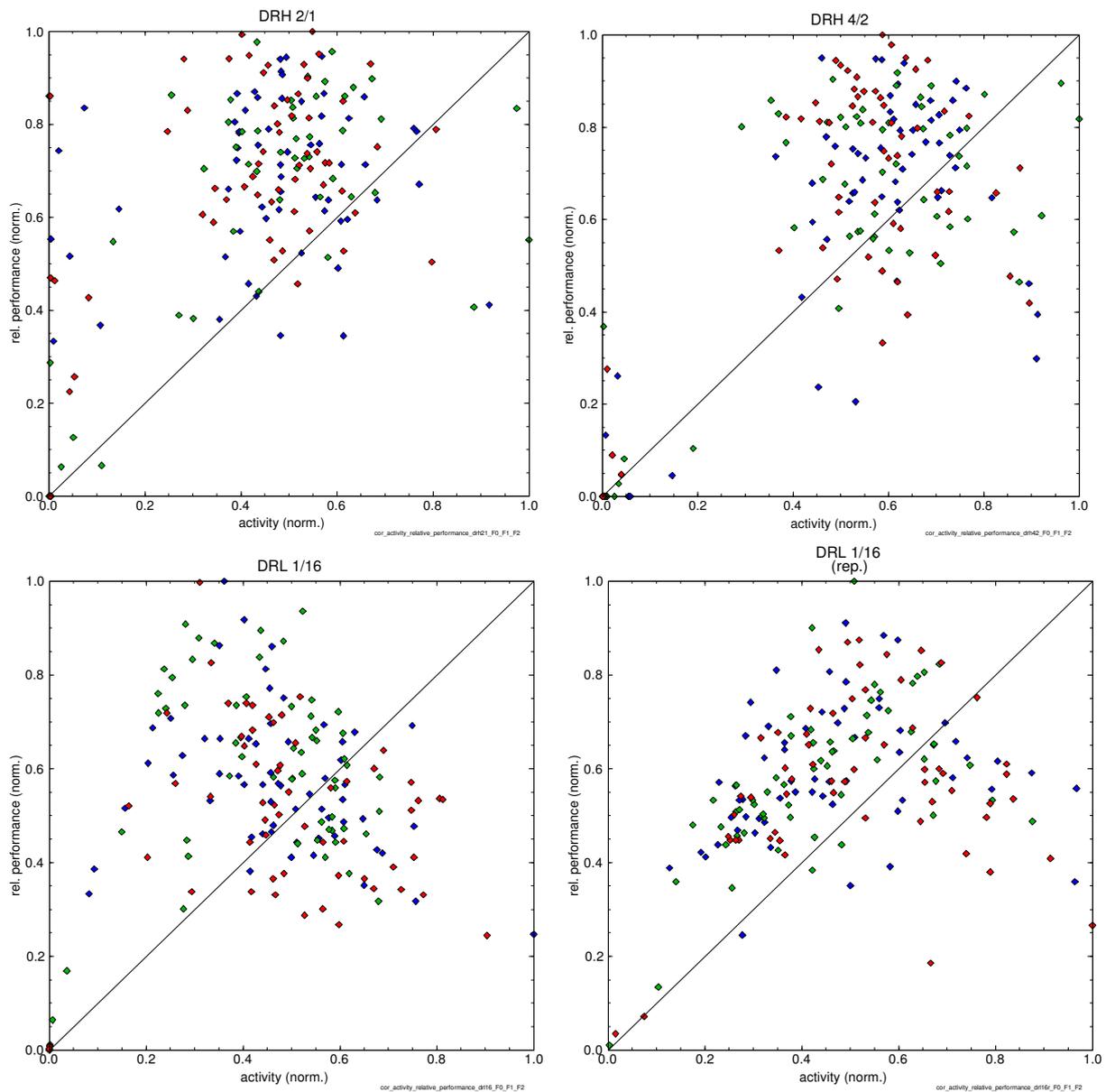


Abb. 17

Korrelation "activity" vs. "rel. performance"

Die normierten Werte für Hebeldrücke und Test-spezifische Verhaltensleistung (siehe Formel auf Seite 33) wurden miteinander korreliert und für die vier aufeinander folgenden Testverfahren DRH 2/1, DRH 4/2, DRL 1/16 und DRL 1/16 rep. dargestellt. Männliche und weibliche Ratten der F0-, F1- und F2-Generation wurden zusammengefasst. Blaue Rauten repräsentierten die Kontroll-, rote Rauten die GSM-, grüne Rauten die UMTS-Tiere.

Die Durchmischung der Werte für alle experimentellen Gruppen liess gegenüber den Kontrolltieren keine EMF-induzierten Änderungen erkennen.

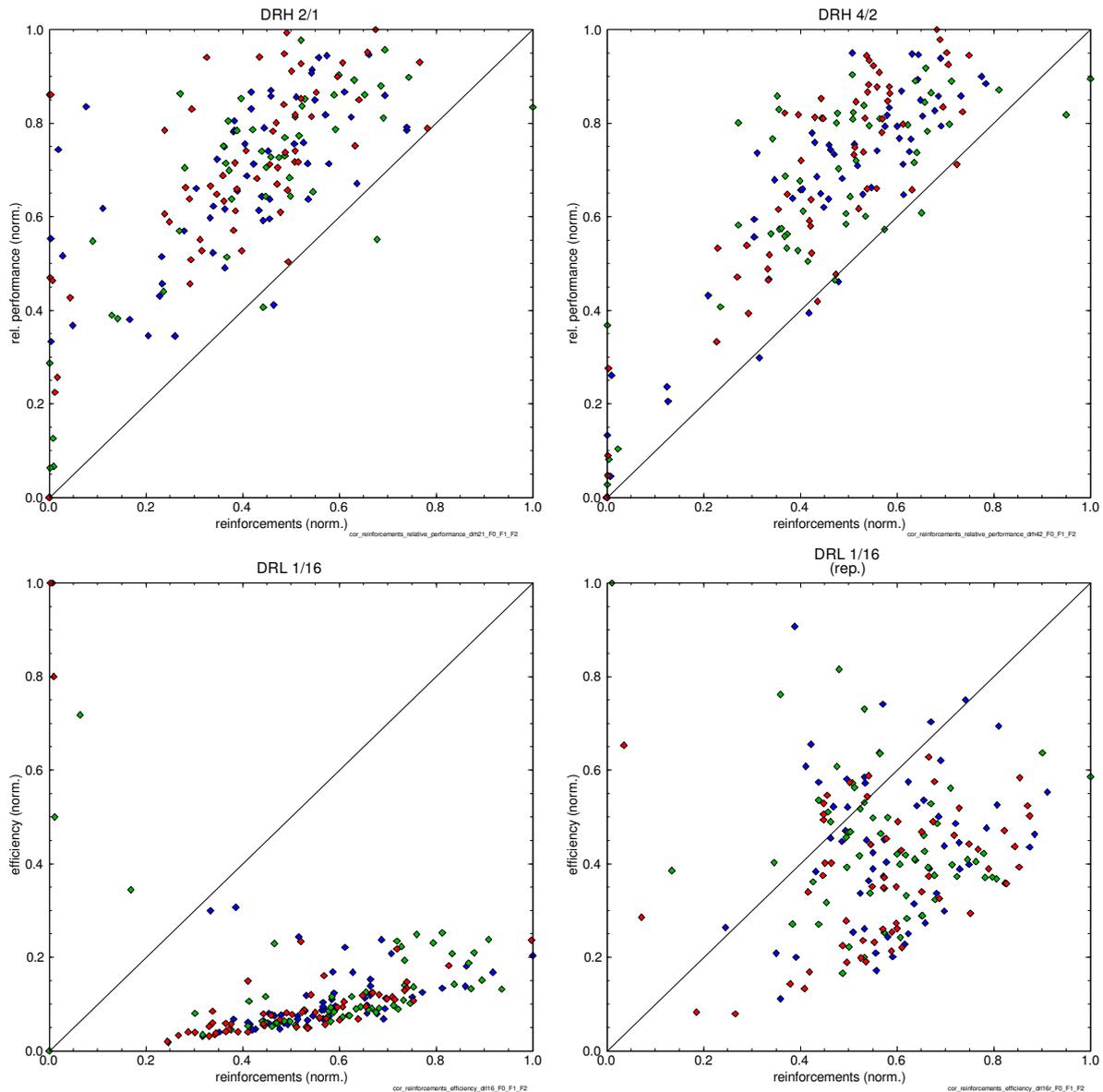


Abb. 18
Korrelation "reinforcements" vs. "rel. performance"

Die normierten Werte für Belohnungen und "rel. performance" wurden miteinander korreliert und für die DRH- und DRL-Testschritte dargestellt. Männliche und weibliche Ratten der F0-, F1- und F2-Generation wurden zusammengefasst. Blaue Rauten repräsentierten die Kontroll-, rote Rauten die GSM-, grüne Rauten die UMTS-Tiere. Wegen des linearen Bezugs beim DRL-Test zwischen "reinforcements" and der "rel. performance" wurden für eine differenziertere Darstellung der Korrelation in den beiden DRL-Testschritten jeweils sogen. "efficiency"-Werte herangezogen (siehe Seite 27).

Die Durchmischung der Werte für alle experimentellen Gruppen liess gegenüber den Kontrolltieren keine EMF-induzierten Änderungen erkennen. Auffällig war die Verschiebung der Punktwolke in den DRH-Tests nach links oben und insbesondere beim ersten DRL-Test nach rechts unten, was hier wahrscheinlich durch die Berücksichtigung der sogen. "efficiency" bedingt war.

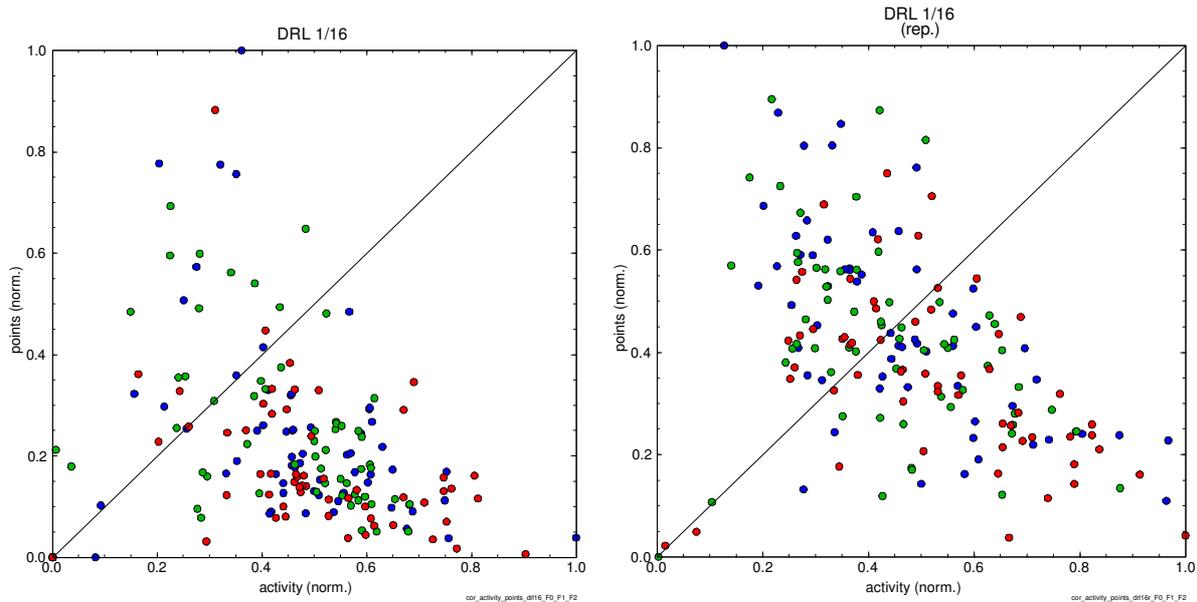


Abb. 19

Korrelation "activity" vs. "points"

Die normierten Werte für "activity" und "points" wurden miteinander korreliert und für die beiden DRL-Testschritte dargestellt. Männliche und weibliche Ratten der F0-, F1- und F2-Generation wurden zusammengefasst. Blaue Kreise repräsentierten die Kontroll-, rote Kreise die GSM-, grüne Kreise die UMTS-Tiere.

Die Durchmischung aller Werte liess weder für das "Lernvermögen" in der ersten noch für die "Gedächtnisleistung" in der zweiten DRL-Testsitzung eine EMF-induzierte Änderung erkennen. Auffällig war die grössere Häufigkeit grüner Kreise (UMTS) zugunsten der "points" während der ersten DRL-Sitzung.

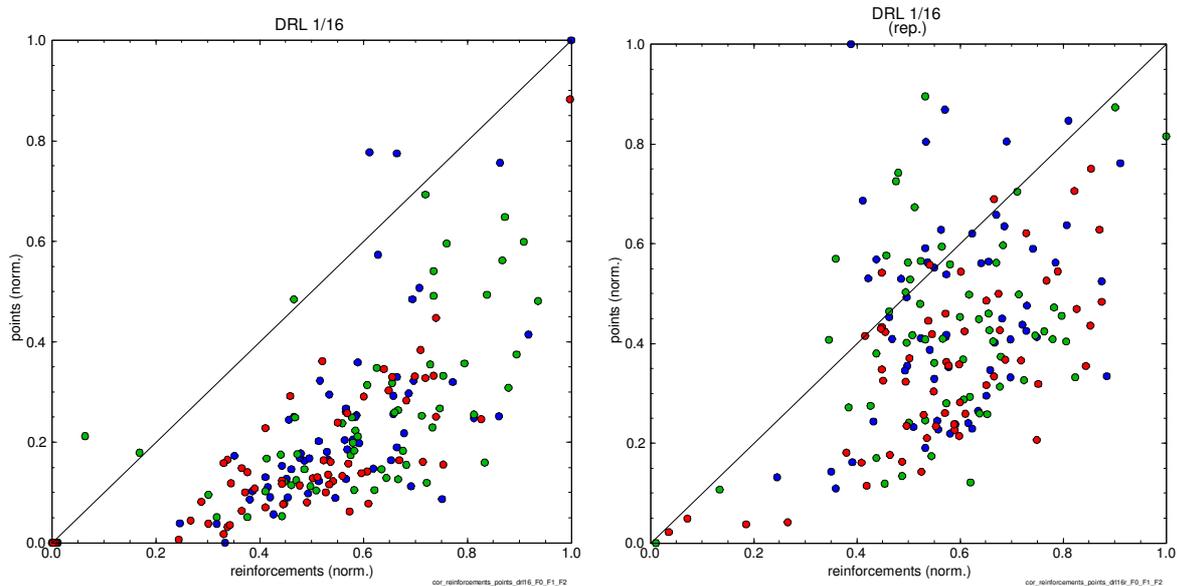


Abb. 20

Korrelation "reinforcements" vs. "points"

Die normierten Werte für "reinforcements" und "points" wurden miteinander korreliert und für die beiden DRL-Testschritte dargestellt. Männliche und weibliche Ratten der F0-, F1- und F2-Generation wurden zusammengefasst. Blaue Kreise repräsentierten die Kontroll-, rote Kreise die GSM-, grüne Kreise die UMTS-Tiere.

Die Durchmischung aller Werte liess keine EMF-induzierten Änderungen erkennen. Auffällig war die Verschiebung der Punktwolke zugunsten der "reinforcements" insbesondere während der ersten DRL-Sitzung, die das "Lernvermögen" der Ratten prüfte.

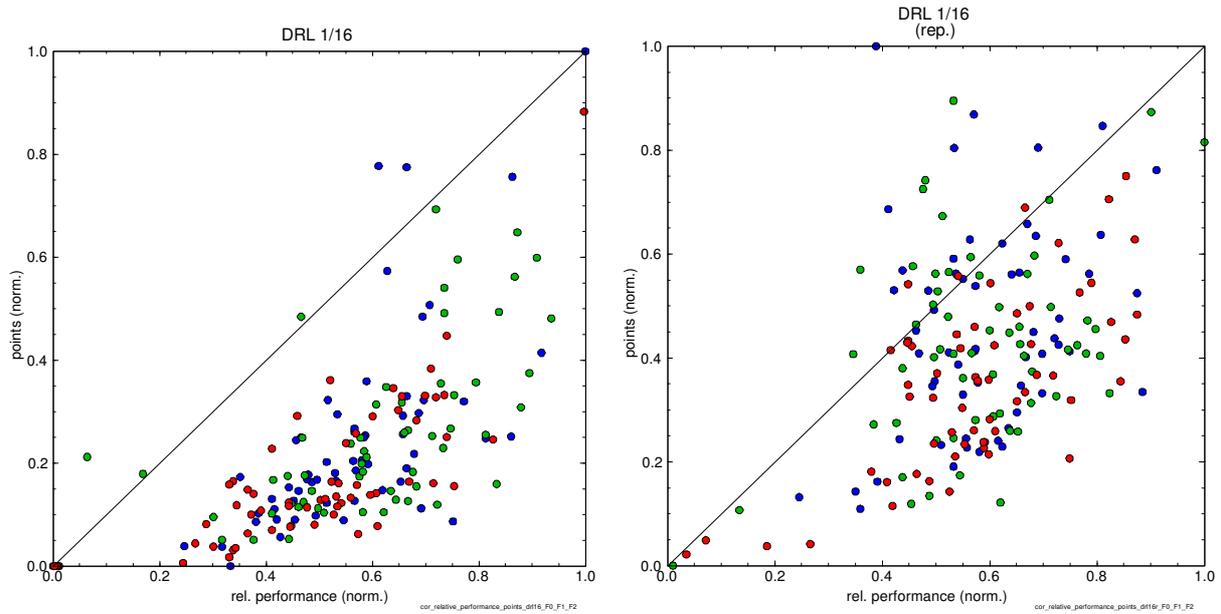
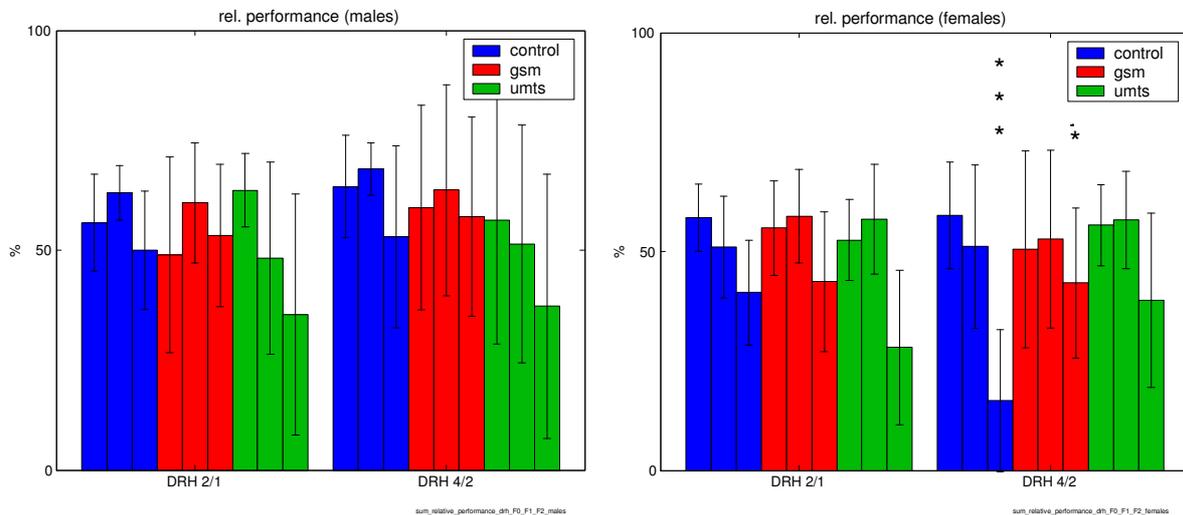


Abb. 21
Korrelation "rel. performance" vs. "points"

Die normierten Werte für "rel. performance" und "points" wurden miteinander korreliert und für die beiden DRL-Testschritte dargestellt. Männliche und weibliche Ratten der F0-, F1- und F2-Generation wurden zusammengefasst. Blaue Kreise repräsentierten die Kontroll-, rote Kreise die GSM-, grüne Kreise die UMTS-Tiere.

Die Durchmischung aller Werte liess keine EMF-induzierten Änderungen erkennen. Auffällig war die Verschiebung der Punktwolke zugunsten der "rel. performance" insbesondere während der ersten DRL-Sitzung, die das "Lernvermögen" der Ratten prüfte.

Zusammenfassung der Werte für "rel. performance" und "points" der F0-, F1-, F2-Ratten in den 2 DRH- und 2 DRL-Testverfahren als Säulen-Diagramme



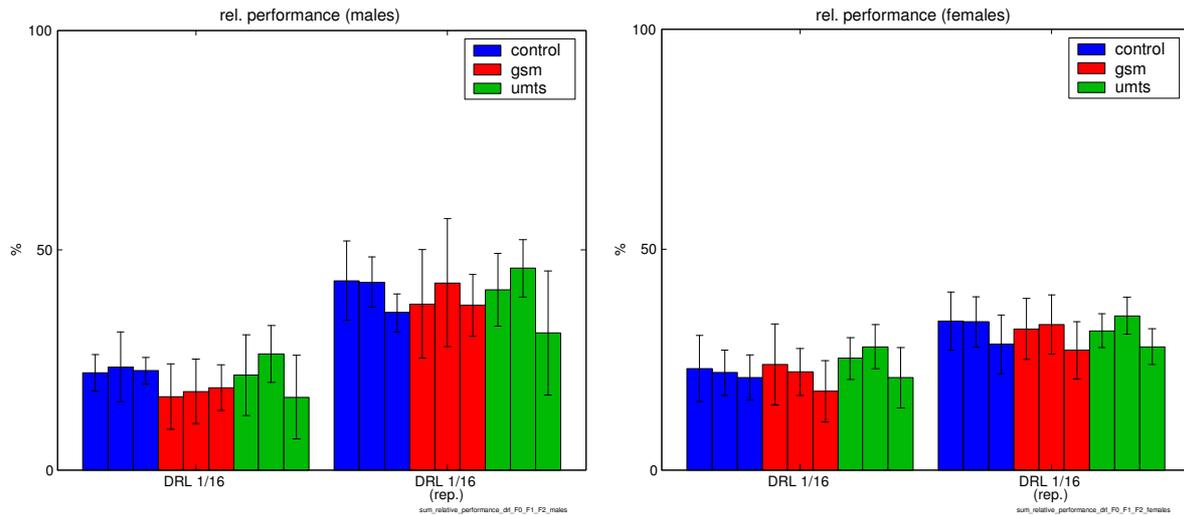


Abb. 22

Zusammenfassung der "rel. performance" der F0-, F1-, F2-Ratten in den 2 DRH- und 2 DRL-Testverfahren

Die Test-spezifische operante Verhaltensleistung ("rel. performance") wurde für männliche und weibliche Ratten getrennt dargestellt. Die farbig markierten 3-teiligen Säulen repräsentierten die Mittelwerte und Standard-Abweichungen (vertikale Klammern) für die drei Generationen (von links nach rechts F0, F1, F2) der Kontrollen (blau), der GSM- (rot) und der UMTS-Tiere (grün).

Bei den Männchen und bei den Weibchen liessen sich signifikante Unterschiede der "rel. performance" weder zwischen den beiden exponierten Tiergruppen und den Kontrollen noch zwischen den drei Generationen feststellen. Auffällig waren die deutlichen Einbussen der DRH 2/1-Verhaltensleistung bei den UMTS-Weibchen der F2-Generation, die allerdings einherging mit einem überproportionalen Anstieg der inter-individuellen Variabilität.

Zusätzliche Sternchen über den Säulen (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) weisen auf statistisch gesicherte Unterschiede zwischen verschiedenen Gruppen. Einzelheiten können der Tab. 1 auf Seite 105 entnommen werden.

Auf die Zusammenfassung der übrigen Parameter, i.e. activity, reinforcements, als Säulengrafik wurde verzichtet.

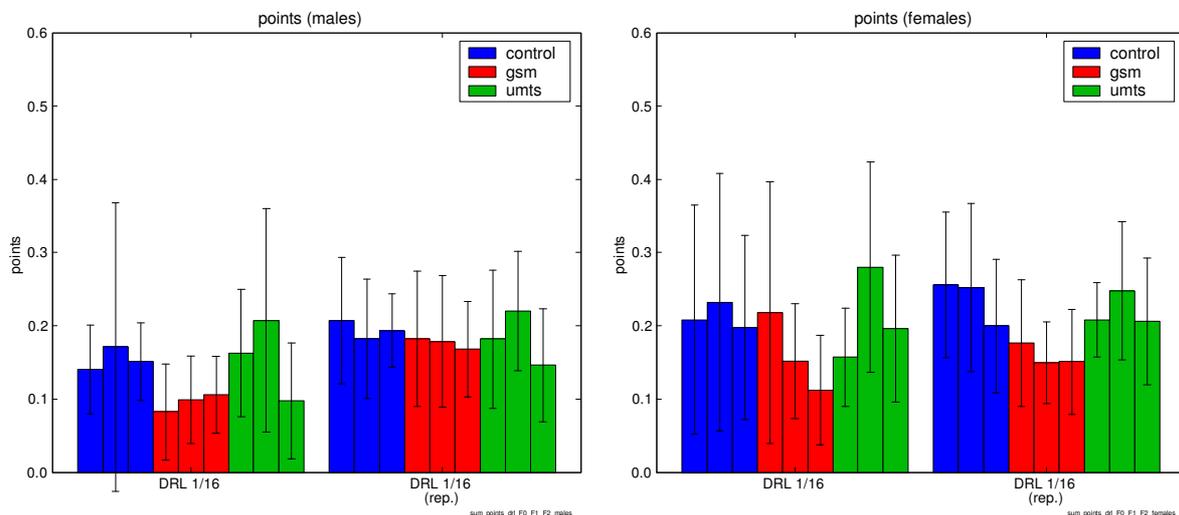


Abb. 23

Zusammenfassung der "points" der F0-, F1-, F2-Ratten in den 2 DRL-Testverfahren

Die Dynamik des Erlernens der DRL-Testaufgabe wurde mit Hilfe der "points" während der ersten DRL-Tests (DRL 1/16, jeweils links) dargestellt. Die Prüfung der Gedächtnisleistung wurde ebenfalls mit Hilfe der "points" während der Wiederholung der DRL-Tests (DRL 1/16 rep.) nach 6 Tagen vorgenommen. Die jeweiligen Resultate wurden für männliche und weibliche Ratten getrennt dargestellt. Die farbig markierten 3-teiligen Säulen repräsentierten die Mittelwerte und Standard-Abweichungen (vertikale Klammern) für die drei Generationen (von links nach rechts F0, F1, F2) der Kontrollen (blau), der GSM- (rot) und der UMTS-Tiere (grün).

Die Analyse der Dynamik des Erlernens der DRL-Testaufgabe zeigte Unterschiede auf, die im Vergleich mit den statischen Ergebnissen der "rel. performance" (siehe Abb. 22) insbesondere bei den männlichen und weiblichen UMTS-Tieren der F2-Generation deutlich wurden. Zwischen den verschiedenen Säulen-Diagrammen ergaben sich

jedoch übereinstimmende Trends. Diese und die grossen Inter-individuellen Unterschiede innerhalb der einzelnen Generationen (vertikale Klammern) liessen daher keinen eindeutigen EMF-Einfluss erkennen.

Wiederholungsuntersuchungen bei den F0-Ratten

Nur die Tiere der F0-Generation wurden noch einmal mit den selben Verhaltenstests geprüft. Sie waren anlässlich der Wiederholung der Prüfung sowohl deutlich älter als auch länger exponiert.

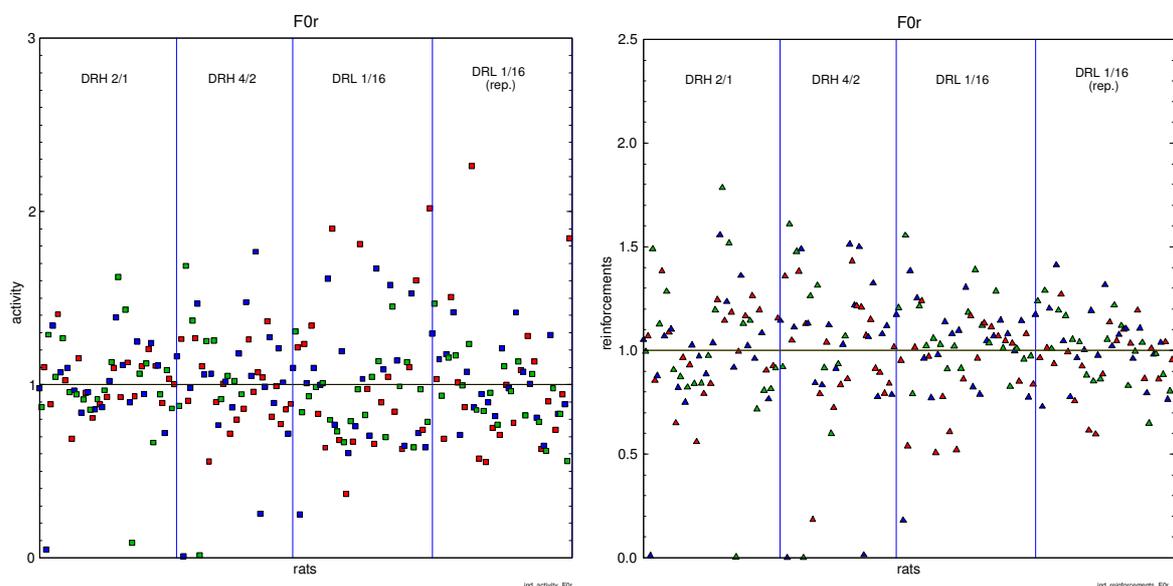
Anmerkungen

Die graphischen Darstellungen endeten mit Wiederholungsuntersuchungen, die nur mit den Ratten der F0-Generation (im Alter von ca. 10 Monaten) durchgeführt worden waren. Vier Tiere der beiden Gruppen Gr1 und Gr 2 dieser Generation waren allerdings in der Zwischenzeit aus unterschiedlichen Gründen verstorben. Die Wiederholungstests wurden daher mit Testgruppen der F0-Generation durchgeführt, in denen die vier ausgefallenen Tiere durch andere Tiere (RF-IDs: # 285863, 269852, 283333, 280604) der beiden Gruppen der F0-Generation ersetzt wurden. Diese Tiere waren unter identischen Expositionsbedingungen gehalten, aber nicht für die ersten Verhaltenstests eingesetzt worden. Bei der Bewertung der Wiederholungsuntersuchungen der Ratten aus der F0-Generation musste berücksichtigt werden, dass diese Tiere zum Zeitpunkt der Wiederholung der Tests einerseits deutlich älter waren und andererseits wesentlich länger unter dem Einfluss des jeweiligen EMFs standen. Ein Einfluss der "neuen" Tiere auf die Ergebnisse der Wiederholungstests mit den Tieren der F0-Generation liess sich nicht erkennen.

Für alle Abbildungen galt erneut: Blaue Marken kennzeichneten die Kontrollen, rote Marken die GSM- und grüne Marken die UMTS-Tiere.

Erneut wurden zunächst Normierungen für die Werte in den verschiedenen Testverfahren und schliesslich Korrelationen zwischen den Parametern der operanten Verhaltensleistung ("activity" = Hebelrücke; "reinforcements" = Belohnungen; "rel. performance" = operante Testspezifische Verhaltensleistung) aufgeführt. Die Position jedes einzelnen Versuchstiers in den Normierungen wurde zufällig bestimmt und dann für alle weiteren Auswertungen beibehalten. Als Parameter zur Erfassung der Dynamik des "Lernvorgangs" einerseits bzw. der "Gedächtnisleistung" andererseits bei den entscheidenden DRL-Tests wurden zusätzlich jeweils die "points" berechnet und graphisch dargestellt.

Normierungen



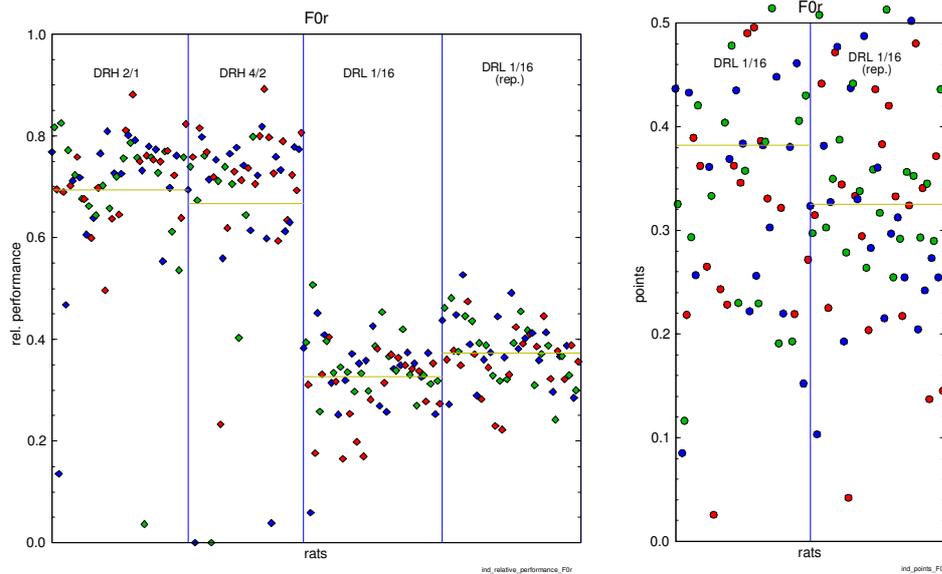


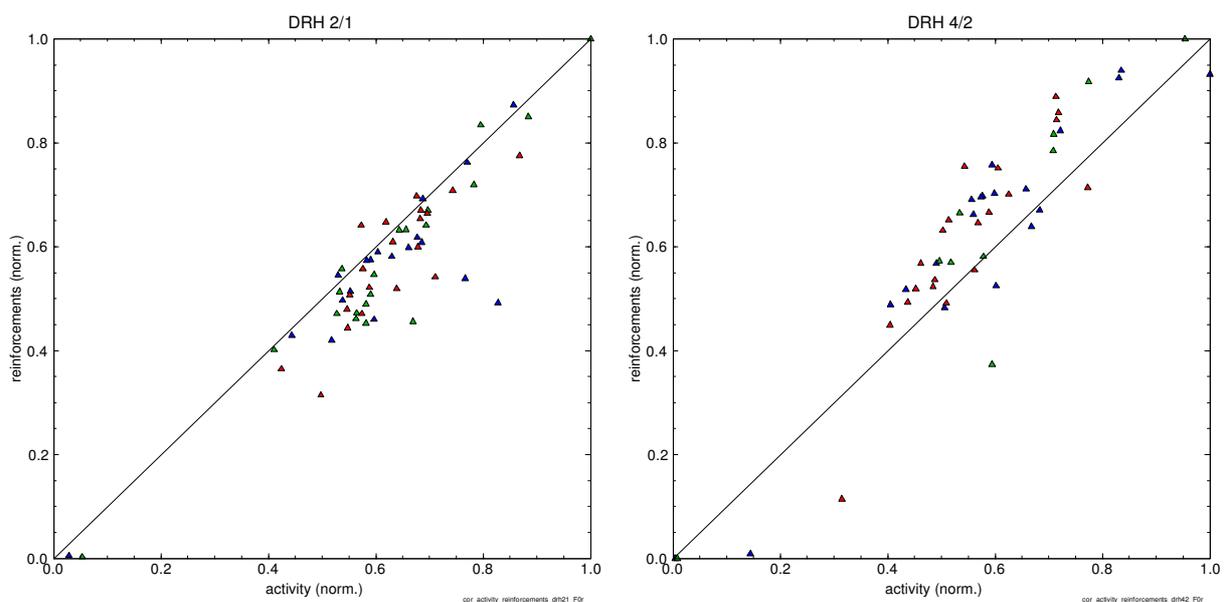
Abb. 24
"activity", "reinforcements", "rel. performance" und "points" (F0)

Die Werte für Aktivität ("activity", Quadrate), Belohnungen ("reinforcements", Dreiecke), Test-spezifische Verhaltensleistung ("rel. performance", Rauten) und Lerndynamik ("points", Kreise) wurden bei der Wiederholungsuntersuchung der männlichen und weiblichen F0-Ratten normiert und zusammengefasst. Die Werte der Kontrolltiere sind blau, die der GSM-Tiere rot und die der UMTS-Tiere grün. Die jeweiligen Werte werden für die vier aufeinander folgenden Testverfahren DRH 2/1, DRH 4/2, DRL 1/16 und DRL 1/16 rep. getrennt dargestellt. Die Werte der unterschiedlichen Expositionsgruppen waren unter Berücksichtigung des jeweiligen Mittelwerts für die einzelnen Testschritte von 0 bis 1 und bei den "points" von 0.0 bis 0.5 normiert worden.

Zur Erinnerung: In der ersten DRL-Sitzung wurde nach dem "Lernvermögen" und in der zweiten DRL-Sitzung nach der "Gedächtnisleistung" gefragt. Zur Übersicht wurden die Mittelwerte für jeden einzelnen Testschritt dargestellt (blasse Linien in "rel. performance" und "points").

Korrelationen

Die Ergebnisse der Korrelation der einzelnen normierten Parameter der operanten Verhaltenstests bei diesen Wiederholungsuntersuchungen wurden in den nachfolg. Abb. dargestellt.



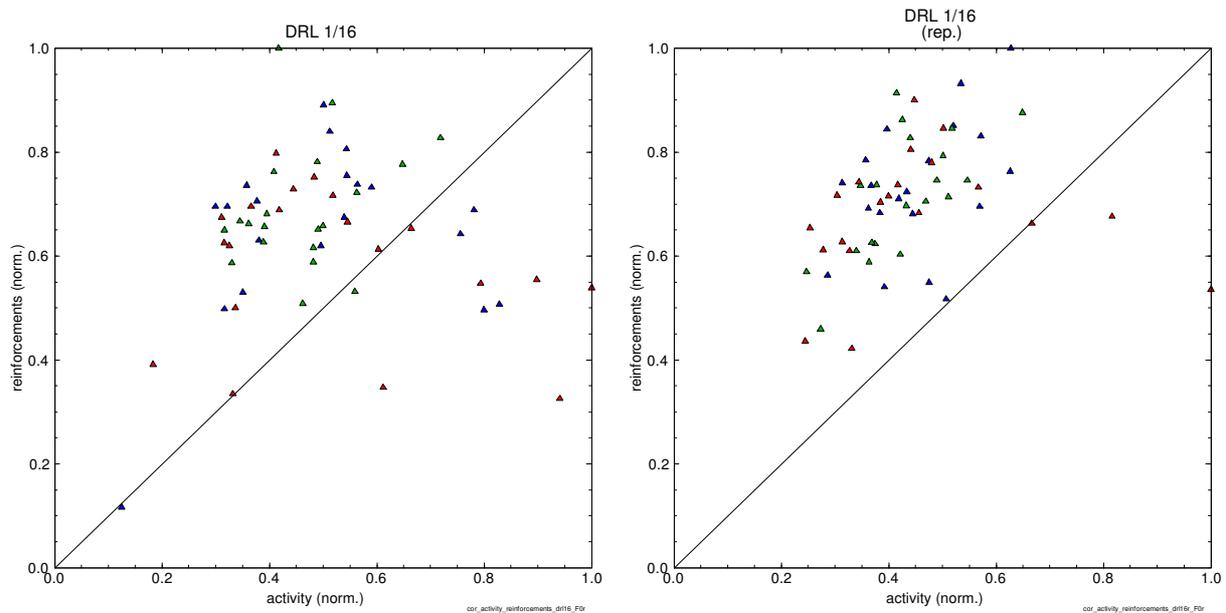
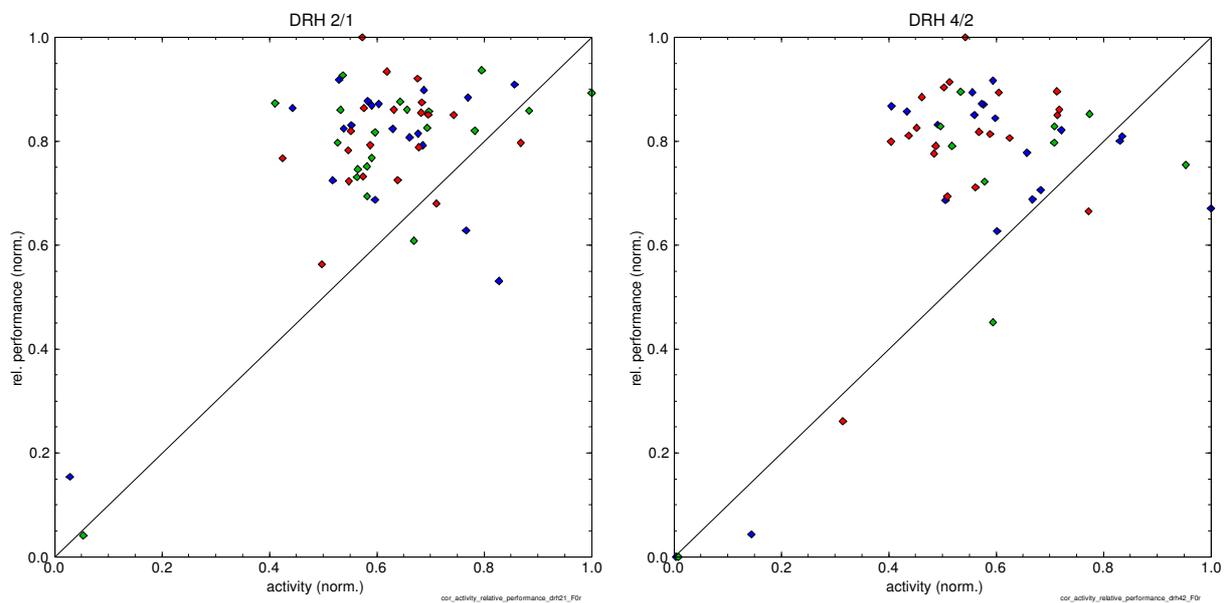
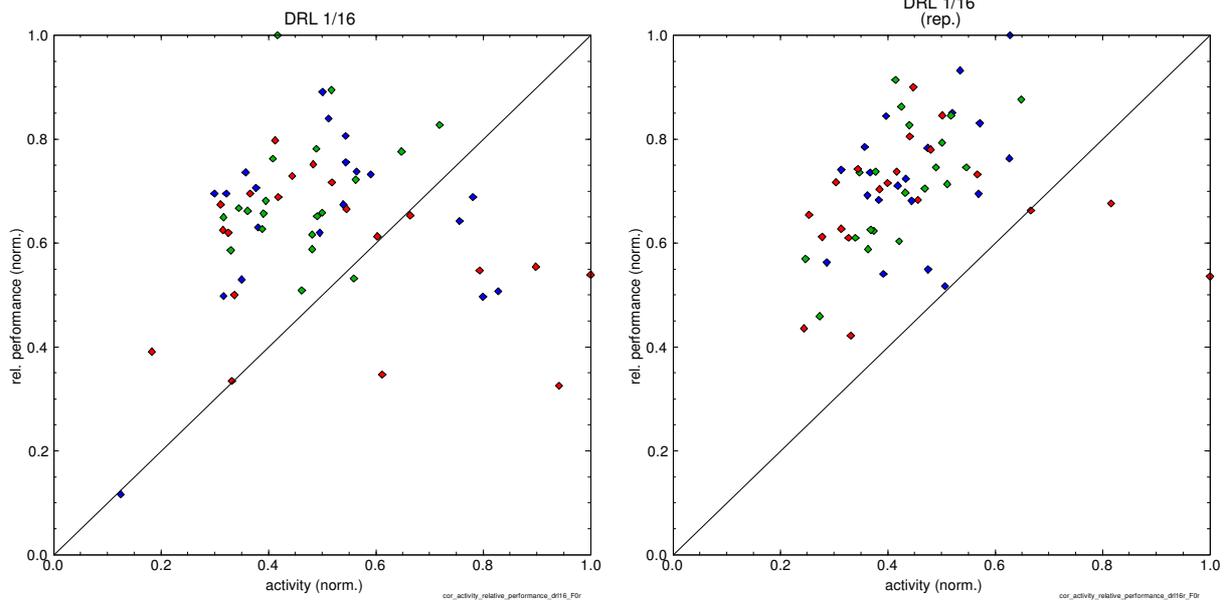


Abb. 25
Korrelation "activity" vs. "reinforcements" (F0)

Die normierten Werte für "activity" (Hebeldrücke) und "reinforcements" (Belohnungen) wurden miteinander korreliert und für die vier aufeinander folgenden Testverfahren DRH 2/1, DRH 4/2, DRL 1/16 und DRL 1/16 rep. dargestellt. Für diesen Wiederholungstest wurden erneut die männlichen und weiblichen Ratten der F0-Generation zusammengefasst. Blaue Dreiecke repräsentierten die Kontroll-, rote Dreiecke die GSM-, grüne Dreiecke die UMTS-Tiere.

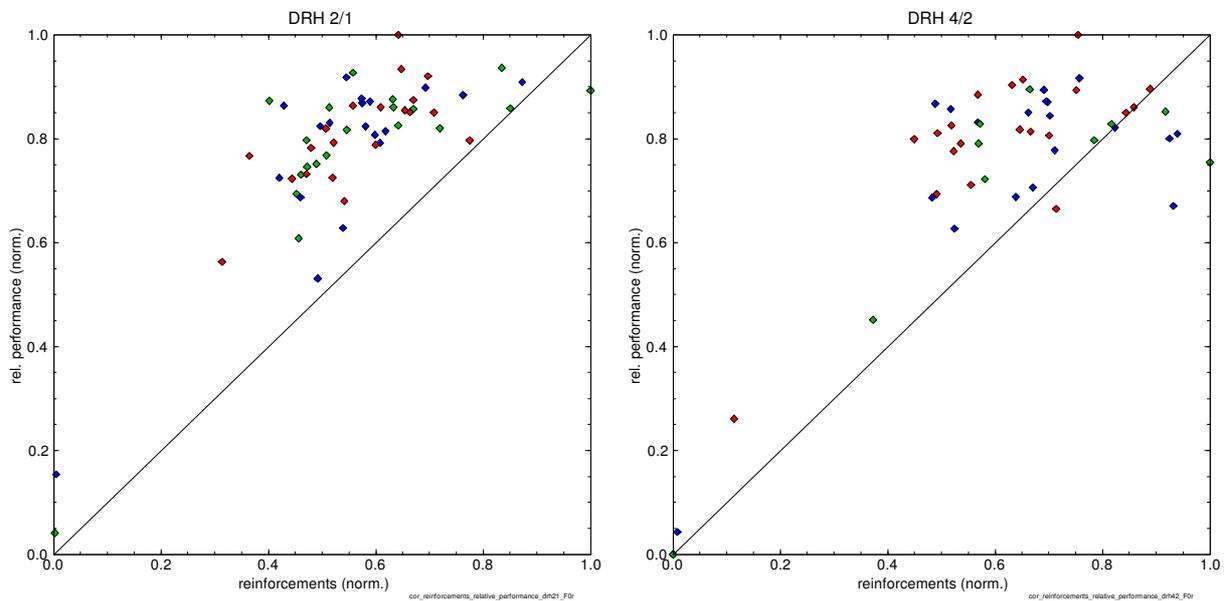
Die Durchmischung der Werte für alle experimentellen Gruppen liess gegenüber den Kontrolltieren keine EMF-induzierten Änderungen erkennen. Auffällig war die Abweichung des Schwerpunkts der Punktwolke nach einer Seite bei der Wiederholung des DRL-Testverfahrens (DRL rep.), das die "Gedächtnisleistung" der Ratten prüfte.



**Abb. 26****Korrelation "activity" vs. "rel. performance" (F0)**

Die normierten Werte für die "activity" (Hebeldrücke) und "rel. performance" (Test-spezifische Verhaltensleistung) wurden miteinander korreliert und für die vier aufeinander folgenden Testverfahren DRH 2/1, DRH 4/2, DRL 1/16 und DRL 1/16 rep. dargestellt. Männliche und weibliche Ratten der F0-Generation wurden zusammengefasst. Blaue Rauten repräsentierten die Kontroll-, rote Rauten die GSM-, grüne Rauten die UMTS-Tiere.

Die Durchmischung der Werte bei allen Testschritten liess gegenüber den Kontrolltieren keine EMF-induzierten Änderungen erkennen. Auffällig war die Abweichung des Schwerpunkts der Punktwolke in allen 4 Testschritten zugunsten der "rel. performance".



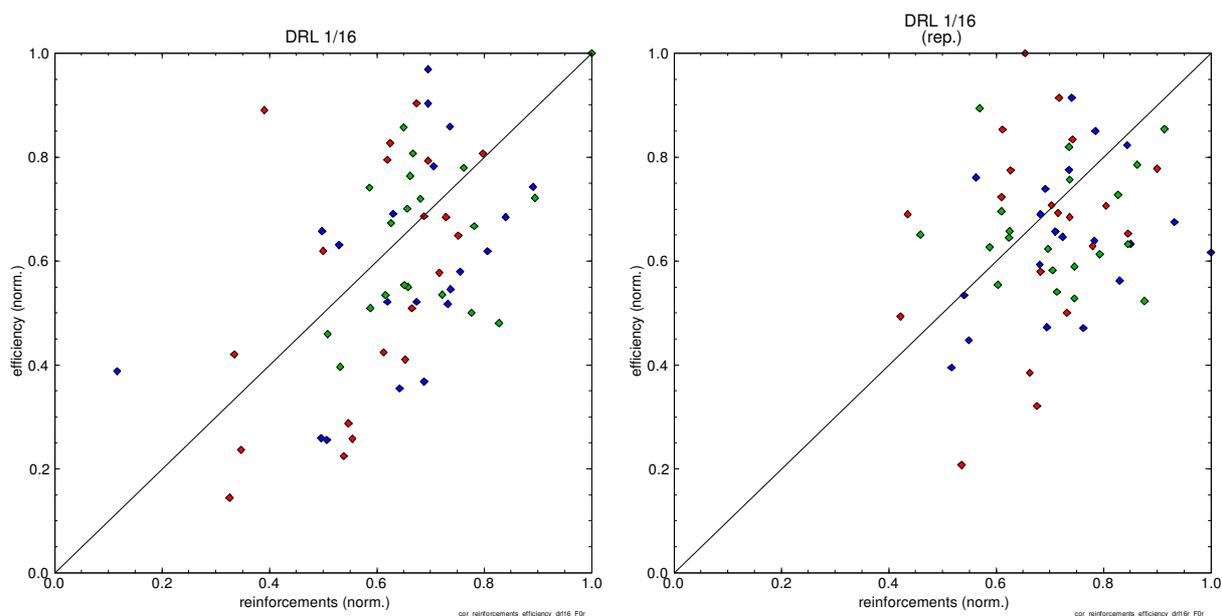


Abb. 27
Korrelation "reinforcements" vs. "rel. performance" (F0)

Die normierten Werte für "reinforcements" (Belohnungen) und "rel. performance" wurden miteinander korreliert und für die vier aufeinander folgenden Testverfahren DRH 2/1, DRH 4/2, DRL 1/16 und DRL 1/16 rep. dargestellt. Männliche und weibliche Ratten der F0-Generation wurden zusammengefasst. Blaue Rauten repräsentierten die Kontroll-, rote Rauten die GSM-, grüne Rauten die UMTS-Tiere. Wegen des linearen Bezugs zwischen "reinforcements" und "rel. performance" bei den DRL-Tests wurden für eine differenziertere Darstellung der Korrelation in den beiden DRL-Testschritten jeweils sogen. "efficiency"-Werte herangezogen (siehe Seite 27).

Die Durchmischung der Werte bei allen Testschritten liess gegenüber den Kontrolltieren keine EMF-induzierten Änderungen erkennen. Auffällig war die Abweichung des Schwerpunkts der Punktwolke insbesondere im ersten DRH-Test zugunsten der "rel. performance".

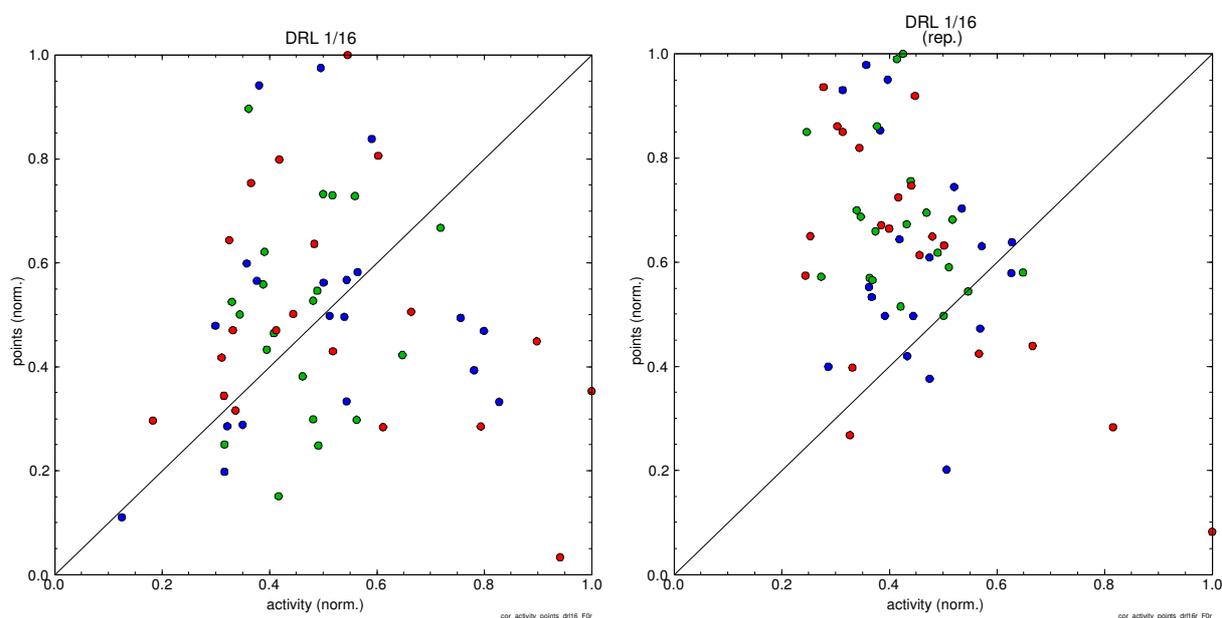


Abb. 28
Korrelation "activity" vs. "points" (F0)

Die normierten Werte für "activity" und "points" wurden miteinander korreliert und für die beiden DRL-Testschritte dargestellt. Männliche und weibliche Ratten der F0-Generation wurden zusammengefasst. Blaue Kreise repräsentierten die Kontroll-, rote Kreise die GSM-, grüne Kreise die UMTS-Tiere.

Die Durchmischung aller Werte liess keine EMF-induzierten Änderungen erkennen. Auffällig war die Verschiebung der Punktwolke zugunsten der "points" während der zweiten DRL-Sitzung, die die "Gedächtnisleistung" der Ratten prüfte.

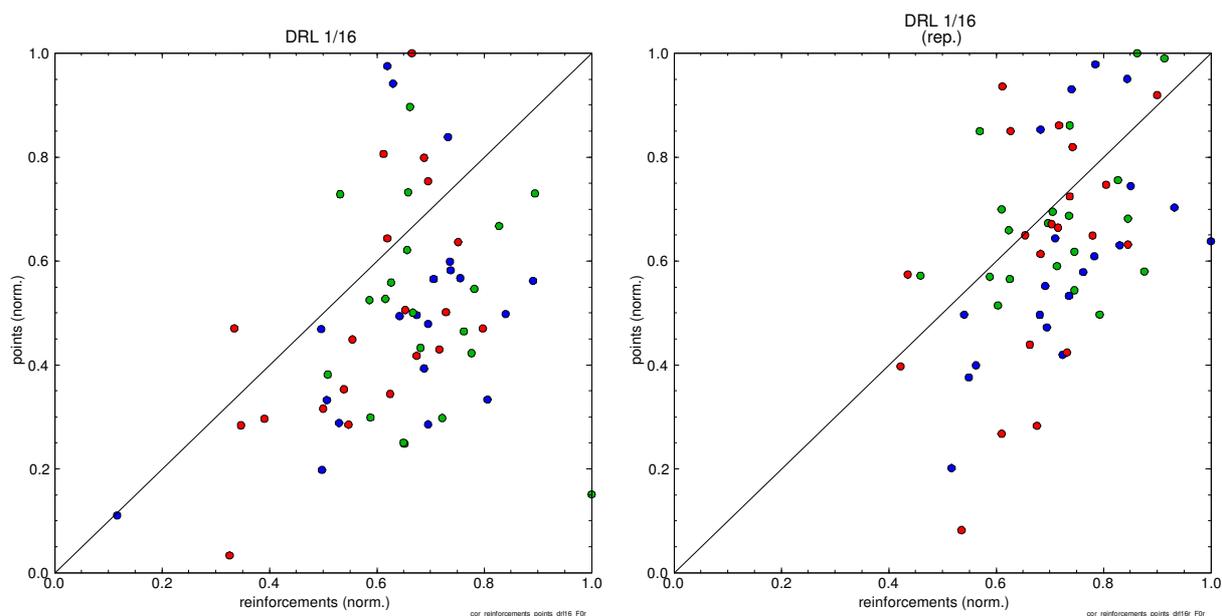


Abb. 29
Korrelation "reinforcements" vs. "points" (F0)

Die normierten Werte für "reinforcements" und "points" wurden miteinander korreliert und für die beiden DRL-Testschritte dargestellt. Männliche und weibliche Ratten der F0-Generation wurden zusammengefasst. Blaue Kreise repräsentierten die Kontroll-, rote Kreise die GSM-, grüne Kreise die UMTS-Tiere.

Die Durchmischung aller Werte liess keine EMF-induzierten Änderungen erkennen.

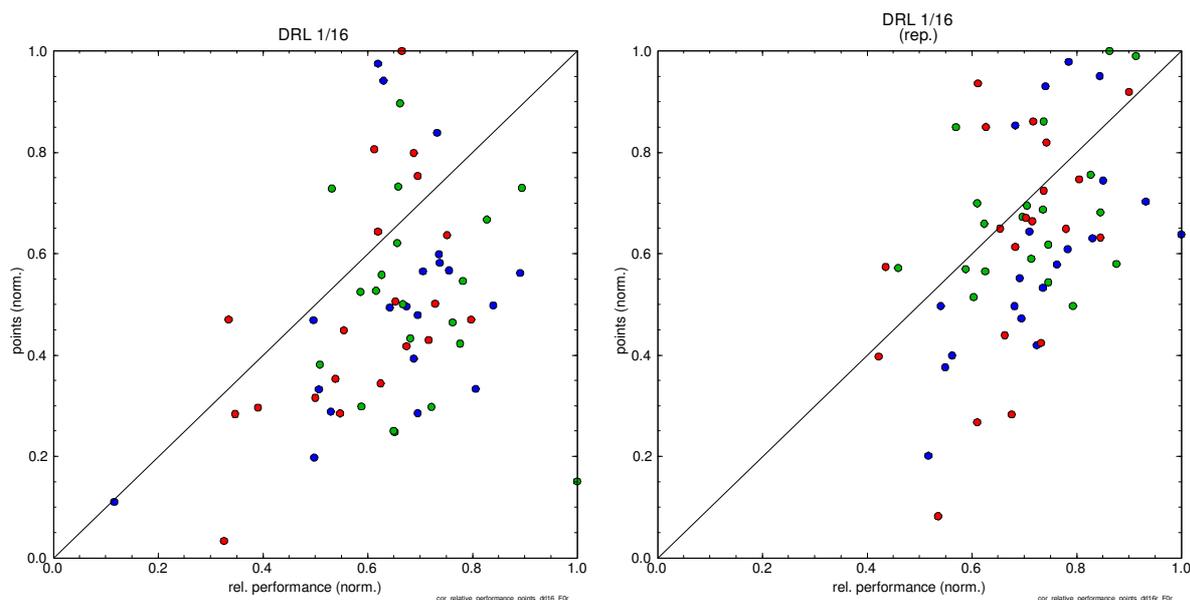


Abb. 30
Korrelation "rel. performance" vs. "points" (F0)

Die normierten Werte für "rel. performance" und "points" wurden miteinander korreliert und für die beiden DRL-Testschritte dargestellt. Männliche und weibliche Ratten der F0-Generation wurden zusammengefasst. Blaue Kreise repräsentierten die Kontroll-, rote Kreise die GSM-, grüne Kreise die UMTS-Tiere.

Die Durchmischung aller Werte liess keine EMF-induzierten Änderungen erkennen.

Säulengrafiken fassten die Ergebnisse der Wiederholungsuntersuchungen bei den F0-Ratten (im Alter von ca. 10 Monaten) unter besonderer Berücksichtigung der "rel. performance" und der "points" zusammen. Der Vergleich dieser Ergebnisse mit denjenigen, die mit diesen Tieren bereits im Alter von ca. 10 Wochen erzielt worden waren, erlaubte Rückschlüsse auf die Altersabhängigkeit des Testergebnisses. Die jeweils linke Säule in den farbkodierten Grafiken entsprach hierbei dem Ergebnis dieser Rattengruppe beim ersten Testdurchgang.

Zusammenfassung der Werte für "rel. performance" und "points" der F0-Ratten in der Wiederholung der 2 DRH- und 2 DRL-Testverfahren

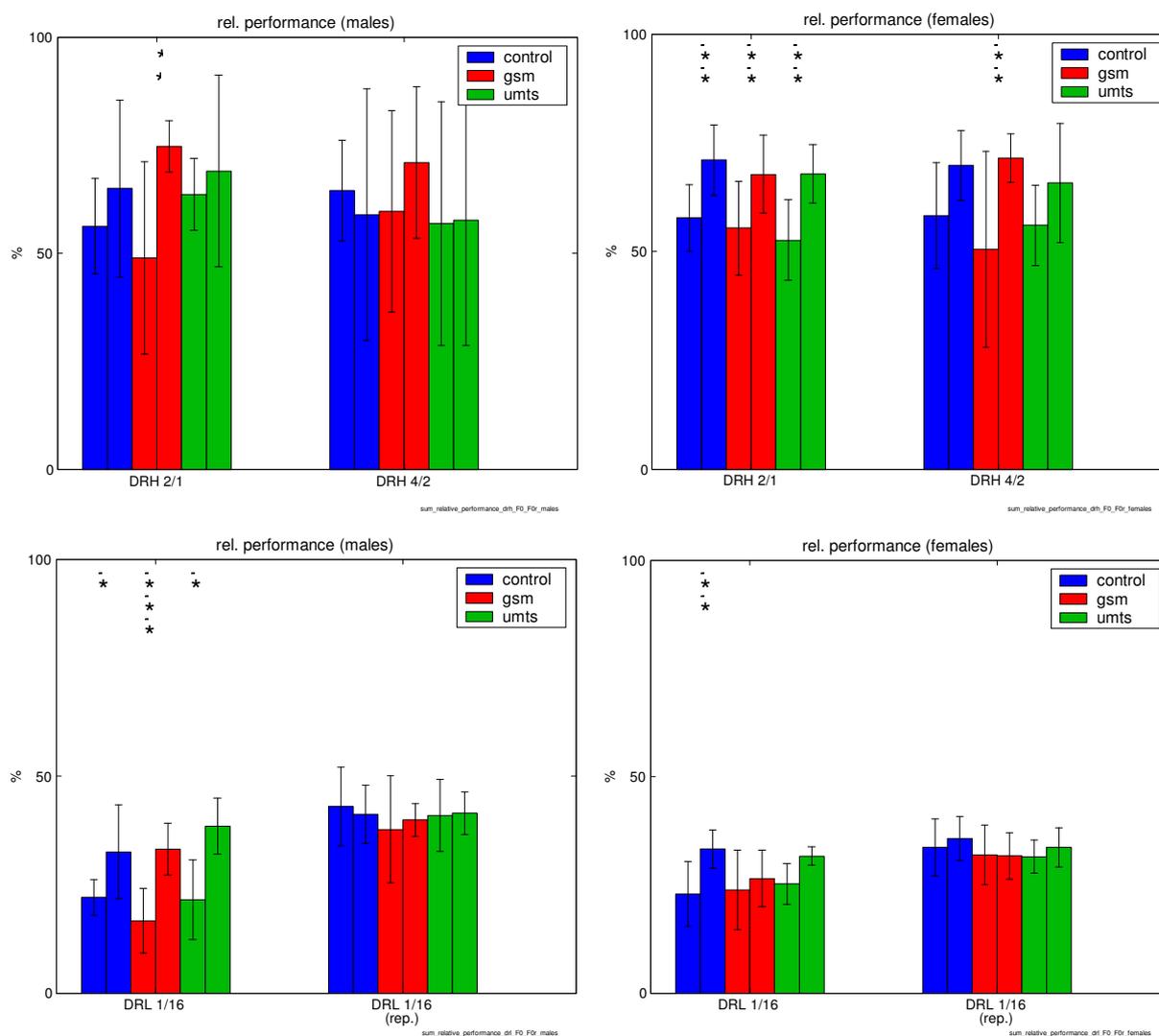


Abb. 31

Zusammenfassung der "rel. performance" der F0-Ratten bei der Wiederholung der zwei DRH- und zwei DRL-Testverfahren

Die Test-spezifische operante Verhaltensleistung ("rel. performance") wurde für männliche und weibliche Ratten getrennt dargestellt. Die farbig markierten zweiteiligen Säulen repräsentierten die Mittelwerte und Standard-Abweichungen (vertikale Klammern) für die Kontrollen (blau), die GSM- (rot) und die UMTS-Tiere (grün) der F0-Generation. Zur Bewertung der Altersabhängigkeit der Verhaltens- bzw. der Gedächtnisleistung wurden die Säulen der ersten Prüfung dieser Tiere den Wiederholungswerten vorangestellt (siehe auch Abb. 22).

Vier Tiere der beiden Gruppen Gr1 und Gr2 dieser Generation aus den Expositionskammern #1 (GSM) und #3 ("sham") waren allerdings in der Zwischenzeit aus unterschiedlichen Gründen verstorben. Die Wiederholungstests wurden daher mit Testgruppen der F0-Generation durchgeführt, in denen die vier ausgefallenen Tiere durch andere Tiere der beiden Gruppen der F0-Generation (RF-IDs: #285863, 269852, 283333, 280604) ersetzt wurden. Diese Tiere waren unter identischen Expositionsbedingungen gehalten, aber nicht für die ersten Verhaltenstests eingesetzt worden.

Bei der Betrachtung der Werte für die vier aufeinander folgenden Testverfahren liessen sich unter Berücksichtigung der Standard-Abweichungen weder bei den Männchen noch bei den Weibchen signifikante Unterschiede der "rel. performance" zwischen exponierten und Kontroll-Tieren finden. Im Vergleich mit der ersten Prüfung kamen sowohl die männlichen als auch die weiblichen Tiere der F0-Generation bei der Prüfungswiederholung zu verbesserten Ergebnissen. Diese Beobachtung war bemerkenswert, weil die Tiere der F0-Generation während der ersten Prüfung teilweise schlechtere Ergebnisse gezeigt hatten als die Tiere der folgenden Generationen F1 und F2 (siehe auch Abb. 22).

Auffällig war bei den DRL-Tests das fast identische Niveau mit relativ geringen Standard-Abweichungen bei allen Gruppen. Im Vergleich zu den Kontrollen konnten aber auch bei den Wiederholungsuntersuchungen keine EMF-induzierten Abweichungen bei den exponierten Tieren der F0-Generation festgestellt werden.

Zusätzliche Sternchen über den Säulen (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) weisen auf statistisch gesicherte Unterschiede zwischen erstem und zweitem Test hin. Einzelheiten können der Tabelle 1 auf Seite 105 entnommen werden.

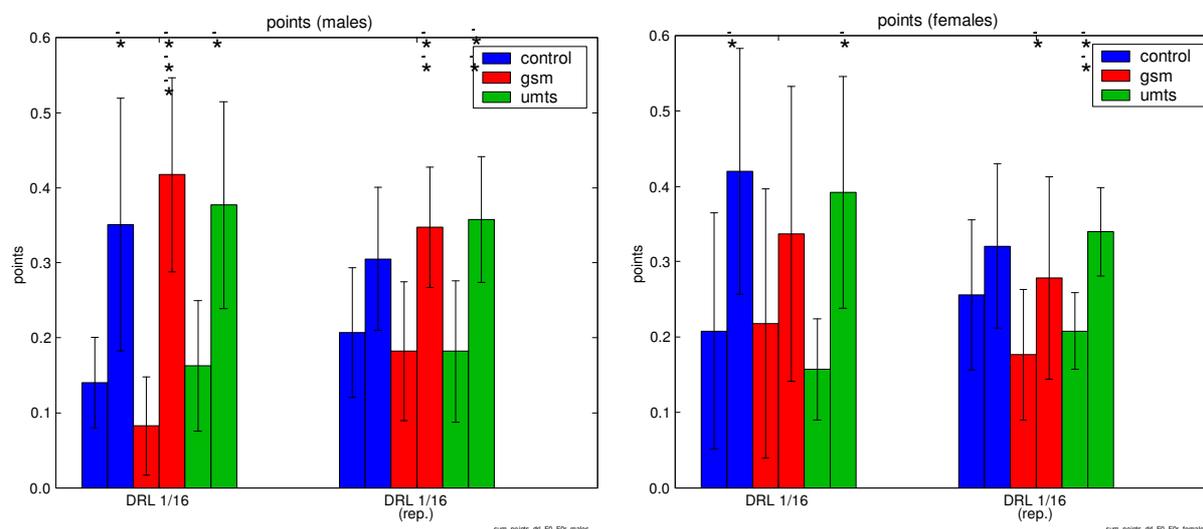


Abb. 32

Zusammenfassung der "points" der F0-Ratten bei der Wiederholung der zwei DRL-Testverfahren

Die Dynamik des Erlernens der DRL-Testaufgabe wurde mit Hilfe der "points" während der ersten DRL-Tests (DRL 1/16, jeweils links) dargestellt. Die Prüfung der Gedächtnisleistung wurde ebenfalls mit Hilfe der "points" während der Wiederholung der DRL-Tests (DRL 1/16 rep.) nach 6 Tagen vorgenommen. Die jeweiligen Resultate wurden für männliche und weibliche Ratten getrennt dargestellt. Die farbig markierten zweiteiligen Säulen repräsentierten die Mittelwerte und Standard-Abweichungen (vertikale Klammern) für die Kontrollen (blau), die GSM- (rot) und die UMTS-Tiere (grün) der F0-Generation. Zur Bewertung der Altersabhängigkeit der Verhaltens- bzw. der Gedächtnisleistung wurden die Säulen der ersten Prüfung dieser Tiere den Wiederholungswerten vorangestellt (siehe auch Abb. 22).

Die Analyse der Dynamik des Erlernens der – und des Erinnerns an die DRL-Testaufgabe zeigte Unterschiede auf, die im Vergleich mit den statischen Ergebnissen der "rel. performance" (siehe Abb. 22) deutlich wurden. Trotz überproportionaler Standard-Abweichungen fiel auf, dass alle Gruppen im höheren Alter offensichtlich deutliche Fortschritte gegenüber der ersten Prüfung (jeweils linke Säule) gemacht hatten. Zwischen den verschiedenen Säulen-Diagrammen ergaben sich jedoch auch bei den Wiederholungsuntersuchungen übereinstimmende Trends. Diese und die grossen Standard-Abweichungen innerhalb der einzelnen Säulen (vertikale Klammern) liessen daher keinen eindeutigen EMF-Einfluss erkennen.

Zusätzliche Sternchen über den Säulen (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$) weisen auf statistisch gesicherte Unterschiede zwischen erstem und zweitem Test hin. Einzelheiten können der Tabelle 1 auf Seite 105 entnommen werden.

Auch bei den Wiederholungsuntersuchungen der F0-Ratten wurde auf die Zusammenfassung der übrigen Parameter, i.e. activity, reinforcements, als Säulengrafik verzichtet.

Tab. 1: Zusammenfassung der signifikanten Unterschiede aus der Statistik für den Abschlussbericht zu den Operanten Verhaltensuntersuchungen (Dr. Stohrer).

Abb / Test	Gruppe	Vergleichsgruppe(n)	p-Wert	Angewandter Test
22/ Rel. performance females DRH 4/2	F 0, control	F 1, control und F 2 control	ns p<0,001	Kruskal-Wallis (non-parametric ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
22/ Rel. Performance females DRH 4/2	F 2, control	F 2, gsm Und F 2, umts	P<0,05 nsP>0,05	Kruskal-Wallis (non-parametric ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test

31/ Rel. performance males DRH 2/1	F 0, control	nsF 0rep., control	ns	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
31/ Rel. performance males DRH 2/1	F 0, gsm	F 0rep., gsm	P<0,01	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
31/ Rel. performance males DRH 2/1	F 0, umts	F 0rep., umts	ns	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
31/ Rel. performance females DRH 2/1	F 0, control	F 0rep., control	P<0,01	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
31/ Rel. performance females DRH 2/1	F 0, gsm	F 0rep., gsm	P<0,01	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
31/ Rel. performance females DRH 2/1	F 0, umts	F 0rep., umts	P<0,01	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
31/ Rel. performance females DRH 4/2	F 0, control	F 0rep., control	ns	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
31/ Rel. performance females DRH 4/2	F 0, gsm	F 0rep., gsm	P<0,01	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
31/ Rel. performance females DRH 4/2	F 0, umts	F 0rep., umts	ns	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
31/ Rel. performance males DRL 1/16	F 0, control	F 0rep., control	P<0,05	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
31/ Rel. performance males DRL 1/16	F 0, gsm	F 0rep., gsm	P<0,001	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
31/ Rel. performance males DRL 1/16	F 0, umts	F 0rep., umts	P<0,05	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
31/ Rel. performance females DRL 1/16	F 0, control	F 0rep., control	P<0,01	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
31/ Rel. performance females	F 0, gsm	F 0rep., gsm	ns	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test

DRL 1/16				
31/ Rel. performance females DRL 1/16	F 0, umts	F 0rep., umts	ns	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
32/ Points males DRL 1/16	F 0, control	F 0rep., control	P<0,05	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
32/ Points males DRL 1/16	F 0, gsm	F 0rep., gsm	P<0,001	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
32/ Points males DRL 1/16	F 0, umts	F 0rep., umts	P<0,05	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
32/ Points males DRL 1/16 repeat.	F 0, control	F 0rep., control	ns	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
32/ Points males DRL 1/16 repeat.	F 0, gsm	F 0rep., gsm	P<0,01	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
32/ Points males DRL 1/16 repeat	F 0, umts	F 0rep., umts	P<0,01	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
32/ Points females DRL 1/16	F 0, control	F 0rep., control	P<0,05	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
32/ Points females DRL 1/16	F 0, gsm	F 0rep., gsm	ns	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
32/ Points females DRL 1/16	F 0, umts	F 0rep., umts	P<0,05	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
32/ Points females DRL 1/16 repeat.	F 0, control	F 0rep., control	ns	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
32/ Points females DRL 1/16 repeat.	F 0, gsm	F 0rep., gsm	P<0,05	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test
32/ Points females DRL 1/16 repeat	F 0, umts	F 0rep., umts	P<0,01	Friedman Test (Non-parametric repeated measures ANOVA) und Dunn's multiple comparisons test

Im Vergleich zu den Kontrolltieren konnten expositionsabhängige Abweichungen der miteinander vermengten Werte ("scores") für die hier angeführten Parameter der operanten Verhaltens- bzw. Gedächtnisleistung anlässlich der 2. Prüfung der F0-Generation nicht festgestellt werden.

DISKUSSION

Als Schwerpunkt des EMVU-Forschungsvorhabens sollten "kognitive" Leistungen von Ratten nach ununterbrochener Langzeit-Einwirkung von elektromagnetischen Feldern (SAR 0.4 W/kg) der Mobilfunk-Kommunikation (GSM- bzw. UMTS- *versus* Schein-Exposition) geprüft werden. Im Rahmen eines "doppelt verblindeten" Experiments wurde die Verhaltensleistung von WISTAR-Ratten aus drei aufeinander folgenden Generationen (F0, F1 und F2) mit Hilfe

verschiedener operanter Verhaltenstests und allmählich ansteigenden Lernanforderungen – im Sinne eines "challenge" – untersucht. Die Untersuchungen wurden bei den nachtaktiven Tieren in standardisierten Testkammern ("Skinner-Boxen") unter Rechnerkontrolle während der Nachtstunden durchgeführt. Die Tiere der drei aufeinander folgenden Generationen entstammten der F-1-Generation, deren jeweilige operante Verhaltensleistungen zuvor mit Hilfe des selben Verfahrens geprüft worden waren, das später auch für ihre Nachkommen eingesetzt werden sollte. Diese Prüfung führte zur Selektion von "zu guten" und "zu schlechten" männlichen und weiblichen Tieren, die von einer Zeugung von Nachkommen (F0-Generation) ausgeschlossen wurden.

Die Untersuchungen profitierten von einem für das Forschungsvorhaben neu entwickelten Verfahren, das während der operanten Verhaltenstests zeitliche Mikrostrukturen ("interresponse intervals", IRIs) mit einer Auflösung von 1 msec registrierte und damit die Dynamik der jeweiligen Verhaltensleistung während einer Testsitzung analysieren konnte. Die Sequenz der aufeinander folgenden verschiedenen Testsitzungen und die Auswahl eines geeigneten operanten Testverfahrens für diese neue Analyse hatten zum Ziel, eventuell durch eine kontinuierliche Einwirkung von EMFs des Mobilfunks auf drei Ratten-Generationen ausgelöste Defizite der Lern- und Gedächtnisleistungen zu entdecken.

Strahlenbiologische Befunde basieren auf Erkenntnissen mit hoch-energetischen, ionisierenden EMFs. Sie können für eine Beurteilung der Wirkung nicht-ionisierender EMFs, z.B. des Mobilfunks, nur mit Vorsicht herangezogen werden. Trotzdem schien es wahrscheinlich, dass – unter Berücksichtigung der Wellenlängen für GSM- bzw. UMTS-EMFs und der Körperlänge einer Ratte – von einer deutlich höheren "biologischen Wirksamkeit" dieses SAR-Wertes bei diesem Tier als beim Menschen ausgegangen werden durfte. Insofern konnte angenommen werden, dass unsere Befunde bei männlichen und weiblichen Tieren von drei Ratten-Generationen nach kontinuierlicher EMF-Einwirkung trotz augenfälliger Unterschiede auch für den Menschen von Bedeutung sind (siehe auch Haarala et al. 2003; Hamblin and Wood 2002; Hamblin et al. 2004; Herman and Hossmann 1997, Hossmann und Herrmann 2003).

Die sorgfältige Analyse mit Korrelationen aller Parameter ließ jedoch in keinem der eingesetzten Prüfverfahren signifikante Unterschiede zwischen den drei experimentellen Gruppen (GSM, UMTS, "sham") oder zwischen den drei Ratten-Generationen (F0, F1, F2) erkennen. Auch die Wiederholungsuntersuchungen der F0-Ratten im Alter von 10 Monaten ergaben keine Hinweise auf EMF-induzierte Störungen der operanten Verhaltensleistung, obwohl diese Tiere zwar inzwischen älter geworden aber auch der EMF-Einwirkung länger ausgesetzt waren. Geschlechtsspezifische Änderungen der Lern- oder Gedächtnisleistung waren nicht zu erkennen.

Selbstverständlich durfte das von uns neu entwickelte Verfahren zur quantitativen Beschreibung der Dynamik von Lern- oder Gedächtnisvorgängen nur als erster Schritt betrachtet werden, wenn es darum geht, für strahlenbiologische und umwelttoxikologische Fragen das Instrument mathematischer Analysen von zentralnervösen Funktionen einzusetzen (siehe auch Annau 1990; Weiss and Laties 1975). Operante Verhaltensuntersuchungen bieten hierfür offensichtlich eine geeignete Basis.

SCHLUSSFOLGERUNG

Aus den hier vorgestellten Untersuchungsergebnissen zur "Kognition" von drei aufeinander folgenden Rattengenerationen lässt sich nicht ableiten, dass eine chronische Exposition durch GSM- oder UMTS-EMFs des Mobilfunks (SAR 0.4 W/kg) zu Änderungen der operanten Verhaltensleistung von Ratten führen, die als Beeinträchtigungen der "Lernfähigkeit" oder der "Gedächtnisleistung" interpretiert werden könnten.

Weitere Erfahrungen mit der für dieses Forschungsvorhaben neu entwickelten Analyse-methode zur Erfassung der Dynamik von operanten Verhaltensleistungen werden auch eine Wichtung der hier vorgestellten Parameter erlauben.

Danksagung

Dr. M. Bornhausen und Dipl.-Ing. (FH) C. Kögler danken Herrn Dr. H. Scheingraber, Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik, Garching, für sein anhaltendes Interesse und die wertvollen Ratschläge für unsere Arbeit.

Der Forschungsverbund ist den folgenden Personen für ihre zuverlässige technische Mitarbeit zu grossem Dank verpflichtet: M. Mayer, M. Kowalewski, A. Schöffman, H. Opitz, F. Meggendorfer, S. Lochbrunner, T. Hoschka, C. Krohmann, B. Schusser, E. Stadler und Mitarbeiter, OWF-Hausmeister Brinkmann und Mitarbeiter

LITERATURVERZEICHNIS

American National Standards Institute (ANSI)/IEEE Std C95.1 Safety levels with respect to human exposure to radiofrequency electromagnetic fields. 3 kHz to 300 GHz. Copyright 1992 by the Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), Inc., New York, NY 10017 1518, 1992

Annu Z: Behavioral toxicology and risk assessment. *Neurotoxicol. Teratol.* 12:547-551, 1990

Bornhausen M, H.R. Müsch, H. Greim: Operant behavior performance changes in rats after prenatal methylmercury exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 56, 305-310, 1980

Bornhausen M: Verhaltensteratologische Untersuchungen bei Ratten nach pränataler Einwirkung eines hochfrequenten, elektromagnetischen Feldes (Forschungsvertrag Nr. 4160/55102). Abschlussbericht an die Dt. Telekom AG, 1998

Bornhausen M, D. Kinkel, X.N. Wu, H. Scheingraber: Operant behavior tests in rats after prenatal exposure to high-frequency electromagnetic fields. In: F. Bersani (ed.): *Electricity and Magnetism in Biology and Medicine*, Plenum Press, London, UK, 1998

Bornhausen M and H. Scheingraber: Prenatal exposure to 900 MHz, cell-phone electromagnetic fields had no effect on operant-behavior performances of adult rats. *Bioelectromagnetics* 21:566-574, 2000

Bornhausen M et al.: Abschlussbericht zum BfS-Forschungsvorhaben "in vivo-Experimente unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation – Langzeituntersuchungen" (BfS-StSch # 4415), 2007

Bornhausen M and H. Scheingraber: Homogeneity of test groups via microstructures of operant-behavior performance acquisition (submitted to *Bioelectromagnetics* in 2007)

Cobb BL, JR Jauchem, PA Mason, MP Dooley, SA Miller, JM Ziriaux, MR Murphy: Neural and behavioral teratological evaluation of rats exposed to ultra-wideband electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* 21:524-537, 2000

Cobb BL, JR Jauchem, ER Adair: Radial arm maze performances of rats following repeated low level microwave radiation exposure. *Bioelectromagnetics* 25:49-57, 2004

D'Andrea JA: Behavioral evaluation of microwave irradiation. *Bioelectromagnetics* 20:64-74, 1999

D'Andrea JA: Behavioral evaluation of microwave irradiation. *Bioelectromagnetics* 20, Suppl. 4:64-74, 1999

D'Andrea JA, ER Adair, JO de Lorge: Behavioral and cognitive effects of microwave exposure. *Bioelectromagnetics* Suppl. 6:S39-S62, 2003

D'Andrea JA, CK Chou, SA Johnston, ER Adair: Microwave effects on the nervous system. *Bioelectromagnetics* Suppl. 6:S107-S147, 2003

Dubreuil D, T. Jay, JM Edeline: Head-only exposure to GSM 900 MHz electromagnetic fields does not alter rat's memory in spatial and non-spatial tasks. *Behavioural Brain Research* 145 (2003) 51-61

Federal Communications Commission (FCC) Guidelines for evaluating the environmental effects of radiofrequency radiation FCC 96-326, Washington, DC, USA, 1996

- Ferster CB and B.F. Skinner: Schedules of Reinforcement. Appleton-Century-Crofts, New York, 1957
- Food and Drug Administration: FDA response to NRPB report on mobile phones and health. Cell phone facts—consumer information on wireless phones [Online]. 2005. Available: <http://www.fda.gov/cellphones/>
- Foster KR, P. Vecchia, and M.H. Repacholi: "Science and the precautionary principle". *Science*, vol. 288, pp. 979–980, 2000.
- Haarala C, L Björnberg, M Ek, M Laine, A Revonsuo, M Koivisto, H Hämäläinen: Effect of 902 MHz electromagnetic field emitted by mobile phones on human cognitive function: A replication study. *Bioelectromagnetics* 24:283-288, 2003
- Hamblin DL, AW Wood: Effects of mobile phone emissions on human brain activity and sleep variables. *Int. J. Radiat. Biol.*, Vol. 78, no. 8, 659-669, 2002
- Hamblin DL, AW Wood, RJ Croft, C Stough: Examining the effects of electromagnetic fields emitted by GSM mobile phones on human event-related potentials and performance during an auditory task. *Clinical Neurophysiology* 115 (2004) 171-178
- Health Council of the Netherlands (Gezondheidsraad): "Mobile telephones; an evaluation of health effects" 2002, The Hague: Health Council of the Netherlands, Publication no. 2002/01E.
- Hermann DM, KA Hossmann: Neurological effects of microwave exposure related to mobile communication. *Journal of Neurological Sciences* 152, 1-14, 1997
- Hossmann KA, DM Hermann: Effects of electromagnetic radiation of mobile phones on the central nervous system. *Bioelectromagnetics* 24:49-62, 2003
- Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE) Std C95.1 *IEEE Standard for Safety Levels With Respect to Human Exposure to Radiofrequency Electromagnetic Fields 3 kHz to 300 GHz* (New York: IEEE) 1999
- International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP): Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz) *Health Phys.* **74** 494–522, 1998a
- International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP): Response to questions and comments on ICNIRP *Health Phys.* **75** 438, 1998b
- International Commission on Radiological Protection (ICRP): *23 Report of the Task Group on Reference Man* (Oxford: Pergamon) 1992
- Jensh RP, Ludlow, J., Vogel, W.H., McHugh, T., Weinberg, I., and Brent, R.L. Studies concerning the effects of non-thermal protracted prenatal 915 MHz microwave radiation on prenatal and postnatal development in the rat. Digest of the XIV International Microwave Symposium, Monaco, June 11-15 (IMPI), 99-101, 1979.
- Jensh RP: Behavioral testing procedures: a review. In: E.M. Johnson, D.M. Kochhar (eds.): Handbook of experimental pharmacology, Vol 65. Teratogenesis and reproductive toxicology. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1983
- Jensh RP: Studies of the teratogenic potential of exposure of rats to 6000 MHz microwave radiation. II. Postnatal psychophysiological evaluations. *Rad. Res.*, 97:282-301, 1984.
- Juutilainen J: Developmental effects of electromagnetic fields. *Bioelectromagnetics* Supplement 7:S107-S115, 2005
- Kemerov S, M Marinkev, D Getova: Effects of low-intensity electromagnetic fields on behavioral activity of rats. *Folia Medica*, XLI, 3, 1999
- Kuster N, Berdinas-Torres V, Nikoloski N, Frauscher M, Kainz W: Methodology of detailed dosimetry and treatment of uncertainty and variations for *in vivo*-studies. *Bioelectromagnetics* 27, 378-391, 2006
- National Radiological Protection Board (NRPB), "Mobile phones and health 2004," in: *Documents NRPB*, vol. 14, no. 2, 2003.
- National Radiological Protection Board (NRPB), "Mobile phones and health 2004", in: *Documents NRPB*, vol. 15, no. 5, 2004.
- Pakhomov AG, Y Akyel, ON Pakhomova, BE Stuck, MR Murphy: Current state and implications of research on biological effects of millimeter waves. A review of the literature. *Bioelectromagnetics* 19:393-413, 1998

- Repacholi MH: Low-level exposure to radiofrequency electromagnetic fields. Health effects and research needs. *Bioelectromagnetics* 19:1-19, 1998
- Salford LG, AE Brun, JL Eberhardt, L Malmgren, BRR Persson: Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 111, no. 7, 881-883, 2003
- Siegel S: Nonparametric Statistics. Mc Graw-Hill Book Company, Inc., New York, 1956
- Sienkiewicz ZJ, RGE Haylock, RD Saunders: Deficits in spatial learning after exposure of mice to a 50 Hz magnetic field. *Bioelectromagnetics* 19:79-84, 1998
- Sienkiewicz ZJ, RGE Haylock, R Bartrum, RD Saunders: 50 Hz magnetic field effects on the performance of a spatial learning task by mice. *Bioelectromagnetics* 19:486-493, 1998
- Sienkiewicz ZJ, RP Blackwell, RGE Haylock, RD Saunders, BL Cobb: Low-level exposure to pulsed 900 MHz microwave radiation does not cause deficits in the performance of a spatial learning task in mice. *Bioelectromagnetics* 21:151-158, 2000
- Sienkiewicz ZJ, R Bartrum, RGE Haylock, RD Saunders: Single, brief exposure to a 50 Hz magnetic field does not affect the performance of an object recognition task in adult mice. *Bioelectromagnetics* 22:19-26, 2001
- Silny J: Effekte und gesundheitsrelevante Wirkungen hochfrequenter elektromagnetischer Felder des Mobilfunks und anderer neuer Kommunikationssysteme. VDE-Bericht, Forschungszentrum für elektromagnetische Umweltverträglichkeit (femu), RWTH Aachen, 2002
- Skinner BF: The Behavior of Organisms. Appleton-Century-Crofts, New York, 1938
- Skinner BF: The experimental analysis of behavior. *Am. Scientist* 45, 4 1957
- Tsurita G, H Nagawa, S Ueno, S Watanabe, M Taki: Biological and morphological effects on the brain after exposure of rats to a 1439 MHz TDMA field. *Bioelectromagnetics* 21:364-371, 2000
- Unofficial translation by MMF (Mobile Manufacturers Forum) of the Russian standard "Hygienic requirements for the siting and operation of land mobile radio communication equipment" *SanPiN 2.1.8/2.24*, pp. 1190-1203, 2003
- Wang B, H Lai: Acute exposure to pulsed 2450 MHz microwaves affects water-maze performance of rats. *Bioelectromagnetics* 21:52-56, 2000
- Weiss B, J.M. Zirix, M. Christopher Newland: Serial properties of behavior and their chemical modification. *Animal Learning & Behavior* 17(1):83-93, 1989
- Weiss B, VG Laties: Behavioral toxicology. Plenum Press, New York and London, 1975
- Yamaguchi H, G Tsurita, S Ueno, S Watanabe, K Wake, M Taki, H Nagawa: 1439 MHz pulsed TDMA fields affect performance of rats in a T-maze task only when body temperature is elevated. *Bioelectromagnetics* 24:223-230, 2003
- Zmirou, D. (Chair), P. Aubineau, A. Bardou, M. Goldberg, R. de Seze, B. Veyret, and G. Dixsaut (2001): LES TÉLÉPHONES MOBILES, LEURS STATIONS DE BASE ET LA SANTÉ. [Complete report in French, available at http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/telephon_mobil/intro.htm; summary in English at: http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/telephon_mobil/resum_uk.htm; conclusions and recommendations in English at http://www.sante.gouv.fr/htm/dossiers/telephon_mobil/conclus_uk.htm]

Vorträge und Veröffentlichungen dieses Teils des Forschungsvorhabens seit 2003

- Bornhausen et al.: Research project on the detection and analysis of alleged cognitive, biochemical, and immunological consequences of chronic exposure of three generations of rats to electromagnetic GSM- and UMTS-fields of mobile communication. 5th COST 281 MCM and Workshop "Mobile Telecommunications and the Brain - Potential health implications from mobile communication systems" and European BioElectromagnetics Association (EBEA), Budapest, Hungary, November 15-16, 2003 (Vortrag)
- Okorn et al.: Study of eventual consequences of continuous exposure to GSM and UMTS electromagnetic fields in three generations of rats. ICNIRP/WHO, International NIR workshop, Sevilla, Spain, May 20-22, 2004 (Poster)
- Bornhausen et al.: Detecting and analyzing eventual cognitive, biochemical, and immunological consequences of chronic exposure to electromagnetic GSM- and UMTS-fields of mobile communication in three generations of rats. Research Project. FGF/COST 281-workshop "Can electromagnetic fields used in

mobile communications provoke sleep disorders and other cognitive changes?", Schloss Hersberg, Immenstaad, Germany, 7.-9. Dez. 2003 (Vortrag)

- M. Bornhausen: Noxious effects or signal detection - ? Examples of interactions between electromagnetic fields and biological systems. 25th European Telemetry Conference (ETC), Garmisch-Partenkirchen, Germany, May 24-27, 2004 (Vortrag)
- Bornhausen et al.: Are there any health consequences of chronic exposure to GSM- or UMTS-fields? Research project on eventual cognitive, immunological, and blood-brain-barrier effects in three generations of rats. Annual Meeting of the Bioelectromagnetics Society, Washington, DC, USA, June 20-24, 2004 (Poster)
- Stohrer et al.: Kolloquium zu biologischen Projekten im Rahmen des Deutschen Mobilfunkforschungsprogramms, BfS, Neuherberg, Germany, 11./12. Okt. 2005 (Vortrag)
- M. Bornhausen and C. Kögler: Microstructure analysis of operant-behavior test performance in rats for the detection of eventual health hazards of cell-phone electromagnetic fields. 26th European Telemetry Conference (ETC), Garmisch-Partenkirchen, Germany, May 2-5, 2006 (Vortrag)
- M. Bornhausen: Assessing deficits of central nervous system functions in the detection of eventual environmental and occupational health hazards. 4th International Academic Conference on Environmental and Occupational Medicine (IACEOM), Kunming, Yunnan, PR China, Oct. 16-19, 2006 (Vortrag)
- M. Bornhausen and C. Kögler: Analysis of serial properties of operant-behavior tests in rats after exposure to cell-phone EMFs. FGF-workshop "Do children represent a special sensitive group for EMF-exposure? State of research", Stuttgart, Germany, Nov. 26-29, 2006 (Vortrag)
- M. Bornhausen, C. Kögler, J. Schneider: Effects of chronic whole-body exposure to GSM or UMTS on learning and memory *in vivo*. BfS-workshop on long term effects. Ismaning, Germany, Oct. 11-12, 2007 (Vortrag)

DURCHLÄSSIGKEIT DER BLUT-HIRN-SCHRANKE UND ZAHL DER CA1-NEURONEN

M. Stohrer, N. Hettenbach, T. Gärtner

Veterinärstrasse 13

80539 München

Tel.: 089 2180 3277

Fax: 089 2180 2554

Email: stohrer@tiph.vetmed.uni-muenchen.de

Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke

Einleitung	116
1.1 Aufbau und Funktionen der Blut-Hirn-Schranke (BHS).....	116
1.2 Bisherige Untersuchungen zum Einfluss elektromagnetischer Felder auf die BHS	117
1.3 Planung der eigenen Untersuchungen zum Einfluss elektro- magnetischer Felder auf die BHS.....	118
1.4 CA1 – Neuronen	120
Material und Methoden	122
2.1 Messung der Integrität der BHS als unidirektionale Influxkonstante (K_{in})	122
2.2 Messung und Extrapolation des Plasma-Verteilungsvolumens von ^3H -Inulin und ^{14}C - Saccharose.....	124
2.3 Ausarbeitung der Challenge – Bedingungen	128
2.4 Praktische Versuchsdurchführung zur Messung der BHS	133
2.5 CA1 – Neuronen.....	133
2.6 Statistische Berechnungen.....	135
Ergebnisse	136
3.1 Integrität der BHS (K_{in}) nach 4-monatiger Bestrahlung (F0b).....	136
3.2 Integrität der BHS (K_{in}) nach 11-monatiger Bestrahlung (F0a)	139
3.3 Integrität der BHS (K_{in}) der dritten Rattengeneration nach 4- monatiger Bestrahlung (F2)	141
3.4 CA1 – Neuronen.....	145

Diskussion	147
4.1 Vergleichende Betrachtung der publizierten Untersuchungen der Einflüsse elektromagnetischer Befeldung auf die BHS	147
4.2 Pathophysiologische Konsequenz einer Öffnung der BHS	149
4.3 CA1 – Neuronen	150
Zusammenfassung, Summary.....	151
Literatur	154

Einleitung

In diesem Projekt ist die Messung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke, die eher akut und reversibel beeinträchtigt werden könnte, mit der Untersuchung des Absterbens der hochempfindlichen CA1-Neuronen im Hippocampus, einer eher chronisch bleibenden und additiven Spätfolge, kombiniert. Darüber hinaus könnten in den Lernversuchen (Skinner-Boxen) auftretende Defizite auch durch eine Abnahme dieser Neuronen zu erklären sein (Geinisman et al., 1995).

1.1 **Aufbau und Funktionen der Blut-Hirn-Schranke (BHS)**

Die Art und die Intensität der Verbindung der Endothelzellen, welche die Blutgefäße auskleiden, sind entscheidend für die Durchlässigkeit der Gefäßwände für viele im Blut gelöste Substanzen. Die Permeabilität vor allem für wasserlösliche Stoffe ist im Gehirn außerordentlich gering. Somit entsteht eine ausgeprägte Barrierefunktion der Blutgefäßwände im Gehirn, die als Blut-Hirn-Schranke (BHS) bezeichnet wird.

Diese Barriere wird durch interzelluläre Adhäsionsstrukturen zwischen den Endothelien, den tight junctions, erzeugt. Sie sind noch nicht endgültig strukturell aufgeklärt, bestehen jedoch vor allem aus Lipiden und Proteinen wie den Transmembranproteinen Occludin und Claudin (Kniesel and Wolburg, 2000).

Die Integrität der Blut-Hirn-Schranke ist eine wesentliche Grundbedingung für die uneingeschränkte Funktion des Gehirns, da sie einerseits eine konstante Zusammensetzung des die Nervenzellen umgebenden Mikromilieus gewährleistet und andererseits dadurch neuroprotektiv wirkt, dass sie die Nervenzellen vor zahlreichen, im Blut vorkommenden toxischen Stoffen abschirmt. Dies ist besonders wichtig in Anbetracht der Tatsache, dass abgestorbene Nervenzellen in der Regel nicht wieder ersetzt werden können. Eine Beschleunigung der Sterbensrate von Nervenzellen infolge einer defekten BHS würde zur vorzeitigen Demenz führen.

1.2 Bisherige Untersuchungen zum Einfluss elektromagnetischer Felder auf die BHS

Um die Auswirkung elektromagnetischer Felder auf die Blut-Hirn-Schranke aufzuklären, wurden in-vitro Studien, die vor allem zur Erklärung potentieller Wirkmechanismen hilfreich sind, und in-vivo Studien, welche die pathophysiologische Relevanz darstellen können, durchgeführt.

Die Messung der Blut-Hirn-Schranke nach elektromagnetischer Befeldung erfolgte bisher über die Bestimmung der Extravasation externer Marker oder interner Serumbestandteile. In zahlreichen Studien wurde nach elektromagnetischer Befeldung eine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke sowohl in-vitro (Schirmacher et al., 2000) als auch in-vivo beschrieben (Frey et al., 1975; Oscar and Hawkins, 1977; Merritt et al., 1978; Sutton and Carrol, 1979; Albert and Kerns, 1981; Lin and Lin, 1982; Goldman et al., 1984; Williams et al., 1984; Neubauer et al., 1990; Moriyama et al., 1991; Persson et al., 1992; Salford et al., 1994, Salford et al., 2003). Leszczynski et al., 2002 beschreiben die Beeinflussung eines Endothelzellsystems (EA.hy926 und EA.hy96v1) und stellen die Hypothese auf, dass derartige Änderungen auch an Zellen der Blut-Hirn-Schranke auftreten könnten.

Andererseits wurde in vielen Studien keine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke gefunden (Preston et al., 1979; Gruenau et al., 1982; Ward et al., 1982; Fritze et al., 1997a, Tsurita et al., 2000, Kuribayashi et al. 2005, Finnie et al. 2001, 2002, 2006)

Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten durch einen strahleninduzierten Temperaturanstieg des Hirngewebes (Merritt et al., 1978; Sutton and Carrol, 1979; Lin and Lin, 1982; Goldman et al., 1984; Williams et al., 1984; Moriyama et al., 1991) oder methodisch bedingte Stressreaktionen der Tiere, wie hohe Blutdruckanstiege, auch unter thermisch kontrollierten Bedingungen (Frey et al., 1975; Oscar and Hawkins, 1977), erklärt werden.

1.3 Planung der eigenen Untersuchungen zum Einfluss elektromagnetischer Felder auf die BHS

Aufgrund der bisher publizierten Untersuchungen ist anzunehmen, dass die Blut-Hirn-Schranke durch kurzzeitige elektromagnetische Befeldung höchstens geringfügig geöffnet wird und sich dann schnell wieder schließt (Fritze et al., 1997; Lin and Lin, 1982; Albert and Kerns, 1981). Die neuropathologische Relevanz einer solchen Öffnung der Blut-Hirn-Schranke ist wahrscheinlich gering. Mit den eigenen Untersuchungen wird geprüft, ob eine lang andauernde, sogar lebenslange Bestrahlung, die eine potentiell länger anhaltende Öffnung der Blut-Hirn-Schranke verursacht, weiterreichende Folgen hat. Darüber hinaus werden durch bereits pränatale und über mehrere Generationen durchgeführte Befeldungen potentiell teratogene Effekte erfasst.

Bei den eingesetzten Methoden sind im Gegensatz zu den publizierten Untersuchungen zwei wesentliche Weiterentwicklungen enthalten, die dazu beitragen, pathophysiologisch relevante und eindeutige Ergebnisse zu erarbeiten, selbst dann, wenn nur kleinste Schädigungen der BHS durch die Befeldung auftreten. Einerseits wird die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke quantitativ als unidirektionale Influxkonstante (K_{in}) gemessen und berechnet und andererseits wird mit Hilfe der eingesetzten „Challenge“-Versuchsbedingungen auch eine sehr geringe Öffnung der Blut-Hirn-Schranke nachweisbar.

1.3.1 Quantitative Messung als unidirektionale Influxkonstante (K_{in})

In bisherigen Untersuchungen wurden meist geringste Spuren von Albumin infolge der Nachweismethode extrem verstärkt dargestellt. Dadurch war nicht mehr zu beurteilen, ob es sich um einen marginalen Effekt, d.h. eine zu vernachlässigende Albumin-Extravasation handelte, die sogar physiologisch sein könnte, oder ob eine eindeutige, quantitativ relevante und statistisch gesicherte Öffnung der Blut-Hirn-Schranke induziert wurde.

Um diese Probleme zu vermeiden, wurde in unseren Untersuchungen als radioaktiver Marker ^{14}C -Saccharose eingesetzt, dessen Molekulargewicht ca. 200-

fach kleiner als das von Albumin ist. Der Übertritt des Markers über die BHS wird durch das Konzentrationsgefälle getrieben und ist somit diffusionslimitiert. Die Diffusionsrate hängt sehr stark vom Molekulargewicht ab. Für dieselbe Stoffmenge Saccharose, die in 10 Minuten über die BHS tritt, müsste man bei Makromolekülen wie Albumin Wochen oder Monate abwarten. Daher ist im Vergleich zu den früheren Albumin-Messungen nach der hier gewählten 10-minütigen Messzeit ein wesentlich höherer Übertritt der gewählten ^{14}C -Saccharose als Marker zu erwarten, der dann auch quantitativ gut messbar ist. Die zusätzliche Messung des zeitlichen Verlaufs der Aktivität des Markers im Blut erlaubt dann die Berechnung der unidirektionalen Influxkonstante (K_{in}). Dieser Parameter ist für die Quantifizierung der Integrität der BHS optimal. Infolge der hohen Messempfindlichkeit werden potentielle Unterschiede zwischen den Kontroll- und Behandlungsgruppen deutlicher und dadurch eher statistisch auswertbar. Die Qualität der Messung der BHS wird dadurch gewährleistet, dass alle relevanten physiologischen Einflüsse (Blutdruck, Temperatur, Blutgase, pH-Wert etc.) erfasst und kontrolliert werden und dadurch Nebenwirkungen der Bestrahlung (siehe oben: Temperaturanstieg, Blutdruckanstieg) vermieden werden.

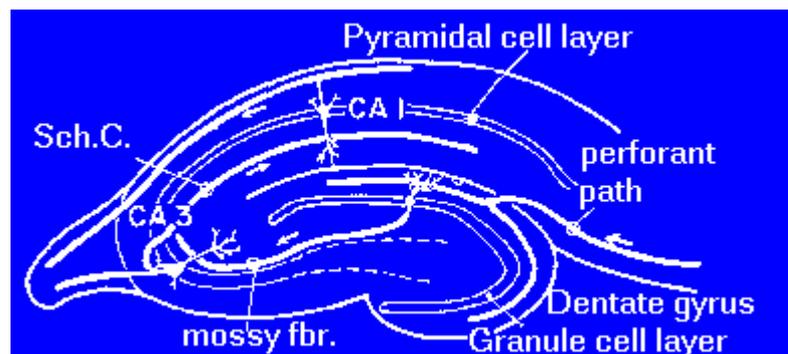
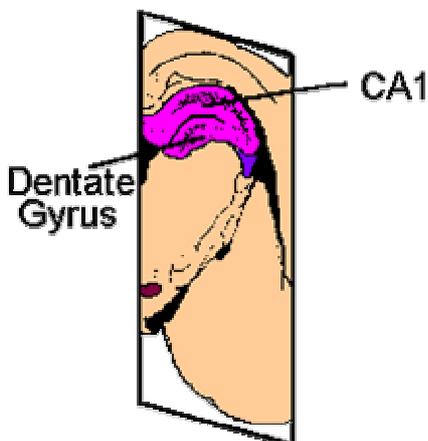
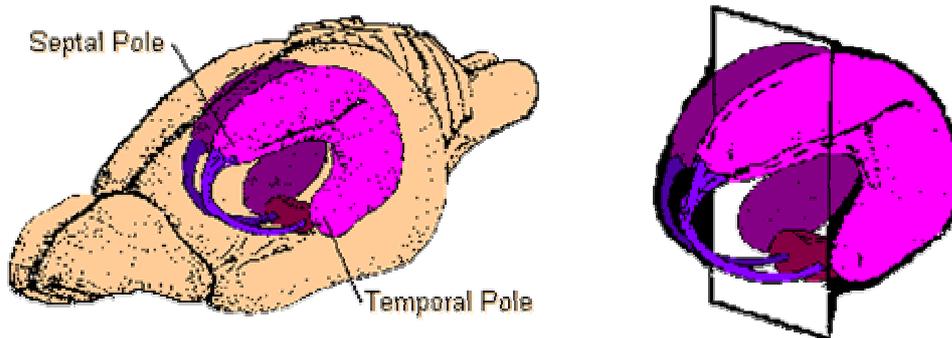
1.3.2 Erhöhung der Messempfindlichkeit unter Challenge – Bedingungen

Für dieses Projekt wurden Challenge-Versuchsbedingungen ausgearbeitet und eingesetzt, die eine Schwächung der Blut-Hirn-Schranke verursachen. Unter diesen Bedingungen führen schon geringe weitere Einflüsse (z.B. der elektromagnetischen Strahlung) zu einer eindeutigen Öffnung der Blut-Hirn-Schranke. Liegt andererseits kein Einfluss der zu untersuchenden Strahlung vor, bleibt die Blut-Hirn-Schranke unverändert intakt. Dadurch ist es möglich, auch geringste Auswirkungen der Strahlung auf die BHS zu erfassen. Können hingegen keine Veränderungen der unidirektionalen Influxkonstante (K_{in}) im Gehirn gemessen werden, ist ein Einfluss der Strahlung auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke sehr unwahrscheinlich.

1.4 CA1 – Neuronen

Der Hippocampus gehört zum medialen Teil des Großhirns und ist eine bilaterale Struktur. Diese ähnelt zwei „Cs“, welche im oberen Bereich aneinander lehnen, während sie unten auseinander divergieren. Der obere Anteil mit dem septalen Pol als Spitze wird als dorsaler Hippocampus bezeichnet. Ventral endet der Hippocampus im temporalen Pol.

Im coronaren Schnittbild wird die innere Struktur des Hippocampus sichtbar. Die Nervenzellschichten ähneln zwei ineinandergreifenden Bögen, dem Denta Gyrus und dem Ammonshorn, das auch als eigentlicher Hippocampus bezeichnet wird und als Grundbestandteil die Pyramidenzellschicht enthält, die sich aus den CA1 bis CA3-Neuronen zusammensetzt (Amaral und Witter, 1989).



Der Hippocampus ist evolutionär eine der ältesten Gehirnstrukturen und eine wichtige Schaltstation des limbischen Systems. Er ist vor allem für das Langzeitgedächtnis unentbehrlich: Lernen (Gedächtnisbildung), Erinnern und räumliche Orientierung (Gedächtnis abrufen). Im Hippocampus werden die Informationen aus dem Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis überführt, die dann in der Großhirnrinde gespeichert werden. Wird der Hippocampus verletzt oder zerstört, kann keine neue Information mehr aufgenommen werden, die Patienten leiden an einer anterograden Amnesie.

Informationen gelangen über kortikale Afferenzen in den Denta Gyrus und werden von dort über Moosfasern zu den CA3-Neuronen transportiert, von wo sie über Schaffer-Kollaterale zu den CA1-Neuronen gelangen. Die CA1-Pyramidenzellen projizieren weiter ins Subiculum (Amaral und Witter, 1995).

In Anbetracht dieser Anordnung aus hintereinander geschalteten Neuronen wird deutlich, warum sich ein Schaden in dieser Region so verheerend auf die Gedächtnisleistung auswirkt.

Die CA1-Neuronen im Hippocampus gehören zu den empfindlichsten Zellen des Gehirns. Sie reagieren besonders sensibel auf unterschiedlichste Stressfaktoren: hohe Corticosteroidspiegel (Pavlidis et al., 1996), globale und fokale Ischämie (Kirino, 1982; Wang et al., 2004; Zeng and Xu, 2000), Hypoglykämie (Matthew, 2007), Sauerstoffradikale und andere Noxen und Toxine (zum Beispiel exzessive Stimulierung durch exzitatorische Neurotransmitter wie Glutamat (Jubb and Huxtable, 1993)). Deutliche Veränderungen sind schon nach kurzer Zeit erkennbar. Die Nervenzellen degenerieren und sterben nach wenigen Tagen ab, so dass eine verminderte Neuronenzeldichte und verringerte gesamte CA1-Neuronenzahl gemessen werden kann.

Die Untersuchung der CA1-Neuronen im Hippocampus ist in unserer Langzeitstudie besonders geeignet, einen potentiellen Strahleneffekt nachzuweisen, weil auch eine geringe akute Schädigung der Neuronen über die lange Bestrahlungszeit zu einer

deutlichen Verringerung der verbleibenden Neuronen führen kann. Wenn beispielsweise wöchentlich die Neuronenzahl um 2% abnimmt, dann führt das nach drei Monaten zu einem 24%igen Zellverlust.

Ein einfacher Ansatz die CA1-Neuronen zu messen wären Dichtemessungen der Neuronen in exemplarischen Hirnschnitten. Dabei könnten allerdings zahlreiche methodische Fehler auftreten. So würde etwa eine Zellschwellung zu einer scheinbar höheren Zelldichte führen. Die optimale Methode, die Zahl der CA1-Neuronen sehr genau und unverfälscht zu bestimmen, ist die physikalische Disektormethode (Miki et al., 2004). Diese wurde für dieses Projekt eingesetzt.

Material und Methoden

2.1 Messung der Integrität der BHS als unidirektionale Influxkonstante (K_{in})

Die praktische Messung der unidirektionalen Influxkonstante K_{in} (Begley, 1999) erfolgt mit Hilfe von ^{14}C -Saccharose als Marker. Zusätzlich wird ^3H -Inulin zur Bestimmung des vaskulären Raumes eingesetzt.

$$K_{in} = \frac{C_{br} - C_i}{\int_0^T C_{pl}(t) dt}$$

C_{br} = Aktivität des Markers pro Gewebeprobe [dpm/g]

C_i = Aktivität des Markers im vaskulären Raum pro Gewebeprobe [dpm/g]

C_{pl} = Radioaktivität des Markers im vaskulären Raum [dpm/ μl]

^{14}C -Saccharose wurde aus verschiedenen Gründen als Marker ausgewählt. Stoffwechsel: Das einzige im Organismus vorkommende Saccharose abbauende Enzym ist die in den Darmepithelzellen auftretende Saccharase, die nur die enteral

resorbierte Saccharose spaltet. Die hier im Experiment parenteral injizierte Saccharose erreicht dieses Enzym nicht und wird daher nicht metabolisiert. Transport: Für Saccharose im Blutplasma gibt es weder aktive noch passive Transportmechanismen. Wenn Saccharose vom intravasalen Raum in das Hirngewebe übertritt, kann dies nur über eine Öffnung der BHS erfolgen. Diffusions-Geschwindigkeit: Da die Diffusionsrate sehr stark vom Molekulargewicht abhängt, wurde ein Marker mit relativ kleinem Molekulargewicht gewählt. Für dieselbe Stoffmenge Saccharose, die in 10 Minuten über die BHS tritt, müsste man bei Makromolekülen wie Albumin Wochen oder Monate abwarten. Daher ist auch bei relativ kurzer Messzeit im Versuch schon ein gut nachweisbarer Übertritt von ^{14}C -Saccharose bei geöffneter BHS zu erwarten.

Die K_{in} ($\mu\text{l}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) beschreibt die Durchlässigkeit der BHS, d.h. die während der Messzeit (hier 10 min) vom vaskulären Raum in den interstitiellen Raum übergetretene Flüssigkeitsmenge.

Dazu wird ^{14}C -Saccharose ins Blut injiziert und nach 0,5; 1; 2; 5; 7,5 sowie 10 min werden Blutproben genommen, um die Konzentration des Markers zu bestimmen (C_{pl}). Unmittelbar nach der letzten Blutprobe werden die Tiere in tiefer Narkose getötet, das Gehirn entnommen und in jeder Hemisphäre in definierten Arealen die Aktivität (C_{br}) bestimmt. Ein zweiter Marker ^3H -Inulin wird 0,5 min vor der Tötung injiziert, um aus den Aktivitäten im Blut und der zu untersuchenden Hirnprobe, den vaskulären Raum in den einzelnen Hirnproben zu berechnen. Daraus lässt sich die ^{14}C -Saccharose -Radioaktivität im Gefäßbett in der untersuchten Hirnprobe (C_i) bestimmen. Diese wird von der gemessenen Aktivität der Hirnprobe (C_{br}) abgezogen und das Ergebnis durch das Integral der Plasmakonzentration über die Zeit dividiert.

2.2 Messung und Extrapolation des Plasma-Verteilungsvolumens von ^3H -Inulin und ^{14}C - Saccharose

2.2.1 Extrapolation des Plasma-Verteilungsvolumens von ^3H -Inulin und ^{14}C -Saccharose

Erste Messungen des vaskulären Raumes im Hirngewebe ergaben unrealistisch hohe und je nach eingesetzter Methode stark streuende Plasmavolumina. Nach einer Literaturrecherche und einigen Vorversuchen wurde als optimale Methode, die zu realistischen Messwerten führt, eine Extrapolation des vaskulären Raums zum Zeitpunkt 0 aus zu drei verschiedenen Zeitpunkten (t) gemessenen Verteilungsvolumina (V in μl Blutplasma / g Hirngewebe) erarbeitet. Dazu wurden Messungen mit jeweils vier Tieren nach 1, 5 und 30 Minuten durchgeführt. Die Werte V(t) nach 1, 5 und 30min werden gegen den folgenden Quotienten aufgetragen: über die Zeit integrierte Plasmakonzentration ($\int C_p dt = \int C_p dt$) dividiert durch die Plasmakonzentration zum Zeitpunkt der Tötung ($C_p T$). Der konstante Term der Trendlinienfunktion entspricht dem Verteilungsvolumen zum Zeitpunkt $t=0$. Die Abbildung 1 zeigt die Abhängigkeit von V(T) von $\int C_p dt / C_p T$ exemplarisch im Cortex, die mit ^3H -Inulin sowie mit ^{14}C -Saccharose gemessen wurde. Jeder Punkt repräsentiert ein Versuchstier (n=12). In diesem Fall ergibt V(0) gemessen mit ^3H -Inulin 7,6 $\mu\text{l/g}$ und V(0) gemessen mit ^{14}C -Saccharose 12,4 $\mu\text{l/g}$. Die Extrapolation der übrigen sechs Hirnareale ergab analoge Verläufe und wurde daher nicht graphisch dargestellt.

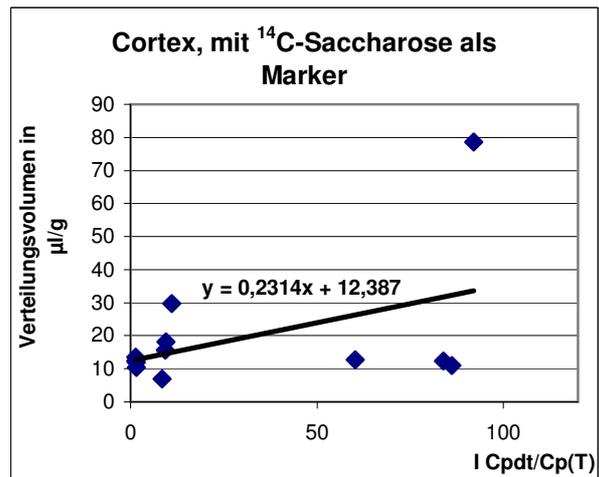
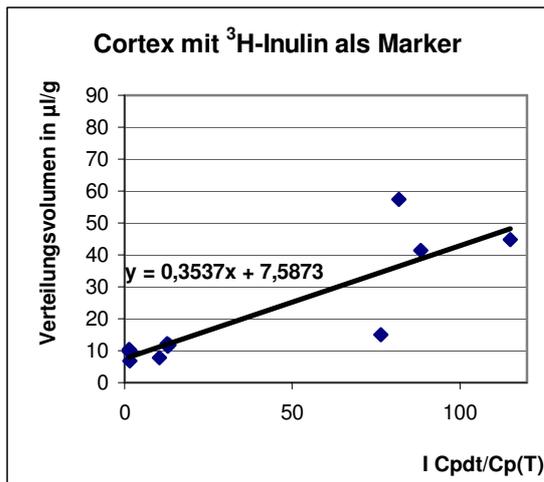


Abbildung 1: Das Plasma-Verteilungsvolumen für ³H-Inulin und ¹⁴C-Saccharose im Cortex als Funktion $V(T) = |Cpdt/CpdT$ dargestellt. Aus der Funktion der Trendlinie lässt sich $V(0)$ bei $x=0$ ablesen. Jeder Punkt im Diagramm repräsentiert ein Versuchstier ($n=12$).

Tabelle 1: Extrapolierte Plasmavolumina in $\mu\text{l/g}$ Hirn. Die Werte wurden wie oben beschrieben mit Hilfe der Trendlinienfunktion für jedes Hirnareal mit jeweils ^3H -Inulin und ^{14}C -Saccharose bestimmt.

Extrapoliertes Plasmavolumen [$\mu\text{l/g}$]		
Hirnregion	^3H-Inulin	^{14}C- Saccharose
Cortex	7,6	12,4
Diencephalon	12,1	16,1
Mesencephalon	7,9	14,7
Pons	12,8	18,5
Medulla	16,8	20,7
Cerebellum	14,2	21,0
Bulbus	13,6	26,9

In Tabelle 1 sind die mit ^3H -Inulin und ^{14}C -Saccharose ermittelten extrapolierten Plasma-Verteilungsvolumina dargestellt. Die ^3H -Inulin-Werte sind deutlich niedriger als die ^{14}C -Saccharose-Werte und auch niedriger als die nach 1min gemessenen Verteilungsräume von ^3H -Inulin (siehe unten Abb. 2). Die Extrapolations-Methode kann jedoch nicht für jedes einzelne Versuchstier eingesetzt werden, da Messungen zu unterschiedlichen Endzeitpunkten notwendig sind. Daher wurde ein weiterer Versuch mit ^3H -Inulin und verkürzter Verteilungszeit durchgeführt.

2.2.2 Plasma-Verteilungsvolumen von ^3H -Inulin nach einer Verkürzung der Verteilungszeit auf 0,5 min

^3H -Inulin wird den Versuchstieren 0,5min vor Dekapitation in die A. carotis interna injiziert und das Plasma-Verteilungsvolumen bestimmt. Abbildung 2 stellt die Plasmavolumina nach einer 0,5 und 1-minütigen Verteilungszeit dar. Das Plasma-Verteilungsvolumen nach 0,5 min ist deutlich niedriger als nach 1 min und entspricht den extrapolierten Werten.

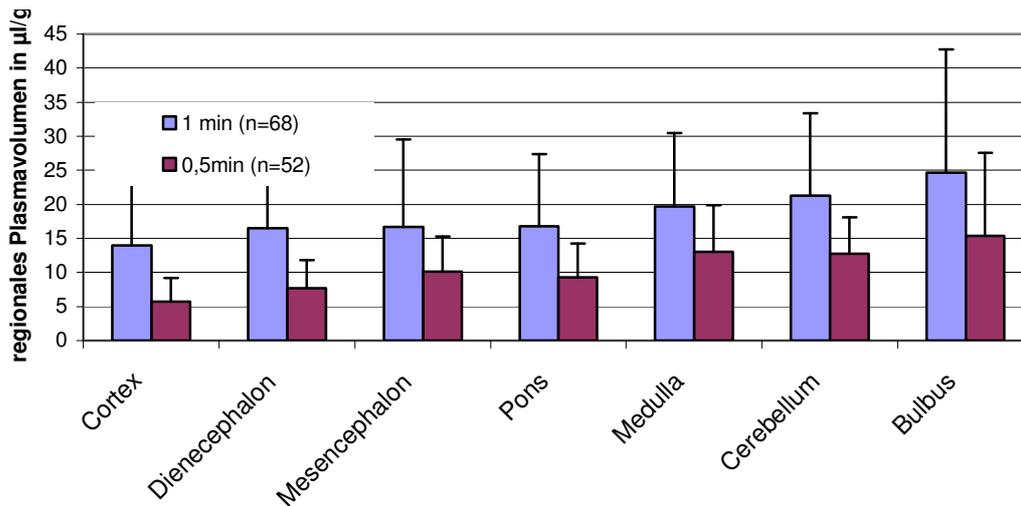


Abbildung 2: Plasma-Verteilungsvolumen von ^3H -Inulin nach 1 min (blau n=68) und 0,5 min (rot n=52) in sieben Hirnarealen (MW \pm STD).

Vergleicht man die in Tabelle 2 aufgeführten extrapolierten ^3H -Inulin-Werte mit den Plasma-Verteilungsvolumina nach 0,5 min so wird deutlich, dass diese sehr nahe liegen. Das Plasmavolumen wurde daher für jedes Versuchstier über das Verteilungsvolumen von ^3H -Inulin nach 0,5 min bestimmt.

Tabelle 2: Vergleich des extrapolierten Plasmavolumens mit dem Verteilungsvolumen nach 0,5 min, gemessen mit ^3H -Inulin. Angabe der Werte als arithmetischer Mittelwert \pm STD, bei den extrapolierten Volumina ist keine Angabe der STD möglich.

Hirnregion	Extrapoliertes Volumen [µl/g]	Verteilungsvolumen nach 0,5 min [µl/g]
Cortex	7,6	5,7 \pm 3,5
Diencephalon	12,1	7,7 \pm 4,2
Mesencephalon	7,9	10,1 \pm 5,1
Pons	12,8	9,3 \pm 4,9
Medulla	16,8	13,1 \pm 6,8
Cerebellum	14,2	12,7 \pm 5,4
Bulbus	13,6	15,4 \pm 12,2

Eigene Erfahrungen und Daten aus der Literatur zeigen, dass die Messung des Plasma-Verteilungsvolumens sehr variable Werte ergeben kann, die stark von den Messbedingungen abhängen. Die realistischsten Werte erhält man nach der oben beschriebenen Extrapolation nach verschiedenen Messzeiten. Dieses Verfahren ist jedoch für einen einzelnen Versuch nicht einsetzbar. Daher wurde die kurze Messung nach 0,5 min mit ^3H -Inulin gewählt, da die Ergebnisse denen nach Extrapolation gleichen. Daraus ergibt sich auch die Wahl des zweiten Markers ^3H -Inulin, die die gleichzeitige Messung mit ^{14}C -Saccharose in derselben Probe im Flüssigszintillationszähler bei den entsprechenden Energiefenstern ermöglicht.

2.3 Ausarbeitung der Challenge – Bedingungen

Die Blut-Hirn-Schranke ist keine absolut dichte Barriere. Hirnareale wie der Plexus choroideus weisen höhere Permeabilitäten auf und ermöglichen den Übertritt von Hormonen aus dem Hirngewebe in das Blut. Unter bestimmten pathophysiologischen Zuständen wie Entzündungen (ausgelöst durch Infektionen, Hirninfarkte oder andere Erkrankungen) oder Phasen extremer Blutdruckerhöhungen wird in den betroffenen Hirnarealen die Blut-Hirn-Schranke geöffnet.

Um die Nachweisempfindlichkeit des Einflusses der Bestrahlung auf die Integrität der BHS zu verbessern, wurde eine Methode ausgearbeitet, die die BHS reproduzierbar latent schwächt. Dies könnte theoretisch über eine Erhöhung des Blutdruckes (über die Auslösung des Cushing-Reflexes oder Infusion vasoaktiver Hormone) oder über die Infusion hyperosmolarer Lösungen erreicht werden.

Als Cushing-Reflex wird eine reflektorische Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdruckes infolge einer Steigerung des intrakranialen Drucks bezeichnet. In unseren Vorversuchen war die individuelle Reaktion der Tiere äußerst variabel. Bei einzelnen Tieren waren nur geringe Blutdruckanstiege zu erkennen, bei anderen waren diese deutlicher ausgeprägt. Das angestrebte Ziel einer starken Blutdrucksteigerung nach geringer Erhöhung des intrakranialen Drucks konnte systematisch nicht erreicht werden. Insgesamt zeichnete sich die Tendenz ab, dass die intrakranialen Drücke und die Blutdrücke etwa um denselben Betrag ansteigen. Demzufolge bleibt der

Perfusionsdruck (intravasaler Druck minus Gewebedruck) konstant. Eine Labilisierung der BHS ist so nicht zu erreichen. Daher wurden diese Vorversuche abgebrochen.

Durch Adrenalininfusionen ist es dann gelungen, den Blutdruck bei den einzelnen Tieren definiert einzustellen. Allerdings musste damit gerechnet werden, dass bei geringen Blutdrucksteigerungen die Hirngefäße autoregulieren und konstringieren, und demzufolge der systemische Blutdruckanstieg auf die Blutgefäße im Gehirn nicht weitergeleitet wird (Baumbach and Heistad, 1983; Heistad et al., 1978). Erst bei sehr hohen Blutdruckerhöhungen würde die autoregulatorische Kapazität überschritten werden, da große Hirngefäße dann dilatieren (Kantos et al., 1978; Kantos et al., 1981). Die Autoregulation würde über einen weiten Blutdruckbereich eine Labilisierung der BHS verhindern. Bei sehr hohen Blutdrücken (über 180mmHg) würde die BHS dann übergangslos aufgerissen.

Daher wurde für diese Untersuchungen eine zusätzliche Messung der Hirndurchblutung mit Hilfe der Laser-Doppler-Flowmetrie eingeführt, um über die Hirndurchblutung den Verlauf des Druckanstieges in den Hirngefäßen indirekt zu erfassen. Tatsächlich stellte sich heraus, dass bei den meisten Tieren Blutdruckanstiege bis 150 mmHg noch keine Auswirkungen auf die Hirndurchblutung haben. Dies deutet darauf hin, dass die Autoregulation der Hirndurchblutung tatsächlich den Druckanstieg in den Hirngefäßen begrenzt. Da zusätzlich zu diesem Problem auch große Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren auftraten, wurde auch dieser experimentelle Ansatz als ungeeignet betrachtet.

Eine weitere physikalische Methode die BHS zu öffnen ist die Infusion hyperosmolarer Lösungen. Es wird angenommen, dass es dadurch zur Schrumpfung der Endothelzellen und infolgedessen zu einer partiellen Öffnung der Verbindung zwischen den Endothelzellen (tight junctions) kommt. Diese Öffnung ist reversibel. Sie ist in den ersten zehn Minuten nach der Infusion am stärksten ausgeprägt und nach zwei Stunden wieder vorbei.

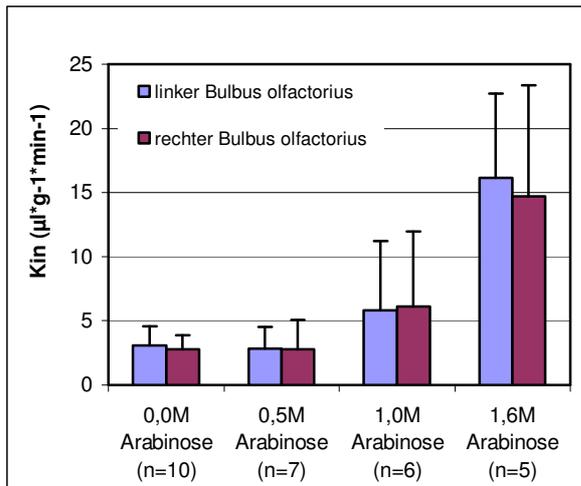
Konzentration, Volumen, Infusionsdauer und Temperatur der infundierten Lösung sind wichtig für den Grad der Öffnung der BHS und die Reproduzierbarkeit. Bei sonst

konstanten Versuchsbedingungen lässt sich die Öffnung über die Konzentration variieren.

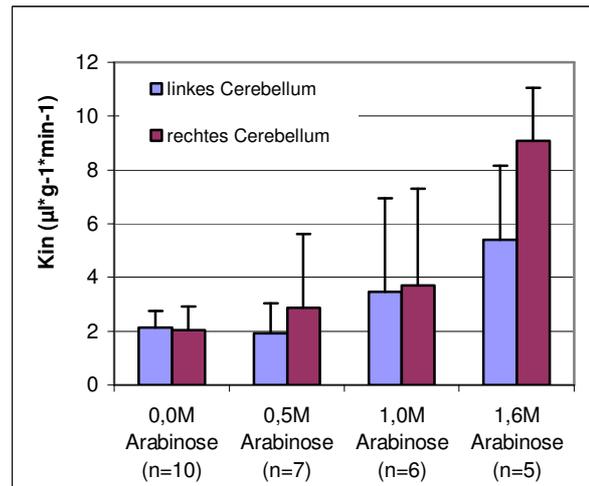
Rapoport (1980), der die Methode als erster beschrieben hat, gibt als „threshold“ 1,6 mol/l Arabinose an. Bei höheren Konzentrationen wurde in seinen Untersuchungen die BHS geöffnet, bei Konzentrationen unter 1,4 mol/l blieb sie geschlossen. Diese Angaben treffen für ein Infusionsvolumen von 3,6 ml, eine Infusionsdauer von 30 s und einer Temperatur der Infusionslösung von 37 °C zu.

Das Ziel der Vorversuche war, Challenge-Bedingungen auszuarbeiten, die entweder keine Öffnung der BHS (aber eine latente Schwächung) oder nur eine sehr geringe Öffnung auslösen.

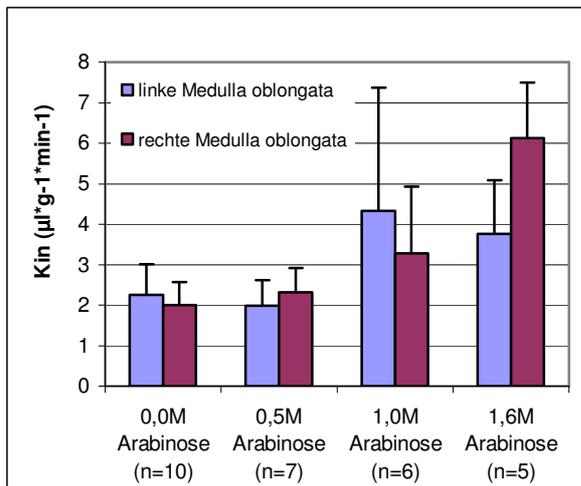
In einem ersten Ansatz wurden die in der Literatur beschriebenen Grenzwerte (1,6 mol/l Arabinose) überprüft. Die Infusion erfolgte streng standardisiert einseitig über die A. carotis interna (in unserer Studie rechts). Die Öffnung der BHS ist dann in dieser Hirnhälfte deutlich stärker ausgeprägt. Dabei wurde, wie erwartet, die BHS geöffnet ($p \leq 0,017$). Entgegen den Ergebnissen von Rapoport (1980) war auch bei Konzentrationen von 1,2 und 1,0 mol/l Arabinose noch eine Öffnung der BHS nachzuweisen. Daher wurde die Konzentration bis auf 0,5 mol/l abgesenkt.



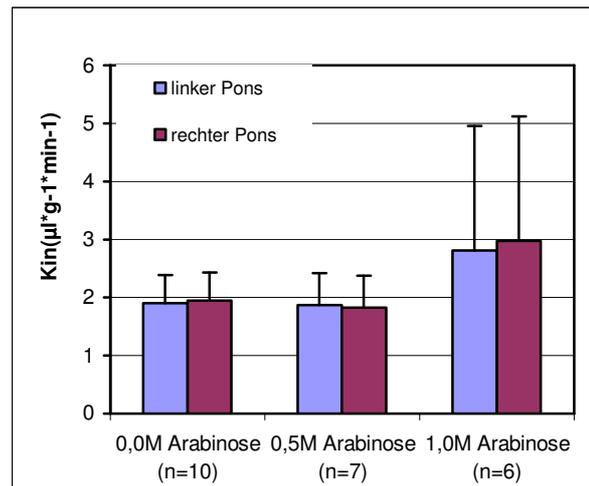
A



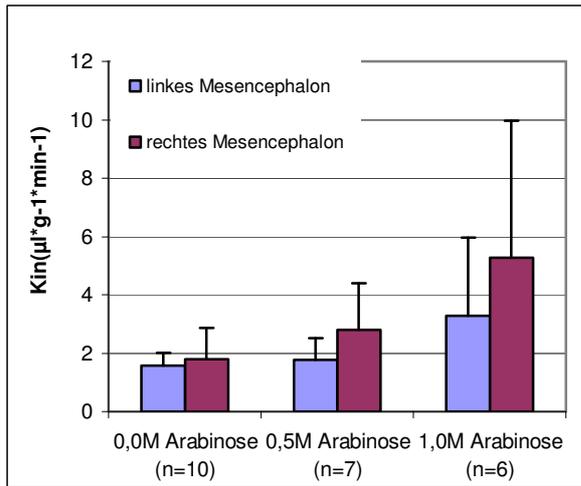
B



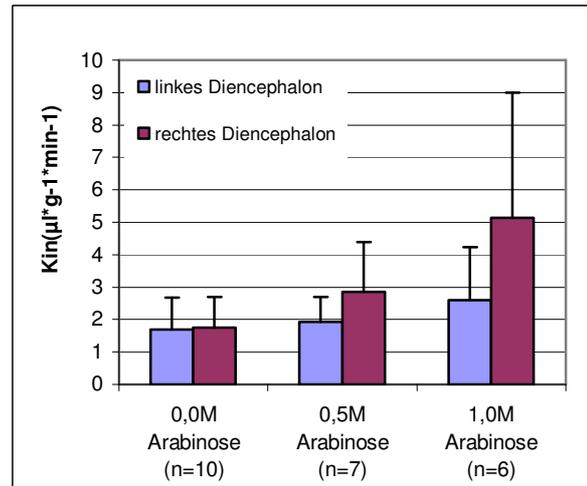
C



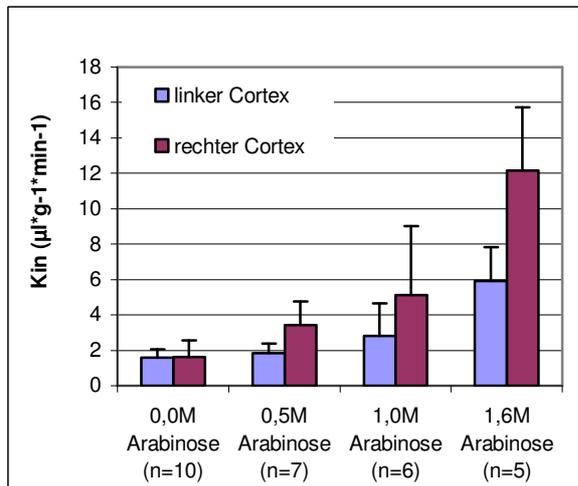
D



E



F



G

Abbildung 3: A-G (A= Bulbus olfactorius, B= Cerebellum, C= Medulla oblongata, D= Pons, E= Mesencephalon, F= Diencephalon, G= Cortex) Dargestellt ist die unidirektionale Influxkonstante (K_{in}) in Abhängigkeit von steigenden Arabinosekonzentrationen. K_{in} wird als MW \pm STD angegeben. Aufgrund der abweichenden Blutversorgung ist der Unterschied zwischen den Hemisphären im vorderen Hirnbereich (Bulbus olfactorius) und hinteren Hirnbereich (Medulla oblongata, Pons) nicht so deutlich ausgeprägt.

Bei einer Arabinosekonzentration von 0,5 mol/l kommt es auf der Injektionsseite (hier rechts) zu einer geringfügigen Öffnung der BHS (nicht signifikant nachweisbar), auf der Kontrollseite (hier links) bleibt die BHS intakt. Diese leichte Labilisierung der BHS

der rechten Hirnhälfte dient dazu, die Nachweisempfindlichkeit für Strahlenschäden deutlich zu erhöhen. Die nicht labilisierte linke Hirnhälfte dient als zusätzliche unbeeinflusste Kontrolle (zur unbestrahlten Kontrollgruppe).

Dies betrachten wir als idealen Challenge, den wir daher für die Untersuchung der bestrahlten und Kontroll-Tiere einsetzen.

2.4 Praktische Versuchsdurchführung zur Messung der BHS

Das Versuchstier wird in Narkose gelegt (Isofluran-Inhalation), die Arteria und Vena femoralis der rechten Hinterextremität werden freigelegt und kanüliert. Die rechte Femoralarterie dient der Blutdruckmessung des Versuchstiers während des gesamten Versuchs. In die Vene werden die beiden radioaktiv markierten Tracer infundiert. Aus der kanülierten A. coccygea wird nach 0,5; 1; 2; 5; 7,5; und 10 Minuten, 50µl Blut entnommen, in welchem später der Konzentrationsverlauf der Tracer gemessen wird. Nach 15 Minuten wird das Tier durch Narkoseüberdosierung getötet. Danach wird das Gehirn entnommen und mit Hilfe der Mikrodissektionstechnik werden definierte Hirnareale (A= Bulbus olfactorius, B= Cerebellum, C= Medulla oblongata, D= Pons, E= Mesencephalon, F= Diencephalon, G= Cortex) präpariert. In diesen wird dann anschließend ebenfalls die Aktivität der beiden Tracer gemessen. Dadurch können topographische Unterschiede der einzelnen Hirnareale aufgezeigt und dargestellt werden.

2.5 CA1 – Neuronen

Herstellung der Präparate: Dazu wurde zunächst eine geeignete Kunststoffeinbettung der Gehirne etabliert, die es einerseits ermöglicht, 3,0 µm dicke Schnitte anzufertigen und bei der darüber hinaus keine Schrumpfung des Gewebes auftritt, die bei Parafineinbettung bis zu 70% beträgt.

Die Ratte wird mit Ketamin/Xylazin tief anästhesiert und anschließend wird eine Perfusionsfixierung durchgeführt (über eine Kanüle in die linke Herzkammer wird PBS (Phosphate Buffered Saline)-Puffer infundiert bis kein Blut mehr in den Gefäßen ist, dann erfolgt über sechs Minuten die Infusion mit 4% Paraformaldehyd). Das Tier wird dekapitiert und nach Entfernen der Schädelkalotte das Gehirn entnommen. Das Kleinhirn wird entfernt, die beiden Hemisphären getrennt und über 24 Stunden bei Raumtemperatur in frischem 4 % Paraformaldehyd fixiert.

Nach dem Auswaschen mit 0,1 mol/l Phosphatpuffer werden die Hirnhälften über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Anschließend erfolgen Präinfiltration (Technovit + absoluter Alkohol), Infiltration (Technovit + Härter I) und Polymerisation (Technovit mit Härter I + Härter II) mit Technovit 7100 (Fa. Heraeus). Zuletzt wird der ausgehärtete Kunststoffblock mittels Technovit 3040 (Fa. Heraeus) auf einen Träger aufgeblickt.

Schneiden und Färben der Präparate: Die in Kunststoffblöcken eingebetteten Hirnhälften werden möglichst exakt ausgerichtet im Mikrotom (Rotationsmikrotom HM 360, Fa. Microm) eingespannt und durch die Hippocampusregion von rostral nach kaudal koronare Schnittserien von jeweils acht 3 µm dicken Schnitten in Folge angefertigt. Nach einer Schnittreihe wird der Block soweit getrimmt, dass die nächste Serie von acht Schnitten im Abstand von 300 µm beginnt. Über den gesamten Hippocampus entstehen dadurch zwischen 12 bis 15 Schnittserien. Die Schnitte werden auf unbeschichteten Objektträgern (vorgewärmt und mit 0,4 ml warmem, destilliertem Wasser betropft) aufgefangen und bei 60°C über 30 Minuten auf der Heizplatte getrocknet. Danach werden die Präparate mit einer Kernfärbung (Hämatoxylin nach Mayer + Kalialaun 0,1%-ig) gefärbt und mit Eukitt eingedeckelt.

Auswertung: Der Beginn und das Ende der CA1-Region des Hippocampus werden dargestellt. In systematischen Stichproben über die CA1-Region wird sowohl die Fläche ausgemessen (zur Berechnung des Volumens der CA1-Region), als auch die Zelldichte ausgezählt. Die gesamte Neuronenzahl der CA1-Region wird als Produkt aus dem Volumen und der Zelldichte berechnet. Damit wird zwar im Vergleich zu einfachen Dichtemessungen von CA1-Neuronen eine relativ aufwändige Methode

gewählt, dafür sind aber optimale Voraussetzungen geschaffen, präzise und richtige Zellzahlen der hochempfindlichen CA1-Neuronen zu berechnen.

Die getrockneten Schnitte werden mit Hilfe eines Mikroskops mit Kameraeinrichtung betrachtet und abgespeichert. Am Computer werden die Bilder mit der Software LSM 510 (Zeiss, Jena) bearbeitet (Maßstabsbalken einfügen, Fläche bestimmen etc.). Zum Auswerten wird die Fläche der CA1-Neuronenregion (genauer: die oberflächliche Pyramidenzellschicht – Stratum pyramidale superficiale) des oberen Hippocampus jeder Reihe bestimmt und dann die Gesamtfläche mit 300 multipliziert, um das Volumen des gesamten CA1-Bereiches im oberen Hippocampus zu erhalten. Für die Dichtebestimmung wird in den acht aufeinanderfolgenden Schnitten einer Serie dieselbe Stelle mit 40facher Vergrößerung eingelesen und die Bilderserie mit einem speziellen Computerprogramm (Amira 4.0, Fa. Mercury Computer Systems) überarbeitet um die neu hinzugekommenen CA1-Neuronen nach der physikalischen Disektormethode auszuzählen.

2.6 Statistische Berechnungen

Die untersuchten Parameter wurden als arithmetische Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (STD) in Tabellen oder in grafischer Form angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit dem statistischen Beratungslabor (Stablab) der LMU München.

In den Vorversuchen wird die K_{in} , nach Injektion unterschiedlicher Arabinosekonzentrationen, mittels Levene-Test auf die Homogenität ihrer Varianzen ($p=0,05$) untersucht. Je nach Homogenität der Varianzen wird anschließend der MW der K_{in} der Gruppe mit 0,5 mol/l Arabinose mit dem MW der Kontrollgruppe (isotone Kochsalzlösung: 0,0 mol/l Arabinose), der Gruppe mit 1,0 mol/l und der Gruppe mit 1,6 mol/l Arabinose mit Hilfe eines T-Tests für ungepaarte Stichproben auf ihre Signifikanz $p=0,017$ geprüft (korrigiert nach Bonferroni $p=0,05/3$). Der Seitenvergleich zwischen linker und rechter Hemisphäre erfolgte mittels des T-Tests für gepaarte Stichproben (Signifikanzniveau $p=0,05$).

Zum Vergleich der Versuchsgruppen (Kontrolle, GSM, UMTS) wurde ebenfalls zuerst die Homogenität der Varianzen der K_{in} mit Hilfe des Levene-Tests ($p=0,05$) überprüft. Anschließend wurden die Mittelwerte der K_{in} mit einer oneway Anova überprüft, wobei das Signifikanzniveau auf $p=0,05$ festgelegt ist. Innerhalb der Versuchsgruppen wurden die beiden Hemisphären eines Versuchstieres mittels eines gepaarten T-Tests auf ihre Signifikanz $p=0,05$ untersucht.

Ergebnisse

Drei Tiergenerationen wurden ganztägig kontinuierlich bestrahlt. Die Bestrahlung wurde nur während der Pflegetätigkeiten in den Kammern unterbrochen (max. 2% der Gesamtbestrahlungszeit). In jeder Generation wurden Gruppen mit GSM (SAR: 0,4 W/kg), mit UMTS (SAR: 0,4 W/kg) bestrahlt, sowie die Kontrollgruppe (Sham) unter sonst identischen Haltungsbedingungen scheinexponiert. Die Untersuchung der Integrität der BHS wurde verblindet durchgeführt. Erst nach der Messung aller Parameter einschließlich der Berechnung der K_{in} aller Versuchstiere einer Generation erfolgten die Entblindung und der Vergleich der Gruppen.

Für die Untersuchung der BHS standen Tiere der ersten (F0) und der dritten (F2) Generation zur Verfügung. Die F0-Generation wurde in eine viermonatig bestrahlte Gruppe F0b und eine elfmonatig bestrahlte Gruppe F0a unterteilt, um die Auswirkung der Bestrahlungsdauer auf die BHS zu untersuchen. Die dritte Generation (F2) wurde wie F0b ebenfalls vier Monate bestrahlt, um im Vergleich untereinander Einflüsse der Strahlen auf die prä- und postpartalen Entwicklungsphasen der Tiere (u.a. teratogene Effekte) untersuchen zu können.

3.1 Integrität der BHS (K_{in}) nach 4-monatiger Bestrahlung (F0b)

Die Gruppe F0b der ersten Tiergeneration F0 wurde vier Monate bestrahlt. In Abbildung 3 werden die K_{in} der GSM-, UMTS- und Kontrollgruppe der verschiedenen

Hirnregionen (Bulbus olfactorius, Cerebellum, Medulla oblongata, Pons, Mesencephalon, Diencephalon, Cortex) dargestellt.

Zwischen den Kontrolltieren und Versuchgruppen gab es keine Unterschiede.

Wie in den Vorversuchen bereits beobachtet und beschrieben, treten in jeder Gruppe Unterschiede zwischen der linken und rechten (Infusions-) Seite auf, die im Mesencephalon, Diencephalon und Cortex und zum Teil auch im Cerebellum statistisch signifikant sind.

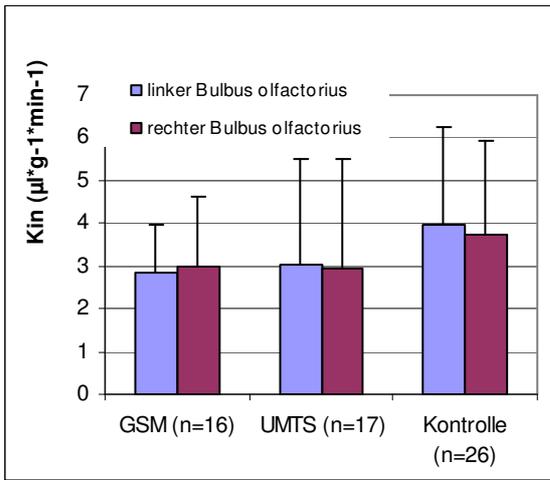
gepaarter T-Test $p \leq 0,05$:

GSM: Diencephalon $p=0,001$; Cortex $p=0,016$

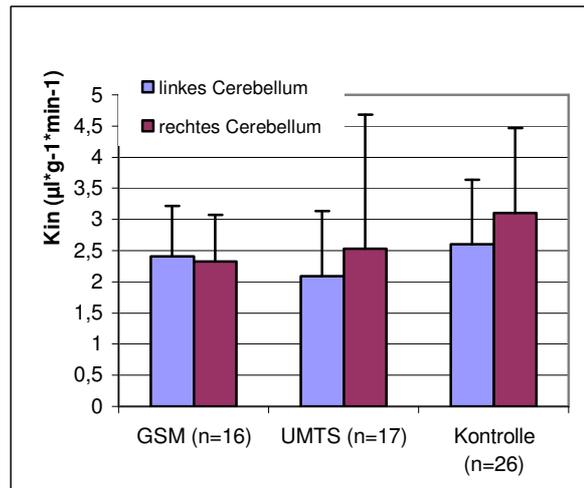
UMTS : Diencephalon $p=0,033$; Cortex $p=0,014$

Kontrolle : Cerebellum $p=0,016$; Mesencephalon $p=0,002$; Diencephalon $p=0,000$, Cortex $p=0,001$

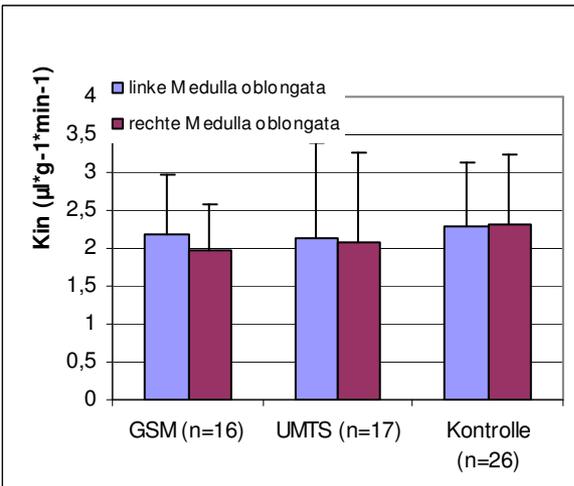
Die in der Kontrollgruppe in zwei weiteren Hirnarealen statistisch signifikant nachweisbaren Unterschiede zwischen den beiden Hirnseiten, sind wahrscheinlich auf die größere Tierzahl in dieser Gruppe zurückzuführen.



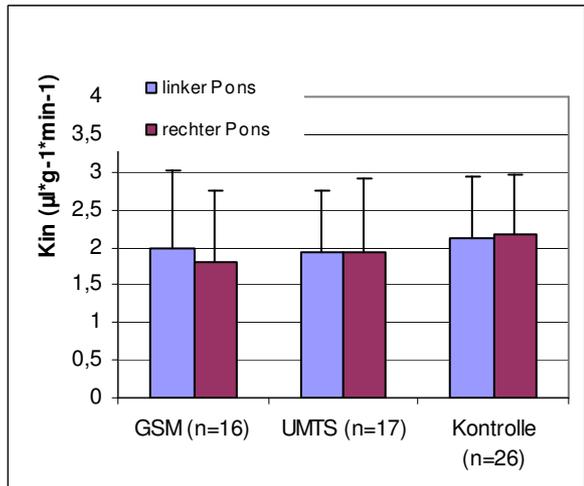
A



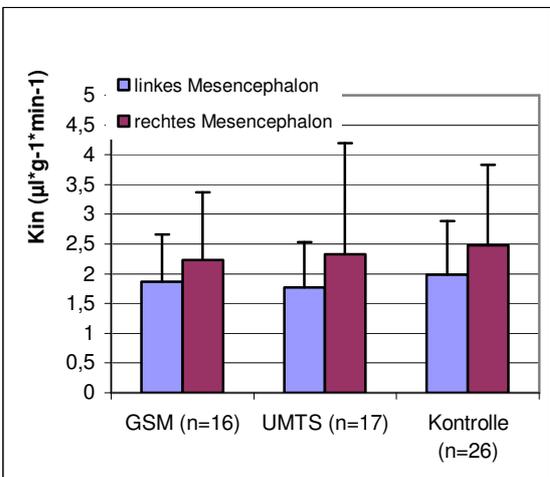
B



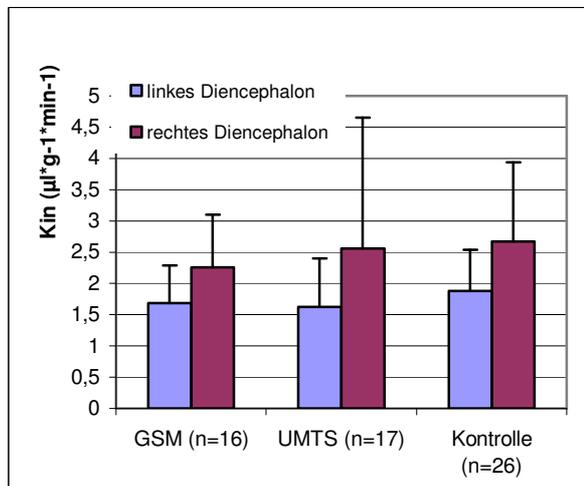
C



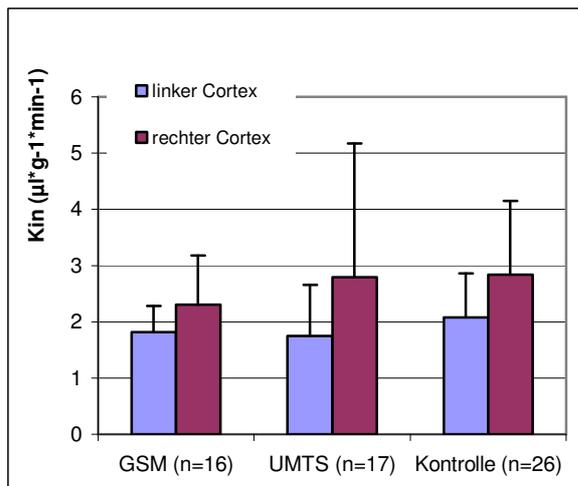
D



E



F



G

Abbildung 3: A-G (A= Bulbus olfactorius, B= Cerebellum, C= Medulla oblongata, D= Pons, E= Mesencephalon, F= Diencephalon, G= Cortex) Tiere der F0b-Generation, vier Monate bestrahlt. Vergleich der K_{in} der Tiere aus GSM-, UMTS- und Kontrollkammer. Die K_{in} wird als $MW \pm STD$ angegeben.

3.2 Integrität der BHS (K_{in}) nach 11-monatiger Bestrahlung (F0a)

Die Tiere der F0a-Generation wurden elf Monate bestrahlt. Wie in der F0b-Generation werden die K_{in} der GSM-, UMTS- und Kontrollgruppe in den verschiedenen Hirnregionen dargestellt (siehe Abbildung 4 A-G). Es treten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf.

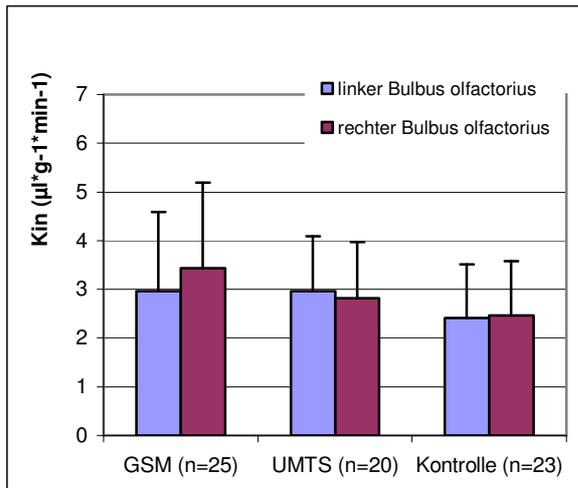
Innerhalb der drei Gruppen ist wiederum die höhere K_{in} auf der Infusionsseite im Mesencephalon, Diencephalon und Cortex zu sehen:

gepaarter T-Test $p \leq 0,05$:

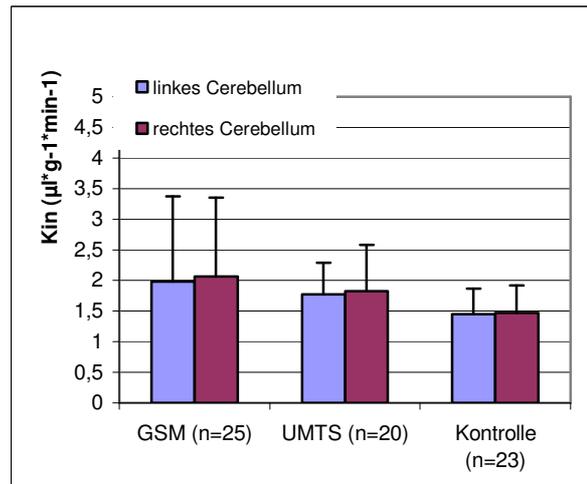
GSM: Mesencephalon $p=0,009$; Diencephalon $p=0,002$; Cortex $p<0,001$

UMTS : Pons $p=0,023$; Mesencephalon $p=0,002$; Diencephalon $p=0,002$;
Cortex $p=0,005$

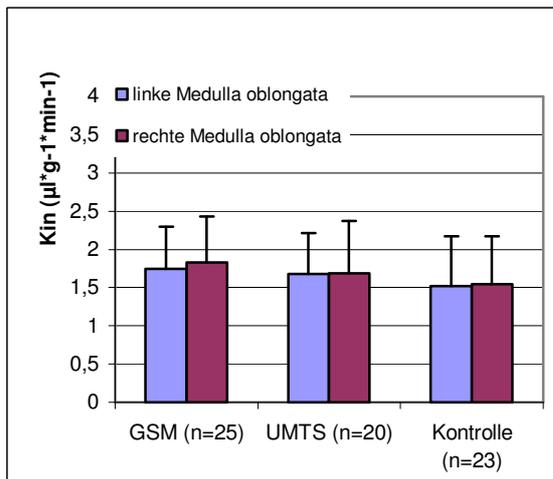
Kontrolle : Mesencephalon $p=0,007$; Diencephalon $p=0,024$, Cortex $p=0,003$



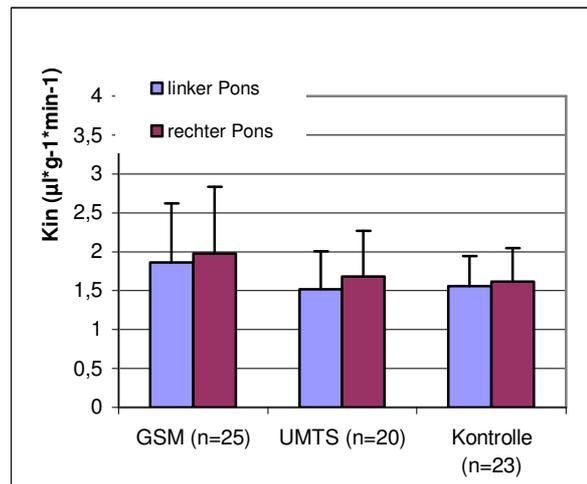
A



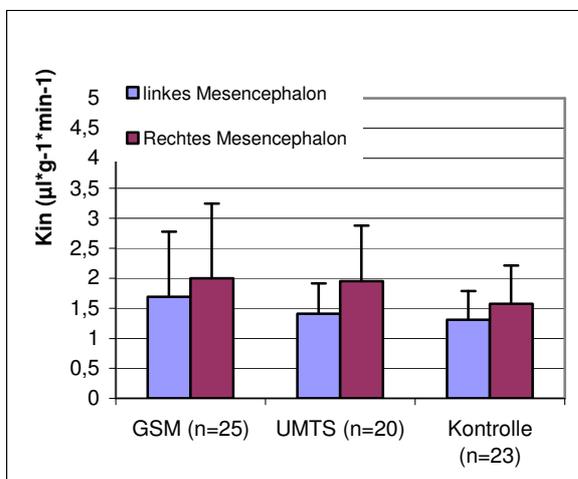
B



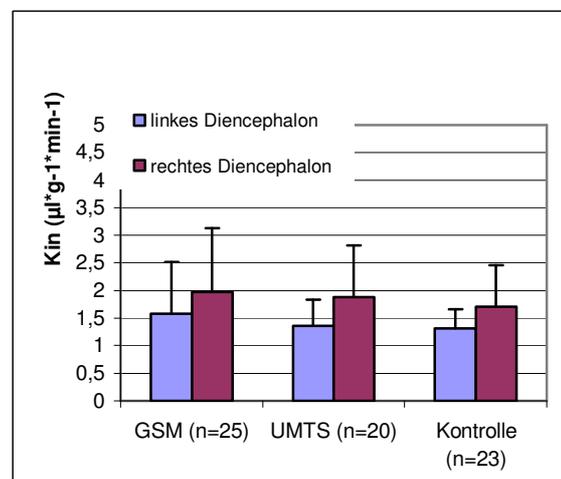
C



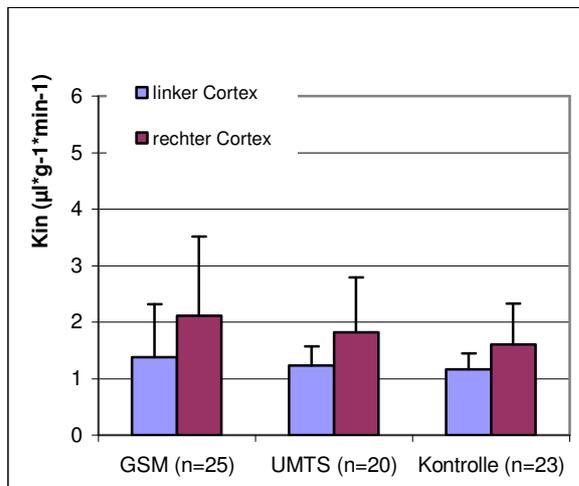
D



E



F



G

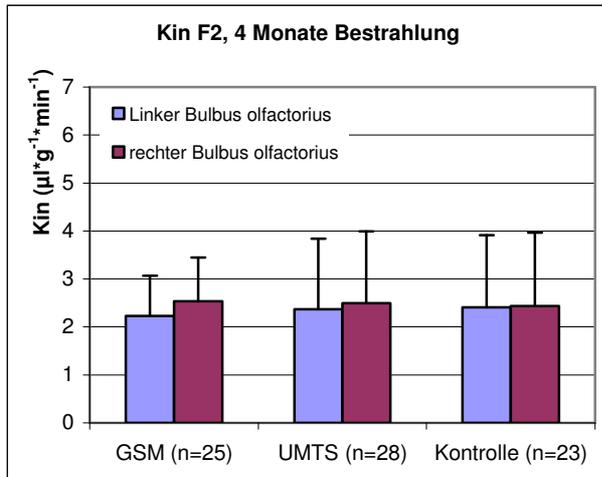
Abbildung 4: A-G (A= Bulbus olfactorius, B= Cerebellum, C= Medulla oblongata, D= Pons, E= Mesencephalon, F= Diencephalon, G= Cortex) Tiere der F0a-Generation, elf Monate bestrahlt. Vergleich der K_{in} der Tiere aus GSM-, UMTS- und Kontrollkammer. Die K_{in} wird als arithmetischer MW ± STD angegeben.

3.3 Integrität der BHS (K_{in}) der dritten Rattengeneration nach 4-monatiger Bestrahlung (F2)

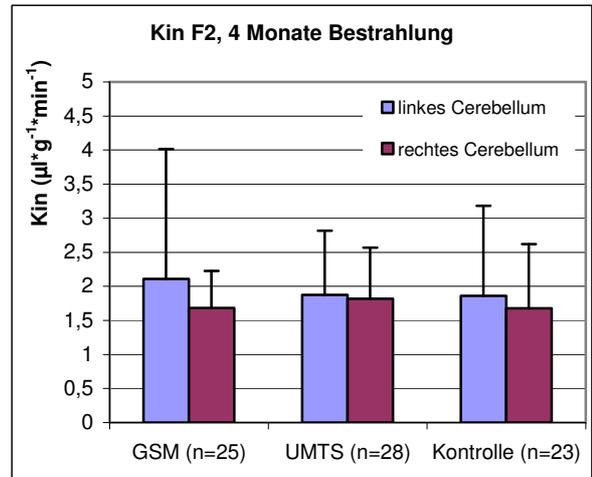
Die Tiere der F2-Generation wurden ebenso wie die F0b insgesamt vier Monate bestrahlt. Die Abbildung 5 stellt die K_{in} der GSM-, UMTS- und Kontrollgruppe in den unterschiedlichen Hirnregionen (A-G) und deren linker und rechter (Infusions-) Seite dar. Die K_{in} der drei Kammern unterscheiden sich nicht voneinander.

Wiederum ist der Unterschied der K_{in} der rechten Seite verglichen mit der linken Seite in Mesencephalon, Diencephalon und Cortex (E, F, G) zu sehen. Untersucht man diesen statistisch, so ergeben sich für alle drei Regionen folgende Signifikanzen:

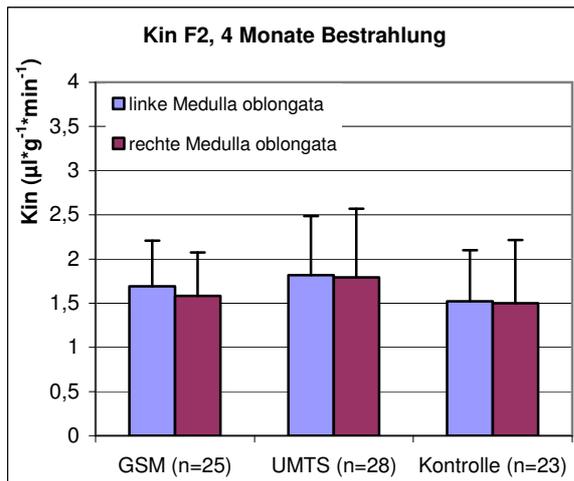
GSM:	Mesencephalon p=0,014,	Diencephalon p=0,002	Cortex p=0,001
UMTS :	Mesencephalon p<0,001	Diencephalon p<0,001	Cortex p<0,001
Kontrolle :	Mesencephalon p=0,009	Diencephalon p<0,001	Cortex p<0,001



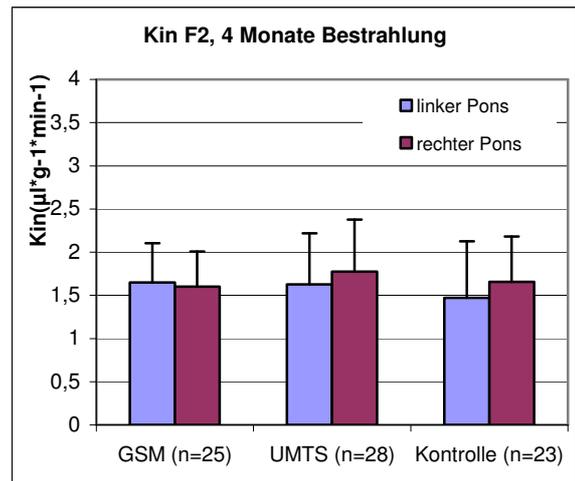
A



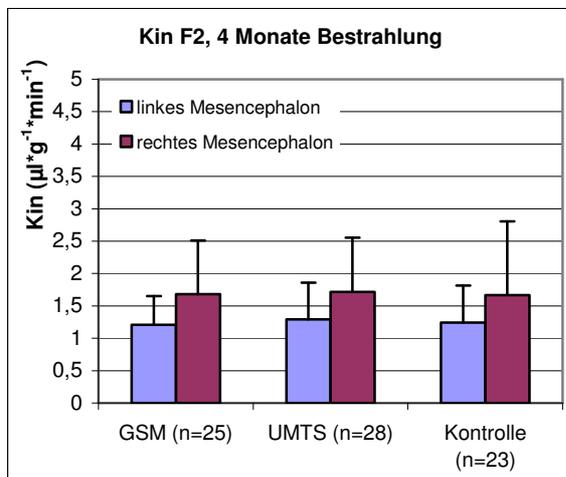
B



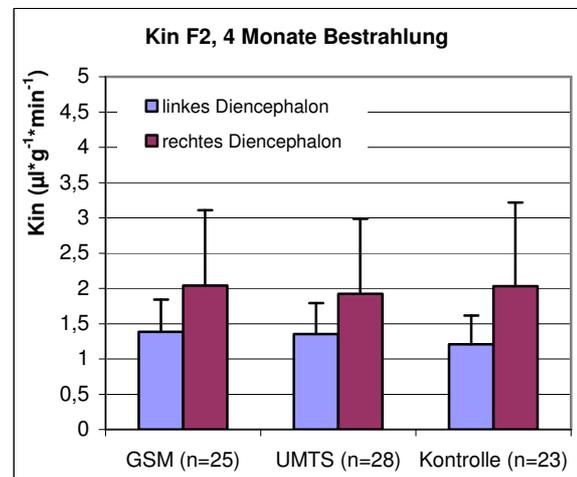
C



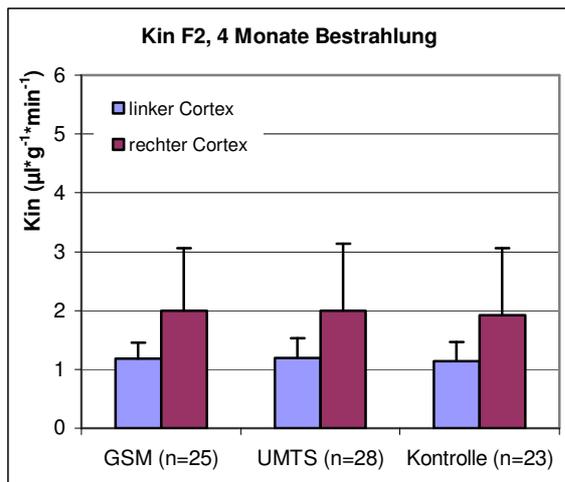
D



E



F



G

Abbildung 5: A-G (A= Bulbus olfactorius, B= Cerebellum, C= Medulla oblongata, D= Pons, E= Mesencephalon, F= Diencephalon, G= Cortex) Tiere der F2-Generation, vier Monate bestrahlt. Vergleich der K_{in} der Tiere aus GSM-, UMTS- und Kontrollkammer. Die K_{in} wird als arithmetischer MW \pm STD angegeben.

Tabelle 3: Übersicht aller unidirektionaler Influxkonstanten K_{in} ($\mu\text{l}^*\text{g}^{-1}*\text{min}^{-1}$). Dargestellt sind MW \pm STD.

Generation, Bestrahlungsdauer		F0-1, 4 Monate	F0-2, 11 Monate	F2, 4 Monate	
Bulbus	li	GSM	2,8 \pm 1,1	3,0 \pm 1,6	2,2 \pm 0,8
		UMTS	3,0 \pm 2,5	3,0 \pm 1,1	2,4 \pm 1,5
		Kontrolle	4,0 \pm 2,3	2,4 \pm 1,1	2,4 \pm 1,5
	re	GSM	3,0 \pm 1,6	3,4 \pm 1,7	2,5 \pm 0,9
		UMTS	2,9 \pm 2,6	2,8 \pm 1,2	2,5 \pm 1,5
		Kontrolle	3,7 \pm 2,2	2,5 \pm 1,1	2,4 \pm 1,5
Cerebellum	li	GSM	2,4 \pm 0,8	2,0 \pm 1,4	2,1 \pm 1,9
		UMTS	2,1 \pm 1,1	1,8 \pm 0,5	1,9 \pm 0,9
		Kontrolle	2,6 \pm 1,0	1,4 \pm 0,4	1,9 \pm 1,3
	re	GSM	2,3 \pm 0,7	2,1 \pm 1,3	1,7 \pm 0,5
		UMTS	2,5 \pm 2,1	1,8 \pm 0,8	1,8 \pm 0,7
		Kontrolle	3,1 \pm 1,4	1,5 \pm 0,4	1,7 \pm 0,9
Medulla	li	GSM	2,2 \pm 0,8	1,7 \pm 0,5	1,7 \pm 0,5
		UMTS	2,1 \pm 1,2	1,7 \pm 0,5	1,8 \pm 0,7
		Kontrolle	2,3 \pm 0,8	1,5 \pm 0,7	1,5 \pm 0,6
	re	GSM	2,0 \pm 0,6	1,8 \pm 0,6	1,6 \pm 0,5
		UMTS	2,1 \pm 1,2	1,7 \pm 0,7	1,8 \pm 0,8
		Kontrolle	2,3 \pm 0,9	1,5 \pm 0,6	1,5 \pm 0,7
Pons	li	GSM	2,0 \pm 1,0	1,9 \pm 0,8	1,7 \pm 0,5
		UMTS	1,9 \pm 0,8	1,5 \pm 0,5	1,6 \pm 0,6
		Kontrolle	2,1 \pm 0,8	1,6 \pm 0,4	1,5 \pm 0,7
	re	GSM	1,8 \pm 0,9	2,0 \pm 0,9	1,6 \pm 0,4
		UMTS	1,9 \pm 1,0	1,7 \pm 0,6	1,8 \pm 0,6
		Kontrolle	2,2 \pm 0,8	1,6 \pm 0,4	1,7 \pm 0,5
Mes- encephalon	li	GSM	1,9 \pm 0,8	1,7 \pm 1,1	1,2 \pm 0,4
		UMTS	1,8 \pm 0,8	1,4 \pm 0,5	1,3 \pm 0,6
		Kontrolle	2,0 \pm 0,9	1,3 \pm 0,5	1,2 \pm 0,6
	re	GSM	2,2 \pm 1,1	2,0 \pm 1,2	1,7 \pm 0,8
		UMTS	2,3 \pm 1,9	2,0 \pm 0,9	1,7 \pm 0,8
		Kontrolle	2,5 \pm 1,4	1,6 \pm 0,6	1,7 \pm 1,1
Di- encephalon	li	GSM	1,7 \pm 0,6	1,6 \pm 0,9	1,4 \pm 0,5
		UMTS	1,6 \pm 0,8	1,4 \pm 0,5	1,4 \pm 0,4
		Kontrolle	1,9 \pm 0,7	1,3 \pm 0,3	1,2 \pm 0,4
	re	GSM	2,3 \pm 0,8	2,0 \pm 1,2	2,0 \pm 1,1
		UMTS	2,6 \pm 2,1	1,9 \pm 0,9	1,9 \pm 1,1
		Kontrolle	2,7 \pm 1,3	1,7 \pm 0,7	2,0 \pm 1,2
Cortex	li	GSM	1,8 \pm 0,5	1,4 \pm 0,9	1,2 \pm 0,3
		UMTS	1,7 \pm 0,9	1,2 \pm 0,3	1,2 \pm 0,3
		Kontrolle	2,1 \pm 0,8	1,2 \pm 0,3	1,1 \pm 0,3
	re	GSM	2,3 \pm 0,9	2,1 \pm 1,4	2,0 \pm 1,1
		UMTS	2,8 \pm 2,4	1,8 \pm 1,0	2,0 \pm 1,1
		Kontrolle	2,8 \pm 1,3	1,6 \pm 0,7	1,9 \pm 1,1

Die unterschiedliche Bestrahlungsdauer von vier oder elf Monaten hatte keinen Einfluss auf die Integrität der BHS (Vergleich F0b und F0a). Auch die kontinuierliche Bestrahlung über mehrere Generationen wirkte sich nicht auf die BHS aus (Vergleich F0b mit F2).

3.4 CA1 – Neuronen

Die Messung der CA1-Neuronen ist sehr zeitaufwändig und derzeit noch nicht abgeschlossen. Weitere Messungen werden fortlaufend durchgeführt. Die abschließenden Ergebnisse dieser zusätzlich zum vereinbarten Projektvolumen durchgeführten Arbeiten werden nachgereicht.

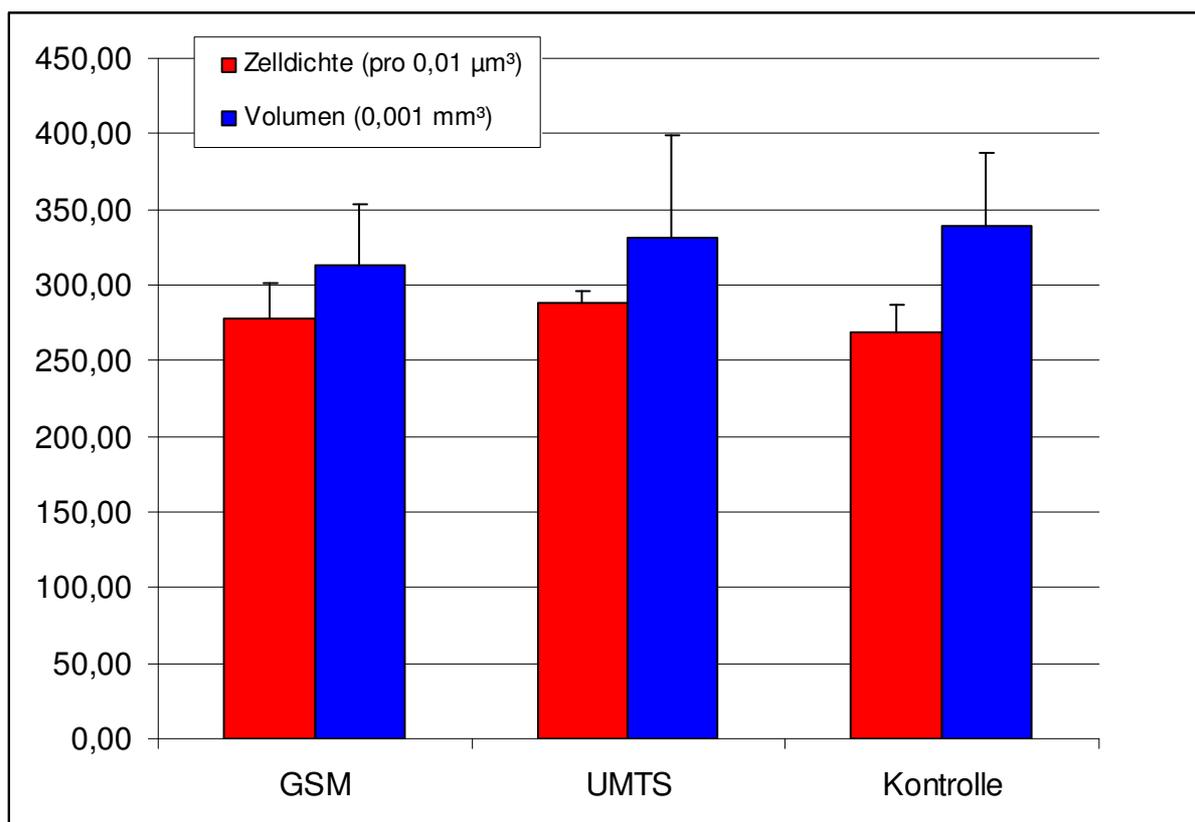


Abbildung 7: Zelldichten und Volumina der CA1-Region des Hippocampus der bestrahlten (GSM, UMTS) und Kontroll-Tiere (jeweils n=5) aus der F1 Generation.

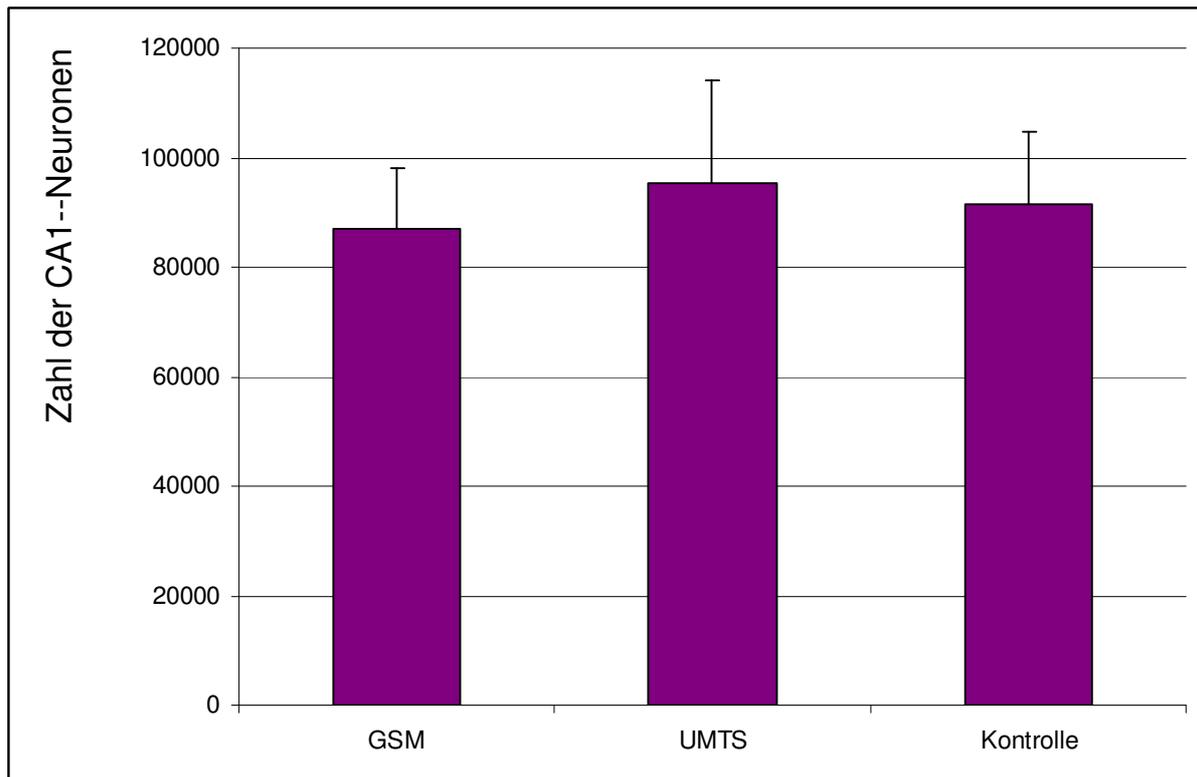


Abbildung 8: Berechnete Anzahl der CA1-Neuronen des Hippocampus der über 7 Monate bestrahlt (GSM, UMTS) und Kontroll-Tiere (jeweils n=5) aus der F1 Generation.

Die Zelldichten der ersten 15 untersuchten Tiere aus der F1-Generation unterscheiden sich kaum. In allen drei Gruppen wurden 250 bis 300 Zellen pro $\mu\text{m}^3 \times 10^6$ gefunden. Die Volumina der CA1-Region des Hippocampus streuen aus messtechnischen Gründen (Einbettung der Präparate, geringere Anzahl ausgewerteter Schnitte) etwas stärker. Aus diesen beiden gemessenen Parametern wurde die Gesamtzahl der CA1-Neuronen berechnet. Weder bei den Zelldichten und Volumina noch bei den Zellzahlen treten Unterschiede zwischen den bestrahlten Versuchstieren (GSM, UMTS) und den scheinexponierten Kontrolltieren auf.

Obwohl die angestrebte Versuchstierzahl (10-15 pro Gruppe) noch nicht erreicht ist, ist jetzt schon sehr wahrscheinlich, dass die derzeitige Schlussfolgerung, dass sich die Bestrahlung nicht auf die Gesamtzahl der CA1-Neuronen ausgewirkt hat, bestehen bleibt, da die Streuungen zwischen den Tieren gering sind und bisher keine Unterschiede zwischen den Gruppen aufgetreten sind.

Diskussion

4.1 Vergleichende Betrachtung der publizierten Untersuchungen der Einflüsse elektromagnetischer Befeldung auf die BHS

4.1.1 Interpretation der publizierten Ergebnisse

In fast allen Studien zum Einfluss der elektromagnetischen Befeldung auf die BHS (vergleiche Tabelle 4) bleibt bei niedriger Spezifischer Absorptionsrate (SAR) die Hirntemperatur im Normalbereich (normotherm) und die Integrität der BHS erhalten (+). Bei höheren Absorptionsraten kommt es zu einer bedeutsamen Erwärmung des Hirngewebes (hypertherm, > 42 bis 43 °C) und zur Störung der Integrität der BHS (-). Daher ist die Wahrscheinlichkeit hoch, dass allein eine Erwärmung des Hirngewebes auf ca. 43 °C die Öffnung der BHS verursacht.

Tabelle 4: Übersicht der publizierten Arbeiten zum Einfluss von EMF auf die BHS unter Berücksichtigung der Integrität der BHS (+, -) und der Erwärmung

BHS Integrität bleibt erhalten	normotherm = N hypertherm = H	Autor
+	N	Cosquer et al. 2005
+	N	Franke et al. 2005
+	N	Finnie et al. 2001
+	N	Finnie et al. 2002
+	N	Finnie et al. 2006
+	N	Tsurita et al. 2000
+	N	Gruenau et al. 1982
+	N	Ward et al. 1982
+	N	Preston et al. 1979
+ / -	Effekte bei SAR > 7,5W/kg	Fritze et al. 1997
+ / -	42,5°C 60min, 44,3°C 30min	Moriyama et al. 1991
+ / -	> 43°C Temp. abh. Anstieg der Öffnung	Neilly and Lin 1986
+ / -	> 43°C nach 5min, zunehmende Effekte	Goldman et al. 1984
+ / -	H	Sutton and Carroll 1979
+ / -	42±2°C 90min ohne Bestrahlung > 41,5°C 30/90min, SAR 13W/kg	Williams et al. 1984
+ / -	> 43°C	Lin and Lin 1982
-	N	Schirmacher et al 2000
-	N	Persson et al. 1992
-	N	Salford et al. 1994
-	N	Salford et al. 2003

4.1.2 Einfluss methodischer Probleme

In einigen Studien ist beschrieben, dass auch geringe Spezifische Absorptionsraten im nicht-thermischen Bereich die BHS öffnen können. Dazu zählen eine in-vitro Studie (Schirmacher et al., 2000) und einige Arbeiten aus der Arbeitsgruppe von L.G. Salford und B.R.R. Persson. Diese Arbeiten sind jedoch methodisch angreifbar und konnten von anderen Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden. In der Arbeit von Schirmacher wurde eine Zellkultur unter suboptimalen Bedingungen, aus der geringen Dichtigkeit ableitbar, etabliert und bestrahlt. Es handelt sich außerdem um

ein einmaliges Experiment mit nur einem Zellkulturansatz, das nicht reproduziert wurde. Andere Mitarbeiter aus derselben Arbeitsgruppe konnten in mehrfachen Wiederholungen mit verbesserten Kulturbedingungen die Ergebnisse nicht reproduzieren (Franke et al., 2005). Bei den Arbeiten der Arbeitsgruppe Salford (Persson et al., 1992; Salford et al., 1993; Salford et al., 2003) wird u.a. kritisiert, dass in der dort verwendeten Expositionsanlage vor allem auch aufgrund der starken Gewichts- und Größenunterschiede zwischen den Tieren bereits geringfügige Lageveränderungen, wie zum Beispiel ein Umdrehen im Käfig, zu extrem unterschiedlichen SAR führen. Der vorrangige Kritikpunkt ist aber, dass die Hauptzielgröße der Autoren, die sogenannten „dark neurons“ erst 50 Tage nach der Exposition nachgewiesen wurden und in ihrer biologischen Bedeutung völlig ungeklärt sind. Es könnten also Artefakte nach der Anfärbung der Gewebeschnitte sein, die zudem auch zeitlich unabhängig von der Bestrahlung der Tiere entstanden sind.

4.2 Pathophysiologische Konsequenz einer Öffnung der BHS

Erste Konsequenz einer Öffnung der BHS ist das Eindringen proteinreicher vasogener Flüssigkeit in den Extrazellulärraum des Gehirns und damit das Entstehen eines vasogenen Ödems. Auch nach osmotischer Öffnung der BHS werden solche Ödeme beobachtet, die jedoch nicht von langer Dauer und mit nur geringgradigen und reversiblen Verhaltensstörungen bei den Versuchstieren verbunden sind und ohne weitere pathologische Konsequenzen bleiben (Rapoport, 1996). Eine langfristige Öffnung der BHS von einigen Stunden über Tage würde zu ernsthaften strukturellen und hydrodynamischen Veränderungen im Gehirn führen. Auf Grund der räumlichen Einschränkung des Gehirns in der knöchernen Schädelhöhle führt ein Anstieg des Hirnvolumens unvermeidlich zu einer Senkung des cerebralen Blutflusses, zu verminderter Liquorproduktion sowie der Kompression der intrakraniellen Liquorräume. Ein Anstieg des ICP (intracranial pressure, intrakranieller Druck) führt zu klinischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, sogenannter Druckunruhe gefolgt von verminderter Vigilanz bis zu Bewusstlosigkeit, eingeschränkter Herz-Kreislauffunktion, Atemstörungen und Tod. Als Folge der Einschränkung der Blutzufuhr und des Energiemangels der Nervenzellen werden exzitatorische Transmitter, vor allem Glutamat, freigesetzt.

Diese bewirken rezeptorvermittelt einen Natriuminflux, begleitet von Wasser, in die Nervenzelle und führen damit zur osmotischen Schwellung der Dendriten und letztendlich zur Depolarisation. Diese löst die Öffnung von Kalziumkanälen aus. Der Influx von Ca^+ und dessen Reaktionen als second messenger bewirken über eine Reaktionskette die Aktivierung von Proteinkinasen, Phospholipasen und Proteasen sowie die Bildung freier Radikale, Freisetzung freier Fettsäuren und Initiierung von Apoptosemechanismen (Unterberg et al., 2004). Gleichzeitig wird durch Glutamat die pH-Regulation beeinträchtigt, woraus eine Azidose resultiert. Ein chronisches Ödem führt somit langfristig zum Neuronenuntergang.

4.3 CA1 – Neuronen

Die bisher ermittelten Neuronenzahlen liegen mit etwa 100.000 CA1-Neuronen pro unilateralem Hippocampus unter den in vielen anderen Arbeiten ermittelten Werten (150.000 bis 600.000: Hosseini-Sharifabad et al., 2007; Miki et al., 2005; Sousa et al., 1998; West et al., 1991).

Diese Unterschiede in den Zellzahlen könnten durch die Versuchstiere oder die Untersuchungsmethode erklärt werden. Die CA1-Neuronenzahl hängt von den untersuchten Rattenstämmen und vom Alter der Ratten ab (Miki et al., 2005).

Die vollständige Erfassung aller Nervenzellen im Hippocampus ist äußerst aufwändig, da der Hippocampus eine sehr komplexe Struktur mitten im Gehirn ist. Deshalb haben sich viele Autoren dazu entschieden, nur einen repräsentativen Anteil des Hippocampus zu erfassen. Die ausgewählten Bereiche hängen zudem von der gewählten Schnittrichtung ab: coronal (hier) versus horizontal (West et al., 1991; Miki et al., 2005).

In unserer Auswertung ist die CA1-Neuronenzahl im niedrigeren Bereich. Das könnte einerseits daran liegen, dass wir nur die oberflächliche Schicht der CA1-Neuronen erfassen (superficial pyramidal layer) und andererseits auch nur den oberen Hippocampusbereich auswerten. Wir haben die Methode so optimiert, dass sich die Versuchsgruppen bestmöglich miteinander vergleichen lassen. Daher sind unsere Streuungen innerhalb der Gruppen relativ gering.

Aus den bisher ausgewerteten Daten von je 5 Tieren pro Gruppe sind bei geringen Streuungen innerhalb der Gruppen keine Veränderungen der CA1-Neuronenzahlen bei den verschiedenen Tiergruppen zu erkennen.

Publizierte Untersuchungen zum Einfluss elektromagnetischer Befeldung auf Nervenzellen im Frequenzbereich der Handystrahlung liegen bisher vor allem in Zellkultursystemen vor. Bestrahlungen im nichtthermischen Bereich hatten dabei weder Auswirkungen auf Funktionen noch die Überlebensrate der Nervenzellen (Hossmann und Hermann, 2003, Joubert et al. 2007).

Zusammenfassung, Summary

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss chronischer elektromagnetischer Befeldung mit Mobilfunkstrahlen (GSM, UMTS, Sham) auf die Integrität der BHS und die Zahl der CA1-Neuronen im Hippocampus von Ratten untersucht.

Es wurde erstmals eine weiterentwickelte quantitative Methode zur Messung der Integrität der BHS nach elektromagnetischer Befeldung eingesetzt. Darüber hinaus wurde eine Challenge-Methode zur Labilisierung der BHS entwickelt, um die Nachweisempfindlichkeit der Methode zu verbessern. Um die Zahl der CA1-Neuronen sehr genau und unverfälscht zu bestimmen, wurde die aufwändige physikalische Disektormethode eingesetzt.

In drei Hochfrequenzexpositions-kammern (GSM 900 MHz, UMTS 1966 MHz, Kontrolle) wurden drei Rattengenerationen kontinuierlich (24h/d) unter Fernfeldbedingungen bestrahlt. Die Feldstärken wurden so eingestellt, dass bei den Versuchstieren eine Ganzkörper-SAR von 0,4W/kg erreicht wurde. Die Integrität der BHS wurde an den Generationen F0b und F2, nach viermonatiger Bestrahlung und an der Generation F0a, nach elfmonatiger Bestrahlung, untersucht. Die quantitative Messung der Integrität der BHS erfolgte mit Hilfe der unidirektionalen Influxkonstante K_{in} von ^{14}C -Saccharose für sieben Hirnareale (Bulbus olfactorius, Cerebellum, Medulla oblongata, Pons, Mesencephalon, Diencephalon und Cortex) der jeweils linken und rechten Hemisphäre.

Die K_{in} -Werte nach Infusion einer 0,5 mol/l Arabinoselösung entsprechen fast denen nach Infusion isotoner Kochsalzlösung und wurden daher als geeignete Challenge-Methode festgelegt und in den Hauptversuchen angewendet.

In keiner der untersuchten Tiergenerationen (F0 und F2) traten Unterschiede zwischen den K_{in} -Werten der GSM-, UMTS- und Kontrollgruppe auf. Weder die unterschiedliche Bestrahlungsdauer von vier oder elf Monaten (Vergleich F0a mit F2), noch die kontinuierliche Bestrahlung über mehrere Generationen (Vergleich F0b mit F2) ergaben signifikante Unterschiede der Integrität der BHS.

Die Zahl der CA1-Neuronen im Hippocampus wurde in der Generation F1 nach 7-monatiger Bestrahlung untersucht. Auch hier traten keine Unterschiede zwischen der GSM-, UMTS- und Kontrollgruppe auf.

Die lebenslange Bestrahlung der Versuchstiere mit einer SAR von 0,4 W/kg hatte keine nachweisbaren Auswirkungen auf die untersuchten Parameter, da sowohl bei der Integrität der BHS und als auch bei den CA1-Neuronenzahlen keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auftraten.

Summary

In this study the effects of chronic exposure to electromagnetic radiation of mobile phones (GSM, UMTS, Sham) on the permeability of the blood-brain barrier (BBB) and the number of CA1-neurons of hippocampus of rats was investigated.

For the first time a further developed quantitative method for the evaluation of the integrity of BBB after electromagnetic radiation was used. Additionally challenge conditions were developed in order to increase the sensitivity of the measurements. The number of CA1-neurons was precisely and correctly estimated using the elaborate physical dissector method.

In three high frequency exposition chambers (for GSM 900 MHz-, UMTS 1966 MHz- and sham exposure) three rat generations were continuously (24h/d) exposed under far field conditions. The field intensity was adjusted to reach a whole body SAR (wb-SAR) of 0.4W/kg within the animals. Integrity of the BBB was measured after four months of exposure within the generation F0b and F2, and after eleven months of exposure within generation F0a. The quantitative measurement was accomplished

by determination of the unidirectional influx-constant K_{in} of ^{14}C -saccharose within seven defined brain areas of the left and right hemisphere (bulbus olfactorius, cerebellum, medulla oblongata, pons, mesencephalon, diencephalon and cortex).

K_{in} -values after infusion of 0.5mol/l arabinose correspond with those of isotone saline and were therefore chosen as challenge conditions and applied in the main tests.

No differences between the K_{in} -values of the three groups (GSM, UMTS and sham) were found in any of the investigated rat generations (F0 and F2). Neither a longer duration of exposition from four to eleven months (F0a compared to F2), nor the continuous exposure of several generations (F0b compared to F2) did result in significant differences of the K_{in} -values.

The number of CA1-neurons in the hippocampus was investigated in the rat generation F1 of 7 months radiation exposure. Again no differences between GSM-, UMTS- as well as sham-radiated rats were found.

The lifelong radiation of the rats using a SAR of 0.4 W/kg did not change the investigated parameters since there were neither differences between the experimental groups after BBB integrity measurements nor numbers of CA1-neurons.

Literatur

Albert EN and Kerns JM (1981)

Reversible microwave effects on the blood–brain barrier.
Brain Res 230:153–164

Amaral DG and Witter MP (1995)

Hippocampal Formation.
Academic Press (New York)

Baumbach GL and Heistad DD (1983)

Effects of sympathetic stimulation and changes in arterial pressure in segmental resistance of cerebral vessels in rabbits and cats.
Circ Res 52: 527-533

Begley DJ (1999)

Methods of determining CNS drug transport in animals.
Alfred Benzon Symposium 45: 91-109

Cosquer B, Vasconcelos AP, Frohlich J, Cassel JC (2005)

Blood-brain barrier and electromagnetic fields: Effects of scopolamine methylbromide on working memory after whole-body exposure to 2,45GHz microwaves in rats.
Behav Brain Res 161(2): 229-237

Finnie JW, Blumbergs PC, Manavis J, Utteridge TD, Gebski V, Swift JG, Vernon-Roberts B, Kuchel TR (2001)

Effect of global system for mobile communication (gsm)-like radiofrequency fields on vascular permeability in mouse brain.
Pathology 33: 338-340

Finnie JW, Blumbergs PC, Manavis J, Utteridge TD, Gebski V, Davies RA, Vernon-Roberts B, Kuchel TR (2002)

Effect of long-term mobile communication microwave exposure on vascular permeability in mouse brain.
Pathology 34: 344-347

Finnie JW (2005)

Expression of the immediate early gene, c-fos, in mouse brain after acute global system for mobile communication microwave exposure.

Pathology 37(3): 231-233

Finnie JW, Blumbergs PC, Cai Z, Manavis J, Kuchel TR (2006)

Effect of mobile telephony on blood-brain barrier permeability in the fetal mouse brain.

Pathology 38:63-65

Franke H, Ringelstein EB, Stögbauer F (2005)

Electromagnetic fields (GSM 1800) do not alter blood-brain barrier permeability to sucrose in models in vitro with high barrier tightness.

Bioelectromagnetics 26 (7): 529-535

Frey AH, Feld SR, Frey B (1975)

Neural function and behaviour: Defining the relationship.

Ann NY Acad Sci 247: 433-439

Fritze K, Wiessner C, Kuster N, Sommer C, Gass P, Hermann DM, Kiessling M, Hossmann K-A (1997)

Effect of GSM microwave exposure on the genomic response of the rat brain.

Neuroscience 81: 627-639

Geinisman Y, deToledo-Morrell L, Morrell F, Heller RE (1995)

Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives.

Prog Neurobiol 45(3): 223-52

Goldman H, Lin JC, Murphy S, Lin MF. (1984)

Cerebrovascular permeability to Rb-86 in the rat after exposure to pulsed microwaves.

Bioelectromagnetics 5: 323-330

Gruenau SP, Oscar KJ, Folker MT, Rapoport SI (1982)

Absence of microwave effect on blood-brain barrier permeability to ¹⁴C-sucrose in the conscious rat.

Exp Neurol 75: 299-307

Heistad DD, Marcus ML, Abboud FM (1978)

Role of large arteries in regulation of cerebral blood flow in dogs.

J Clin Invest 62: 761-768

Hosseini-Sharifabad M and Nyengaard JR (2007)

Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus.
Journal of Neuroscience Methods 162: 206–214

Hossmann K-A and Hermann DM (2003)

Effects of electromagnetic radiation of mobile phones on the central nervous system.
Bioelectromagnetics 24: 49-62

Jubb K and Huxtable C, (1993)

The Nervous System.
Pathology of Domestic Animals Vol. 1: 292-299

Joubert V, Leveque P, Cueille M, Bourthoumieu S, Yardin C (2007)

No apoptosis is induced in rat cortical neurons exposed to GSM phone fields.
Bioelectromagnetics 28:115-21.

Kuribayashi M, Wang J, Fujiwara O, Doi Y, Nabae K, Tamano S, Ogiso T, Asamoto M, Shirai T. (2005)

Lack of effects of 1439 MHz electromagnetic near field exposure on the blood-brain barrier in immature and young rats.
Bioelectromagnetics 26:578-588.

Kantos HA, Wei EP, Dietrich WD (1981)

Mechanism of cerebral arteriolar abnormalities after acute hypertension.
Am J Physiol 240: H511-H527

Kantos HA, Wei EP, Navari RM, Levassure JE, Roseblum WI, Patterson JL (1978)

Responses of cerebral arteries and arteriols to acute hypotension and hypertension.
Am J Physiol 234: H371-H383

Kirino T, (1982)

Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia.
Brain Res. 239: 57–69

Kniesel U and Wolburg H (2000)

Tight junctions of the blood brain barrier.
Cell Mol Neurobiol, 20(1): 57-76

Leszczynski D, Joenväärä S, Reivinen J, Kuokka R, (2002)

Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: Molecular mechanism for cancer- and blood-brain barrier-related effects.

Differentiation, 70: 120-129

Lin JC and Lin MF (1982)

Microwave hyperthermia-induced blood–brain barrier alterations.

Radiat Res 89: 77–87

Matthew P (2007)

Effects of relative hypoglycaemia on LTP and NADH imaging in rat hippocampal slices.

Brain Res.1165: 30-39

Merritt JH, Chamness AP, Allen SJ (1978)

Studies on blood–brain barrier permeability after microwave radiation.

Radiat Environ Biophys 15(4): 367–377

Miki T, Harris SJ, Wilce PA, Takeuchi Y, Bedi KS (2004)

Effects of age and alcohol exposure during early life on pyramidal cell numbers in the CA1-CA3 region of the rat hippocampus.

Hippocampus 14: 124-134

Miki T, Satriotomo L, Li H-P, Matsumoto Y, Gu H, Yokoyama T, Lee K-Y, Bedi K.S, Takeuchi Y, (2005)

Application of the physical disector method to the central nervous system: Estimation of the total number of neurons in subdivisions of the rat hippocampus.

Anatomical Science International 80: 153-162

Moriyama E, Salcman M, Broadwell RD (1991)

Blood–brain barrier alteration after microwave-induced hyperthermia is purely a thermal effect: I. Temperature and power measurements.

Surg Neurol 35: 177–182

Neilly Jp and Lin J. (1986)

Interaction of ethanol and microwaves on the blood-brain barrier of rats.

Bioelectromagnetics. 7(4): 405-414

Neubauer C, Phelan AM, Kues H, Lange DG (1990)

Microwave irradiation of rats at 2.45 GHz activates pinocytotic-like uptake of tracer by capillary endothelial cells of cerebral cortex.

Bioelectromagnetics 11: 261–268

Oscar KJ and Hawkins TD (1977)

Microwave alteration of the blood–brain barrier system of rats.
Brain Res 126: 281–293

Pavlidis C and McEwen BS (1996)

Role of adrenal steroid mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in long-term potentiation in the CA1 field of hippocampal slices.
Brain Res. 738: 229-235

Persson BRR, Salford LG, Brun A, Eberhardt JL, Malmgren L (1992)

Increased permeability of the blood–brain barrier induced by magnetic and electromagnetic fields.
Ann NY Acad Sci 649: 356–358

Preston E, Vavasour EJ, Assenheim HM (1979)

Permeability of the blood–brain barrier to mannitol in the rat following 2,450 MHz microwave irradiation.
Brain Res 174: 109–117

Rapoport SI (1996)

Modulation of the Blood-Brain Barrier Permeability.
Journal of Drug Targeting 3: 417-425

Rapoport SI, Fredericks WR, Ohno K, Pettigrew KD (1980)

Quantitative aspects of reversible osmotic opening of the blood-brain barrier.
Am. J. Physiol. 238 (Regulatory integrative Comp. Physiol. 7): R421-R431

Salford LG, Brun AE, Eberhardt JL, Malmgren L, Persson BR (2003)

Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones.
Environ Health Perspect. 111(7): 881-3

Salford LG, Brun AE, Stuesson K, Eberhardt JL, Persson BR (1994)

Permeability of the blood–brain barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 50, and 200 Hz.
Microsc Res Tech 27: 535–542

Schanker LS and Hogben CA (1961)

Billiary excretion of inulin, sucrose and Mannitol: analysis of bile formation.
Am J Physiol. 200: 1087-1090

Schirmacher A, Winters S, Fischer S, Goeke J, Galla HJ, Kullnick U, Ringelstein EB, Stögbauer F (2000)

Electromagnetic fields (1.8 GHz) increase the permeability to sucrose of the blood–brain barrier in vitro.

Bioelectromagnetics 21: 338–345

Sutton CH and Carrol FB (1979)

Effects of microwave-induced hyperthermia on the blood–brain barrier of the rat.

Radiat Sci 14: 329–334

Tsurita G, Nagawa H, Ueno S, Watanabe S, Taki M (2000)

Biological and morphological effects on the brain after exposure of rats to a 1439 MHz TDMA field.

Bioelectromagnetics Jul;21(5): 364-71

Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL (2004)

Edema and brain trauma

Neuroscience 129: 1021-1029

Wang W, Redeckera C, Bidmonc H-J, Witte OW, (2004)

Delayed neuronal death and damage of GDNF family receptors in CA1 following focal cerebral ischemia.

Brain Res.1023: 92–101

Ward TR, Elder JA, Long MD, Svendsgaard D (1982)

Measurement of blood–brain barrier permeation in rats during exposure to 2450-MHz microwaves.

Bioelectromagnetics 3: 371–383

West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG (1991)

Unbiased Stereological Estimation of the Total Number of Neurons in the Subdivisions of the Rat Hippocampus Using the Optical Fractionator.

The Anatomical Record 231: 482-497

Williams WM, Lu S-T, del Cerro M, Michaelson SM (1984)

Effect of 2450 MHz microwave energy on the blood–brain barrier to hydrophilic molecules.

A. Effect of Permeability to Sodium Fluorescein.

B. Effect on the permeability to HRP

C. Effect on the permeability to [¹⁴C]sucrose

D. Brain temperature and blood–brain barrier permeability to hydrophilic tracers.

Brain Res Rev 7: 165–212

Zeng Y-S and Xu ZC, (2000)

Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia.
Neuroscience Res. 37: 113–125

6. **UNTERSUCHUNGEN ZUM POTENTIELLEN EINFLUSS AUF DAS IMMUNSYSTEM UND DIE STRESSBE- LASTUNG**

Die Untersuchungen zum Einfluss auf das Immunsystem und die Stressbelastung wurden schwerpunktmäßig am Lehrstuhl für Tierschutz, Verhaltenskunde, Tierhygiene und Tierhaltung der Tierärztlichen Fakultät der LMU – Direktor Univ. Prof. Dr. med. vet. M. Erhard – durchgeführt.

Federführend waren folgende wissenschaftliche Mitarbeiter mit den Untersuchungen befasst:

Dr. med. vet. A.-C. Wöhr

Catrin Kahlfeld

Dr. med. vet. C. Engmann

Judith Schreiner

Dr. med. vet. S. Okorn

Prof. Dr. med. vet. M. Erhard

Inhalt

6	UNTERSUCHUNGEN ZUM POTENTIELLEN EINFLUSS AUF DAS IMMUNSYSTEM UND DIE STRESSBELASTUNG	161
6.1	ZIELSETZUNG	162
6.2	LITERATUR	162
6.2.1	Immunsystem	163
6.2.2	Stresssystem	166
6.3	MATERIAL UND METHODE.....	174
6.3.1	Allgemeines	174
6.3.2	Versuchstiere.....	175
6.3.3	Versuchsdurchführung	176
6.3.4	Immunologische Untersuchungen	177
6.3.5	Untersuchungen zum Stressgeschehen	182
6.3.6	Statistische Methoden der Beschreibung und Analyse	193
6.3.7	Definition der im Ergebnisteil verwendeten Begriffe und Abkürzungen	194
6.4	ERGEBNISSE.....	195
6.4.1	Ergebnisse der Untersuchungen zum Immunsystem.....	195
6.4.2	Ergebnisse der Untersuchungen zum Stressgeschehen	206
6.5	DISKUSSION	222
6.5.1	Diskussion der Methoden	222
6.5.2	Diskussion der Ergebnisse	223
	ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY	227
	LITERATUR.....	230

6.1 ZIELSETZUNG

Ziel des Teilprojekts ist die Untersuchung von chronischen Wirkungen hochfrequenter Felder der mobilen Kommunikation auf die Reproduktionsparameter, das Immun- und Stresssystem im Tierexperiment (Ratten).

Das im Rahmen des Deutschen Mobilfunk – Forschungsprogramms seit November 2003 durchgeführte Forschungsprojekt beinhaltet ein neues Expositions-konzept und mehrere tierexperimentelle Endpunkte. Im Vordergrund steht die chronische Exposition von drei Gruppen Wistar-Ratten (F0, F1 und F2) durch die Mobilfunksysteme GSM (900 MHz) und UMTS (1966 MHz) mit einer beim Menschen vergleichbaren SAR von 0,4 W/kg. Bestimmt werden reproduktionsbiologische, immunologische und physiologisch-adaptive Parameter.

Im Rahmen der Untersuchungen zum Immunsystem soll mittels der Injektion verschiedener Antigene (Ovalbumin, Huhn IgY) die Immunkompetenz des Einzeltiers unter Langzeit- GSM- oder UMTS-Exposition mit der einer nicht-exponierten Kontrollgruppe verglichen werden. Die Tiere wurden jeweils mit beiden Antigenen immunisiert.

Sollten nun hochfrequente Felder der mobilen Kommunikation einen chronischen Stressor für das Individuum darstellen, kann mittels eines zusätzlichen `künstlichen´ Stressors [ACTH (Adreno-Corticotropes-Hormon)-Test] untersucht werden, ob GSM- oder UMTS-langzeit-exponierte Ratten in der Lage sind auf diesen zusätzlichen Stressor noch adäquat (Anstieg des Stresshormons Kortikosteron) zu reagieren, im Vergleich zu einer nicht-exponierten Kontrollgruppe, die ebenfalls einem ACTH-Test unterzogen wird.

6.2 LITERATUR

Das Immunsystem steht als körpereigenes Abwehrsystem in ständigem Kontakt mit seiner Umwelt. Dabei reagieren zelluläre und humorale Immunfaktoren sowohl mit exogenen, als auch mit endogenen antigenen Strukturen. Die Immunantwort wird dabei von endogenen Faktoren, denen der Organismus gleichzeitig ausgesetzt ist, wie z.B. dem Stressgeschehen, beeinflusst. Zwischen Stressreaktionen und dem Immunsystem besteht demnach eine enge wechselseitige Beziehung. So kann akuter, kurzzeitiger Stress stimulierend auf das Immunsystem wirken, während chronischer Stress zu einer Immunsuppression führen kann (z.B. DRABHAR UND MCEWEN, 1997, 1999). Folglich sind zur Beurteilung der potentiellen Wirkungen elektromagnetischer Felder nicht nur direkte Wirkungen auf Immun- und Stressparameter zu berücksichtigen, sondern auch jene Faktoren, die ohne Anwesenheit eines elektromagnetischen Feldes zur Beeinflussung der Immun- oder Stressantwort führen können.

Während in zahlreichen Studien der Einfluss eines niederfrequenten elektromagnetischen Spektrums (1 bis ca. 10^4 Hz) auf den Hormonhaushalt (Östrogene, Prolaktin, Melatonin) und das Krebsrisiko, den Biorhythmus, das Immun- und Nervensystem, sowie Psyche und Verhalten untersucht wurde (z.B. LÖSCHER UND LIBURDY, 1998; PORTIER UND WOLFE, 1998; WHO, 2002), existieren hinsichtlich der Wirkung des hochfrequenten elektromagnetischen Spektrums (nach LÖSCHER (2003) ca. 10^4 bis 10^{11} Hz; bzw. nach RÖÖSLI ET AL. (2003) 10^5 bis 10^{12} Hz) auf Leistung, Gesundheit und Verhalten von Mensch und Tier nur wenige Untersuchungen (FERNIE ET AL., 1999; WENZEL ET AL., 2002; RODRIGUEZ ET AL., 2002). Im Gegensatz zu niederfrequenten Feldern sind hochfrequente elektromagnetische Wellen durch eine ungehinderte räumliche Ausbreitung bei gleichzeitig beschränkter biologischer Eindringtiefe gekennzeichnet (MATTHES, 1996). Die Existenz lokaler thermischer Effekte starker elektromagnetischer Felder, die bei hoher Intensität gesundheitsschädigend wirken (RÖÖSLI ET AL., 2003) wird bestätigt, während jedoch nicht-thermische Wirkungen (LESZCZYNSKI ET AL., 2002) umstritten sind (BERNHARDT ET AL., 1997; JUUTILAINEN UND DE SEZE, 1998; KREWSKI ET AL., 2001; REPACHOLI 2001; RÖÖSLI ET AL., 2003). Zum Schutz vor thermischen und bekannten nicht-thermischen Effekten wird von ICNIRP (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection) die Einhaltung von frequenzspezifischen Grenzwerten (z.B. 41 V/m bei 900 MHz bzw. 58 V/m bei 1800 MHz) empfohlen. Entsprechende Regelungen sind auch in Deutschland gültig.

In ihrer Übersichtsarbeit bewerten RÖÖSLI ET AL. (2003) die Studien, deren Ergebnisse im Zusammenhang mit Hochfrequenzstrahlung auf gesundheitliche Wirkungen deuten. Einzelne Ergebnisse sprechen für einen „möglichen“ Einfluss auf die Schlafqualität, das Auftreten von Leukämien und Lymphomen sowie Hirntumoren und einer Elektrosensibilität. Als „nicht beurteilbar“ wird hingegen ein Zusammenhang zwischen Hochfrequenzstrahlung und gesundheitlichen Wirkungen auf das Hormonsystem, das Immunsystem, das Herz-Kreislauf-System, das psychische Befinden, das Auftreten von Brustkrebs, Augen- sowie Hodentumoren, Aborte und Genotoxizität beurteilt, da diesbezüglich bislang nur einzelne Studien mit wenig Aussagekraft existieren. Diese Studien wiesen methodische Schwächen sowie teilweise widersprüchliche Ergebnisse auf (RÖÖSLI ET AL., 2003). Infolge mehrfacher Hinweise auf Abwesenheit wird ein Zusammenhang zwischen Hochfrequenzstrahlung und Mortalität oder weiteren Tumoren als „unwahrscheinlich“ erachtet (RÖÖSLI ET AL., 2003).

6.2.1 Immunsystem

Nach RÖÖSLI ET AL. (2003) ist das Risiko einer gesundheitsschädlichen Wirkung von Hochfrequenzstrahlung im Niedrigdosisbereich auf das Immunsystem nicht beurteilbar.

MASHEVICH ET AL. (2003) wiesen nach Elektromagnetfeld-Exposition (830 MHz) menschlicher Leukozyten ein erhöhtes Auftreten von Mitosefehlern und Chromosomenanomalien nach, die eine lineare Abhängigkeit von der spezifischen Absorptionsrate zeigten.

Durch die Immunisierung wird das spezifische Immunsystem aktiviert und reagiert auf diesen Stimulus mit einer Antikörperproduktion. Da an der Immunantwort eine Vielzahl von immunkompetenten Zellen beteiligt sind, ist eine komplexe Interaktion der einzelnen Komponenten des Immunsystems notwendig, an der insbesondere T-Helfer-Zellen, Interleukine und B-Zellen beteiligt sind. Somit stellt die Immunisierung eine einfache Methode dar, um ein komplexes Geschehen analysieren zu können. Die chronische Exposition im elektromagnetischen Feld stellt unter Umständen einen permanenten Stressor dar, der zu einer chronischen Immunsuppression mit verminderter Antikörperproduktion führt. Anhand des Vergleiches der IgG-Antikörpertiter UMTS- oder GSM-exponierter Tiere sowie nicht-exponierter Kontrolltiere dürfte ein Einfluss der elektromagnetischen Strahlung auf eine dieser Immunkomponenten zu erkennen, und somit hinsichtlich eines potentiellen Einflusses auf das spezifische Immunsystem beurteilbar sein.

Allerdings konnten Untersuchungen von NASTA ET AL. (2006) bei Mäusen keinen Einfluss einer GSM-Exposition auf die Produktion von Antikörpern gegen OVA nachweisen. TUSCHL ET AL. (2006) stellten in vitro ebenfalls keinen Einfluss auf die humane Immunzellen durch eine GSM-Exposition fest.

6.2.1.1 Verwendete Antigene

In vorliegenden Untersuchungen werden OVA (Ovalbumin aus dem Eidotter) und IgY (Huhn Immunglobulin Y) als Antigene verwendet.

Ovalbumin (OVA):

Das Protein OVA wurde bereits für zahlreiche Studien verwendet. So verwendeten KNIPPELS ET AL. OVA, um die Möglichkeit einer oralen Sensibilisierung gegenüber Nahrungsmittelproteinen zu testen. Sie stellten fest, dass bei jungen (4 bis 6 Wochen alten) männlichen Brown Norway-Ratten, die entweder per Magensonde oder ad libitum per Trinkwasser mit OVA konfrontiert wurden, bei wöchentlicher Blutentnahme erst ab Tag 21 Antikörper (IgG) gegen OVA messbar waren (KNIPPELS ET AL., 1998). In einem weiteren Versuch, der ähnlich aufgebaut war, stellten KNIPPELS ET AL. fest, dass vor einer Verabreichung von OVA keine Antikörper gegen OVA nachweisbar waren (KNIPPELS ET AL., 1999).

Auch Pilegaard und Madsen verabreichten Ratten oral OVA, um ein Modell zu testen, mit dem man Allergene in Lebensmitteln eruieren kann (PILEGAARD UND MADSEN, 2004).

OvA hat eine molekulare Masse von rund 43 kDa und stellt somit ein Vollantigen dar. Wegen des phylogenetischen Abstands verursacht eine Verabreichung von OvA bei Säugetieren eine gute Immunantwort. In einer Studie von NASTA ET AL. (2006) wurde der Einfluss von EMF auf die Differenzierung von B-Zellen und die AK-Produktion untersucht. Dafür wurden weibliche Mäuse Fernfeldbedingungen ausgesetzt (GSM, 900 MHz, SAR 2 W/kg, 2 Stunden pro Tag, 5 Tage in der Woche, 4 Wochen lang). Um eine Antigen-spezifische Immunantwort zu erreichen, wurde den Tieren i.p. (intra peritoneal) eine Lösung aus OVA (1 µg/Maus), Wasser und dem kompletten Freundschens Adjuvans verabreicht. Eine Woche später erhielten sie i.p. eine Lösung aus OVA, Wasser und dem inkompletten Freundschens Adjuvans. Direkt im Anschluss an die Immunisierung wurden die Tiere dem Feld ausgesetzt. Nach Ablauf der vier Wochen wurden die Mäuse getötet und die IgM- und IgG-Konzentrationen mittels Sandwich-ELISAs ermittelt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der exponierten und der nicht exponierten Gruppe beobachtet werden (NASTA ET AL., 2006).

Immunglobulin Y (IgY):

Das Protein IgY stellt das funktionelle Äquivalent des Antikörpers IgG der Säuger und wahrscheinlich den evolutionären Vorgänger der Antikörper IgG und IgE der Säuger dar.

IgY wird bei weiblichen Vögeln vom Plasma in das Eigelb transferiert, um so dem Embryo und später dem Neugeborenen eine passive Immunität zu vermitteln (PATTERSON ET AL., 1962). Dieses entspricht dem plazentaren IgG-Transfer der Säugetiere.

Wegen des phylogenetischen Abstands verursacht eine Verabreichung von IgY bei Säugetieren eine verstärkte immunogene Aktivität (GASSMANN ET AL., 1990).

IgY besteht aus zwei schweren (H) und zwei leichten (L) Ketten und hat eine molekulare Masse von rund 180 kDa (SUN ET AL., 2001).

6.2.1.2 Adjuvans

Ein Adjuvans stellt eine essentielle Komponente der meisten Immunisierungen dar. In dieser Studie wurde Pam3CysSerLys4 verwendet. Dabei handelt es sich um ein synthetisches bakterielles Lipopeptid von *Escherichia coli* (HEUMANN ET AL., 2003). Für synthetisch hergestellte Lipopeptide konnte inzwischen bei verschiedenen Säugetierspezies in Zusammenhang mit einer ganzen Reihe von Antigenen eine immunstimulierende Wirkung

nachgewiesen werden, die nicht mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden ist (BESSLER UND JUNG, 1992; KELLNER ET AL., 1992; KLEINE ET AL., 1994)

6.2.2 Stresssystem

Stress ist eine unter allen Organismen verbreitete Erfahrung des täglichen Lebens. Die Fähigkeit, auf die unterschiedlichsten physikalisch-chemischen, physischen oder psychischen stressauslösenden Faktoren (Stressoren) adäquat zu reagieren ist eine fundamentale Voraussetzung des Überlebens. Werden bei der Aufrechterhaltung der Homöostase jedoch maladaptive Prozesse induziert, kann dies beim Menschen beispielsweise in Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems, des Immunsystems, Krebs und neuropsychiatrischen Krankheiten wie z.B. der Depression resultieren. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (BRUNDTLAND, 1999) stellen insbesondere psychiatrische Störungen und neurologische Krankheiten in Zukunft ein nicht zu unterschätzendes sozioökonomisches Problem für alle Nationen dar. Die Neurobiologie chronisch psychosozialen Stresses ist jedoch in ihrer Vielschichtigkeit weitgehend unbekannt.

Die medizinisch-biologische Definition von Stress geht auf WALTER B. CANNON (1915) zurück, der die Stressreaktion als eine Kampf- oder Fluchtreaktion verstand. Seit SELYE 1936 zum ersten Mal darauf hingewiesen hat, dass eine Stressreaktion in Form einer chronischen Belastung pathologische Folgen haben kann, wurde die Möglichkeit einer psychologischen Komponente der Stressreaktion erst von MASON im Jahre 1968 diskutiert. Dies begründet sich unter anderem darin, dass es sehr unterschiedlich ist, welche internen oder externen Faktoren von einem Individuum als Stressor empfunden werden. Externe Faktoren sind die Wahrnehmung und Verarbeitung von Sinneseindrücken. Interne Faktoren sind beispielsweise der Kontext der Sinneseindrücke, die individuelle prae- und postnatale Vorerfahrung, der hormonelle Status des Individuums sowie dessen genetische Prädisposition (CHROUSOS UND GOLD, 1992; MCCORMICK ET AL. 1995; LIU ET AL., 1997; BAHATNAGAR UND DALLMAN, 1998). Die Perzeption und Verarbeitung belastender Stimuli rufen ein breites Spektrum physiologischer Reaktionen hervor, die aus einer Vielzahl interagierender hormoneller und neuronaler Antworten auf den Reiz resultieren.

Die Stressreaktion wird nach der klassischen Betrachtungsweise vornehmlich über zwei interagierende Achsen vermittelt, die sympathoadrenale und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden Achse (HHN-Achse; VON HOLST ET AL., 1983; MINTON, 1994; VON HOLST, 1993; DE KLOET ET AL., 1998).

Bei akutem Stress, vor allem wenn eine aktive Verhaltensantwort gezeigt wird, wird überwiegend das sympathoadrenale System angeregt (CANNON, 1915; FRANKENHAEUSER, 1982; DE BOER ET AL., 1990). Über das periphere sympathische Nervensystem werden

innerhalb von Sekunden die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin ausgeschüttet, die aus den Nervenendigungen des Sympathikus und aus dem Nebennierenmark in die Blutbahn gelangen. Die in der Blutbahn zirkulierenden Katecholamine entfalten daraufhin über α - und β -adrenerge Rezeptoren ihre Wirkung auf die verschiedenen Organe. So erhöhen sie z.B. den Blutdruck und die Herzkontraktionsfrequenz, stimulieren die Atmung, erweitern die Pupillen, vermindern die Darmperistaltik und führen vor allem zur Mobilisierung oxidabler Substanzen wie Glucose (NORMAN UND LITWACK, 1997). Das zentrale Nervensystem schüttet als Reaktion auf Stress ebenso Adrenalin und Noradrenalin aus, deren synthetisierende Neurone primär im Hirnstamm, in Pons und Medulla oblongata, zu finden sind (DAHLSTRÖM UND FUXE, 1964; NIEUWENHUIS, 1985; FLÜGGE, 2000).

Eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HHN) Achse ist dauerhafter und führt zu einer vermehrten Ausschüttung von Glucokortikoiden aus der Nebennierenrinde (Zusammenfassung: DE KLOET ET AL., 1998). Die Nebenniere ist als wichtiger Bestandteil der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) an der Regulation von Stressreaktionen beteiligt. Während der Hypothalamus als übergeordnetes Regelzentrum auf hormoneller Ebene ausschließlich die Ausschüttung von GnRH (Gonadotropin-Releasing-Hormon) reguliert, bewirkt dieses an der Hypophyse eine Freisetzung verschiedener Hormone mit stimulierender Wirkung, u.a. ACTH (Adrenocorticotropes-Hormon). ACTH führt seinerseits zum Anstieg der Cortisolkonzentration durch Stimulation der Nebennierenrinde (NNR), deren histologischer Bau (Z. glomerulosa; Z. fasciculata; Z. reticularis) sich tierartlich unterscheidet. Weitere in der NNR nach ACTH-Stimulation gebildete Hormone sind Aldosteron sowie Steroidhormone.

Die zentrale Kontrolle der Glucokortikoidsekretion wird vorwiegend von parvozellulären neurosekretorischen Neuronen aus dem PVN (Nucleus paraventricularis) gesteuert. Das von diesen Neuronen sekretierte Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) wiederum stimuliert die Bildung und Ausschüttung des adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus der Adenohypophyse (DALLMAN, 1993; HERMAN UND CULLINAN, 1997). ACTH seinerseits stimuliert die Nebennierenrinde zur Ausschüttung der Glucocorticoide Cortisol (Primaten, einschließlich Mensch) und Kortikosteron (Nagetiere). Über den Blutkreislauf gelangen die adrenalen Steroidhormone an die Hypophyse und hemmen dort in Folge einer schnellen negativen Rückkopplung ihre eigene Ausschüttung. Eine weitere zeitverzögerte negative Rückkopplung verläuft zentralnervös gesteuert über den Hypothalamus und Hippocampus ausgehend von einem Durchtritt der zirkulierenden Glucocorticoide über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn (HOLSBOER ET AL., 1992; DALLMAN, 1993; DE KLOET ET AL., 1998).

6.2.2.1 Chronischer Stress

Wie nun beschrieben, bewirkt eine kurzzeitige Aktivierung der limbisch gesteuerten HHN-Achse eine adaptive Rolle bei der Stressreaktion, bei denen die adrenalen Glucocorticoide durch eine direkte oder indirekte Beeinflussung der Genexpression sowie auch der neuronalen elektrischen Aktivität eine entscheidende Rolle spielen (MUNCK ET AL., 1984; JOELS UND DE KLOET, 1992). Unter lang anhaltenden, chronischen Bedingungen jedoch kann Stress von einer adaptiven Reaktion zu einer maladaptiven Belastung mit einer schädigenden Wirkung auf viele Körperfunktionen wie z.B. dem Immunsystem werden (MUNCK ET AL., 1984; COHEN ET AL., 1991). Charakteristisch für eine lang andauernde Stressreaktion ist eine chronische Hyperaktivität der HHN-Achse mit daraus resultierenden erhöhten Glucocorticoidspiegeln (DALLMAN, 1993; DINAN, 1994).

Chronisch erhöhte Glucocorticoid-Konzentrationen haben schädigende Effekte, wie bei Patienten mit Cushing's Syndrom und als Ergebnis lang anhaltender Steroidbehandlung mehrfach nachgewiesen wurde (STARKMAN ET AL., 1992; DUBROVSKY, 1993; KUPERSMITH ET AL., 1994; SECKL UND OLSSON, 1995; LUPIEN UND MCEWEN, 1997). So werden sie auch ursächlich in Verbindung gebracht mit depressiven Erkrankungen oder der Alzheimer-Krankheit (PLOTZKY ET AL., 1998; LUPIEN ET AL., 1999).

Bei der Betrachtung der physiologischen Stressreaktion und resultierenden Verhaltensänderungen sind jedoch die verschiedenen Qualitäten von Stressoren zu berücksichtigen. So ist nachgewiesen worden, dass physischer und psychischer Stress oder ein sozialer Kontext des Stressors Unterschiede in der zentralnervösen Stressreaktion der Tiere zur Folge haben (HERMAN UND CULLINAN, 1997; SGOIFO ET AL., 1997).

RADON ET AL. (2001) stellten keinen Einfluss eines von Mobiltelefonen emittierten Elektromagnetfeldes auf die menschliche Speichelkortisolkonzentration sowie deren Rhythmik fest. Auch in einer Studie von MANN ET AL. (1998B) wurde kein signifikanter Einfluss eines pulsierenden Hochfrequenz-Elektromagnetfeldes auf die menschliche Gehirnaktivität (während des Schlafes) sowie die nächtlichen Hormonkonzentrationen von Cortisol, Wachstumshormon, luteinisierendes Hormon und Melatonin dokumentiert. Dennoch unterschieden sich die Serum-Kortisolkonzentrationen und der zeitliche Konzentrationsverlauf während der jeweils ersten und letzten Stunde der Dunkelphase unter Magnetfeld-Exposition signifikant von den Kontrollgruppen. Auch waren die REM-Schlafdauer und -Häufigkeit unter Magnetfeld-Exposition geringer sowie die Zeitspanne zwischen aufeinander folgenden REM-Phasen länger als unter Kontrollbedingungen. Ältere Untersuchungen an Ratten konnten unter Anwesenheit eines elektromagnetischen Feldes hingegen eine Stimulation der Nebennierenrindenaktivität (z.B. LAI ET AL., 1990), sowie eine Unterdrückung der pinealen Aktivität (REITER UND RICHARDSON, 1992; KATO ET AL., 1993; YELLON, 1994) dokumentieren. In einer weiteren Studie konnte während des Schlafes kein

Einfluss eines pulsierenden Hochfrequenz-Elektromagnetfeldes auf die Herzfrequenz des Menschen festgestellt werden (MANN ET AL., 1998A). Demnach wurde die sympathisch/parasympathische Regulation der Herzfrequenz nicht beeinflusst. Diese Arbeitsgruppe limitierte die Aussagekraft jedoch auf ihre experimentellen Bedingungen, so dass diese Ergebnisse nicht generalisiert und auf beispielsweise ältere Personen oder Patienten mit kardiovaskulären bzw. neuroendokrinen Erkrankungen übertragen werden können. Frühere Studien dieser Gruppe zeigten dagegen eine Verkürzung der Einschlafdauer, sowie eine Verkürzung der REM-Schlafphase (MANN UND RÖSCHKE, 1996), während das EEG im wachen Zustand nicht durch die Anwesenheit eines elektromagnetischen Feldes beeinflusst wurde (RÖSCHKE UND MANN, 1997).

6.2.2.2 Cortisol

Das Glucocorticosteroidhormon Cortisol wird in der Nebennierenrinde (NNR) gebildet. Seine Freisetzung wird, wie oben erwähnt, durch ACTH gefördert, dessen diurnale Variation über den SCN des Hypothalamus (sowie die CRH-Sekretion) reguliert wird (BUIJS UND KALSBECK, 2001; KALSBECK UND BUIJS 2002; BUIJS ET AL. 2003).

Cortisol weist eine Tagesrhythmik auf, die bei nacht- und dämmerungsaktiven Spezies, wie z.B. Ratte, Maus und Hamster durch niedrige Konzentrationen am Morgen sowie ein abendliches oder nächtliches Konzentrationsmaximum charakterisiert ist. Bei tagaktiven Spezies liegt das Konzentrationsmaximum am Morgen vor der Hauptaktivitätsphase der Tiere (z.B. TUPIA; COLLINS ET AL., 1984).

In der Nebennierenrinde wird neben Cortisol auch Kortikosteron gebildet, das ebenso wie Cortisol, die intrazelluläre Energiebereitstellung (Glykogenolyse und Gluconeogenese) fördert. Die beiden Hormone werden nicht bei allen Tierarten zu gleichen Anteilen gebildet, so dass das Konzentrationsverhältnis von Cortisol zu Kortikosteron speziesspezifisch ist. .

Auch die Kortikosteronkonzentration weist einen circadianen Rhythmus auf. KALSBECK ET AL. (2003) konnten bei Ratten nokturnale Plasma-Kortikosteronprofile, sowie auch Plasma-ACTH-Profile nachweisen, deren Konzentrationsmaxima zeitgleich in der Mitte der Nachtphase auftraten. IMAIZUMI ET AL. (1987) wiesen circadiane Rhythmen von Plasma-Kortikosteron, -Aldosteron und -18-HydroxKortikosteron mit einem Konzentrationsmaximum um 20:00 Uhr und einem Minimum um 8:00 Uhr bei Ratten nach.

6.2.2.3 ACTH-Test

Um eine Belastung in Haltungssystemen anzuzeigen, sind physiologisch-biochemische Parameter geeignet. Anhand der Werte und ihrer zeitlichen Anordnung ist feststellbar, in welchem Zusammenhang die Tiere auf ihre Umgebung reagieren. Stress wird mit einer Aktivitätssteigerung des Hypothalamus-Hypophysen-Systems in Zusammenhang gebracht. Dabei kommt es zur Ausschüttung von ACTH (*Adrenocorticotropes Hormon*), welches in der Hypophyse gebildet wird. ACTH ist verantwortlich für die Ausschüttung von corticosteroidalen Hormonen, wie Kortikosterol und Cortisol von der Nebennierenrinde ins Blut.

Der *ACTH-Stimulationstest* dient zur Feststellung einer geänderten Nebennierenrindenaktivität bei chronischer Belastung. Die Behandlung von Tieren mit einer Standarddosis ACTH gleicht dem Einwirken eines akuten Stressors. Der Verlauf der Cortisolsekretion nach Injektion kann Aufschluss über das Stressgeschehen im Organismus geben.

ACTH-Stimulationstest bei der Ratte

Die Bestimmung der systemischen Cortisolkonzentration nach einer exogenen (i.v., i.m.) ACTH-Applikation wird human-, sowie auch veterinärmedizinisch zur Untersuchung der Nebennierenfunktion und routinemäßig zur Diagnostik eines Hypercortizismus, sowie zur Diagnose seines Ursprungs (hypophysär, adrenal) eingesetzt (Details siehe z.B. Kraft/Dürr, Kleintierkrankheiten, UTB Verlag). Ein synthetisches ACTH-Analogon ist Synacthen® (Novartis Pharma, Nürnberg (25 I.E./ml Injektionslösung sowie Synacthen® Depot, 100 I.E./ml Injektionslösung), dessen erste 24 Aminosäuren mit der Aminosäuresequenz des endogenen ACTHs übereinstimmen. Dieses oder entsprechende (Depot-)Präparate einer anderen Firma [(Depot) Synacthen®, Ciba-Geigy] wurden bei Ratten in Dosierungen von 100 µg/kg Körpergewicht (body weight, BW) (HINSON ET AL. 2001, BAMBERG ET AL. 2001) sowie 100 µg/100 µl (HO und VINSON, 1998) oder 7,5 IU/250 g BW (LEHOUX ET AL. 1998) angewendet. In weiteren Untersuchungen an Ratten wurde halbsynthetisches, porcines ACTH[1-39] (Sigma Chemicals Co.) in einer Dosierung von 10 µg/kg oder 20 µg/kg BW verwendet (ZILZ ET AL. 1999, RAFF ET AL. 2003, RAFF ET AL. 2004, LEE ET AL. 2004).

In den Untersuchungen von FRASER ET AL. (2001) und TURNER ET AL. (2001) zur Eignung einer nicht-invasiven Blutdruckmessmethode über eine am Schwanz des Tieres angebrachten Blutdruck-Messmanschette für Ratten sowie durch Telemetrie wurde ACTH in Dosierungen von 0,5 µg/kg BW und 100 mg/kg BW appliziert.

Bei Ratten konzentrieren sich die Untersuchungen zur Applikation von ACTH zur Nebennierenrinden-Stimulation im Gebiet der Grundlagenforschung auf die zelluläre Ebene

der Nebennierenfunktion (z.B. ZILZ ET AL., 1999; HINSON ET AL., 2001; RAFF ET AL., 2003; RAFF ET AL., 2004; LEE ET AL., 2004). Hierbei wurden Tiere unterschiedlicher Altersgruppen verglichen, die unter normoxischen bzw. hypoxischen Bedingungen gehalten wurden. Zur Stimulation der Nebenniere wurden einmalig porcines ACTH[1-39] (Sigma Chemicals Co.) in physiologischer NaCl-Lösung in einer Konzentration von 10 µg/kg BW bei adulten, bzw. von 20 µg/kg BW bei juvenilen Tieren intraperitoneal injiziert (ZILZ ET AL., 1999; RAFF ET AL., 2003; RAFF ET AL., 2004; LEE ET AL., 2004). HINSON ET AL. (2001) setzten ein Depot-Präparat (Depot Synacthen®, Ciba-Geigy, UK) zur subkutanen Injektion in einer Dosis von 100 µg/kg BW/Tag über einen Zeitraum von 7 Tagen ein. In der Untersuchung von LEE ET AL. (2004) erhielten juvenile und adulte Ratten über einen Zeitraum von 1 oder 2 Wochen 2x täglich je 20 µg/kg BW ACTH, während eine weitere Tiergruppe nur während der ersten Woche mit ACTH, und anschließend mit NaCl behandelt wurde. Hierbei zeigte sich, dass die Zunahme des Nebennierengewichts, die Kortikosteronantwort, sowie der Anstieg des „peripheren-Benzodiazepin-Rezeptor-Typs“ (PBR) hinsichtlich der Protein-Konzentration und des PBR-mRNA-Gehalts bei nur einwöchiger ACTH-Applikation reversibel waren, und die Steroidsynthese während der anschließenden NaCl-Applikation normalisiert wurde. Ebenso hatte eine akute einwöchige – im Gegensatz zur chronischen zweiwöchigen – ACTH-Applikation keinen Effekt auf das Gewicht der Nebennierenrinde (LEE ET AL., 2004).

ZILZ ET AL. (1999) verglichen die altersabhängige Entwicklung der PBR-Proteinexpression und der Steroidsynthese zwischen Tieren im Alter von 9-11 Tagen und adulten Tieren und konnten zeigen, dass die verringerte ACTH-Sensitivität sehr junger Ratten mit einer altersabhängigen Expression der für die Steroidhormonsynthese essentiellen Rezeptortypen und -Proteine in Verbindung stand. Zur Bestimmung des Einflusses einer einmaligen intraperitonealen NaCl- bzw. ACTH-Injektion wurden vor der Injektion (Kontrollgruppe), sowie 30, 60, 90 und 120 min. nach der Injektion Blutproben entnommen, und die ACTH- und Kortikosteronkonzentrationen mittels Radioimmunoassay (RIA) bestimmt. Die Blutgewinnung erfolgte mittels Dekapitation. Hierbei konnte im Anschluss an die NaCl-Injektion ein signifikanter Anstieg der Kortikosteronkonzentration festgestellt werden, dessen zeitliches Auftreten altersabhängig war. Er trat bei Tieren im Alter von 5 Tagen erst nach 120 min. auf, während er bei Tieren im Alter von 15 Tagen nach 30 min. und bei adulten Tieren bereits nach 15 min. ausgeprägt war. Das Auftreten dieses Konzentrationsanstiegs wurde im Zusammenhang mit der potentiellen Wahrnehmung der NaCl-Injektion als ‚mildem Stressor‘ diskutiert. Die NaCl-Injektion hatte keinen Einfluss auf die ACTH-Konzentration. Die ACTH-induzierte ACTH-Konzentration war altersunabhängig zu allen Zeitpunkten signifikant höher als die der Kontrollgruppe, während der ACTH-induzierte Anstieg der Kortikosteronkonzentration bei den jungen Tieren signifikant niedriger war als bei den adulten. Die

Kortikosteronkonzentration der adulten Tiere sank 120 min. nach der ACTH-Injektion auf die Basalkonzentration.

RAFF ET AL. (2003) untersuchten den Einfluss einer Hypoxie ab der Geburt auf die ACTH-induzierte Kortikosteronantwort. Die Blutgewinnung erfolgte vor, sowie 15, 30, 45 und 60 min nach intraperitonealer ACTH-Injektion mittels Dekapitation. Tiere, die unter hypoxischen Bedingungen gehalten wurden (12% O₂), wiesen höhere basale, sowie ACTH-induzierte Kortikosteronkonzentrationen auf, als normoxische (21% O₂) Kontrolltiere, während die ACTH-Konzentrationen nicht vom Luftsauerstoffgehalt beeinflusst wurden (RAFF ET AL., 2003, 2004). TORRES ET AL. (2001) untersuchten die Progesteron-, Dihydroprogesteron- und Allopurinolkonzentrationen in Plasma und Gehirn männlicher und weiblicher Ratten, die mit CRH (CRH 1-41, Sigma-Aldrich) oder mit ACTH (1-24, Novartis Pharma) behandelt wurden, und verglichen diese mit einer unbehandelten Kontrollgruppe. Die Blutgewinnung erfolgte 30 min. nach intraperitonealer CRH- bzw. ACTH-Injektion mittels Dekapitation. Die Basiskonzentrationen der weiblichen waren höher als die der männlichen Kontrolltiere. Nach CRH und nach ACTH Applikation wurde bei beiden Geschlechtern ein signifikanter Konzentrationsanstieg beobachtet, was für einen genetischen Unterschied der adrenalen Stressantwort spricht.

HEDGES ET AL. (2003) verglichen im Anschluss an einen „Forced-swim-Test“ Stressparameter zwischen einer Gruppe junger männlicher Ratten, die über 10 Tage eine Transcraniale Magnetische Stimulation (TMS; 3 Sekunden, 15 Hz) erhielten und einer Kontrollgruppe. Sie konnten unmittelbar nach der letzten Exposition bei signifikant erhöhter Schwimmaktivität ebenfalls signifikant erhöhte endogene ACTH- und Kortikosteronkonzentrationen im Plasma der exponierten Tiere feststellen, was möglicherweise im Hinblick auf eine erhöhte akute Anpassung an Stress für einen Einfluss auf die HHN-Achse sprechen könnte, während 1, 3, 5, 7 und 14 Tage nach der letzten Exposition keine Unterschiede mehr auftraten. Hingegen wurden die LH- und Testosteronkonzentrationen zu keinem Zeitpunkt beeinflusst. Die Blutgewinnung erfolgte im direkten Anschluss an den Schwimmtest durch Dekapitation.

LEHOUX ET AL. (1998) verglichen den Einfluss einer einmaligen ACTH-Injektion mit dem einer chronischen ACTH-Injektion über 9 Tage auf die Expression der steroidal Enzyme der Nebenniere bei Ratten. Das Konzentrationsmaximum von ACTH und Kortikosteron im Plasma (sowie der Konzentrationsanstieg des Proteins StAR) traten bei einmaliger ACTH-Injektion 30 bis 60 min. später auf, während die Konzentrationen bei chronischer Injektion über 12h, 24h, 36h und 9 Tage erhöht blieben. Auch in dieser Untersuchung erfolgte die Blutgewinnung mittels Dekapitation.

HINSON ET AL. (2001) wandten die cervicale Dislokation als Tötungsmethode an, während die Studie von HO und VINSON (1998) keine Angaben über die Tötungsmethode enthält. In den

Untersuchungen von LEAL ET AL. (1995, 1999), LEAL UND MOREIRA (1997a) und LEE ET AL. (2004) wurde ebenfalls die Dekapitation zur Blutgewinnung eingesetzt, während FLESHNER ET AL. (1995) und MARQUEZ ET AL. (2004) die Schwanzvene punktierten. Den Ergebnissen von FLESHNER ET AL. (1993) zu folge beginnt der Anstieg der Kortikosteronkonzentration 2-3 min nach Einsetzen des Stressors und sinkt erst 1-2 h nach dessen Ende auf Basalwerte ab. BUIJS ET AL. (1997), WINDLE ET AL. (1998a, b), SAGE ET AL. (2001), KALSBECK ET AL. (2003) sowie ROYO ET AL. (2004) implantierten ihren Versuchsratten Jugulariskatheter zur Blutentnahme im direkten Anschluss an die OP (ROYO ET AL., 2004) bzw. 1-2 Wochen nach der OP, und entnahmen Blutproben vor, sowie 5, 15, 30 und 60 min. nach der Konfrontation mit einer fremden Umgebung (BUIJS ET AL., 1997). Sage et al. (2001) entnahmen vor, sowie während einer Konfrontation mit Stress, bestehend aus einem 120 minütigen Aufenthalt in einer Plastikröhre (Restrainer), nach 15, 30, 45, 60 und 120 min jeweils 0,3 ml Blut.

Da die Nebenniere als wichtiger Bestandteil der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse an der Regulation von Stressreaktionen beteiligt ist, eignet sich das in ihr gebildete Glucocorticoid Cortisol bzw. Kortikosteron - das bei Ratten überwiegende Glucosteroid - für die Untersuchung einer eventuellen chronischen Stressbelastung im elektromagnetischen Feld. Die Glucocorticoid-Inkretion wird von Qualität, Einwirkdauer und Belastungsfrequenz von einwirkenden Stressoren beeinflusst (KAUFMANN UND THUN, 1998). SAKELLARIS UND VERNIKOS-DAELLIS (1975) zeigten, dass chronisch gestresste Ratten nach einer akuten Belastung eine erhöhte Kortikosteronsekretion gegenüber unbelasteten Kontrolltieren aufwiesen. Bei landwirtschaftlichen Nutztieren konnte diese erhöhte NNR-Reaktion an chronisch belasteten Milchkühen und Kälbern durch Untersuchungen von FRIEND ET AL. (1979, 1984) bestätigt werden.

Bei chronischen Belastungen, z.B. Dauerexposition im elektromagnetischen Feld, ist von einer permanent erhöhten Aktivität der Nebenniere auszugehen und der Organismus reagiert auf einen exogenen Stressor mit erhöhter Kortikosteronausschüttung. Die erhöhte Serumkonzentration hält auch länger an (BORELL UND LADEWIG, 1986; REDBO 1992; ROBIA, 1998). Der Verlauf der Kortikosteronkonzentration nach Injektion von ACTH als exogenem Stressor gibt also Aufschluss über das Stressgeschehen im Organismus.

Nach WENZEL ET AL. (2002) steigen unter dem Einfluss eines hochfrequenten elektromagnetischen Feldes von Mobilfunkantennen, die Cortisolkonzentrationen im Speichel von Rindern nach ACTH-Applikation im Vergleich zu einer unbelasteten Kontrollgruppe deutlicher an und fallen langsamer wieder ab. Dies spricht für eine chronische Belastung von Tieren, die hochfrequenten Feldern von Mobilfunkantennen ausgesetzt sind.

6.3 MATERIAL UND METHODE

Die Untersuchungen zum potentiellen Einfluss einer chronischen Exposition mit elektromagnetischen Feldern (GSM, UMTS) auf das Immunsystem und die Stressreaktion von Ratten wurden an 294 weiblichen Tieren durchgeführt.

Drei Rattengenerationen, F0, F1 und F2 wurden exponiert. Die Untersuchungen zu Stress- und Immungeschehen wurden in zwei Rattengenerationen, (F0 und F2) durchgeführt. Die F0-Generation wurde in 2 Gruppen aufgeteilt (F0a und F0b) und unterschiedlich lang exponiert. Die untersuchten Tiere wurden über 24 Wochen (F0b und F2) bzw. über 55 Wochen (F0a) exponiert. Die Tiere der F0a-Gruppe wurden im Alter von 46 Wochen erstmals untersucht, die Tiere der F0b-Gruppe und F2-Generation jeweils im Alter von 13 und 14 Wochen. Sie unterschieden sich somit nur durch die Chronizität ihrer Expositionsdauer.

Aus arbeitstechnischen Gründen waren alle Generationen in je 2 Gruppen unterteilt, die im Abstand von 4 Wochen gezeugt, geboren, sowie untersucht wurden. Somit waren die Tiere beider Gruppen zu Versuchsbeginn sowohl gleich alt, als auch gleich lange exponiert.

Es wurden jeweils 84 Tiere von der kürzer exponierten F0b-Gruppe (27 GSM, 24 UMTS, 33 SHAM) und der länger exponierten F0a-Gruppe (23 GSM, 26 UMTS, 35 SHAM) untersucht. Bei der F2-Gruppe waren es 126 Tiere (42 GSM, 42 UMTS, 42 SHAM).

6.3.1 Allgemeines

Die Regierung von Oberbayern hat das Tierversuchsvorhaben „In vivo-Langzeituntersuchungen des Einflusses elektromagnetischer Felder der Mobilfunkkommunikation im Rattenmodell“ (Vor- und Hauptversuch) unter dem Aktenzeichen Az: 55.2-1-54-2531-91-04 genehmigt.

Die Durchführung des Versuches erfolgte im Auftrag des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit und des Bundesamtes für Strahlenschutz im Rahmen des Projektes „In vivo-Experimente unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation –Langzeituntersuchung“ im Zeitraum Februar 2005 bis Januar 2007. Die hier untersuchten Hochfrequenzbereiche waren das GSM-Netz (Global System for Mobile Communications, 900 MHz) sowie das UMTS-Netz (Universal Mobile Telecommunications System, 1966 MHz), sowie eine Scheinexposition (SHAM).

Die Forschungsnehmer waren der Forschungsverbund Elektromagnetische Verträglichkeit, Mensch und Umwelt (EMVU) der Technischen Universität München und die Ludwig-

Maximilians-Universität München (LMU). Die Räumlichkeiten für die Versuchsdurchführung befanden sich auf dem Gelände der Tierärztlichen Fakultät der LMU.

Die Projektpartner für die Umsetzung des Projektes waren das Institut für Tierschutz, Verhaltenskunde und Tierhygiene (Untersuchungen zur Funktion des Immunsystems, Untersuchungen zur Stressbelastung) und das Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung (Untersuchungen zur kognitiven Leistung, Untersuchungen zur Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke) der Tierärztlichen Fakultät der LMU in Kooperation mit dem Lehrstuhl für Hochfrequenztechnik und dem Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München (Planung und Errichtung der Expositionseinrichtungen, Dosimetrie, technisches Monitoring).

Der Versuch wurde als Doppelblindstudie durchgeführt. Den durchführenden Personen war während des gesamten Versuchszeitraumes nicht bekannt, welcher Strahlungsart (GSM, UMTS, Scheinexposition) die jeweiligen Tiere ausgesetzt waren. Auf diese Weise konnte eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die persönliche Erwartungshaltung der versuchsdurchführenden Personen ausgeschlossen werden.

6.3.2 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Albino-Ratten vom Stamm WISTAR, RjHAN. Die für den Hauptversuch relevanten Tiere wurden als institutseigene Nachzucht in den Expositions-kammern geboren. Die Untersuchungen zur chronischen Stressbelastung wurden an zwei Generationen (F0, F2) nach unterschiedlicher Expositionsdauer, und an unterschiedlichen Altersgruppen durchgeführt (F0b und F2 im Alter von 19 und 20 Wochen, F0a im Alter von 52 Wochen).

Die Ausgangstiere des Versuches wurden im Alter von neun Wochen am 10.05.2005 vom Züchter (Janvier, Le Genest-St-Isle, Frankreich) geliefert.

Um eine eindeutige Identifizierung des Einzeltieres zu gewährleisten, erfolgte die Kennzeichnung der Tiere mittels eines Mikrochip-Transponder-Systems (Alvic-Transponder, ALVETRA GmbH, Neumünster, Deutschland). Die Transponder wurden am 21. Lebenstag subcutan (s.c.) appliziert. Jeder Transpondernummer wurde eine laufende Versuchstiernummer zugeteilt. Zusätzlich erhielt jedes Versuchstier bei Eintritt in den Versuch eine laufende Labornummer (Nr. 1 bis Nr. 294).

In die Untersuchungen wurden ausschließlich weibliche Tiere einbezogen, um Geschlechtseinflüsse auf die diversen Parameter auszuschließen.

Für die immunologischen- und Stressparameter wurden insgesamt 294 Tiere untersucht. Die

Verteilung der Tiere auf die drei Expositionskammern ist aus Tab. 6.1 ersichtlich.

Tabelle 6. 1: Anzahl der Versuchstiere je Gruppe und je Expositionskammer

	GSM	UMTS	SHAM	Gesamt-tierzahl	Expositionsdauer
F0a / Gr. 1	14	14	18	46	55 Wochen
F0a / Gr. 2	9	12	17	38	55 Wochen
F0b / Gr. 1	15	13	15	43	24 Wochen
F0b / Gr. 2	12	11	18	41	24 Wochen
F2 / Gr. 1	21	21	21	63	24 Wochen
F2 / Gr. 2	21	21	21	63	24 Wochen
Gesamt-tierzahl	92	92	110	294	

Detaillierte Angaben über Versuchstiere, Haltungsbedingungen und Vorgaben für die Paarung sind dem Berichtteil 4 „Tierhaltung, Reproduktion und physische Entwicklung zu entnehmen.

6.3.3 Versuchsdurchführung

6.3.3.1 Daten und Belegung der Hochfrequenz-Expositionskammern

Wie bereits in Berichtteil 3 und 4 eingehend beschrieben, wurde die Exposition in drei speziellen vollklimatisierten Hochfrequenz-Expositionskammern (Außenabmessung 3,870 m x 3,870 m x 3,787 m) für die GSM- (900 MHz), UMTS- (1966 MHz) und für die Scheinexposition (SHAM) durchgeführt. Die durchschnittliche Tagesbefeldung ist dem Berichtteil 3 unter 3.5.2 zu entnehmen. Dieser Wert resultierte aus dem Abschalten der Befeldung bei Betreten und während des Aufenthaltes von Personen in den Expositionskammern zur Durchführung von Routinemaßnahmen wie Tierpflege als auch zur Entnahme von Tieren für die Versuchsdurchführung und etwaige Ausfälle von HF-Technischen Komponenten. Zur Gewährleistung einer gleichmäßigen Befeldung und Beleuchtung aller Käfige, erfolgte einmal pro Woche eine Rotation der Käfige, wobei jeder Käfig einen Stellplatz nach rechts und der letzte Käfig einer Etage nach unten bewegt wurde.

Der Käfig in der untersten Etage rechts außen wurde in die oberste Etage links außen gestellt. Die einzelnen Expositionszeiträume sind Tab. 6.2 zu entnehmen. Die Reihenfolge beruht auf der Länge der Exposition.

Tabelle 6.2: Expositionszeiträume, zutreffend für die Untersuchungen der immunologischen und Stressparameter

Gruppe	Expositionsszeitraum	
F0b / Gr. 1	12.08.2005 - 18.01.2006	=159 Tage = 22 Wochen und 5 Tage
F0b / Gr. 2	13.09.2005 - 22.02.2006	= 163 Tage = 23 Wochen und 2 Tage
F0a / Gr. 1	12.08.2005 - 28.08.2006	= 381 Tage = 54 Wochen und 3 Tage
F0a / Gr. 2	13.09.2005 - 02.10.2006	= 385 Tage = 55 Wochen
F2 / Gr. 1	18.06.2006 - 27.11.2006	= 162 Tage = 23 Wochen und 2 Tage
F2 / Gr. 2	23.07.2006 -02.01.2007	= 162 Tage = 23 Wochen und 2 Tage

6.3.4 Immunologische Untersuchungen

Die Untersuchungen des Immunsystems der F0b-Gruppe wurden am 30.11.2005 begonnen und erstreckten sich bis zum 8.02.2006. Die Tiere der F0a-Gruppe wurden vom 19.07.06 bis 27.09.06 immunisiert und beprobt; in der F2-Gruppe lag der Zeitraum zwischen 18.10.06 und 27.12.06.

6.3.4.1 Versuchsaufbau

Zur Untersuchung des Immunsystems wurden die Ratten an Versuchstag 7 mit einer Suspension bestehend aus den Antigenen Ovalbumin (OVA) und Huhn Immunglobulin Y (IgY), sowie einem Lipopeptid-Adjuvans (Pam3CysSerLys4) immunisiert. Blutentnahmen erfolgten an Tag 0, sowie zur Untersuchung des Impferfolgs und des Titeranstiegs der spezifischen Antikörper jeweils an Tag 14 und Tag 35. Die Tiere wurden dabei im Doppelblind-Design immunisiert bzw. beprobt. Die entsprechenden Antikörper (Anti-OVA, Anti-IgY, Gesamt IgG) wurden mittels spezifischen ELISAs (Enzyme-linked-Immunosorbent-Assay) bestimmt.

Nach Abschluss der Immunisierungen wurden die Untersuchungen zum Stressgeschehen begonnen. Diese wurden jeweils täglich durchgeführt. Auch hier wurde entsprechend eines kodierten Versuchsplanes im Doppelblind-Design gearbeitet.

Der Versuchsablauf war bei allen Versuchsgruppen identisch. Um einen Kontrollwert zu erhalten, erfolgte am Tag 0 die erste Blutentnahme. Am Tag 7 wurde die Immunisierung durchgeführt. Die zweite Blutentnahme erfolgte am Tag 14. Eine Boosterung fand am Tag 28 statt und eine dritte Blutentnahme am Tag 35.

Zeitplan:

F0b-Gr.1 Versuchstiere:	28.11.2005 – 04.01.2006
F0b-Gr.2 Versuchstiere:	05.01.2006 – 08.02.2006
F0a-Gr.1 Versuchstiere:	19.07.2006 – 23.08.2006
F0a-Gr.2 Versuchstiere:	23.08.2006 – 27.09.2006
F2-Gr.1 Versuchstiere:	18.10.2006 – 22.11.2006
F2-Gr.2 Versuchstiere:	22.11.2006 – 27.12.2006

6.3.4.2 Versuchsdurchführung

Die Tiere wurden von einer dritten Person in ihren Käfigen in den Untersuchungsraum gebracht, so dass den Blutnehmenden nicht bekannt war, aus welcher Kammer die Tiere stammten (Blindstudie).

Gewinnung der Blutproben

Die Blutentnahme fand am wachen Tier, das von einem Helfer in einem Restraîner fixiert wurde, statt. Dazu wurde zuerst der Schwanz mittels warmen Wassers aufgewärmt, dann mit Hilfe des Perfusionsbestecks Tro-Venuset (Tro-Venuset®, Trodger Medical GmbH, Hamburg, Deutschland) gestaut, das Blut mit BD Microlance™3-Kanülen (24G, 0,55x25mm bzw. 23G, 0,6x30 mm, Becton Dickinson GmbH, Deutschland), von denen der Konus abgebrochen wurde, aus der Schwanzvene entnommen und in 1,5 ml „Original eppendorf® safe-lock cups“ aufgefangen. Jedem Tier wurden ca. 0,5 ml Blut entnommen.

Immunisierung und Boosterung

Bei der Immunisierung und der Boosterung wurden jedem Tier 100 µg OVA, 100 µg IgY und 100 µg Pam₃-Cys-Ser-(Lys)₄ als Adjuvans in 0,2 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) an der Flanke subcutan injiziert. Auch hier war die Herkunft bezüglich der Kammern unbekannt.

Verarbeitung der Blutproben

Dreißig Minuten nach der letzten Blutentnahme wurden die Blutproben 10 min bei 2000 g und 4 °C zentrifugiert (Heraeus Biofuge stratos, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland), dann das Serum in 0,5er „Original eppendorf® safe-lock cups“ abpipettiert und dieses wiederum 5 min bei 4000 g und 15 °C zentrifugiert. Danach wurde das Serum wiederum in 0,2 ml fassende „Original eppendorf® safe-lock cups“ abpipettiert. Von dieser Nativprobe wurden je 10 µl in bereits vorbereitete, mit je 90 µl PBS befüllte Cups eingespült und durchgemischt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries).

Die verdünnten Proben und der Rest der Nativproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

6.3.4.3 ELISA

Die Antikörpertiter wurden mit Hilfe eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests (ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay) untersucht.

Es wurden drei verschiedene ELISA-Tests verwendet. Dabei wurde das Ratten- Gesamt IgG, anti Huhn IgY IgG-Antikörper und anti OVA IgG-Antikörper bestimmt.

Nachweis von Gesamt IgG

A- Beschichtung:

Die ELISA-Platten wurden mit 5 µg/ml Goat Anti-Rat-IgG beschichtet und bei 4 °C über Nacht inkubiert.

B- Blockierung:

Nachdem die Platten mit PBS-Tween gewaschen wurden (Auto Plate Washer, ELX 405, Bio-Tek Instruments, INC., USA), erfolgt die Blockierung durch Pipettierung von je 200 µl 1%igem Magermilchpulver vom Rind (200 mg Milchpulver in 20 ml PBS pro Platte) in jede Delle. Danach werden die Platten eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

C- Probenauftrag:

Die Platten werden wiederum gewaschen.

Als Blank wurde PBS-Tween verwendet. Die Proben und der Pool werden 1:1.000 verdünnt (5 µl der 1:10 vorverdünnten Proben in 495 µl PBS-Tween) und jeweils 100 µl in die entsprechenden Dellen pipettiert. Als Standard wurden 1,45 µg/ml Ratte IgG (Sigma I 4131) verwendet. Danach erfolgte eine log₂-Verdünnung und eine einstündige Inkubation bei 37 °C.

D- Konjugat:

Nach erneutem Waschen wurde als Konjugat Goat Anti-Rat-IgG-POD (Sigma A9037) in einer Konzentration von 1:50.000 verwendet, je 100 µl in jede Delle pipettiert und erneut eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

E- TMB:

Die Platten wurden nochmals gewaschen und danach je 100 µl TMB (Tetramethyl-benzidin)-Substrat (10 ml warmer TMB-Puffer + 322 µl TMB-Stock + 3 µl H₂O₂/Platte) zugefügt. Nach 10 Minuten Reaktionszeit in Dunkelheit wurde als Stopplösung je 50 µl 1molare H₂SO₄ dazugegeben und die Extinktion bei 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge bei 595 nm).

6.3.4.4 Nachweis von OVA und Huhn IgY

Zusammenfassende Darstellung (vgl. Nachweis von Gesamt IgG):

1. Beschichtung: 5 µg/ml OVA (Grade V: Sigma A5503) bzw. Huhn IgY (Bio Trend 003-0102)
2. Inkubation bei 4 °C über Nacht
3. Waschen

4. Probenauftrag und log₂-Verdünnung: Proben von geboosterten Ratten 1:1.000 (5 μ l 1:10 vorverdünnte Probe in 495 μ l PBS-Tween), Proben von ungeimpften und einmal geimpften Tieren 1:100 (50 μ l 1:10 vorverdünnte Probe in 450 μ l PBS-Tween). Bei den Gruppen F0a und F2 wurden alle Proben 1:500 verdünnt (10 μ l 1:10 vorverdünnte Probe in 490 μ l PBS-Tween).

Als Standard wurde ein Ratten-Serum-Pool drei Wochen nach der Boosterung (09.03.06) 1:100 verwendet.

5. Inkubation bei 37°C eine Stunde
6. Waschen
7. Konjugat: 1:20.000 Goat μ Rat-IgG-POD
8. Inkubation bei 37°C eine Stunde
9. Waschen
10. TMB-Substrat-Gabe
11. H₂SO₄-Gabe
12. Messung

Zusammensetzung der verwendeten Chemikalien:

- Beschichtungspuffer: für 1 Liter: 3,11 g Natriumcarbonat (Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland), 6 g Natriumhydrogencarbonat (Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland), Monodest ad 1 l; pH 9,6
- PBS: für 1 Liter: Natriumchlorid (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland) 8 g, Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) 1,45 g, Kaliumdihydrogenphosphat (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) 0,20 g, Kaliumchlorid (Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland) 0,20 g, Monodest ad 1l; pH 7,2
- PBS-Tween: für 1 l: zu PBS 500 μ l Tween 20 zugeben; pH 7,2
- TMB-Puffer: für 1 l: Natriumacetat (Merck KG aA, Darmstadt, Deutschland) 8,20 g, Citronensäure-Monohydrat (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) 3,15 g, Monodest ad 1 l; pH 5,0
 - TMB für 10 ml: 60 mg Tetramethylbenzidin, 10 ml Dimethylsulfoxid, 500 ml H₂SO₄, 27,8 ml 96- prozentige H₂SO₄, Monodest ad 500 ml

Berechnung des Titers

Die Berechnung des Titers erfolgte mit Hilfe des Programms Microwin 2000.

- Gesamt IgG: mit Hilfe des Interceptbereichs wird der Mittelwert errechnet.
- B- OVA/BSA und Huhn IgY:

Die optimale optische Dichte (OD) wurde bei 0,5 festgelegt. Damit wurde die Elisaeinheit nach folgenden Formeln errechnet:

$$t = x \cdot (a - L) / (H - L)$$

$$E = b \cdot 2^t$$

T=Titer, x=Verdünnungsstufe unter der optimalen OD, a=Optimale OD, L=Extinktion unter der optimalen OD, H=Extinktion über der optimalen OD , E=ELISA-Einheit, b=Vorverdünnung

Aus allen errechneten Standards eines Probendurchlaufs wird der Mittelwert von „t“ errechnet. Mit Hilfe jedes einzelnen Standards (t) einer Platte und des Mittelwert-Standards wird für jede einzelne Platte ein Korrekturfaktor errechnet, mit dem die natürlichen Schwankungen von Platte zu Platte korrigiert werden sollen (Korrekturfaktor = MW Std-t/Std-t). Jedes Ergebnis der Proben, Standards und Pools wird durch Multiplikation mit dem Korrekturfaktor korrigiert. Der Standardwert sollte dann genau dem Mittelwert-Standard entsprechen.

Der korrigierte E-Wert wird in einer logarithmischen Schreibweise dargestellt.

6.3.5 Untersuchungen zum Stressgeschehen

6.3.5.1 Vorversuch

Zielsetzung

Ziel der Vorversuche war es, den Einfluss einer Inhalationsnarkose und des routinemäßigen Handlings auf das Stressgeschehen der Ratte zu bestimmen. Da die Blutentnahmen im Hauptversuch aus Gründen der einfacheren und für die Tiere weniger belastenden Methode in Narkose durchgeführt werden sollten, wurde im Vorversuch der potentielle Stressor „Narkose“ untersucht.

Dabei wurde der Einfluss zweier Inhalationsnarkotika (Isofluran versus Halothan) auf die im Blutserum bestimmten Kortikosteronwerte überprüft. Isofluran ist ein halogenerter Ether von etherartigem stechendem Geruch. Isofluran erzeugt eine gute hypnotische, gute

muskelrelaxierende und schwache analgetische Wirkung (Schulte am Esch et al. 2000) und hat nur eine geringe hirndrucksteigernde Wirkung. Isofluran ist nicht so kreislaufftoxisch wie Halothan, weshalb es als Monoanästhesie gut einsetzbar ist. Es ist in Deutschland für die Verwendung bei nicht lebensmittelliefernden Tieren zugelassen (Erhardt et al. 2004).

Halothan ist ein halogener Kohlenwasserstoff mit einem mild etherartigen Geruch. Halothan dämpft das gesamte ZNS und hat eine schwach muskelrelaxierende, gute hypnotische und gute bronchodilatierende Wirkung (Schulte am Esch et al. 2000). Mit Halothan wird nach Ausschalten des Bewusstseins Schmerzfreiheit erreicht (Büch und Büch, 1998), jedoch verursacht es dosisabhängig massive Herz-Kreislauf-Depressionen mit einer stark atemdepressiven Komponente. Es ist somit als Monoästhetikum nicht gut geeignet (Erhardt et al. 2004). Halothan ist als Tierarzneimittel in Deutschland nicht mehr zugelassen.

Die Auswahl dieser beiden Inhalationsnarkotika ergab sich zum Einen, da Isofluran wie oben erwähnt ein gutes Monoanästhetikum darstellt, das auch über einen längeren Zeitraum (hier nach 120 min letzte Blutentnahme) gut steuerbar ist. Zum anderen wurde Halothan gewählt, da es einen eher milden Geruch hat und Erfahrungsberichten zufolge, Ratten beim Einatmen von Isofluran Abwehrreaktionen zeigen, das Prozedere des in Narkoselegens jedoch so schnell und stressfrei wie möglich erfolgen sollte.

Für die Versuchsdurchführung wurden drei Versuchsgruppen festgelegt:

in Versuchsgruppe 1 erfolgte die Blutentnahme unter Isofluran- und in Versuchsgruppe 2 unter Halothan-Narkose. In Versuchsgruppe 3, die zur Festlegung der Referenzwerte als Kontrollgruppe diente, erfolgte die Blutprobenentnahme am wachen Tier. Alle Tiere erfuhren in der Versuchsvorbereitungsphase über 15 Wochen eine Gewöhnung an die versuchsbedingten Manipulationen.

Versuchsvorbereitung und „Handling“

Um einen Einfluss der versuchsbedingten Manipulationen am Tier auf das Stressgeschehen zu minimieren, wurden alle Tiere in der Versuchsvorbereitungsphase zweimal wöchentlich jeweils zehn Minuten „gehandelt“. Das Wort „Handling“ leitet sich aus dem englischen „to handle“ (handhaben) ab und bezeichnet eigentlich die Art des Umgangs von Tierpflegern und Experimentatoren mit Tieren (WIESNER UND RIBBECK, 2000). Es kann aber auch Maßnahmen bezeichnen, die dazu dienen, Tiere an bestimmte Prozeduren zu gewöhnen (MAURER, 2005).

Das „Handling“-Programm umfasste das Aufnehmen der Tiere in die Hand, das Betasten des Bauches und durch Hochheben einer Hautfalte die Simulation einer intraperitonealen (i.p.) Injektion, die sanfte Fixierung der Gliedmaßen und des Schwanzes, die manuelle Fixierung der Tiere zur Injektion sowie das Verbringen der Tiere in die Narkoseröhre und den

Restrainer zur Blutentnahme. Die Tiere hatten während des Vorganges die Möglichkeit, mit Händen und Armen des Untersuchers Kontakt aufzunehmen. Während des Handlings wurde zusätzlich das Verhalten der Tiere hinsichtlich Allgemeinbefinden und genereller Aktivität (aktive/passive Kontaktaufnahme gegenüber Gegenständen/Personen, Neugier-/Meideverhalten, Klettern, Balancieren) beurteilt.

Versuchstiere

Bei den Versuchstieren des Vorversuchs handelte es sich um 57 weibliche Albino-Ratten vom Stamm WISTAR, RjHAN, die am 14.02.2005 im Alter von drei Wochen aus Frankreich (Janvier, Le Genest-St-Isle, Frankreich) geliefert wurden.

Die blutverwandten Tiere einer Transportbox wurden auf drei Versuchstierkäfige verteilt. Die Tiere verschiedener Transportboxen waren nicht verwandt. Die Tiere eines Versuchstierkäfigs waren demnach nicht verwandt.

Um eine eindeutige Identifizierung des Einzeltieres innerhalb eines Käfigs zu gewährleisten, erfolgte die Kennzeichnung der Tiere mittels Ohrlochung (Tier A: Lochung im rechten Ohr, Tier B: Lochung im linken Ohr, Tier C: keine Lochung).

Das Körpergewicht (angegeben als Mittelwert \pm Standardabweichung) $\bar{x} \pm s$ in g betrug zu Versuchsbeginn im Alter von 20 Wochen $272,4 \pm 21,4$ g.

Insgesamt wurden 51 Tiere untersucht. Sechs der insgesamt 57 Versuchstiere dienten als Reservetiere. Die Verteilung der Tiere auf die einzelnen Versuchsgruppen ist Tab. 6.3 zu entnehmen.

Tabelle 6.3: Anzahl der Versuchstiere je Versuchsgruppe

	Anzahl der Versuchstiere
Versuchsgruppe 1 (Isofluran)	11
Versuchsgruppe 2 (Halothan)	10
Versuchsgruppe 3 (wache Tiere)	30
Reservetiere	6
Gesamttierzahl	57

Haltungsbedingungen

Käfige und Belegungsdichte

Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolon®-Typ IV-Käfigen mit erhöhtem Deckel (54 cm x 32 cm x 24,5 cm). Die Käfige befanden sich in drei übereinander liegenden Etagen eines Cage Racks (Käfiggestell) aus Metall. Es wurden jeweils drei weibliche Tiere in einem Käfig gehalten. Daraus ergaben sich insgesamt 19 Käfige zu je drei Tieren.

Futter und Einstreu

Als Futter diente Haltungsfutter für Ratten und Mäuse (ssniff R/M-Haltung, 10 mm, ssniff Spezialitäten GmbH, Soest, Deutschland). Die Fütterung erfolgte ad libitum. Die Wasserversorgung erfolgte ad libitum über Nippeltränken (Fassungsvermögen 700 ml) mit kommunalem Leitungswasser.

Als Einstreu wurde Weichholzgranulat (altromin Animal Bedding Granulat, Altromin GmbH, Lage-Lippe, Deutschland) verwendet. Zur Beschäftigung erhielten die Tiere einige Streifen Zellstoff (Zellstoff in Ballen, ungebleichte Qualität, 40 cm x 60 cm, Wirtschaftsgenossenschaft deutscher Tierärzte eG, Garbsen, Deutschland).

Klima

Die Versuchstiere wurden unter Standardbedingungen bei einer Raumtemperatur von 21 °C (± 2 °C) und einer Luftfeuchte von 55 % (± 10 %) gehalten.

Lichtprogramm

Die Lichtintensität betrug während der zwölfstündigen Tagphase (7.00 bis 19.00 Uhr MEZ) 55 ± 5 Lux, während der Nachtphase (19.00 bis 7.00 Uhr MEZ) Null Lux. Das Lichtprogramm wurde automatisch zeitgesteuert. Um eine gleichmäßige Beleuchtung der Käfige zu erreichen, wurden die Käfige einmal wöchentlich rotiert, indem die Käfige eine Etage höher gestellt wurden.

Pflege und Gesundheit

Es erfolgte eine tägliche, adspektorische Kontrolle der Versuchstiere, des zur Verfügung stehenden Futters und des Trinkwasservorrates. Zur Überprüfung und Dokumentation des Gesundheitszustandes wurden die Tiere einmal pro Woche gewogen und dabei auf klinisch sichtbare Krankheitszeichen überprüft.

Die Tierpflege wurde einmal pro Woche durchgeführt. Dabei wurden die Käfige entleert und nach Reinigung mit neuer Einstreu befüllt. Ein Wasserwechsel fand zweimal pro Woche statt.

Der Umgang mit den Versuchstieren erfolgte unter standardisierten Hygienemaßnahmen

(Schuhwechsel, Händereinigung und -desinfektion, Schutzkleidung, Mundschutz, OP-Haube).

Versuchszeitplan

Das Handlingprogramm erfolgte vom 28.02. bis zum 10.06.2005.

Die chronologische Abfolge der durchgeführten ACTH-Tests ist Tab. 6.4 zu entnehmen.

Tabelle 6.4: Zeiträume der durchgeführten ACTH-Tests (Vorversuch)

	Zeiträume der ACTH-Tests
Versuchsgruppe 1 (Isofluran)	13.06.2005 - 16.06.2005
Versuchsgruppe 2 (Halothan)	21.06.2005 - 24.06.2005
Versuchsgruppe 3 (wache Tiere)	28.06.2005 - 05.07.2005

Gewinnung der Blutproben und ACTH-Applikation (Adreno-Corticotropes-Hormon)

Die intraperitoneale ACTH-Applikation sowie die Gewinnung der Blutproben der narkotisierten Tiere wurde analog zum Hauptversuch durchgeführt (siehe 3.3.6).

Zur Gewinnung der Blutproben am wachen Tiere wurden die Tiere in Zwangsröhren (Restrainer) aus Plexiglas verbracht. Eine Hilfsperson fixierte die Tiere im Restrainer während eine zweite Person aus einer der Schwanzvenen (Vv. coccygeae) die Blutprobenentnahme durchführte.

Entnahmezeitpunkte der Blutproben

Die Entnahmezeitpunkte der narkotisierten Tiere (t0, t15, t30, t45, t60, t90, t120) entsprachen denen des Hauptversuchs (siehe 3.3.7). Bei den wachen Tieren erfolgte jeweils eine Entnahme vor ACTH-Applikation (t0), sowie zu einem einzigen weiteren Zeitpunkt (t15, t30, t60 oder t120).

Verarbeitung und Lagerung der Blutproben

Verarbeitung und Lagerung der Blutproben erfolgten analog zum Hauptversuch (siehe 6.3.5.2).

Probenmessung des Kortikosterons

Fremdanalyse

Die Fremdanalyse wurde durch das Institut für Biochemie der Veterinärmedizinischen Universität Wien (Veterinärplatz 1, 1210 Wien, Österreich) durchgeführt. Die Analyse erfolgte mittels eines kompetitiven ELISAs.

Eigene Analyse

Die eigene Analyse wurde mittels eines kommerziellen ELISAs analog zum Hauptversuch durchgeführt.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Vorversuche zeigten in allen Versuchsgruppen nach intraperitonealer Applikation von 100 µg ACTH je kg Körpergewicht einen signifikanten Anstieg der Corticosteronkonzentration. Die Narkose per se hatte keinen signifikanten Einfluss auf die basale Serum-Corticosteronkonzentration. Auch der jeweilige Konzentrationsanstieg unterschied sich nicht zwischen narkotisierten und wachen Tieren, sodass die Untersuchung narkotisierter Tiere als geeignet beurteilt werden konnte, und daher in den Hauptversuchen angewandt wurde. Da sich die beiden Narkotika hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Corticosteronkonzentration nicht unterschieden, wurde in den Hauptversuchen Isofluran verwendet. Diese Ergebnisse wurden im Rahmen des Biologiekolloquiums vom 11./12. **Oktober 2005** im BfS präsentiert.

6.3.5.2 Hauptversuch zum Stressgeschehen

Vorangegangene Untersuchungen

Zum Zeitpunkt des ACTH-Tests waren alle Tiere bereits einer Immunisierung über 35 Tage unterzogen worden, die Bestandteil des Versuchsteiles „Potentielle Beeinflussung des Immunsystems“ war. Bei den Tieren der F0b Gruppe war dies die einzige vorangegangene Untersuchung. Bei einem Teil der F0a Gruppe hat sowohl ein Verhaltenstest (GSM-Kammer: 11 Tiere, UMTS-Kammer: 10 Tiere, Sham-Kammer: 9 Tiere) als auch Verpaarung, Trächtigkeit und Jungtieraufzucht stattgefunden (GSM-Kammer: 10 Tiere, UMTS-Kammer: 14 Tiere, Sham-Kammer: 13 Tiere). Bei sieben Tieren ging dem Einsatz als Zuchttier kein Verhaltenstest voran. Die Zeitpunkte der ACTH-Tests wurden so gewählt, dass zwischen den Blutentnahmen für die Bestimmung der speziellen Parameter des Immunsystems und anderen Maßnahmen und dem ACTH-Test mindestens zwei Wochen dazwischen lagen, um einen möglichen Einfluss auf das Stressgeschehen auszuschließen.

Versuchszeitplan

Die chronologische Abfolge der Versuche ist der Tabelle 6.5 zu entnehmen.

Tabelle 6.5: Zeiträume der durchgeführten ACTH-Tests (Hauptversuch)

	Zeiträume der ACTH-Tests
F0b / Gr. 1	18.01.2006 - 01.02.2006
F0b / Gr. 2	22.02.2006 - 09.03.2006
F0a / Gr. 1	28.08.2006 - 12.09.2006
F0a / Gr. 2	02.10.2006 - 17.10.2006
F2 / Gr. 1	27.11.2006 - 17.12.2006
F2 / Gr. 2	02.01.2007 – 22.01.2007

Gewinnung der Blutproben und ACTH-Applikation

Die Blutentnahmen wurden zwischen 9.00 und 11.00 Uhr MEZ (Mittleuropäischer Zeit) jeweils an den Tieren eines Käfigs (zwei bis drei Tiere) durchgeführt.

Um die „Verblindung“ der an der Probenentnahme beteiligten Personen zu gewährleisten, brachte eine dritte, unabhängige Person die Tiere nach Bestimmung des jeweiligen aktuellen Körpergewichtes in den Untersuchungsraum.

Die Tiere wurden zur Blutentnahme mittels Inhalationsanästhesie narkotisiert (Narkosegerät: Völker GmbH, Kaltenkirchen, Deutschland). Bei dem verwendeten Narkosemittel handelte es sich um Isofluran (Isoba[®], Essex Tierarznei, München, Deutschland), wobei Sauerstoff als Trägersubstanz verwendet wurde (Sauerstoff für medizinische Zwecke, Westfalen AG, Münster, Deutschland).

Zur Narkoseeinleitung wurden jeweils die Tiere eines Versuchskäfigs in eine Plexiglasröhre verbracht. Diese wurde im Vorfeld, um eine schnelle Narkoseeinleitung zu gewährleisten, zehn Minuten mit Isofluran (5 %) vorgeflutet. Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte individuell über Kopfkammern aus Plexiglas, in die die Tiere nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe überführt wurden (s. Abbildung 6.1 und 6.2).



Abbildung 6.1:

Narkoseeinleitung in vorgefluteter Plexiglasröhre



Abbildung 6.2:

Narkosefortführung an individuellen Kopfkammern

Vor der Blutentnahme am dann narkotisierten Tier wurde der Schwanz durch Eintauchen in warmes Wasser angewärmt (bei ca. 37°C für 60 Sekunden), um eine Gefäßdilatation zu erreichen. Die Venen wurden dann durch Anlegen eines Stauschlauches an der Schwanzbasis gestaut. Als Stauschlauch diente das Perfusionsbesteck Tro-Venoset[®] (Tro-Venoset[®], Trodge Medical GmbH, Hamburg, Deutschland).

Die Entnahme der Blutproben erfolgte aus den Schwanzvenen (Vv. coccygeae). Von den zur Blutentnahme verwendeten Kanülen (BD Microlance[™] 3, 24 G, 0,55 mm x 25 mm, Becton Dickinson GmbH, Deutschland) wurde vor der Entnahme - zur Verhinderung einer Gerinnung des Blutes - der Kunststoffkonus abgebrochen. Den Tieren wurde pro Entnahmezeitpunkt ein

Blutvolumen von ca. 0,5 ml entnommen.

Als standardisierter Stressor wurde ACTH (Adreno-Corticotropes-Hormon) eingesetzt. Hierzu wurde synthetisches ACTH (Synacthen \square , Tetracosactid-hexaacetat, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg, Deutschland) bezogen. Die ACTH-Applikation erfolgte in einer Dosierung von 100 μ g / kg Körpergewicht. Um eine präzise Dosierung vornehmen zu können, wurde mit isotonischer Natriumchloridlösung eine Verdünnung von 1:4 hergestellt (Isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. vet., DeltaSelect GmbH, Pfullingen, Deutschland). Durch die Verdünnung ergab sich eine Applikationsmenge von 0,2 ml / 100 g Körpergewicht. Die ACTH-Injektion erfolgte intraperitoneal (BD MicrolanceTM 3, 23 G, 0,6 mm x 30 mm, Becton Dickinson GmbH, Deutschland) im Bereich der rechten Schenkelfalte unmittelbar nach der ersten Blutentnahme.

Um ein ausreichendes Blutvolumen für den Pool als konstanten Vergleichswert des ELISAs zu erhalten, wurde ein Teil der Tiere nach Beendigung der Blutentnahme mittels Guillotine (Herkunft: Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) dekapitiert und ihr Blut in Reagenzgläsern aufgefangen.

Nach Beendigung des ACTH-Tests wurden die überlebenden Tiere aus dem Versuch ausgeschlossen.

Entnahmezeitpunkte der Blutproben

Die erste Blutentnahme erfolgte zum Zeitpunkt t₀ vor ACTH-Injektion (Synacthen \square verdünnt) bei allen Tieren jeweils um 9.00 Uhr MEZ. Alle weiteren Entnahmen erfolgten 15 (t₁₅), 30 (t₃₀), 45 (t₄₅), 60 (t₆₀), 90 (t₉₀) und 120 (t₁₂₀) Minuten nach der ACTH-Injektion.

Blutprobenverarbeitung und Probenmessung mittels ELISA

Die Zentrifugation und weitere Verarbeitung erfolgt 30 bis 45 Minuten nach der letzten Blutentnahme (t₁₂₀).

1. Probenzentrifugation (10 min, 2000 g, 4°C, Biofuge stratos, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland)
2. Pipettieren des Serums in 0,5 ml Eppendorf Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
3. Probenzentrifugation (5 min, 4000 g, 15°C, Biofuge stratos, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland)

4. Aliquotieren der Serumproben in Portionen zu 100 µl in Eppendorf Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
5. Lagerung der Serumproben bei -20°C

Herstellung des Serumpools

Zur Gewinnung des Pools wurden die durch Dekapitation gewonnenen Blutproben verwendet.

1. Probenzentrifugation (10 min., 2000 g, 4°C, Biofuge stratos, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland)
2. Pipettieren des Serums in ml Cups
3. Probenzentrifugation (5 min., 4000 g, 15°C, Biofuge stratos, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland)
4. alle Serumproben wurden in einen 15 ml Falcon pipettiert und vermischt (Vortex-Genie 2, Scientific Industries)
6. Pipettieren der Serumproben in Portionen von je 80 µl in Eppendorf Tubes (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland)
5. Lagerung der Poolproben bei -20°C

Probenmessung des Kortikosterons mittels ELISA

Prinzip des ELISAs

Die Messung des Kortikosterons erfolgte mittels eines indirekten kompetitiven, kommerziell erhältlichen ELISAs (Active□ Rat Kortikosteroone, DSL-10-81100) und wurde von der Firma Diagnostic Systems Laboratories Inc. (Texas, USA) hergestellt.

Die ELISA-Platte war mit einer definierten Menge Antikörper (Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG) beschichtet. Das Antiserum mit spezifischem Antikörper (Kaninchen-Anti-Ratte-Kortikosteron-Antikörper), das hinzu gegeben wird, bindet an den Beschichtungsantikörper. Das Probenkortikosteron im Rattenserum und ein Peroxidase-markiertes Antigen konkurrieren um die Bindungsstellen dieses spezifischen Antikörpers. Bei einer niedrigen Konzentration an nativem Kortikosteron in der Ratten-Serumprobe kann folglich eine größere Menge des Peroxidase-markierten Antigens binden. Durch einen Waschvorgang werden nach einer Inkubationszeit ungebundene Antigene entfernt.

Durch Zugabe eines Chromogensubstrates entsteht eine blaue Färbung. Diese Reaktion wird durch Zugabe von Schwefelsäure gestoppt und resultiert in einen Farbumschlag nach gelb.

Zur Bestimmung der nativen Kortikosteronkonzentration in den Serumproben der Versuchstiere wird mit einem Plattenphotometer die optische Dichte bei 450 nm gemessen, die indirekt proportional zur Kortikosteronkonzentration der untersuchten Proben ist.

Durchführung des ELISAs

Die Durchführung des ELISAs (Active \square Rat Kortikosterone EIA, DSL-10-81100, Diagnostic Systems Laboratories, Inc., Texas, USA) erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

1. Serumproben und ELISA-Reagenzien auf Raumtemperatur ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) bringen
2. alle Serumproben und Reagenzien sind vor Gebrauch zu mischen (Vortex-Genie 2, Scientific Industries)
3. Pipettieren (Finnpipette \square und Finntip \square , Thermo Electron corporation) der Standardlösungen mit vorgegebener Kortikosteronkonzentration, der Kontrollen, des Pools und der Serumproben in die entsprechenden Kavitäten
4. Herstellung der Kortikosteron-Enzym-Konjugat-Lösung
5. Zugabe der Enzym-Konjugat-Lösung in alle Kavitäten
6. Pipettieren (Finnpipette \square , Labsystems) des Antiserums in alle Kavitäten
7. 60 min Inkubation auf Shaker (MS1 Minishaker, IKA \square , IKA-Works, INC.) bei 500 rpm
8. gesamte Platte fünfmal in Folge mit Waschlösung mittels plate-washer (Auto Plate Washer, ELX 405, Bio-Tek Instruments, INC., USA) waschen und Flüssigkeitsreste stets vollständig entfernen
9. Pipettieren (Finnpipette \square , Labsystems) der TMB-Lösung in alle Kavitäten
10. 15-20 min Dunkel-Inkubation auf dem Shaker (MS1 Minishaker, IKA \square , IKA-Works, INC.) bei 500 rpm
11. Pipettieren (Finnpipette \square , Labsystems) der Stopp-Lösung in alle Kavitäten
12. Photometrische Absorptionsmessung bei 450 nm mittels des Absorptionsmessgerätes GENios (Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland)
13. die Erstellung der Standardkurve erfolgte mittels Mikrowin 2000 Software (Mikrotek

Laborsysteme GmbH, Overath, Deutschland)

Die genauen Mengenangaben der jeweiligen Reagenzien sind den Herstellerangaben des Elisas zu entnehmen.

Eine ELISA-Platte umfasste 96 Kavitäten. Die Kavitäten wurden jeweils mit Doppelansätzen befüllt. Es ergab sich daraus folgende Bestückung der Kavitäten: zwölf Kavitäten mit Standard-Reagenzien, vier Kavitäten mit Kontroll-Reagenzien, zwei Kavitäten mit Poolproben, 70 Kavitäten mit Serumproben und acht Kavitäten mit Wiederholungen von früheren Platten.

Pro Platte konnten die Kortikosteronwerte von fünf Tieren bestimmt werden (sieben Serumproben je Tier im Doppelansatz), wobei auf einer Platte ausschließlich die Werte von Tieren aus der gleichen Expositionskammer bestimmt wurden.

Messungen, deren Einzelwerte eine Variation von $> 20\%$ aufwiesen, oder die außerhalb des Optimalbereichs der Standardkurve lagen, wurden wiederholt. Aus den beiden Einzelwerten wurde jeweils der Mittelwert gebildet, und statistisch ausgewertet.

6.3.6 Statistische Methoden der Beschreibung und Analyse

Die biometrische Planung des Hauptversuchs und die Auswahl der statistischen Testverfahren erfolgte anhand eines biometrischen Gutachtens des Instituts für Statistik (StaBLab) der LMU München. Die statistischen Tests wurden mittels SPSS 14 durchgeführt.

6.3.6.1 Deskriptive statistische Verfahren

Für die Vorgaben einer beschreibenden Statistik für die Ergebnisse gilt Gleiches wie bei dem Teilbericht 5 „Kognition“. Neben Tabellen mit Angaben des Stichprobenumfangs n , des arithmetischen Mittelwerts \bar{x} und der Standard-Abweichung SD finden sich Abbildungen als Balkendiagramme oder Box Plots. Diese wurden mit Hilfe des Programms SigmaPlot 9.0 erstellt. In ihnen sind jeweils Mittelwert und Standard Error of the Mean (SEM) angegeben.

6.3.6.2 Analytische Verfahren und Ergebnisinterpretation

Vorversuche

Die statistischen Tests wurden mittels SPSS 14 durchgeführt, die Berechnung der Area Under Curve (AUC) des Kortikosteron erfolgte mittels SigmaStat 3.0. Zur statistischen Auswertung wurde der unpaired t-Test mit Bonferroni-Korrektur herangezogen.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit $p < 0,05$ als signifikant beurteilt.

Hauptversuche

Da eine Unabhängigkeit des Zeitfehlers nicht gegeben war, wurde das so genannte „gemischte Modell“ angewendet. Bei diesem Verfahren wird jedem Tier ein Intercept zugewiesen. Dies führt dazu, dass die Fehler unabhängig werden. Außerdem wurde jedem Messwert ein Rang zugewiesen, was dazu führt, dass keine Ausreißer auftreten. Im Ergebnisteil werden nur die Ränge zitiert.

Als AUC wurde die Fläche definiert, die einerseits durch den Kurvenverlauf der Kortikosteronkonzentration und andererseits durch eine Parallele zur x-Achse durch den y-Achsen-Schnittpunkt (Serumkortikosteronkonzentration zum Zeitpunkt t_0) festgelegt wurde. Bei der statistischen Auswertung der Serumkortikosteronkonzentrationen der einzelnen Gruppe wurde mit jeweils einer univariaten Varianzanalyse untersucht, welchen Einfluss die Expositionsart und die Gruppe in einer bestimmten Gruppe hat: Die Zielgrößen waren: die Kortikosteronkonzentration zum Zeitpunkt t_0 (cort t_0), die Differenz zwischen der maximalen Kortikosteronkonzentration und der Kortikosteronkonzentration zum Zeitpunkt t_0 (Cort_Diff_Max_Basal) und die Größe der AUC.

Zusätzlich erfolgte eine statistische Auswertung der Zeitpunkte, an denen die Einzeltiere ihre maximale Serumkortikosteronkonzentration erreichten. Ein potentieller Einfluss der Blutentnahmedauer auf die Serumkortikosteronkonzentration wurde ebenfalls untersucht.

Bei dem durchgeführten Test handelte es sich um einen F-Test. Ergab der F-Test eine Signifikanz, so wurde zusätzlich ein T-Test durchgeführt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit $p < 0,05$ als signifikant beurteilt.

Aufgrund der Tatsache, dass die Daten für eine Varianzanalyse in der Regel aus einer Zufallsstichprobe stammen, können sich Unterschiede zwischen den Gruppenmittelwerten in der Stichprobe auch rein zufällig ergeben. Mit dem varianzanalytischen F-Test kann im Anschluss an die Streuungserlegung überprüft werden, ob die gefundenen Effekte auch tatsächlich signifikant sind. Geprüft wurde nach der Nullhypothese.

6.3.7 Definition der im Ergebnisteil verwendeten Begriffe und Abkürzungen

Basalkonzentration: Kortikosteronkonzentration zum Zeitpunkt der ersten Blutentnahme zum Zeitpunkt t_0

Maximalkonzentration: die Kortikosteronkonzentration, die in der Reihe der sieben Blutentnahmen (t_0 , 15, t_{30} , t_{45} , t_{60} , t_{90} , t_{120}) den höchsten absoluten Wert hat

t_0 : Zeitpunkt der ersten Blutentnahme

t15, t30, t45, t60, t90, t120: Zeitpunkt der Blutentnahme 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Min. nach ACTH-Applikation

tMax: Zeitpunkt der Maximalkonzentration - kann t0, t15, t30, t45, t60, t90 oder t120 sein

Diff_Cort_Max_Basal: Wert der Differenz zwischen der Kortikosteronkonzentration zum Zeitpunkt tMax und der Kortikosteronkonzentration zum Zeitpunkt t0

6.4 ERGEBNISSE

6.4.1 Ergebnisse der Untersuchungen zum Immunsystem

6.4.1.1 Gesamt IgG-Konzentration

Die Gesamt IgG-Konzentrationen zeigen bei allen drei untersuchten Gruppen (F0a, F0b, F2) im Zuge der Immunisierungen (Tag 7 und Tag 28) erwartungsgemäß signifikante Anstiege (Tag 7 und Tag 35). Tag 0 ist jeweils der Basalwert vor den jeweiligen Immunisierungen.

Einfluss der Exposition

Im Folgenden werden die einzelnen Gruppen in Abhängigkeit von der Expositionsart besprochen:

Gruppe F0a

Im Vergleich der einzelnen Bestrahlungsarten (GSM, UMTS oder Sham) zeigt sich, dass in der am längsten exponierten Gruppe F0a kein Einfluss der Exposition auf die IgG-Konzentration im Blut der Versuchstiere nachweisbar ist (GSM im Vergleich zur Kontrollgruppe $p=0,45$; UMTS im Vergleich zur Kontrollgruppe $p=0,56$), (s. Abb. 6.3).

Wie aus der Abbildung 6.3 ebenfalls ersichtlich ist, zeigt sich bei allen Tieren, dass die Gesamt IgG-Konzentration von Tag 0 ($3,25 \pm 0,21$ ng/ml) im Vergleich zum Tag 35 ($3,54 \pm 0,29$ ng/ml) signifikant niedriger ist ($p < 0,0001$). Dieser Effekt ist die zu erwartende Reaktion eines Organismus auf die erfolgte Immunisierung.

Die einzelnen Mittelwerte mit Abweichung (SEM) sind der Tabelle 6.6 zu entnehmen.

Tabelle 6.6: IgG-Konzentrationen der Gruppe F0a (Mittelwerte \pm SEM)

	GSM	UMTS	Sham
d0	$3,25 \pm 0,21$	$3,53 \pm 0,2$	$3,4 \pm 0,18$
d14	$3,12 \pm 0,2$	$3,55 \pm 0,24$	$3,4 \pm 0,2$
d35	$3,54 \pm 0,3$	$3,87 \pm 0,26$	$3,75 \pm 0,28$

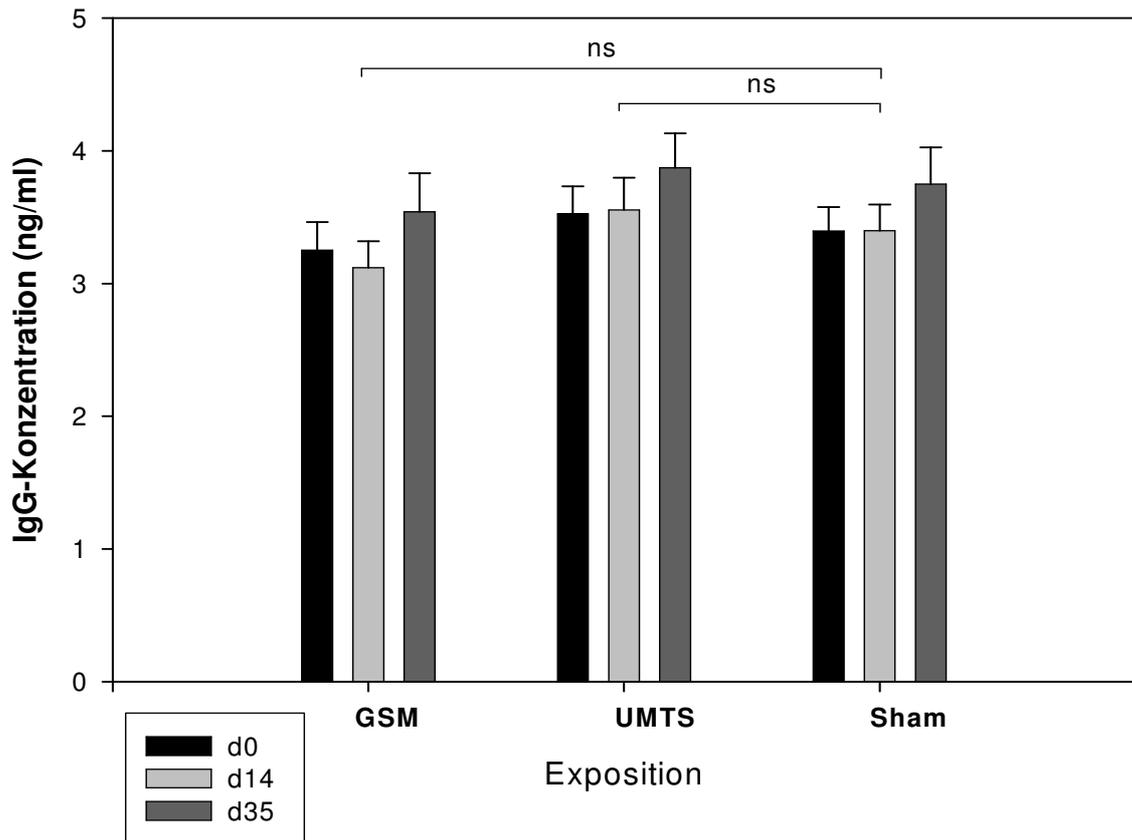


Abbildung 6.3: Einfluss der Exposition auf die Gesamt IgG-Konzentration der Gruppe F0a. Mittelwert \pm SEM, n Ratten = 23 GSM, 26 UMTS, 35 Sham; nicht signifikant (ns), Expositionsdauer ~10 Monate.

Gruppe F0b

Ähnlich wie bei der am längsten exponierten Gruppe F0a, verhält es sich auch für die ca. 4 Monate exponierte Gruppe F0b. Wie aus Abbildung 6.4 deutlich wird, ist wiederum kein Einfluss der Expositionsart (GSM, UMTS, Sham) zu erkennen.

Die Konzentration des Gesamt IgG's im Blut steigt bei allen Tieren über den Tag 0 auf Tag 14 bis Tag 35 signifikant an ($p < 0,0001$), (s. Abb. 6.4).

Die einzelnen Mittelwerte mit Abweichung (SEM) sind der Tabelle 6.7 zu entnehmen.

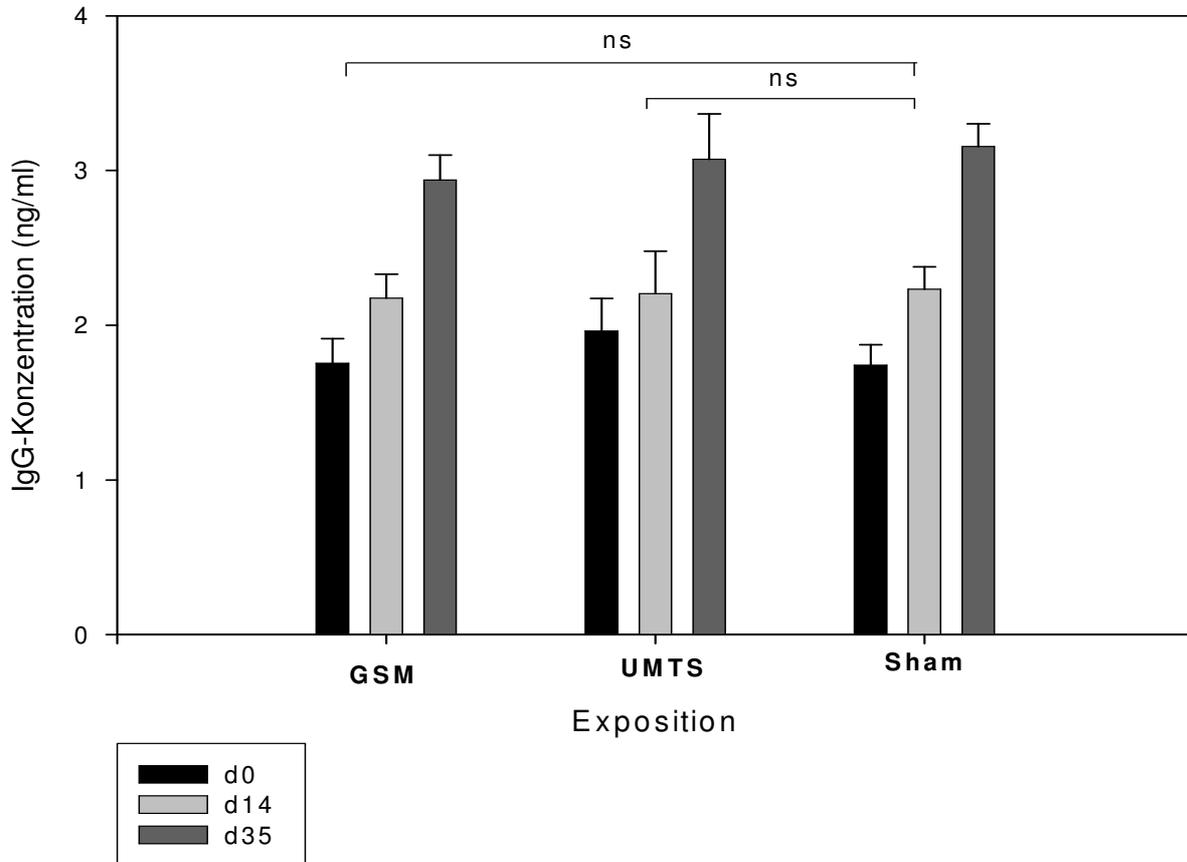


Abbildung 6.4: Einfluss der Exposition auf die Gesamt IgG-Konzentration der Gruppe F0b. Mittelwert \pm SEM, n Ratten = 27 GSM, 24 UMTS, 33 Sham; nicht signifikant (ns), Expositionsdauer ~4 Monate.

Tabelle 6.7: IgG-Konzentrationen der Gruppe F0b (Mittelwerte \pm SEM)

	GSM	UMTS	Sham
d0	1,76 \pm 0,16	1,96 \pm 0,21	1,74 \pm 0,13
d14	2,18 \pm 0,16	2,2 \pm 0,28	2,23 \pm 0,2
d35	2,94 \pm 0,16	3,07 \pm 0,3	3,16 \pm 0,15

Gruppe F2

In der Gruppe F2, deren Tiere über die Gruppe F1 aus der Gruppe F0a hervorgegangen sind und – ebenso wie die Tiere der Gruppe F0 - seit ihrer Zeugung exponiert waren, sind die IgG-Konzentrationen der GSM-exponierten Tiere im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe signifikant erhöht ($p=0,04$).

Die einzelnen Mittelwerte mit Abweichung (SEM) sind der Tabelle 6.8 zu entnehmen.

Tabelle 6.8: IgG-Konzentrationen der Gruppe F2 (Mittelwerte ng/ml \pm SEM)

	GSM	UMTS	Sham
d0	2,19 \pm 0,17	1,69 \pm 0,12	1,83 \pm 0,12
d14	2,42 \pm 0,16	2,18 \pm 0,18	2,19 \pm 0,13
d35	3,20 \pm 0,16	3,19 \pm 0,23	2,92 \pm 0,15

Nicht signifikant jedoch verhält sich die Differenz zwischen Tag 0 und Tag 35 der GSM-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe: diese beträgt bei der GSM-Gruppe 1,01 ng/ml (Differenz zwischen Tag 35 und Tag 0) und bei der Kontrollgruppe 1,09 ng/ml. Der IgG-Mittelwerte der UMTS-Gruppe sind gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant verändert ($p=0,79$), (s. Abb. 6.5).

Auch in dieser Gruppe steigen die Gesamt IgG-Konzentrationen von Tag 0 bis Tag 35 signifikant bei allen Tieren an ($p<0,0001$).

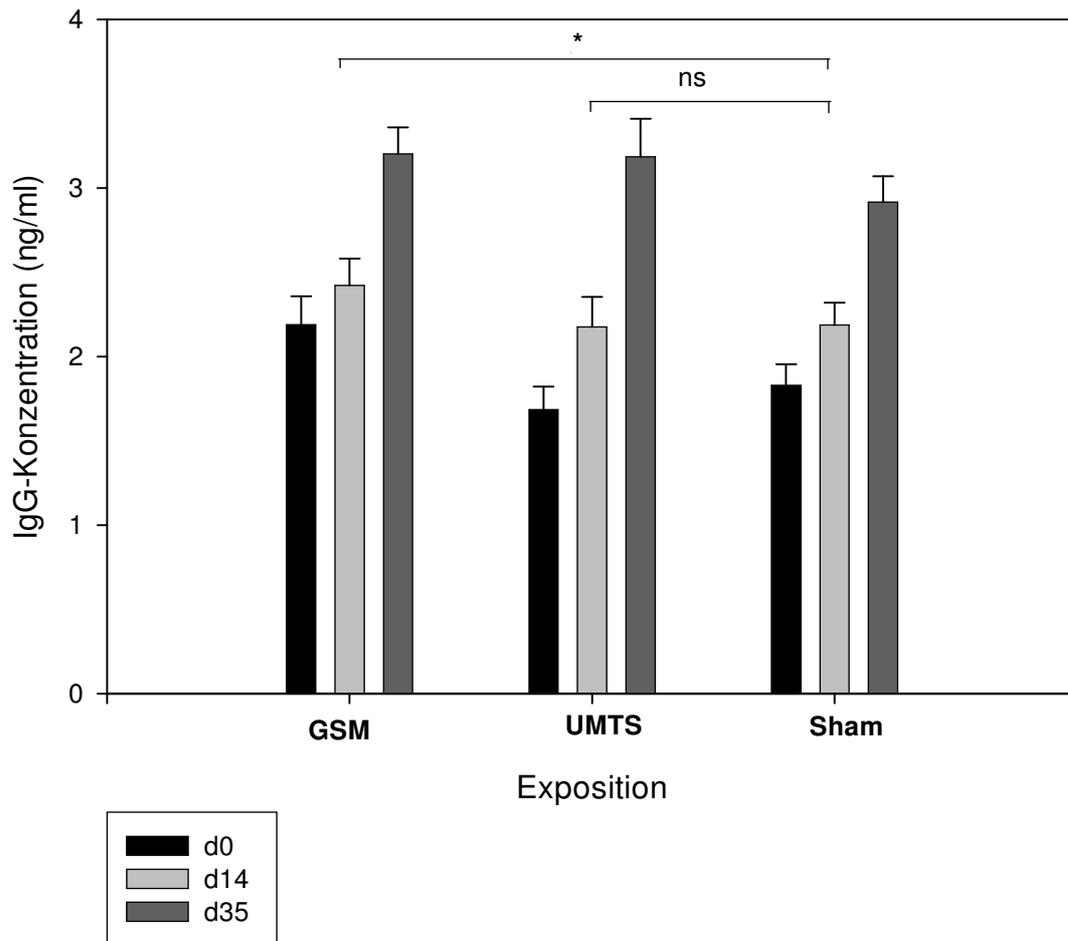


Abbildung 6.5: Einfluss der Exposition auf die Gesamt IgG-Konzentration der Gruppe F2. Mittelwert \pm SEM, n Ratten = 42 GSM, 42 UMTS, 42 Sham; nicht signifikant (ns), * $p=0,040$, Expositionsdauer ~5 Monate.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass ein Einfluss der Expositionsart auf die Gesamt IgG-Konzentration im Serum sowohl bei der Gruppe F0a als auch bei der Gruppe F0b nicht zu erkennen ist. In der Gruppe F2 liegen die Gesamt IgG-Konzentrationen nach GSM-Exposition signifikant höher als die der Kontrollgruppe ($p=0,04$). Die Differenz jedoch zwischen dem Ausgangslevel (Tag 0) und Tag 35 nach der Immunisierung ist gleich.

Wie an den Graphiken 6.3, 6.4 und 6.5 deutlich zu erkennen ist, steigt die Gesamt IgG-Konzentration erwartungsgemäß bei allen Tieren unabhängig von der Expositionsart (GSM, UMTS, Sham) von Tag 0, über Tag 14 bis Tag 35 signifikant an ($p<0,0001$).

6.4.1.2 Ergebnisse der Immunreaktion gegen IgY

Bei der Immunisierung mit IgY konnten bereits nach der Grundimmunisierung am Tag 14 spezifische Antikörper in allen Gruppen nachgewiesen werden. Durch die Boosterungsreaktion erhöhten sich die Antikörpertiter (Tag 35) bei allen Tieren signifikant ($p < 0,0001$). Am Tag 0 vor der Immunisierung waren erwartungsgemäß keine spezifischen Antikörper nachweisbar, weshalb auch in den Graphiken der Abbildungen 23, 24 und 25 am Tag 0 (d0) keine Balken erscheinen.

Einfluss der Exposition

Gruppe F0a

In der am längsten exponierten Gruppe F0a ist, wie auch beim Gesamt IgG kein Einfluss der Exposition (GSM, UMTS, Sham) auf die Produktion von Antikörpern gegen das Antigen Huhn IgY nachweisbar (s. Abb. 6.6).

Gegenüber der Kontrollgruppe gibt es bezüglich der anti-IgY AK-Titer keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur GSM-Gruppe ($p=0,39$) sowie auch im Vergleich zu der UMTS-Gruppe ($p=0,4618$). Die Mittelwerte (\pm SEM) der Anti IgY AK-Titer sind der Tabelle 6.9 zu entnehmen.

Tabelle 6.9: Anti IgY AK-Titer der Gruppe F0a (Mittelwerte $\log_{10} \pm$ SEM)

	GSM	UMTS	Sham
d0	0	0	0
d14	2,5 \pm 0,34	2,87 \pm 0,13	2,96 \pm 0,12
d35	3,6 \pm 0,08	3,55 \pm 0,08	3,57 \pm 0,07

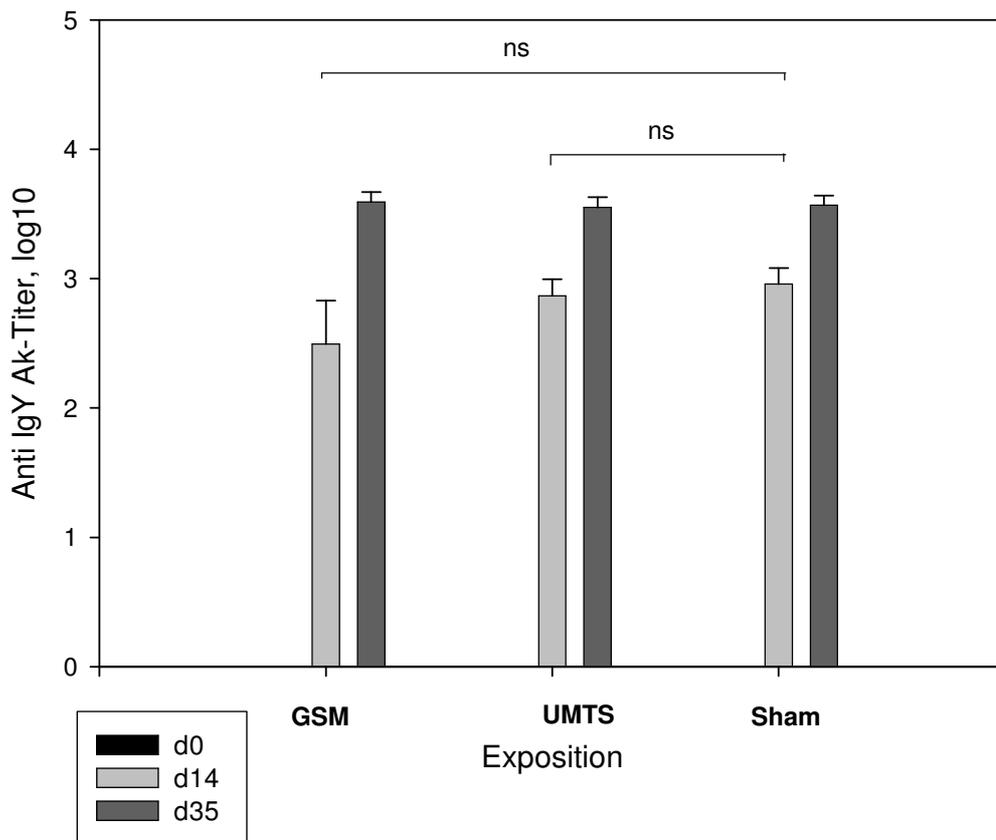


Abbildung 6.6: Einfluss der Exposition auf den Anti IgY AK-Titer der Gruppe F0a. Mittelwert \pm SEM, n Ratten = 23 GSM, 26 UMTS, 35 Sham; nicht signifikant (ns). Am Tag 0 vor der Immunisierung waren erwartungsgemäß keine spezifischen Antikörper nachweisbar.

Gruppe F0b

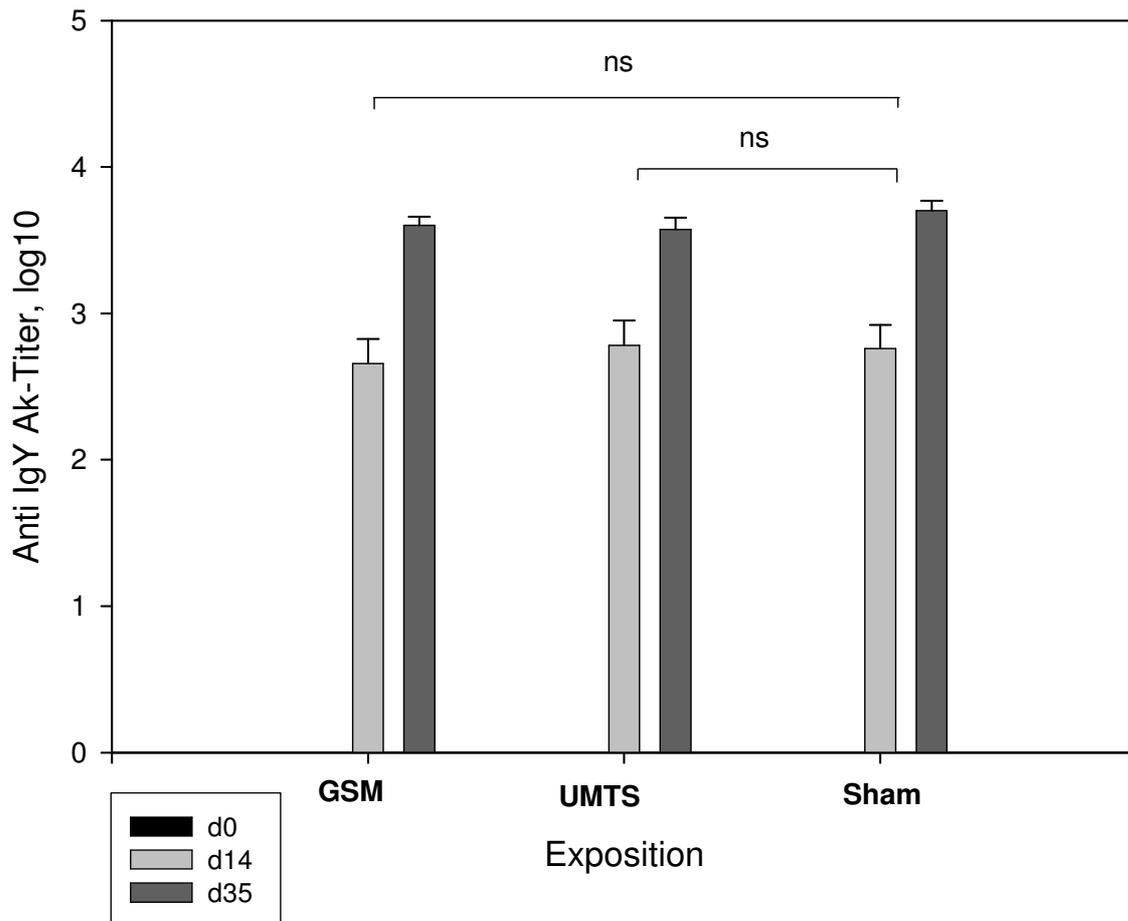
Auch in der Gruppe F0b ist kein Einfluss der unterschiedlichen Exposition auf die Antikörperproduktion nachweisbar.

Die Mittelwerte (\pm SEM) der Anti IgY AK-Titer sind der Tabelle 6.10 zu entnehmen.

Die Mittelwerte der GSM-Gruppe sind gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant verändert ($p=0,75$), ebenso sind auch die Mittelwerte der UMTS-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant verändert ($p=0,83$), (s. Abb. 6.7).

Tabelle 6.10: Anti IgY AK-Titer der Gruppe F0b (Mittelwerte $\log_{10} \pm \text{SEM}$)

	GSM	UMTS	Sham
d0	0	0	0
d14	$2,66 \pm 0,17$	$2,78 \pm 0,17$	$2,76 \pm 0,16$
d35	$3,6 \pm 0,06$	$3,57 \pm 0,08$	$3,7 \pm 0,07$

**Abbildung 6.7:** Einfluss der Exposition auf den Anti IgY AK-Titer der Gruppe F0b. Mittelwert $\pm \text{SEM}$, n Ratten = 27 GSM, 24 UMTS, 33 Sham; nicht signifikant (ns). Am Tag 0 vor der Immunisierung waren erwartungsgemäß keine spezifischen Antikörper nachweisbar.

Gruppe F2 (s. Abb. 6.8).

Ebenfalls in der Gruppe F2 zeigen sich die Anti IgY AK-Titer unbeeinflusst von der Art der Exposition. Die Mittelwerte (\pm SEM) der Anti IgY AK-Titer sind der Tabelle 6.11 zu entnehmen.

Tabelle 6.11: Anti IgY AK-Titer der Gruppe F2 (Mittelwerte $\log_{10} \pm$ SEM)

	GSM	UMTS	Sham
d0	0	0	0
d14	2,93 \pm 0,19	3,11 \pm 0,14	3,18 \pm 0,15
d35	3,76 \pm 0,07	3,71 \pm 0,06	3,79 \pm 0,05

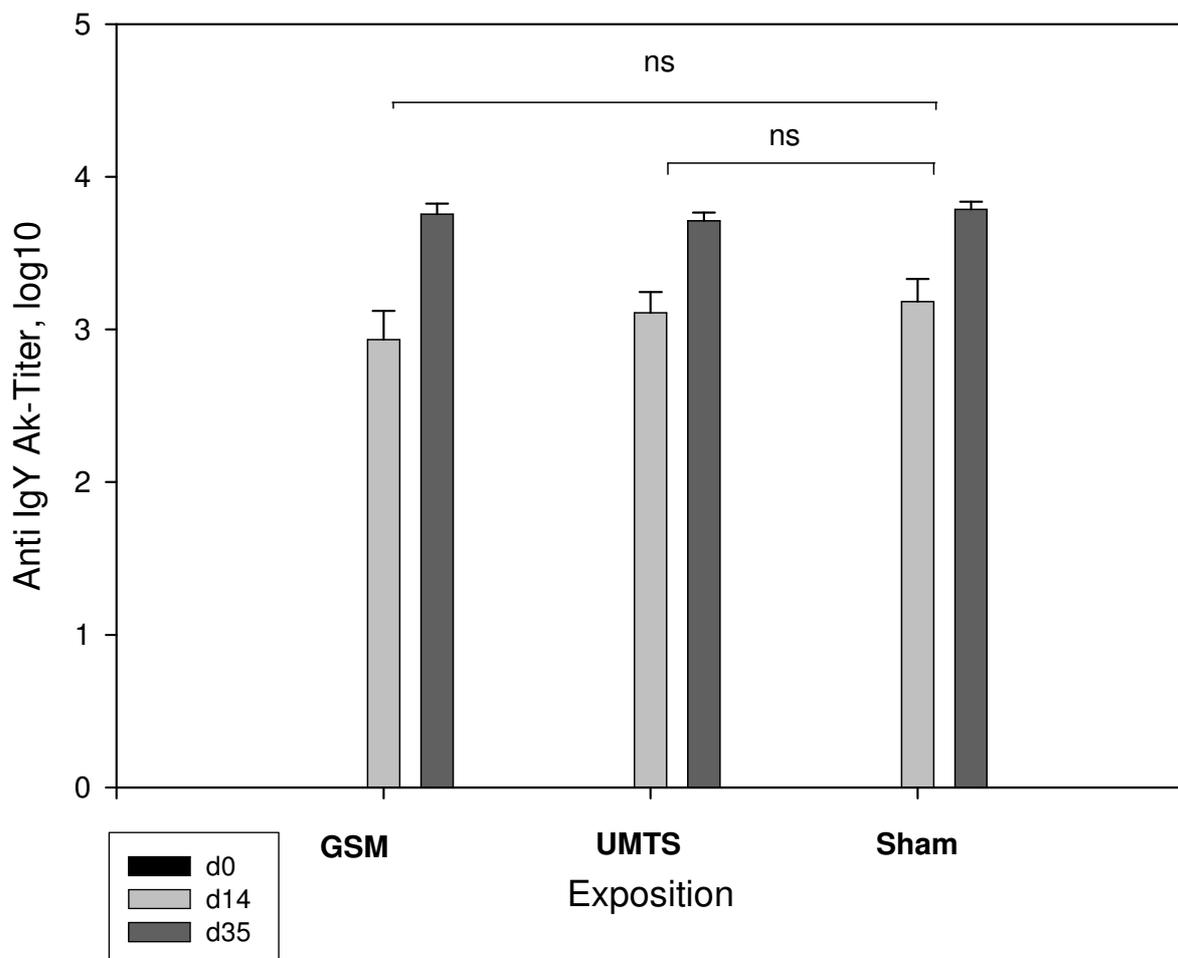


Abbildung 6.8: Einfluss der Exposition auf den Anti IgY AK-Titer der Gruppe F2. Mittelwert \pm SEM, n Ratten = 42 GSM, 42 UMTS, 42 Sham; nicht signifikant (ns).

6.4.1.3 Ergebnisse der Immunreaktion gegen OVA

Bei der Immunisierung mit OvA konnten nach der Grundimmunisierung am Tag 0 am Tag 14 keine spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Erst mit der Boosterungsreaktion waren spezifische Antikörpertiter (Tag 35) in allen Gruppen nachweisbar ($p < 0,0001$). Am Tag 0 vor der Immunisierung waren erwartungsgemäß ebenfalls keine spezifischen Antikörper nachweisbar (s. Abb. 6.9).

Einfluss der Exposition

Gruppe F0a

In der Gruppe F0a ist kein Einfluss der Exposition auf die Produktion von Anti OVA-Antikörpern feststellbar (s. Abb. 6.9). Es liegt kein signifikanter Unterschied der GSM-Gruppe ($MW = 2,60 \pm 0,4 \log_{10}$) zur Kontrollgruppe vor ($MW = 2,73 \pm 0,18 \log_{10}$; $p = 0,87$). Und auch die UMTS-exponierten Tiere weisen keine Unterschiede im Anti OVA AK-Titer ($MW = 3,05 \pm 0,2 \log_{10}$) im Vergleich zu Kontrollgruppe ($p = 0,4$) auf.

Gruppe F0b

Auch in der Gruppe F0b ist kein signifikanter Einfluss der Exposition auf die Fähigkeit, Antikörper gegen das Antigen OVA zu bilden, feststellbar. Im Vergleich der Mittelwerte der GSM-Tiere ($MW = 3,66 \pm 0,07 \log_{10}$) zur Kontrollgruppe ($MW = 3,44 \pm 0,15 \log_{10}$) sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar ($p = 0,85$). Ebenso verhält sich die UMTS-Gruppe ($MW = 3,25 \pm 0,3$) zur Kontrollgruppe ($p = 0,12$), (s. Abb. 6.9).

Gruppe F2

In der Gruppe F2 ist wiederum kein signifikanter Einfluss der Exposition auf den Anti OVA AK-Titer zu erkennen. Die GSM-exponierten Tiere weisen einen Anti OVA AK-Titer im Mittelwert von $3,62 \pm 0,14 \log_{10}$ ($p = 0,06$), die UMTS-exponierten Tiere einen Mittelwert von $3,83 \pm 0,06 \log_{10}$ ($p = 0,52$) und die Kontrolltiere einen Mittelwert von $3,74 \pm 0,06 \log_{10}$ auf (s. Abb. 6.9).

Die Mittelwerte (\pm SEM) der Anti OVA-Antikörper-Konzentration (\log_{10}) der Gruppe F0a, F0b und F2 sind zusammenfassend in Tabelle 6.12 dargestellt.

Tabelle 6.12: Mittelwerte (\pm SEM) der Anti OVA-Antikörper-Konzentration (\log_{10}) der Gruppe F0a, F0b und F2 an Tag 35

	GSM	UMTS	Sham
F0a	2,60 \pm 0,4	3,05 \pm 0,2	2,73 \pm 0,18
F0b	3,5 \pm 0,19	3,25 \pm 0,3	3,56 \pm 0,15
F2	3,62 \pm 0,14	3,83 \pm 0,06	3,74 \pm 0,06

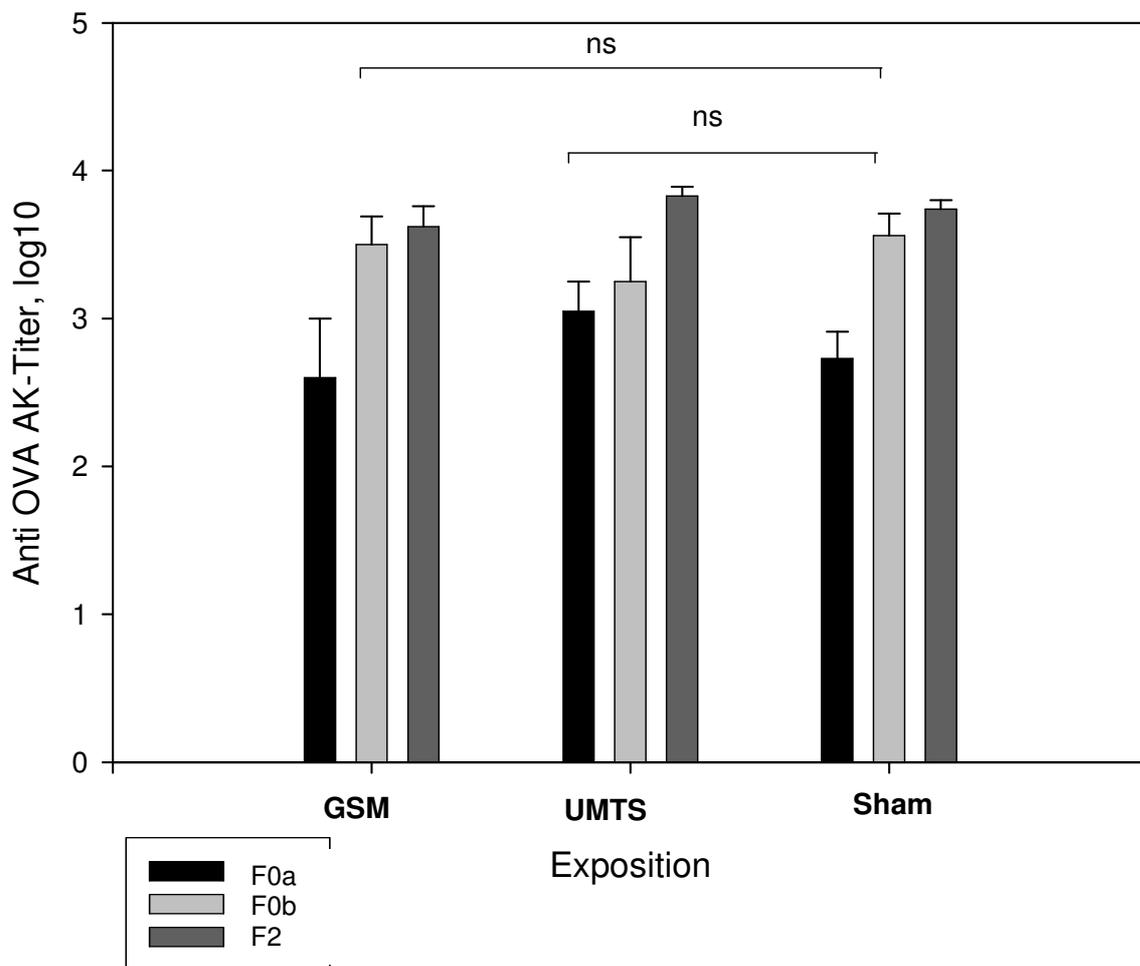


Abbildung 6.9: Einfluss der Exposition auf den Anti OVA AK-Titer am Tag 35 der Gruppen F0a (n=84 Ratten), F0b (n=87 Ratten) und F2 (n=126 Ratten). Mittelwert \pm SEM, nicht signifikant (ns).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass in den untersuchten Gruppen (F0a, F0b und F2) kein Einfluss der Expositionsart (GSM, UMTS oder Sham) auf die Bildung spezifischer Antikörper gegen OVA bei den Tieren erkennbar ist.

6.4.2 Ergebnisse der Untersuchungen zum Stressgeschehen

6.4.2.1 Ergebnisse des Vorversuches

Die Ergebnisse des Vorversuchs sind unter 6.3.5.1 dargestellt.

6.4.2.2 Basalkonzentration von Kortikosteron

Statistisch ausgewertet wurde ein potentieller Einfluss der variablen Expositionsart (GSM, UMTS und Sham) auf die Basalkonzentrationen der einzelnen Gruppen. Die Untersuchung dieser Zielgröße erfolgte, um einen Vergleich der Ausgangskonzentrationen durchführen und um potentielle Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Expositionsarten feststellen zu können.

Gruppe F0a

In die Untersuchungen zur Basalkonzentration der Gruppe F0a wurden 84 Tiere einbezogen. Davon waren 23 Tiere GSM-, 26 Tiere UMTS- und 35 Tiere SHAM-exponiert.

Die statistische Auswertung der Basalkonzentration der Gruppe F0a konnte keinen signifikanten Einfluss der Exposition auf die untersuchte Variable `Basalkonzentration` nachweisen ($p=0,207$), (s. Abb. 6.10). Die Kortikosteron-Basalwerte betragen bei den GSM-exponierten Tieren der Gruppe F0a $425,78 \pm 119,3$ ng/ml Serum, bei den UMTS-exponierten Tieren $492,35 \pm 121,6$ ng/ml Serum und bei der Kontrollgruppe (Sham) $493,45 \pm 139,9$ ng/ml Blutserum.

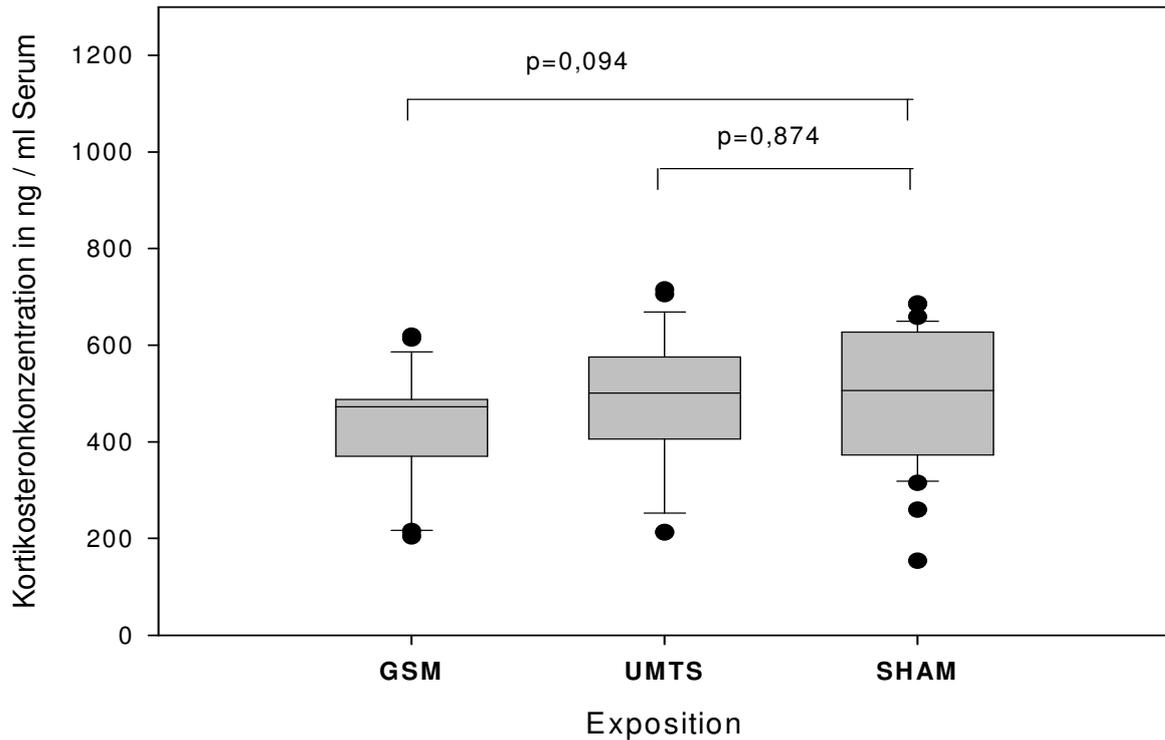


Abbildung 6.10: Vergleich der Kortikosteron-Basalkonzentrationen nach Expositionsart in der Gruppe F0a (n = 23 GSM-, 26 UMTS- und 35 Sham-Tiere).

Gruppe F0b

In die Untersuchungen zur Basalkonzentration der Gruppe F0b wurden 84 Tiere einbezogen. Davon waren 27 Tiere GSM-, 24 Tiere UMTS- und 33 Tiere SHAM-exponiert. Die Basalkonzentrationen sowohl der GSM- ($p=0,015$) als auch der UMTS-exponierten ($p=0,005$) Tiere liegen signifikant niedriger als die Basalkonzentrationen der Sham-Tiere (s. Abb. 6.11; GSM: $MW=453,5 \pm 112,5$, UMTS: $MW=437,91 \pm 161,7$, Sham: $MW=560,12 \pm 174,9$).

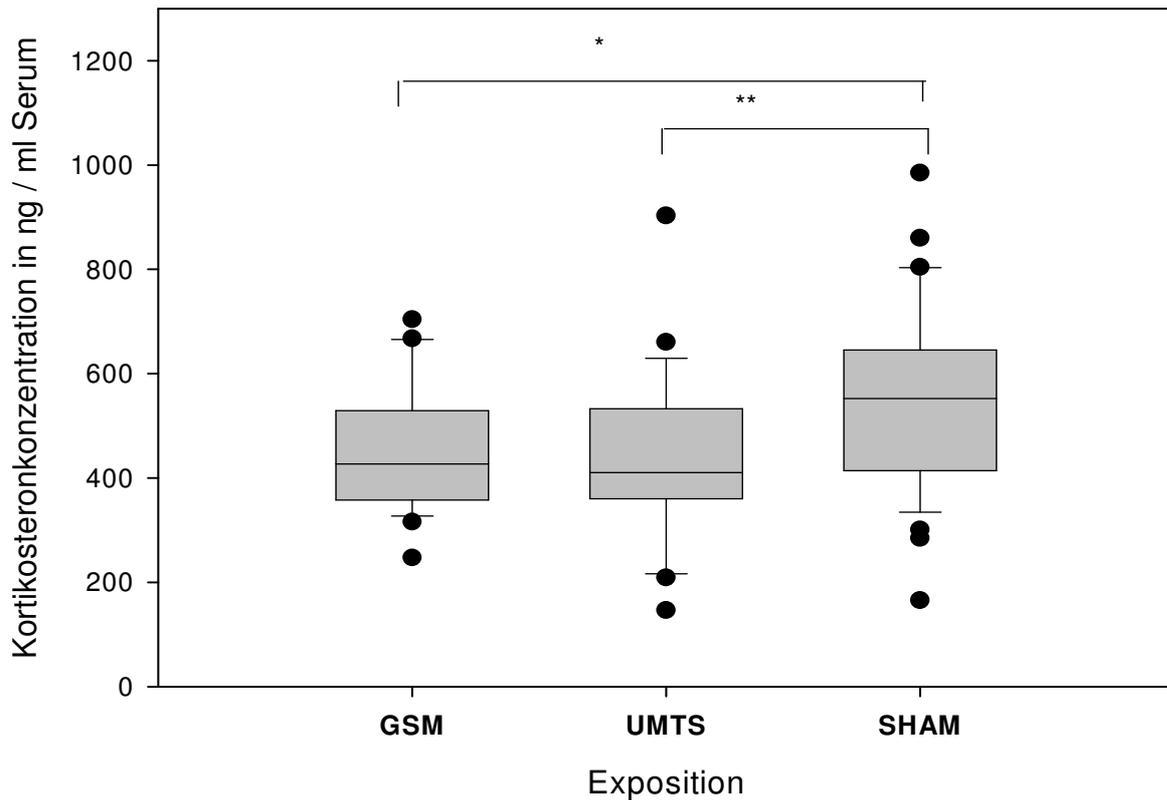


Abbildung 6.11: Vergleich der Basalkonzentrationen von Kortikosteron nach Expositionsart in der Gruppe F0b (n = 84; 27 GSM-, 24 UMTS- und 33 Sham-Tiere); *p=0,015, **p=0,005.

Gruppe F2

In die Untersuchungen zur Basalkonzentration der Gruppe F0b wurden 124 Tiere einbezogen. Davon waren 41 Tiere GSM-, 42 Tiere UMTS- und 41 Tiere SHAM-exponiert.

Wie auch bei der F0a-Gruppe konnte bei der statistischen Auswertung der Basalkonzentration der Gruppe F2 kein signifikanter Einfluss der Exposition auf die untersuchte Variable „Basalkonzentration“ nachgewiesen werden (s. Abb. 6.12).

Die Kortikosteronkonzentrationen im Serum betragen bei den GSM-exponierten Tieren im Mittel $582,89 \pm 112,5$ ng/ml Serum, bei den UMTS-exponierten Tieren $595,17 \pm 176,53$ ng/ml Serum und bei den Kontrolltieren (Sham) $561,27 \pm 160,8$ ng/ml Serum.

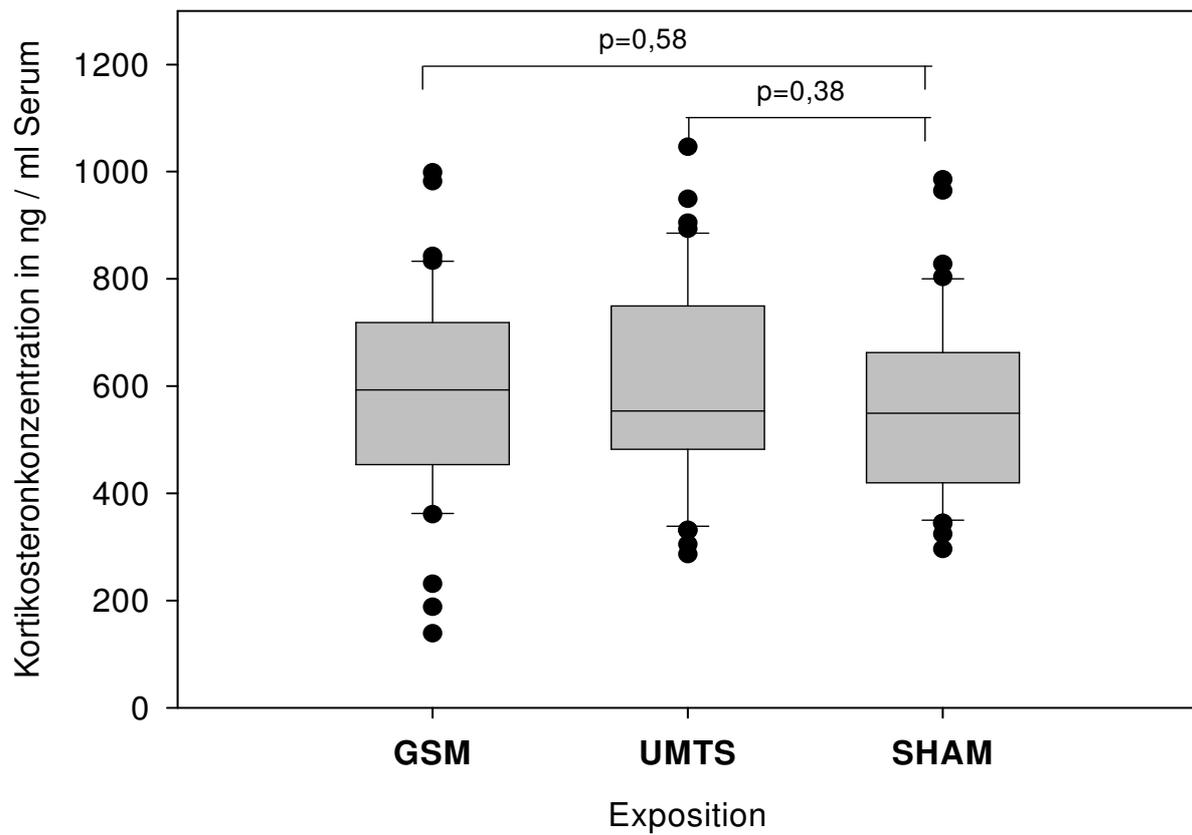


Abbildung 6.12: Vergleich der Basalkonzentrationen von Kortikosteron nach Expositionsart in der Gruppe F2 (n = 124; 41 GSM-, 42 UMTS- und 41 Sham-Tiere)

Vergleich der Gruppen

Ein Vergleich der Gruppen bezüglich der unterschiedlichen Kortikosteron-Basalkonzentrationen ist in der Übersicht Tabelle 6.13 dargestellt.

Tabelle 6.13: Deskriptive Statistik der expositionsart- und Gruppenbezogenen Kortikosteron-Basalkonzentration im Serum.

		Anzahl Tiere	Mittelwert (ng/ml)	Minimum (ng/ml)	Maximum (ng/ml)	Standardfehler (ng/ml)
GSM	<i>F0a</i>	23	425,78	204,58	619,24	119,3
	<i>F0b</i>	27	453,54	247,54	704,42	112,5
	<i>F2</i>	41	582,89	138,77	998,56	188,1
UMTS	<i>F0a</i>	26	492,35	212,54	715,1	121,6
	<i>F0b</i>	24	437,91	146,71	903,34	161,7
	<i>F2</i>	42	595,17	286,49	1046,4	176,5
Sham	<i>F0a</i>	35	493,45	154,01	685,82	139,9
	<i>F0b</i>	33	560,12	165,55	984,97	174,9
	<i>F2</i>	41	561,27	296,1	985,89	160,8

Vergleich der Kortikosteronbasalkonzentration unabhängig von der Gruppe

Zur Darstellung der Schwankungsbreite zwischen den Individuen in Abhängigkeit von der Expositionsart wurden die 3 Gruppen (F0a, F0b und F2) gemeinsam ausgewertet. Es zeigt sich, wie aus Abbildung 6.13 deutlich wird, dass die Verteilung der Ausgangskonzentrationen in Abhängigkeit von der Exposition in allen 3 Gruppen nahezu gleich ist und sich keine signifikanten Unterschiede ergeben (s. Abb. 6.14).

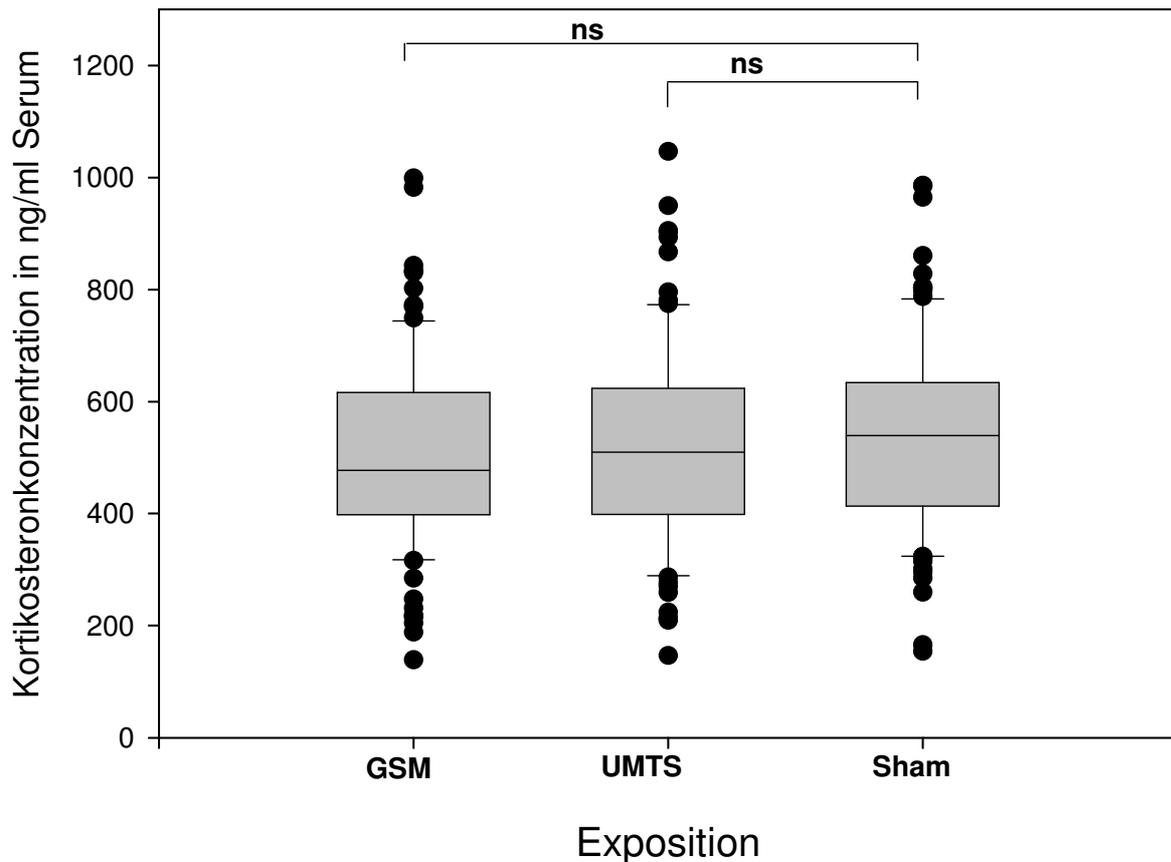


Abb. 6.13: Vergleich der Basalkonzentrationen von Kortikosteron aller Gruppen nach Expositionsart (n = 91 GSM-, 92 UMTS- und 109 Sham-Tiere; ns=nicht signifikant)

6.4.2.3 Blutentnahmedauer

Um trotz der Narkose einen Effekt der Manipulation, hier Dauer der Blutentnahme, auf das Stressgeschehen ausschließen zu können, wurde diese Variable bei jeder Blutentnahme (in Minuten und Sekunden) erfasst und ein potentieller Effekt statistisch analysiert. Insgesamt erfolgten im Versuch 2058 Blutentnahmen mit 7 Blutentnahmen pro Tier (n=294 Tiere).

Gruppe F0a

In die Untersuchungen zur Blutentnahmedauer der Gruppe F0a wurden 84 Tiere einbezogen. Davon waren 23 Tiere GSM-, 26 Tiere UMTS- und 35 Tiere SHAM-exponiert.

Unter Berücksichtigung der Blutentnahmedauer konnte in Gruppe F0a statistisch kein signifikanter Einfluss der Blutentnahmedauer auf die Basalkonzentration nachgewiesen werden ($p=0,372$).

Gruppe F0b

In die Untersuchungen zur Blutentnahmedauer der Gruppe F0b wurden 84 Tiere einbezogen. Davon waren 27 Tiere GSM-, 24 Tiere UMTS- und 33 Tiere SHAM-exponiert. Die Blutentnahmedauer hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Basalkonzentration ($p=0,16$). Somit kann, unter Berücksichtigung der Blutentnahmedauer, wie vorne schon berichtet, statistisch ein signifikanter Einfluss der Exposition nachgewiesen werden ($p=0,017$).

Gruppe F2

In die Untersuchungen zur Blutentnahmedauer der Gruppe F2 wurden 124 Tiere einbezogen. Davon waren 41 Tiere GSM-, 42 Tiere UMTS- und 41 Tiere SHAM-exponiert.

In der Gruppe F2 konnte ebenfalls kein Einfluss der Blutentnahmedauer auf die untersuchte Variable „Basalkonzentration“ statistisch nachgewiesen werden ($p=0,435$).

Weitere Blutentnahmezeitpunkte und Vergleich der Gruppen

Eine statistische Auswertung eines potentiellen Einflusses der Blutentnahmedauer auf die Kortikosteronkonzentration zu den Blutentnahmezeitpunkten t15, t30, t45, t60 und t120 sowie eines potentiellen Unterschiedes bei der Blutentnahmedauer der unterschiedlichen Gruppen einer Expositionsart wurde nicht durchgeführt. Die durchschnittliche Blutentnahmedauer betrug (im Mittel über alle Gruppen und unabhängig von der Expositionsart) für den Zeitpunkt t0 2,6 min, t15 3,4 min, für t30 3,4 min, für t45 3,7 min, für t60 4,1 min, für t 90 4,0 min und für t 120 4,6 min. Es zeigt sich, dass mit zunehmender Dauer der Narkose die Blutentnahme pro Zeitpunkt sich verlängert (s. Abb. 6.14).

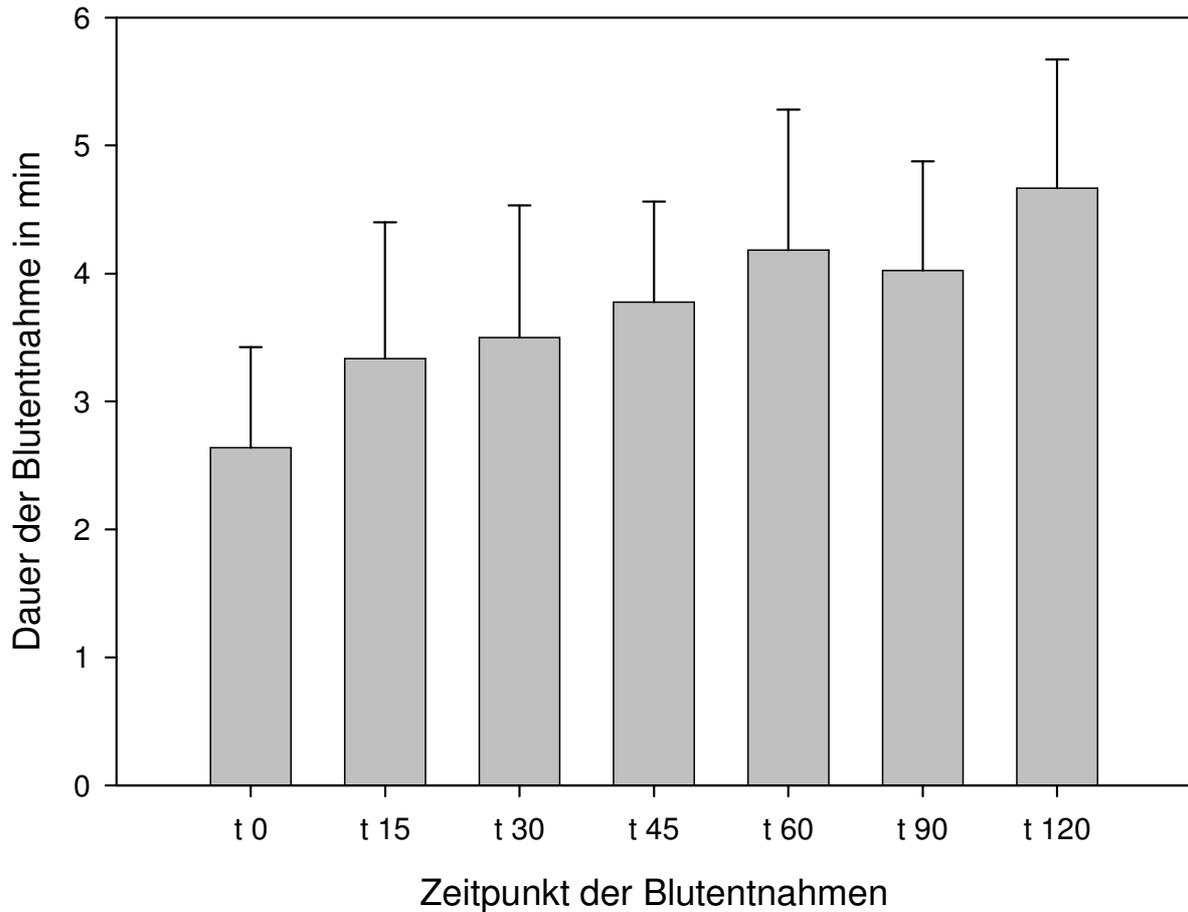


Abbildung 6.14: Darstellung der Blutentnahmedauer in Minuten/Zeitpunkt der Blutentnahme. Die Balken stellen die Mittelwerte aller Blutentnahmen /Zeitpunkt dar, unabhängig von der Gruppe und der Expositionsart. n=294 Tiere und 2058 Blutentnahmen.

6.4.2.4 Analyse der AUC (Area under curve)

Unter der AUC versteht sich hier die Fläche, die einerseits durch den Kurvenverlauf der Kortikosteronkonzentration und andererseits durch eine Parallele zur x-Achse durch den y-Achsen-Schnittpunkt (Serumkortikosteronkonzentration zum Zeitpunkt t0) festgelegt wurde. Statistisch ausgewertet wurde der Einfluss der Exposition zum Versuchszeitpunkt auf die AUC-Größe.

Gruppe F0a

In die Untersuchungen der AUC der Gruppe F0a wurden 83 Tiere einbezogen. Davon waren 23 Tiere GSM-, 25 Tiere UMTS- und 35 Tiere SHAM-exponiert.

Die statistische Auswertung des Effektes der Exposition auf die Größe der AUC ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den unterschiedlichen Expositionsgruppen ($p=0,374$; s. Abb. 6.15).

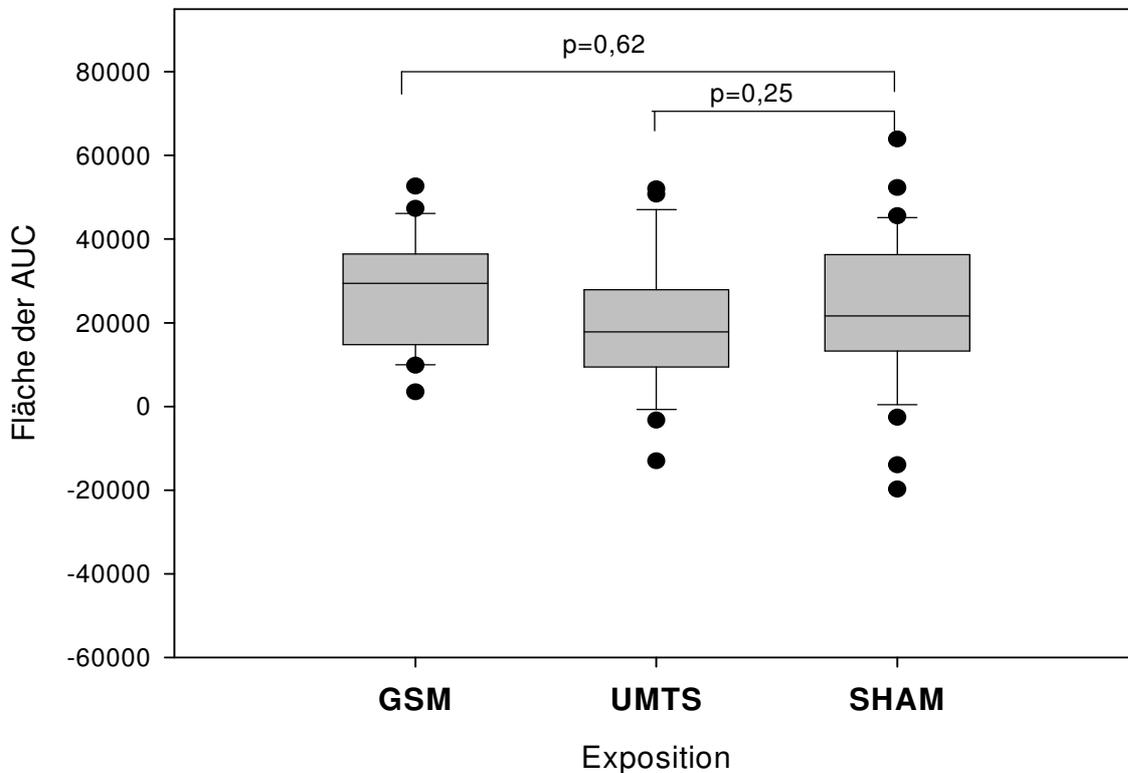


Abbildung 6.15: Vergleich der AUC-Flächen nach Expositionsart in der Gruppe F0a.

Gruppe F0b

In die Untersuchungen der AUC der Gruppe F0b wurden 84 Tiere einbezogen. Davon waren 27 Tiere GSM-, 24 Tiere UMTS- und 33 Tiere SHAM-exponiert.

Mit Hilfe der statistischen Auswertung des Effektes der Exposition auf die Größe der AUC konnte ein signifikanter Einfluss auf die Variable AUC nachgewiesen werden: die Fläche der AUC der GSM-exponierten Tiere ist signifikant größer ($p=0,003$) als die der UMTS- und Sham-exponierten Tiere (s. Abb. 6.16).

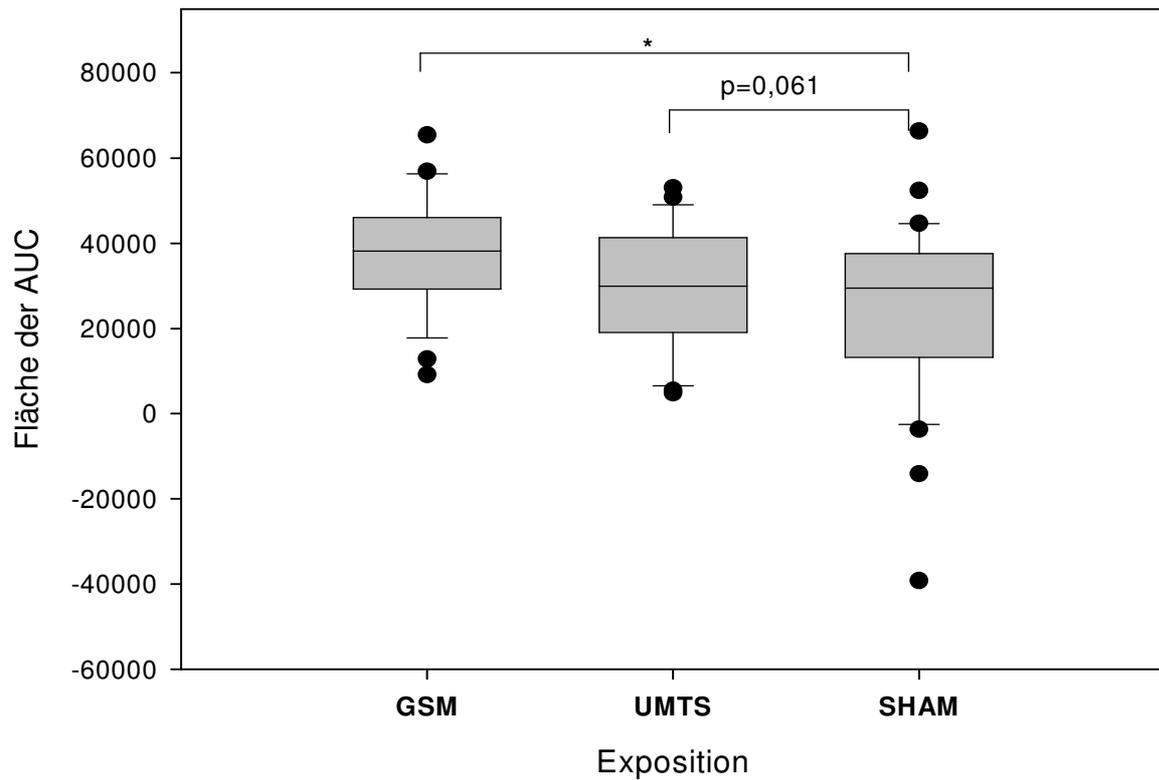


Abbildung 6.16: Vergleich der Flächen der AUC nach Expositionsart in der Gruppe F0b; * $p=0,003$.

Gruppe F2

In die Untersuchungen der AUC der Gruppe F2 wurden 124 Tiere einbezogen. Davon waren 41 Tiere GSM-, 42 Tiere UMTS- und 42 Tiere SHAM-exponiert.

Die statistische Auswertung des Effektes der Exposition auf die Größe der AUC ergab in der F2-Gruppe keinen signifikanten Unterschied zwischen den 3 verschiedenen Expositionsgruppen ($p=0,13$; s. Abb. 6.17).

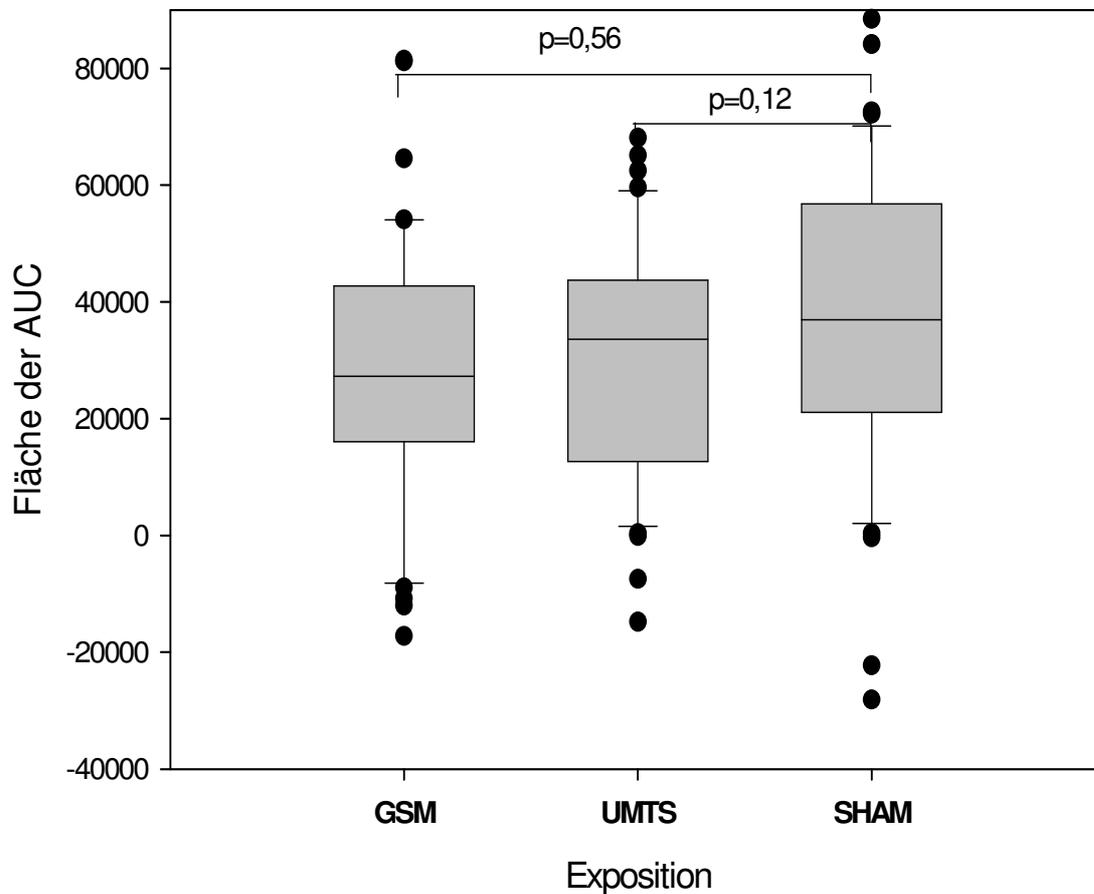


Abbildung 6.17: Vergleich der AUC-Flächen nach Expositionsart in der Gruppe F2.

6.4.2.5 Analyse der Differenz der Kortikosteron-Konzentrationen zwischen Maximal- und Basalwert

Statistisch ausgewertet wurde die Differenz der Kortikosteronkonzentration zum Zeitpunkt tMax und der Kortikosteronkonzentration zum Zeitpunkt t0.

Gruppe F0a

In die Untersuchungen von Diff_Cort_Max_Basal der Gruppe F0a wurden 84 Tiere einbezogen. Davon waren 23 Tiere GSM-, 26 Tiere UMTS- und 35 Tiere SHAM-exponiert.

Die statistische Auswertung des Effektes der Exposition auf Diff_Cort_Max_Basal ergab keinen signifikanten Einfluss der Expositionsart (s. Abb. 6.18).

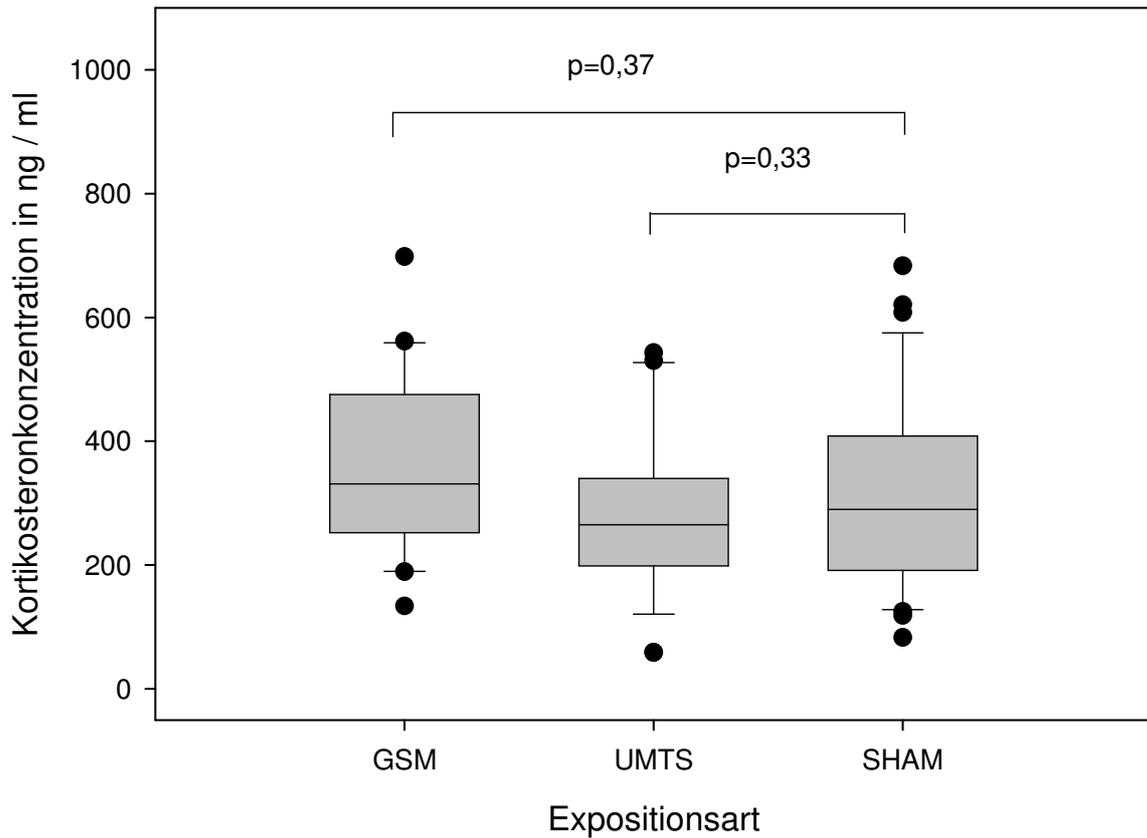


Abbildung 6.18: Differenz der Kortikosteronkonzentrationen zwischen Maximal- und Basalwert (F0a)

Gruppe F0b

In die Untersuchungen von Diff_Cort_Max_Basal der Gruppe F0b wurden 84 Tiere einbezogen. Davon waren 27 Tiere GSM-, 24 Tiere UMTS- und 33 Tiere SHAM-exponiert (s. Abb. 6.19).

Im Gegensatz zur Gruppe F0a ergab die statistische Auswertung in der Gruppe F0b einen signifikanten Unterschied bezüglich Diff_Cort_Max_Basal. Die Differenz zwischen der Kortikosteron-Basal- und Maximalkonzentration der GSM-exponierten Tiere ist im Mittel um 100,5 ng/ml Serum größer, im Vergleich zur Kontrollgruppe ($p=0,006$; s. Abb. 6.19).

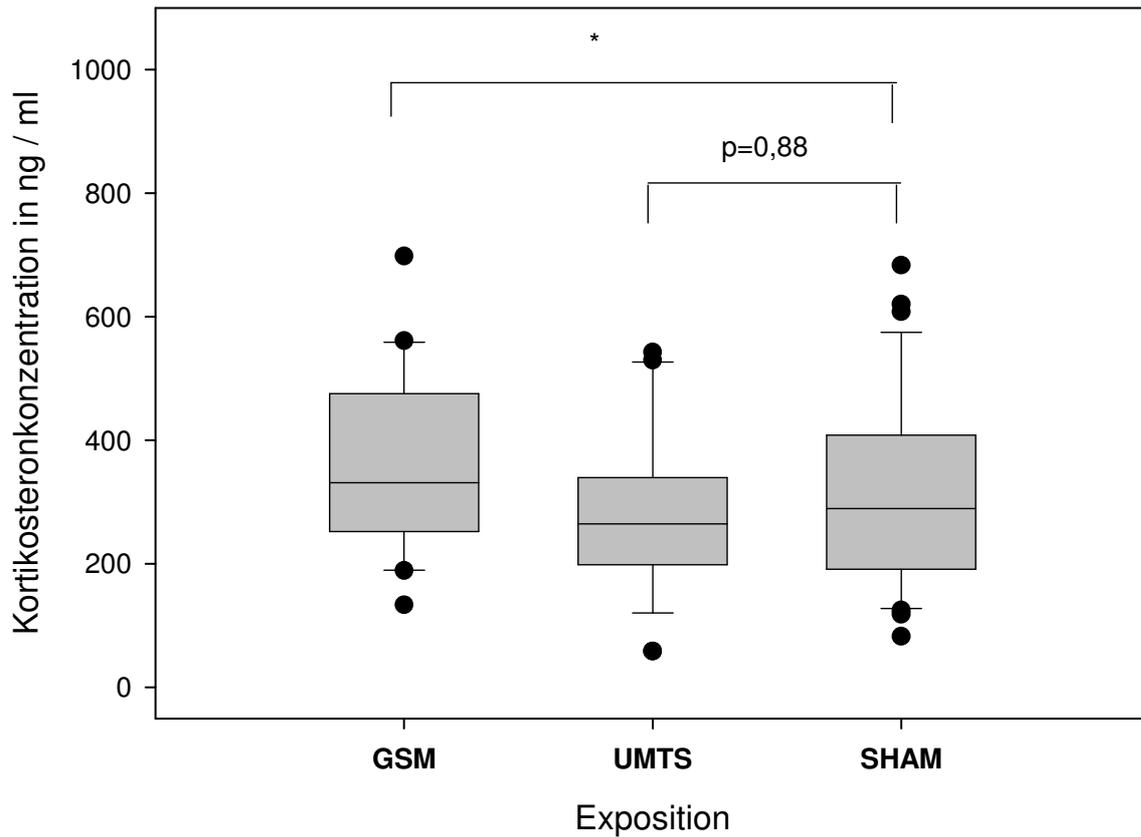


Abbildung 6.19: Differenz zwischen Kortikosteronkonzentration zum Zeitpunkt der maximalen Kortikosteronkonzentration und der Konzentration zum Zeitpunkt t0 in der Gruppe F0b; * $p=0,006$.

Gruppe F2

In die Untersuchungen von Diff_Cort_Max_Basal der Gruppe F2 wurden 124 Tiere einbezogen. Davon waren 41 Tiere GSM-, 42 Tiere UMTS- und 41 Tiere SHAM-exponiert.

Die statistische Auswertung des Effektes der Exposition auf Diff_Cort_Max_Basal ergab keinen signifikanten Einfluss der Expositionsart (s. Abb. 6.20).

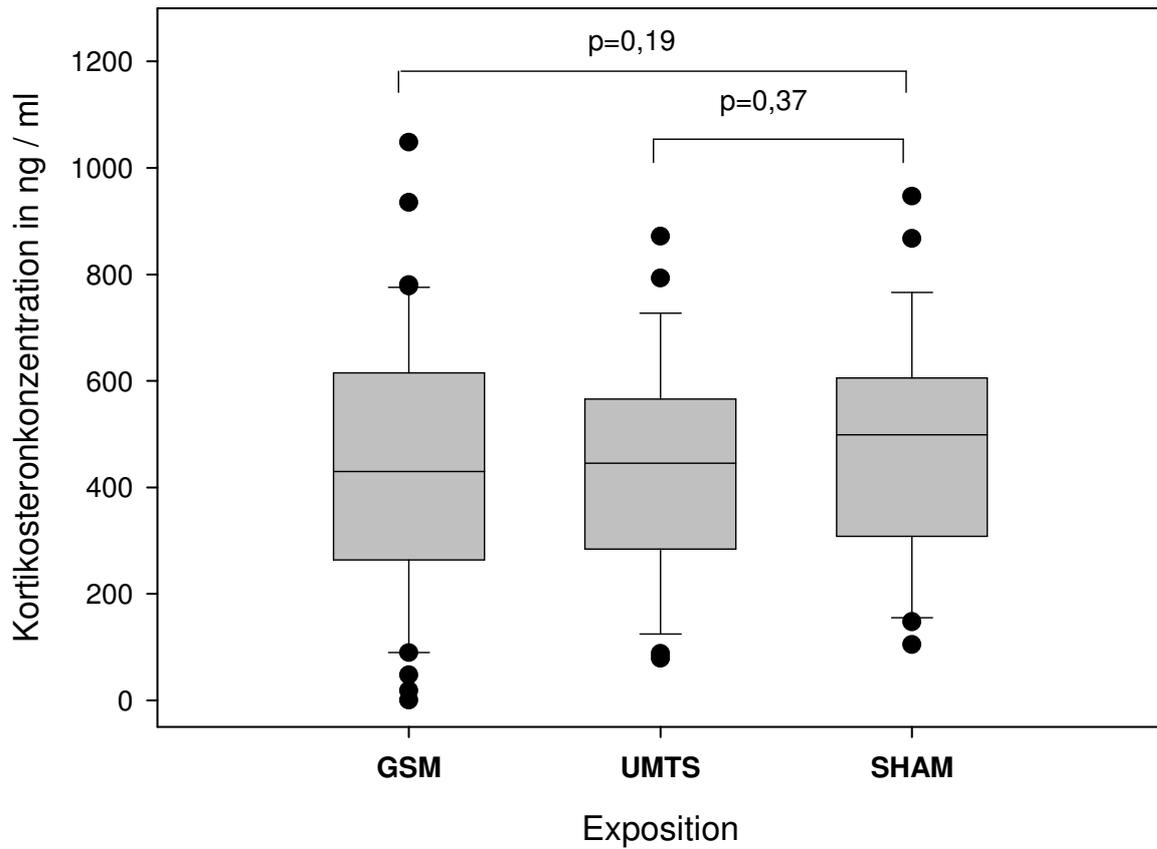


Abbildung 6.20: Differenz zwischen der Kortikosteronkonzentration zum Zeitpunkt der maximalen Kortikosteronkonzentration und der Konzentration zum Zeitpunkt t0 (F2)

6.4.2.6 Zeitpunkt der Maximalkonzentration

Es wurde eine deskriptive Analyse der Zeitpunkte der Maximalkonzentration durchgeführt. In der Tabelle 6.7 sind die einzelnen Gruppen zusammengefasst. Die Ergebnisse werden in der nachfolgenden Tabelle 6.8 detailliert nach entsprechender Exposition dargestellt.

Tabelle 6.7: Deskriptive Statistik über die Verteilung der Maximalkonzentrationen auf die Blutentnahmezeitpunkte in den unterschiedlichen Gruppen

		t0	t15	t30	t45	t60	t90	t120	Gesamt
F0a	Anzahl	0	1	4	8	18	22	31	84
	% von F0a	0,00	1,20	4,80		21,40	26,20	36,90	
		%	%	%	9,50%	%	%	%	100,00%
F0b	Anzahl	0	5	5	12	16	23	23	84
	% von F0b	0,00	6,00	6,00	14,30	19,00	27,40	27,40	
		%	%	%	%	%	%	%	100,00%
F2	Anzahl	2	2	10	7	20	36	47	124
	% von F2	1,60	1,60	8,10		16,10	29,00	37,90	
		%	%	%	5,60%	%	%	%	100,00%
Gesamt	Anzahl	2	8	19	27	54	81	101	292
	% aller Gruppen	0,70	2,70	6,50		18,50	27,70	34,60	
		%	%	%	9,20%	%	%	%	100,00%

Tabelle 6.8: Absolute Anzahl der Tiere je Gruppe und Exposition mit der Maximalkonzentration zum jeweiligen Blutentnahmezeitpunkt

Gruppe/Exposition	Zeitpunkt der max. Kortikosteronkonzentration							Gesamtzahl
	t0	t15	t30	t45	t60	t90	t120	
F0a/GSM	0	0	0	1	3	7	12	23
F0a/UMTS	0	0	2	1	6	6	11	26
F0a/SHAM	0	1	2	6	9	9	8	35
F0b/GSM	0	1	1	2	5	11	7	27
F0b/UMTS	0	0	3	5	3	4	9	24
F0b/SHAM	0	4	1	5	8	8	7	33
F2/GSM	1	0	3	2	9	12	13	40
F2/UMTS	0	1	4	3	5	9	20	42
F2/SHAM	1	1	3	2	6	15	13	42
Gesamtzahl	2	8	19	27	25	45	57	246

Gruppe F0a

In der Gruppe F0a wurde die Maximalkonzentration von Null Tieren zum Zeitpunkt t0, von einem Tier zum Zeitpunkt t15, von vier Tieren zum Zeitpunkt t30, von acht Tieren zum Zeitpunkt t45, von 18 Tieren zum Zeitpunkt t60, von 22 Tieren zum Zeitpunkt t90 und von 31 Tieren zum Zeitpunkt t120 erreicht (siehe Tab. 31). Im Schnitt wurde die Maximalkonzentration in der Gruppe nach 86,6 Minuten erreicht.

Gruppe F0b

In der Gruppe F0b wurde die Maximalkonzentration von Null Tieren zum Zeitpunkt t0, von fünf Tieren zum Zeitpunkt t15, von fünf Tieren zum Zeitpunkt t30, von zwölf Tieren zum Zeitpunkt t45, von 16 Tieren zum Zeitpunkt t60, von 23 Tieren zum Zeitpunkt t90 und von 23 Tieren zum Zeitpunkt t120 erreicht. Im Schnitt wurde die Maximalkonzentration in der Gruppe nach 78,0 Minuten erreicht.

Gruppe F2

In der Gruppe F2 wurde die Maximalkonzentration von zwei Tieren zum Zeitpunkt t0, von zwei Tieren zum Zeitpunkt t15, von zehn Tieren zum Zeitpunkt t30, von sieben Tieren zum Zeitpunkt t45, von 20 Tieren zum Zeitpunkt t60, von 36 Tieren zum Zeitpunkt t90 und von 47 Tieren zum Zeitpunkt t120 erreicht. Im Schnitt wurde die Maximalkonzentration in der Gruppe F2 nach 86,5 Minuten erreicht.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass im Verlauf des Erreichens der Maximalkonzentration von Kortikosteron und in Bezug zum Zeitpunkt der Maximalkonzentration von Kortikosteron keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen F0a, F0b und F2 auch in Bezug zur Expositionsart auftraten.

6.5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Teilstudie war es zu überprüfen, ob hochfrequente elektromagnetische Felder im Bereich der Frequenzen des GSM- und UMTS-Mobilfunk-Systems einen Einfluss auf Immunparameter sowie das Stressgeschehen von Ratten haben.

Hintergrund ist die Diskussion nach einer eventuellen Gesundheitsgefährdung durch Mobilfunk beim Menschen. Da es derzeit zum Einfluss auf Immunparameter sowie das Stressgeschehen nahezu keinerlei Studien insbesondere zu Langzeiteffekten gibt, wurde versucht mit der vorliegenden Studie erste Ergebnisse am Tiermodell zu erzielen. In Bezug auf den Menschen muss natürlich die Einschränkung berücksichtigt werden, dass Ergebnisse von Tierexperimenten nicht direkt auf den Menschen übertragen werden können. Trotz dieser Einschränkung kann ein Tierversuch aber Hinweise liefern, ob Veränderungen beim Menschen zu erwarten sind. Da „Menschenversuche“ aus ethischen Gründen auszuschließen sind, sind die durchgeführten Tierversuche die einzige Möglichkeit, relevante Ergebnisse zu Immunparametern sowie zum Stressgeschehen zu erhalten, ohne allein auf epidemiologische Daten angewiesen zu sein.

6.5.1 Diskussion der Methoden

In der vorliegenden Untersuchung wurden Wistar-Ratten verwendet. Dabei handelte es sich ausschließlich um weibliche Tiere. Damit wurde ein potentieller Einfluss des Geschlechts ausgeschlossen (KLEIN, 2000; PILEGAARD UND MADSEN, 2004). Für diese Untersuchung waren Ratten besonders geeignet, da sie sich in kurzer Zeit reproduzieren und alle Tiere unter den gleichen Bedingungen gehalten werden konnten. Somit war es möglich, mehrere Gruppen in einem angemessenen Zeitrahmen zu untersuchen.

Die Tiere wurden in drei identischen, vollklimatisierten geschirmten Metallkammern gehalten. Dadurch war definierte Bestrahlung der Versuchstiere unter Ausschluss externer Feldquellen sichergestellt.

Gehalten wurden die Tiere in Dreiergruppen, nur in Ausnahmefällen zu zweit (z.B. wenn ein Tier der Gruppe verstarb). Dadurch wurde vermieden, dass die normalerweise im Sozialverband lebenden Ratten sozialem Stress ausgesetzt waren und dadurch z.B. das Immunsystem beeinflusst wurde (MANSER, 1992).

Die Blutproben wurden bei allen Tieren unter gleichen Bedingungen gewonnen. Die Blutentnahme war bei allen Tieren problemlos möglich, so dass alle Messwerte bei allen Tieren eruiert werden konnten. An der Blutentnahme waren immer mindestens zwei, maximal drei Personen beteiligt. Das Verbringen der Tiere aus den Expositionskammern in

den Untersuchungsraum erfolgte zur Gewährleistung der Verblindung durch eine unabhängige Person. Die Blutprobenentnahme erfolgte unter Inhalationsanästhesie. Ein potentieller Einfluss der Anästhesie auf die Serumkortikosteronkonzentration konnte durch einen Vorversuch ausgeschlossen werden. Zudem erfolgte der Vergleich der Expositionsarten in jedem Fall gegen die Kontrollgruppe. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde unter identischen Bedingungen Blut genommen. Der potentielle Blutentnahmestress war demzufolge bei allen drei Gruppen gleich groß. Dieser Stress kann aber für unsere immunologische Fragestellung als unerheblich betrachtet werden, da er zu kurz war, um einen Einfluss auf die Antikörperproduktion nehmen zu können (MANSER, 1992; SAALMÜLLER, 2006).

Die statistische Auswertung der Blutentnahmedauer zum Zeitpunkt t₀ ergab keinen signifikanten Einfluss der Blutentnahmedauer auf die Basal-Kortikosteronkonzentration. Damit wurde die Entnahmetechnik auch für die Stressuntersuchungen bestätigt. Eine statistische Auswertung der Blutentnahmedauer zu den übrigen Blutentnahmezeitpunkten wurde als nicht-sinnvoll erachtet, da zu den übrigen Zeitpunkten aufgrund des relativ hohen Entnahmeevolumens mit zusätzlichem Stress gerechnet werden musste. Dieser zusätzliche Stressfaktor kann nicht isoliert untersucht werden. Eine statistische Auswertung des Faktors Blutentnahmedauer ist also nur zum Zeitpunkt t₀ möglich ohne zusätzliche Einflüsse anderer Faktoren. Zudem gilt auch in diesem Falle, dass sowohl die exponierten als auch die nicht-exponierten Tiere diesem zusätzlichen Stress durch das Blutentnahmeevolumen ausgesetzt waren und bei der statistischen Auswertung immer die Werte einer Expositionsart mit den Werten in der Sham-Gruppe verglichen wurden.

Alle Tiere wurden ad libitum mit einem ausgewogenen Futter für Nager versorgt. Ein Nährstoffmangel oder auch ein Überangebot konnte so weitgehend ausgeschlossen werden und damit auch eine Beeinflussung des Immunsystems, wie es in der Literatur beschrieben ist (KONNO ET AL., 1993; DALY ET AL., 1988; DE JONGE ET AL., 2002; SHANG ET AL., 2003; YEH ET AL., 2003).

Das Lichtprogramm wurde so eingerichtet, dass jeden Tag eine zwölfstündige Licht- und eine ebenso lange Dunkelperiode herrschten. Daher gab es für die Tiere in den Kammern keine Jahreszeiten. Diese Quelle eines möglichen Einflusses auf das Immunsystem wurde damit umgangen.

Die Bestimmung der Gesamt IgG-Konzentration und der Antikörpertiter stellen einen effizienten Parameter dar, um die Beeinflussung des Immunsystems zu eruieren. Antikörper

lassen sich z.B. durch eine Blutentnahme leicht gewinnen und sind mittels ELISA spezifisch zu messen. Allerdings repräsentiert die humorale, spezifische Immunantwort nur einen Teilaspekt des Immunsystems (MANSER, 1992; SAALMÜLLER, 2006).

6.5.2 Diskussion der Ergebnisse

6.5.2.1 Immunsystem

Die Ratten wurden zweimal (Tag 7 und Tag 28) mit den beiden Antigenen OvA und IgY immunisiert. Der signifikante Konzentrationsanstieg von Gesamt IgG von Tag 0 über Tag 14 bis Tag 35 zeigt, dass durch die Immunisierung die Gesamtkonzentration der IgG-Antikörper beeinflusst wird. Dies stellt eine physiologische Reaktion des Organismus nach Antigenkontakt dar.

Ein Einfluss der Exposition auf die Gesamt IgG-Konzentration war weder in der Gruppe F0a noch in der Gruppe F0b nachweisbar. Es war aber ein signifikanter Unterschied in der Gruppe F2 messbar. Hier waren die Werte der GSM-Exposition verglichen mit der Kontrollgruppe signifikant erhöht. Dieser Unterschied konnte durch die spezifischen Antikörpertiter (siehe unten) nicht bestätigt werden und spiegelt auch die unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur wieder, die einerseits eine Beeinflussung des Immunsystems durch EMF nachweisen konnten (BOSCOLO ET AL., 2001; NAGESWARI ET AL., 1991), andererseits aber nicht (TUSCHL ET AL., 2006; RÖÖSLI ET AL., 2003; NASTA ET AL., 2006). Zudem muss berücksichtigt werden, dass die Differenz zwischen dem Ausgangslevel vor der Immunisierung und dem Wert nach der Immunisierung gleich war. Da die Gruppe F0b analog exponiert war, konnten die Ergebnisse der F2 Gruppe nicht bestätigt werden.

Unterschiede in den Gruppen F0a, F0b und F2 können durch altersbedingte Unterschiede erklärt werden, denn mit zunehmendem Alter (F0a) steigt die Konzentration des Gesamt IgG. Dies wird in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt..

Vor der Immunisierung mit IgY (Tag 0) waren bei allen Gruppen keine spezifischen Antikörper gegen IgY nachweisbar. Da es sich bei IgY um ein Fremdatigen handelt, das nicht bei Säugetieren vorkommt (LESLIE UND CLEM, 1969; DU PASQUIER ET AL., 1989) entspricht dies den Vorgaben. Da an Tag 14 und 35 Antikörper nachweisbar waren, war die subkutan applizierte Menge an Antigen ausreichend.

Bei der Messung der anti-IgY-Titer ist kein Einfluss der Exposition statistisch nachweisbar. In keiner der untersuchten Gruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied des Titers im Vergleich GSM zur Kontrolle und UMTS zur Kontrolle.

Hier zeigt sich ein Widerspruch zu den Ergebnissen, die bei der Betrachtung der Gesamt IgG-Konzentrationen zutage traten. In der F2-Gruppe der GSM-Gruppe müssten, ebenso wie beim Gesamt IgG die anti-IgY-Titer ebenfalls signifikant erhöht sein, da es zu erwarten gewesen wäre, dass die Messwerte analog ansteigen.

Bei der Messung der anti-OvA-Titer konnten nach der Erstimmunisierung (Tag 14) keine spezifischen Antikörpertiter gemessen werden. Dies stimmt mit den Ergebnissen von KNIPPELS ET AL. (1998, 1999) überein. Nach der Boosterung (Tag 35) waren erwartungsgemäß hohe Antikörpertiter messbar.

Auf die anti-OvA-Titer ist kein Einfluss durch die Exposition messbar, was vergleichbar ist mit Ergebnissen von TUSCHL ET AL. (2006) Diese untersuchten allerdings nicht die humorale Immunantwort, sondern zelluläre Komponenten des Immunsystems. Aber auch Untersuchungen von NASTA ET AL. (2006) konnten bei Mäusen keinen Einfluss von EMF auf die Produktion von Antikörpern gegen OVA nachweisen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in der vorliegenden Studie signifikante Unterschiede nur in der Gruppe F2 (im Sinne einer Erhöhung der Gesamt IgG-Konzentration im Blut) der GSM-exponierten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe (F2 Sham) zu erkennen sind. Dieser potentielle Einfluss steht jedoch im Widerspruch zu nicht signifikanten, aber tendenziell niedrigeren Antikörper-Titern gegen IgY und OvA und konnte zudem in der Gruppe F0b nicht bestätigt werden. Aufgrund des Vorliegens eines signifikanten Einzelergebnisses muss davon ausgegangen werden, dass es sich um einen Zufallsbefund handeln könnte.

6.5.2.2 Stressgeschehen

Bei chronischen Belastungen ist von einer permanent erhöhten Aktivität der Nebenniere auszugehen und der Organismus reagiert auf einen exogenen Stressor mit erhöhter Kortikosteroauschüttung. Die erhöhte Serumkonzentration hält nach Literaturangaben auch länger an (BORELL UND LADEWIG, 1986; REDBO1992; ROBIA, 1998). Der Verlauf der Kortikosteronkonzentration nach Injektion von ACTH als exogenem Stressor kann also Aufschluss über das Stressgeschehen im Organismus geben.

Entsprechend den Ergebnissen von FLESHNER ET AL. (1993) konnte bei allen Tieren (unabhängig von Gruppe und Exposition), die ACTH appliziert bekamen, ein Anstieg der

Kortikosteronkonzentration kurz nach dem Einsetzen des künstlichen Stressors gemessen werden. Die Kortikosteronkonzentration sank aber, im Gegensatz zu den Untersuchungen von FLESHNER ET AL. (1993), nicht nach 1-2 h auf die Basalwerte wieder ab, sondern blieb unterschiedlich erhöht.

In der vorliegenden Studie wurden nur in der Gruppe F0b signifikante Unterschiede gefunden. Die Basalkonzentration von Kortikosteron war in der Gruppe F0b signifikant unterschiedlich. Die GSM- sowie die UMTS-Gruppe hatten dabei niedrigere Basalkonzentrationen als die Kontrollgruppe. Dementsprechend war auch die Differenz zwischen der maximalen Kortikosteronkonzentration und dem Basalwert bei den GSM-exponierten Tieren der Gruppe F0b signifikant größer, da das Ausgangslevel (t0) entsprechend niedriger war. Damit erklärt sich auch das Ergebnis der AUC-Analyse: hier ist die Fläche der AUC der GSM-exponierten Tiere der Gruppe F0b signifikant größer als die AUC-Fläche der UMTS- oder Kontrolltiere. Da die Ausgangsbasis (t0-Konzentration von Kortikosteron) signifikant niedriger liegt als die Kontrollgruppe, der Anstieg aber nach ACTH-Applikation vergleichbar hoch ist, ist dementsprechend auch die AUC-Fläche der GSM-Tiere größer.

Somit sind die Unterschiede in den AUC-Werten in der F0b-Gruppe primär durch die unterschiedlichen Basalkonzentrationen bedingt und dürfen damit nicht überbewertet werden. Hinzu kommt, dass bei der gemeinsamen Auswertung der Darstellung der Schwankungsbreite der Basalkonzentrationen die Verteilung der Ausgangskonzentrationen in Abhängigkeit von der Exposition in allen 3 Gruppen nahezu gleich ist und sich keine signifikanten Unterschiede ergeben. Die Werte, die in der F2-Gruppe zu den signifikanten Veränderungen geführt haben, liegen alle im Kollektiv.

Entscheidend hinsichtlich der Interpretation der Ergebnisse ist zusätzlich, dass diese signifikanten Unterschiede insbesondere in der F2-Gruppe nicht bestätigt werden konnten. Die Gruppe F2 wurde analog der Gruppe F0b exponiert und ist damit direkt vergleichbar. Gründe für die unterschiedliche Basalkonzentration sind hier eher zufälliger Art, bzw. andere Erklärungen liegen nicht vor.

Nach der Literatur ist bei chronischen Belastungen von einer permanent erhöhten Aktivität der Nebenniere auszugehen und der Organismus reagiert auf einen exogenen Stressor mit *erhöhter* Kortikosteronausschüttung. Die erhöhte Serumkonzentration soll auch länger anhalten (BORELL UND LADEWIG, 1986; REDBO 1992; ROBIA, 1998). Diese theoretische Vorgabe konnte in der vorliegenden Studie nicht reproduzierbar bestätigt werden.

Die in der Gruppe F0b gemessenen signifikant *niedrigeren* Kortikosteronkonzentrationen im Vergleich zu der Kontrollgruppe sowie die nicht unterschiedlichen

Kortikosteronkonzentrationen der übrigen Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen lassen somit den Schluss zu, dass chronische hochfrequente magnetische Felder mit GSM- bzw. UMTS-Charakteristik bei der Ratte keine Dauerstress-ähnliche Belastung darstellen.

6.6 ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY

Deutsch

Im vorliegenden Teilprojekt wurden die chronischen Wirkungen von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation auf das Immunsystem und Stressgeschehen im Rattenexperiment untersucht.

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Albino-Ratten vom Stamm WISTAR, RjHAN. Die 294 weiblichen Ratten wurden entweder einer UMTS (900 MHz)- oder einer GSM (1966 MHz)-Exposition mit einer beim Menschen vergleichbaren SAR von 0,4 W/kg unterzogen oder befanden sich als Kontrollgruppe unter einer Scheinexposition (SHAM). Alle Tiere wurden im jeweiligen Feld geboren und wurden bis zum Versuchsende chronisch exponiert. Die für den Hauptversuch relevanten Tiere wurden somit als eigene Nachzucht in den Expositionskammern geboren. Die Untersuchungen wurden an zwei Gruppen (F0, F2) nach unterschiedlicher Expositionsdauer, und an unterschiedlichen Altersgruppen durchgeführt (F0b und F2 im Alter von 19 und 20 Wochen, F0a im Alter von 52 Wochen).

Zur Untersuchung des Immunsystems wurden die Ratten an Versuchstag 7 mit einer Suspension bestehend aus den Antigenen Ovalbumin (OVA) und Huhn Immunglobulin Y (IgY), sowie einem Lipopeptid-Adjuvans (Pam3CysSerLys4) immunisiert. Blutentnahmen erfolgten an Tag 0, sowie zur Untersuchung des Immunisierungserfolgs (Gesamt IgG) und des Titeranstiegs der spezifischen Antikörper jeweils an Tag 14 und Tag 35. Die Tiere wurden dabei im Doppelblind-Design immunisiert bzw. beprobt. Die entsprechenden Antikörper (Gesamt IgG, Anti-OVA, Anti-IgY,) wurden mittels verschiedener spezifischer ELISA-Systeme bestimmt.

In den Durchgängen F0a und F0b wurden jeweils 84 Ratten und bei der F2-Generation 126 Ratten immunisiert. Im Vergleich der unterschiedlichen Expositionsgruppen (GSM, UMTS, SHAM) gab es mit einer Ausnahme (Gesamt IgG, Gruppe F2, GSM > SHAM, $p < 0,05$) keine signifikanten Unterschiede.

Nach Abschluss der Immunisierungen wurden die Untersuchungen zum Stressgeschehen begonnen. Auch hier wurde entsprechend eines kodierten Versuchsplanes im Doppelblind-

Design gearbeitet. Als standardisierter Stressor wurde synthetisch hergestelltes ACTH eingesetzt. Die ACTH-Applikation erfolgte intraperitoneal in einer Dosierung von 100 µg/kg Körpergewicht. Die erste Blutentnahme erfolgte zum Zeitpunkt t₀ vor ACTH-Injektion. Alle weiteren Entnahmen erfolgten 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten nach ACTH-Injektion. Die Messung des Kortikosterons im Serum der gewonnenen Blutproben erfolgte mittels eines indirekten kompetitiven ELISA-Systems.

Da nur in der F0b-Gruppe beim Stressgeschehen signifikante Unterschiede hinsichtlich der Exposition auftraten, die in der analog exponierten F2-Gruppe nicht bestätigt werden konnten, lassen die dargestellten Ergebnisse den Schluss zu, dass chronische hochfrequente magnetische Felder mit GSM- bzw. UMTS-Charakteristik bei der Ratte keine Dauerstress-ähnliche Belastung darstellen.

Englisch

The present part of the project examined the chronic effects of high-frequency electromagnetic fields of mobile telecommunication on immune system and stress parameters in rats.

The animals were WISTAR, RjHAN albino-rats. The 294 female rats were exposed either to UMTS (900 MHz) or to GSM (1900 MHz) with a specific absorption rate (SAR) of 0.4 W/kg compared to humans. The rats of the control group were under pseudo-exposition (SHAM). All animals were born in the respective field and remained in it until the beginning of the experiment. Therefore, the animals relevant for the main experiment were born in the exposition chambers. Two Generations (F0, F2) after different lengths of exposition and different age groups (F0b und F2 at age 19 and 20 weeks, F0a at age 52 weeks) were examined.

To examine the immune system, the rats were immunised on day 7 with the antigens Ovalbumin (OvA) and chicken immunoglobulin Y (IgY) in combination with the lipopeptide adjuvant Pam3CysSerLys4. Blood samples were taken on day 0 and to examine the result of the immunisation (total IgG) and the increase of the specific antibody titers on day 14 and 35, respectively. The animals were immunised and respectively taken samples by double-blind design. The corresponding antibodies (total IgG, anti-OVA titer, anti-IgY titer) were determined by different specific ELISA-systems.

In the groups F0a and F0b 84 rats and in group F2 126 rats were immunised. Comparing the different exposition groups (GSM, UMTS, SHAM) with one exception (total IgG, group F2, GSM □ SHAM, p □ 0.05) no significant differences could be found.

After finishing the immunisations, the experiments on stress parameters were started. The examination protocol was in double-blind design. Synthetically produced ACTH was applied

as a standardised stressor. The ACTH was applied intraperitoneal with a dosage of 100 μ g/kg body weight. The first blood sample was taken at time t0 before ACTH application. All further blood samples were taken 15, 30, 45, 60, 90 and 120 after ACTH application. The serum Kortikosterone was measured by an indirect competitive ELISA-system.

The basal concentration of Kortikosterone significantly differed only in group F0b (GSM and UMTS \square SHAM, $p \square 0.05$). This effect of the group F0b was also confirmed by the AUC value (defined as area determined by the curve progression of the Kortikosterone concentration and a parallel to the x-axis through the intersection of the y-axis (concentration of serum Kortikosterone at time t0)) (GSM and UMTS \square SHAM, $p \square 0.05$).

Significant differences could only be found in some cases especially according to the stress parameters in the group F0b which could not be reproduced in group F2 with the same exposure time. This indicates that the exposure with GSM and UMTS does not alter an ongoing in vivo antigen-specific immune response or stress parameters in rats.

Literatur

Bamberg E, Palme R, Meingassner JG (2001). Excretion of corticosteroid metabolites in urine and faeces of rats. *Laboratory Anim.* 35: 307-314.

Bernhardt JH, Matthes R und Repacholi MH (1997). Non-thermal effects of RF electromagnetic fields. International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP), Munich 1997.

Bessler WG und Jung G (1992). Synthetic lipopeptides as novel adjuvants. *Res. Immunol.* 143: 548-553.

Bhatnagar S and Dallmann M (1998). Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience* 84: 123-139.

von Borell, E und Ladewig, J (1986). Möglichkeiten der Erfassung von chronischen Belastungsreaktionen beim Schwein mit Hilfe von Nebennierenrinden-Funktionsprüfungen und ethologischen Merkmalen. IN: KTBL (Hrsg.) Aktuelle Arbeiten zur artgemäßen Tierhaltung 1985. *KTBL-Schrift* 311: 30-36.

Boscolo P, Di Sciascio MB, D'Ostilio S, Del Signore A, Reale M, Conti P, Bavazzano P, Paganelli R, Di Gioacchino M (2001). Effects of electromagnetic fields produced by radiotelevision broadcasting stations on the immune system of women. *The Science of The Total Environment* 273:1-10.

Brundtland GH (1999). Raising awareness, fighting stigma, improving care. Press release WHO 67.

Buijs RM und Kalsbeek A (2001).. Hypothalamic integration of central and peripheral clocks. *Nature Rev Neurosci.* 2: 521-526.

Buijs RM, van Eden CG, Goncharuk VD, Kalsbeek A (2003). The biological clock tunes the organs of the body: timing by hormones and the autonomic nervous system. *Journal of Endocrinology* 177: 17-26.

Buijs RM, Wortel J, VanHeerikhuize JJ, Kalsbeek A (1997). Novel environment induced inhibition of corticosterone secretion: Physiological evidence for a suprachiasmatic nucleus mediated neuronal hypothalamo-adrenal cortex pathway. *Brain Research* 758: 229-236.

Bundesamt für Strahlenschutz (2005). Broschüre Strahlenthemen: Mobilfunk und Sendetürme. <http://www.bfs.de>.

Cannon WB (1915). *Bodily changes in pain, hunger, fear, and rage*. Bradford, Boston.

Collins PM, Tsang WN, Metzger JM (1984).. Influence of Stress on Adrenocortical Function in the Male Tree Shrew (*Tupaia Belangeri*). *General and Comparative Endocrinology* 55: 450-457.

Chrousos GP, Gold PW (1992). The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral Homeostasis, *J Am Med Ass* (267). 1244-1252.

Cohen S, Tyrell DAJ, Smith AP (1991). Psychological stress and susceptibility to the common cold, *N Engl J Med* (325): 606-612.

Dahlström A, Fuxe K (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in the cell bodies of brain stem neurons, *Acta Pysiol Scand* (suppl. 232): 1-55.

Dallman MF (1993). Stress update. Adaption of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress, *TEM* (4): 62-69.

Daly J M, Reynolds J, Thom A, Kinsley L, Dietrick-Gallagher M, Shou J, Ruggieri B (1988). Immune and Metabolic Effects of Arginine in the Surgical Patient. *Ann. Surg.* 208:512-521.

DeBoer SF, Koopman SJ, Slangen JL, van der Gugten J (1990). Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length, *Physiol Behav* (47): 1117-1124.

De Jonge WJ, Kwikkers KL, te Velde AA, van Deventer SJH, Nolte MA, Mebius RE, Ruijter JM, Lamers MC, Lamers WH (2002). Arginine deficiency affects early B cell maturation and lymphoid organ development in transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation* 110: 1539-1548.

DeKloet ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M (1998). Brain corticosteroid receptor balance in health and disease, *Endoc Rev* (19): 269-301.

Dinan TG (1994). Glucocorticoids and the genesis of depressive illness. A psychobiological model, *Br J Psych* (164): 365-371.

Drabhar FS und McEwen BJ (1997). Acute stress enhances while chronic stress suppresses immune function in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav. Immun.* 11: 286-306.

Drabhar FS und McEwen BJ (1999). Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96: 1059-1064.

Dubrovsky B (1993). Effects of adrenal cortex hormones on limbic structures: Some experimental and clinical correlations related to depression, *J Psychiatr Neurosci* (18): 4-16.

Du Pasquier L, Schwager J, Flajnik M (1989). The immune system of *Xenopus*. *Annu. Rev. Immunol.* 1989.7:251-275.

Fernie KJ, Bird DM and Petitclerc D (1999). Effects of electromagnetic fields on photophasic circulating melatonin levels in american kestrels. *Environ. Health Perspect.* 107: 901-904.

Flügge G (2000). Regulation of monoamine receptors in the brain: Dynamic changes during stress, *Int Rev Cytol* (195): 145-213.

Frankenhaeuser M (1982). Challenge-control interaction as reflected in sympathetic-adrenal and pituitary-adrenal activity: comparison between the sexes, *Scan J Psychol (Suppl. 1)*: 158-164.

Friend, TH, FC Gwadzdauskas und CE Polan (1979). Change in adrenal response from free stall competition. *J. Dairy Sci.* 62: 768 – 771.

Friend, TH, GR Dellmeier und EE Gbur (1985). Comparison of four methods of calf confinement. I. *Physiology. J. Anim. Sci.* 60: 1095 – 1101.

Gassmann M, Thömmes P, Weiser T, Hübscher U (1990). Efficient production of chicken egg yolk antibodies against a conserved mammalian protein. *FASEB J.* 4:2528-2532.

Hedges DW, Masari C, Salyer DL, Lund TD, Hellewell JL, Johnson AC, Lephart ED (2003). Duration of transcranial magnetic stimulation effects on the neuroendocrine stress response and coping behavior of adult male rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27: 633-638.

Herman JP, Cullinan WE (1997). Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamus-pituitary–adrenocortical axis, *Trends Neurosci* (20): 78-84.

Heumann Didier, Lauener R, Ryffel B (2003). The dual role of LBP and CD14 in response to Gram-negative bacteria or Gram-negative compounds. *J. Endotoxin Res.* 9: 381-384.

Holsboer F, Spengler D, Heuser I (1992). The role of corticotropin-releasing hormone in the pathogenesis of Cushing's disease, anorexia nervosa, alcoholism, affective disorders and dementis, *Prog Brain Res* (93): 385-417.

Imaizumi N, Yamamoto I, Kamei M, Yoshida I, Kigoshi T, Hosojima H, Uchida K, Morimoto S (1987). High-performance liquid chromatographic separation of corticosteroids in plasma of rats. Its application to the determination of the circadian rhythm of 18-hydroxycorticosterone related to aldosterone and corticosterone. *Hormone Research* 27: 53-60

Joels M, DeKloet ER (1989). Effects of glucocorticoids and norepinephrine on the excitability in the hippocampus, *Science* (245): 1502-1505.

Juutilainen J und de Seze R (1998). Biological effects of amplitude-modulated radiofrequency radiation. *Scand. J. Work. Environ. Health* 24: 245-254.

Kalsbeek A, Buijs RM (2002). Output pathways of the mammalian suprachiasmatic nucleus: coding circadian time by transmitter selection and specific targeting. *Cell and Tissue Research* 309: 109-118.

Kalbeek A, Ruitter M, la Fleur SE, Van Heijningen C, Buijs RM (2003). The diurnal modulation of hormonal responses in the rat varies with different stimuli. *Journal of Neuroendocrinology* 15: 1144-1155.

Kaufmann, C., Thun, R. (1998). Einfluss von akutem Stress auf die Sekretion von Cortisol und Progesteron beim Rind. *Tierärztl. Umschau* 53: 403-409.

Kato M, Honma K, Shigemitsu T und Shiga Y (1993). Effects of exposure to a circularly polarized 50-Hz magnetic field on serum and pineal melatonin levels in rats. *Bioelectromagnetics* 14: 97-106.

Kellner, J., Erhard, M H, Schraner, I., Lösch, U. (1992). Influence of various adjuvants on antibody synthesis following immunization with an haptent. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 373: 51-55.

Klein SL (2000). The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. *Neurosci. Behav. Rev.* 24:627-638.

Kleine, B, Rapp, W, Wiesmüller, K-H, Edinger, M, Beck, W, Metzger, J, Ataulakhanov, R, Jung, G und Bessler, WG. (1994). Lipopeptide-polyethylene conjugates as mitogens and adjuvants. *Immunobiol.* 190: 53-66.

Knippels LMJ, Penninks AH, Spanhaak S und Houben GF (1998). Oral sensitization to food proteins: a Brown Norway rat model. *Clin. Exp. Allergy* 28: 368-375.

Knippels LMJ, Penninks AH, van Meeteren M, Houben GF (1999). Humoral and Cellular Immune Responses in Different Rat Strains on Oral Exposure to Ovalbumin. *Food Chem. Toxicol.* 37: 881-888.

Konno A, Utsuyama M, Kurashima C, Kasai M, Kimura S, Hirokawa K (1993). Effects of a protein-free diet or food restriction on the immune system of Wistar and Buffalo rats at different ages. *Mech. Ageing Develop.* 72: 183-197.

Krewski D, Byus CV, Glickman BW, Lotz WG, Mandeville R, Mc Bride ML, Prato FS und Weaver DF (2001). Recent advances in research on radiofrequency fields and health. *J. Toxicol Environ. Health B. Crit. Rev.* 4: 145-159.

Kupersmith MJ, Kaufman D, Paty DW, Ebers G, McFarland H, Johnson K, Reingold S, Whitaker J (1994). Megadose corticosteroids in multiple sclerosis, *Neurology* (44): 1-4.

Lai H, Carino MA, Horita A und Guy AW (1990). Corticotropin-releasing factor antagonist blocks microwave-induced decreases in high-affinity choline uptake in the rat brain. *Brain Res. Bull.* 25: 609-612.

Leal AMO, Carvalho J, Moreira AC (1999). Ontogenetic diurnal variation of adrenal responsiveness to ACTH and stress in rats. *Horm. Res.* 52: 25-29.

Leal AMO, Carvalho J, Moreira AC (1995). Diurnal Variation of the Pituitary-Adrenal and Avp Responses to Stress in Rats under Food Restriction. *Life Sciences* 56: 191-198.

Leal AMO, Moreira AC (1997a) Daily variation of plasma testosterone, androstendione, and corticosterone in rats under food restriction. *Hormones and Behavior* 31: 97-100.

Lee JJ, Eisenberg P, Papadopoulos V, Wang J, Widmaier EP (2004) Reversible changes in adrenocorticotropin (ACTH)- induced adrenocortical steroidogenesis and expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor during the ACTH-insensitive period in young rats. *Endocrinology* 145: 2165-2173.

Leszczynski D, Joenväärä S, Reivinen J und Kuokka R (2002). Non-thermal activation of the hsp27/p38MAPK stress pathway by mobile phone radiation in human endothelial cells: molecular mechanisms for cancer- and blood-brain barrier-related effects. *Differentiation* 70: 120-129.

Leslie GA, Clem LW (1969). Phylogeny of immunoglobulin structure and function. III. Immunoglobulins of the chicken. Department of Microbiology, College of Medicine, University of Florida, 1969 (<http://www.jem.org>)..... (Datum des Zugriffs: 09. Januar 2007).

Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotzky PM, Meaney MJ (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress, *Science* (277): 1659-1662.

Löscher W und Liburdy RP (1998). Animal and cellular studies on carcinogenic effects of low frequency (50/60 Hz) magnetic fields. *Mutation Res.* 410: 185-220.

Löscher, W (2003). Die Auswirkungen elektromagnetischer Felder von Mobilfunksendeanlagen auf Leistung, Gesundheit und Verhalten landwirtschaftlicher Nutztiere: Eine Bestandsaufnahme. *Praktischer Tierarzt* 84 (11): 850-863.

Lupien SJ, Nair NPV, Brière S, Maheu F, Tu MT, Lemay M, McEwen BS, Meaney MJ (1999). Increased cortisol levels and impaired cognition in human aging: Implication for depression and dementia in later life, *Rev Neurosci* (10): 117-139.

Lupien SJ, McEwen BS (1997). The acute effects of corticosteroids on cognition: integration of animal and human model studies, *Brain Res Rev* (24): 1-27.

Mann K und Röschke J (1996). Effects of pulsed high-frequency electromagnetic fields on human sleep. *Neuropsychobiology* 33: 41-47.

Mann K, Röschke J, Connemann B und Beta H (1998a). No effects of pulsed high-frequency electromagnetic fields on heart rate variability during human sleep. *Pharmacoelectroencephalography* 38: 251-256.

Mann K, Wagner P, Brunn G, Hassan F, Hiemke C und Röschke J (1998b). Effects of pulsed high-frequency electromagnetic fields on the neuroendocrine system. *Clinical Neuroendocrinology* 67: 139-144.

Manser CE (1992). The assessment of stress in laboratory animals. Research Animals Department, RSPCA, Causeway, Horsham, England.

Marquez C, Nadal R, Armario A (2004). The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: Individual differences. *Neuroscience* 123: 601-612.

Mason JW (1968). A review of psychoendocrine research on the pituitary-adrenal cortical system, *Psychosom Med* (30): 576-607.

Mashevich M, Folkman D, Kesar A, Barbul A, Korenstein R, Jerby E und Avivi L (2003). Exposure of human peripheral blood lymphocytes to electromagnetic fields associated with cellular phones leads to chromosomal instability. *Bioelectromagnetics* 24: 82-90.

McCormick CM, Smythe JW, Sharma S, Meaney MJ (1995). Sex-specific effects of prenatal stress on hypothalamic pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats, *Dev Brain Res* (84): 55-61.

Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ (1984). Physiological functions of glucocorticoids and their reaction to pharmacological actions, *Endocr Rev* (5): 25-44.

Nageswari KS, Sarma KR, Rajvanshi VS, Sharan R, Sharma M, Barathwal V, Singh V (1991). Effect of chronic microwave radiation on T cell-mediated immunity in the rabbit. *Int J Biometeorol* 35: 92-97.

Nasta F, Prisco MG, Pinto R, Lovisolo GA, Marino C, Pioli C (2006). Effects of GSM-Modulated Radiofrequency Electromagnetic Fields on B-Cell Peripheral Differentiation and Antibody Production. *Radiation Res.* 165: 664-670.

Nieuwenhuis R (1985). *Chemoarchitecture of the brain*, pp. 33-41, Springer Verlag
Norman AW, Litwack G (1997): *Hormones*, 2nd edition, Academic Press Orlando, USA.

Patterson R, Youngner JS, Weigle WO, Dixon FJ (1962). The Metabolism of Serum Proteins in the Hen and Chick and Secretion of Serum Proteins by the Ovary of the Hen. *J. General Physiol.* 45: 501-513.

Pilegaard K, Madsen C (2004). An oral Brown Norway rat model for food allergy: comparison of age, sex, dosing volume, and allergen preparation. *Toxicol.* 196: 247-257.

Plotzky PM, Owens MJ, Nemeroff CB (1998). Psychoneuroendocrinology of depression. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, *Psychiatr Clin North Am* (21): 293-307.

Portier CJ und Wolfe MS (1998). Assessment of health effects from exposure to power-line frequency electric and magnetic fields. NIEHS Working Group Report, National Institute of Environmental Health Sciences, U.S. National Institutes of Health, Research Triangle Park, NC.

Raff H, Hong JJ, Oaks MK, Widmaier EP (2003). Adrenocortical responses to ACTH in neonatal rats: effect of hypoxia from birth on corticosterone, StAR, and PBR. *American Journal of Physiology-regulatory Integrative and Comparative Physiology* 284: R78-R85.

Raff H, Lee JJ, Widmaier EP, Oaks MK, Engeland WC (2004). Basal and adrenocorticotropin-stimulated corticosterone in the neonatal rat exposed to hypoxia from birth: Modulation by chemical sympathectomy. *Endocrinology* 145: 79-86.

Radon K, Parera D, Rose DM, Jung D und Vollrath L (2001). No effects of pulsed radio frequency electromagnetic fields on melatonin, cortisol, and selected markers of the immune system in man. *Bioelectromagnetics* 22: 280-287.

Redbo, I (1993). Stereotypies and cortisol secretion in heifers subjected to tethering. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 38, 213-225.

Reiter RJ und Richardson BA (1992). Magnetic field effects on pineal indoleamine metabolism and possible biological consequences. *FASEB J.* 6: 2283-2287.

Repacholi, M H (2001). Health risks from the use of mobile phones. *Toxicol. Lett.* 120 (1-3): 323-331.

Robia, C (1998). Bestimmung der Konzentration von Kortisolmetaboliten im Kot von Wiederkäuern als Parameter für die Kortisolkonzentration im Blut. Diss. med. vet., Universität Wien.

Rodriguez M, Petitclerc D, Nguyen DH, Block E und Burchard JF (2002). Effect of electric and magnetic fields (60 Hz) on production, and levels of growth hormone and insulin-like growth factor 1, in lactating, pregnant cows subjected to short days. *J. Dairy Sci.* 85: 2843-2849.

Rööfli M, Rapp R, Braun-Fahrländer C (2003). Hochfrequente Strahlung und Gesundheit – eine Literaturanalyse. *Gesundheitswesen* 65: 378-392.

Röschke J und Mann K (1997). No short-term effects of digital mobile radio telephone on the awake human electroencephalogram. *Bioelectromagnetics* 18: 172-176.

Saalmüller A (2006). New understanding of immunological mechanisms. *Vet. Microbiol.* 117:32-38.

Sage D, Maurel D, Bosler O (2001). Involvement of the suprachiasmatic nucleus in diurnal ACTH and corticosterone responsiveness to stress. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 280: E260-E269.

Sakellaris, P.C. und J. Vernikos-Danellis (1975). Increased rate of response of the pituitary-adrenal-system in rats adapted to chronic stress. *Endocrinol.* 97: 597–602.

Seckl JR, Olsson T (1995). Glucocorticoid hypersecretion and the age impaired hippocampus: cause or effect? *J Endocrinol* (145): 201-211.

Selye H (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents, *Nature* (138): 32.

Sgoifo A, DeBoer SF, Westenbroek C, Maes FW, Beldhuis H, Suzuki T, Koolhaas JM (1997). Incidence of arrhythmias and heart rate variability in wild type rats exposed to social stress, *Am J Physiol* (273): H1754-H1760.

Shang H-F, Tsai H-J, Chiu W-C, Yeh S-L (2003). Effects of dietary arginine supplementation on antibody production and antioxidant enzyme activity in burned mice. *Burns* 29: 43-48.

Starkman MN, Gebarsky SS, Berent S, Schteingart DE (1992). Hippocampal formation volume, memory dysfunction, and cortisol levels in patients with Cushing's Syndrome, *Biol Psychiatry* (32): 756-765.

Sun S, Mo W, Ji Y, Liu S (2001). Preparation and mass spectrometric study of egg yolk antibody (IgY) against rabies virus. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 15: 708-712.

Turner JW, Nemeth R, Rogers C (2003). Measurement of fecal glucocorticoids in parrotfishes to assess stress. *General and Comparative Endocrinology* 133: 341-352.

Tuschl H, Novak W, Molla-Djafari H (2006). In vitro Effects of GSM Modulated Radiofrequency Fields on Human Immune Cells. *Bioelectromagnetics* 27: 188-196.

VonHolst D (1993). Zoologische Stressforschung – ein Bindeglied zwischen Psychologie und Medizin, *Spektrum der Wissenschaft* (5): 92-96.

VonHolst D, Fuchs E, Stöhr W (1983). Physiological changes in male *Tupaia belangeri* under different types of social stress. In: Dembrowsky TM, Schmidt TH and Blümchen G (ed.) *Biobehavioural bases of coronary heart disease*, pp. 383-390, Springer Verlag, Berlin.

Weiss J, Maeß J, Nebendahl K (2003). *Haus- und Versuchstierpflege*. Enke Verlag, Stuttgart. ISBN 3-8304-1009-3.

Wenzel C, Wöhr AC und Unshelm J (2002). Das Verhalten von Milchrindern unter dem Einfluss elektromagnetischer Felder. *Prakt. Tierarzt* 83: 260-265.

Windle RJ, Wood SA, Lightman SL, Ingram CD (1998). The pulsatile characteristics of hypothalamo-pituitary-adrenal activity in female Lewis and Fischer 344 rats and its relationship to differential stress responses. *Endocrinology* 139: 4044-4052.

Windle RJ, Wood SA, Shanks N, Lightman SL, Ingram CD (1998). Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: Dynamic interaction with the response to acute stress. *Endocrinology* 139: 443-450.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer (IARC) (2002). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 80, Non-ionizing radiation, Part 1: Static and extremely low frequency (ELF) electric and magnetic fields, IARC Press, Lyon.

Yeh S-L, Shang H-F, Lin M-T, Yeh C-L, Chen W-J (2003). Effects of Dietary Glutamine on Antioxidant Enzyme Activity and Immune Response in Burned Mice. *Nutr.* 19: 880-885.

Yellon SM (1994). Acute 60 Hz magnetic field exposure effects on the melatonin rhythm in the pineal gland and circulation of the adult Djungarian hamster. *J. Pineal Res.* 16: 136-144.

Zilz A, Li H, Castello R, Papadopoulos V, Widmaier EP (1999). Developmental expression of the peripheral-type benzodiazepine receptor and the advent of steroidogenesis in rat adrenal glands. *Endocrinology* 140: 859-864.