

Zwischenbericht 2005/2006

Projekt

***In vivo* –Experimente unter Exposition mit
hochfrequenten elektromagnetischen Feldern
der Mobilfunkkommunikation –
A) Langzeituntersuchungen**

Forschungsnehmer:

**Forschungsverbund EMVU der Technischen Universität
München/Ludwig-Maximilian Universität (TUM/LMU)**

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.

Zusammenfassung und Chronologie wichtiger Ereignisse und Projektabschnitte im Berichtszeitraum 2005

Das erste Quartal des Projektjahres 2005 war geprägt durch den Aufbau der neu konzipierten Expositionseinrichtungen, die Funktionsprüfung der Anlagen wie Klimatisierung, HF-Dichtigkeit der Kammern, Vermessung der Feldhomogenität und Modelluntersuchungen zur Energieabsorption (SAR) von Ratten unter Zugrundelegung unterschiedlicher Tierhaltungssituationen. Neben der Federführung durch den Lehrstuhl für HF-Technik, AG HFS und Fr. Dr. Okorn als Verantwortliche für die wissenschaftliche Koordination und die Bauleitung, waren auch die anderen Projektpartner durch Arbeitsleistungen zur Verringerung der Baukosten am Aufbau der Versuchsanlage und der Expositionskammern beteiligt.

Im April 2005 wurde nach Lieferung durch den Züchter, mit der Habituation der ersten vorgesehenen Tiergeneration F_{-1} begonnen und die Tiere in eine der drei Kammern ohne Befeldung eingebracht. Als Folge eines am 10.05.05 aufgetretenen, fremd verschuldeten Wasserschadens an den beiden für die Befeldung vorgesehenen Expositionskammern, musste eine Verlegung sämtlicher Versuchstiere aus Haltings- Hygiene- und Klimatisierungsgründen in den Tierstall des Instituts für Tierphysiologie erfolgen.

Nach Abschluss der Instandsetzungsarbeiten wurden die ursprünglich 9 Wochen alten Versuchstiere zwei Monate später wieder in der Kontrollkammer eingestallt und nach einer kurzen Habituationszeit konnte der geplante Versuchsablauf weiter verfolgt werden. Die Versuchstiere waren in der Zwischenzeit 17 Wochen alt.

Zwischen Mitte Juli und Anfang September 2005 fanden Kognitionstests zur Selektion der F_{-1} -Elterngeneration statt, in deren Anschluss die Tiere nach ihrer Testleistung für die Reproduktion ausgewählt und in zwei Gruppen eingeteilt wurden. Insgesamt wurde die Versuchstierzahl somit von ursprünglich $N=120$ (60m, 60f) auf insgesamt $N=94$ (47m, 47f) Versuchstiere mit durchschnittlicher Testleistung reduziert.

Mitte August bzw. Mitte September 2005 konnte mit der Verteilung der Zuchtpaare der Tiergruppe 1 (Alter 22 Wochen) bzw. der Tiergruppe 2 (Alter 26 Wochen) auf die einzelnen Expositionskammern und die Reproduktion der F_{-1} -Generation unter Expositionsbedingungen (GSM, UMTS und Sham), begonnen werden. Details der Reproduktion der F_{-1} Generation sind den Zusammenstellungen und Tabellen des Berichts von Frau Dr. med. vet. S. Okorn zu entnehmen.

Bei der Aufzucht der F_0 -Generation, wurden ab dem 7. bis zum 21. Lebenstag relevante Entwicklungsparameter wie die Anzahl der Tage bis zum

- Durchbruch beider oberer Schneidezähne durch das Zahnfleisch,
- Öffnung beider äußerer Gehörgänge und
- Öffnung beider Augen

die Körpergewichtszunahme während der Aufzucht und ab dem 21. Lebenstag das Körpergewicht der Jungtiere in wöchentlichen Abständen bis zur 12. Lebenswoche dokumentiert.

Noch Mitte November (Gruppe 1 F_0a) bzw. Mitte Dezember (Gruppe 2 F_0a) wurde der 1. Kognitionstest vorgenommen. Ergebnisse der Kognitionstests können wegen der Verblindung bis zum Studienabschluss nicht mitgeteilt werden.

Am 30. November 2005 konnten die Untersuchungen des Immunsystems der F_0b -Gruppe1-Generation – bestehend aus 43 weiblichen Ratten (13 UMTS, 15 GSM, 15

SHAM) – begonnen werden. Der Immunisierungszeitraum dieser F0b-Gr.1-Tiere erstreckte sich vom 30.11.05 bis zum 4.01.2006, und ging nahtlos über in den Immunisierungszeitraum der F0b-Gr.2-Tiere (41 Tiere, davon 11 UMTS, 12 GSM, 18 SHAM) vom 4.01. bis 8.02.06.

Alle weiteren Untersuchungen und Projektablaufe sind dem Jahr 2006 zuzuordnen. Bei der Arbeitsgruppe Kognition stand zu Beginn des Jahres 2005 der Aufbau der Testeinrichtungen (10 Skinner Boxen) in einer voll klimatisierten Kammer im Vordergrund. Als besonders erwähnenswert ist die Konzeption und Realisierung eines Überwachungssystems für die operanten Verhaltenstesteinrichtungen zu nennen. Es erlaubt neben der Aufnahme der Untersuchungsdaten, die Überwachung und Dokumentation der Konstanz der Umgebungsbedingungen während der nächtlichen Testsituationen. Über entsprechende Sensoren werden sekundengenau eventuelle 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 aufgenommen.

Als erste projektrelevante Untersuchungen wurden die im September bzw. Oktober 2005 geborenen Ratten dieser F0-Generation im November bzw. Dezember 2005 der Prüfung der operanten Verhaltensleistung im Alter von zehn Wochen unterzogen. Alle Versuchstiergruppen bestanden aus fünf codierten Weibchen und fünf codierten Männchen. Die Untersuchungen wurden unter "blinden" Bedingungen durchgeführt. Den Leitern der Verhaltensuntersuchungen war nicht bekannt, aus welcher der drei Kammern (GSM, UMTS, Sham) die jeweiligen Tiere stammten.

Von der Arbeitsgruppe Blut-Hirn-Schranke wurden die 2005 durchgeführten Vorversuche und methodische Vorarbeiten berichtet. Die Messungen der Integrität der BHS der Versuchstiere begannen 2006. Um die Nachweisempfindlichkeit des Einflusses der Bestrahlung auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) zu verbessern, sollte eine Methode gewählt werden, die die BHS reproduzierbar latent schwächt. Dies könnte über eine Erhöhung des Blutdruckes (über die Auslösung des Cushing-Reflexes oder Infusion vasoaktiver Hormone) oder über die Infusion hyperosmolarer Lösungen erreicht werden.

Die beiden ersten Methoden erwiesen sich als ungeeignet für dieses Projekt. Bei einer Infusion hyperosmolarer Lösungen (Arabinosekonzentration von 0,5 mol/l) kommt es auf der Infusionsseite zu einer geringfügigen Öffnung der BHS, auf der Kontrollseite bleibt die BHS intakt. Die 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 wurde von der Arbeitsgruppe als idealer Challenge betrachtet und wird deshalb bei den BHS-Untersuchungen verwendet. Die erste Gruppe der bestrahlten Tiere wurde unter diesen Versuchsbedingungen bereits untersucht. Die Ergebnisse werden derzeit noch ausgewertet.

Weiterhin stand die Untersuchung der CA1-Neuronen im Vordergrund. Sie ist für die vorliegende 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.

Als Nachweisverfahren für die CA1-Neuronen fiel die Entscheidung für die physikalische Disektormethode, mit der es möglich ist, die Zahl der CA1-Neuronen sehr genau und unverfälscht zu bestimmen.

Im Bereich der Arbeitsgruppe Immunreaktionen wurde im Januar 2005 in Vorbereitungsuntersuchungen an speziell dafür vorgesehenen Ratten begonnen, die für den Hauptversuch zu wählenden methodischen Ansätze zu entwickeln und festzulegen. Fragestellungen waren:

- In wie weit die Narkose per se einen Stressor darstellt.
- Welches Inhalationsnarkotikum sich als geeignet darstellt.
- Welche Corticosteronkonzentrationen bei wachen Tieren auftreten.

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 seitdem auch in den Hauptversuchen angewandt wird. Da sich die Narkotika Halothan und Isofluran hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Corticosteronkonzentration nicht unterschieden, wird in den Hauptversuchen Isofluran verwendet.

Am 30.11.05 (sowie am 4.01.06) erfolgte jeweils die 1. Blutentnahme vor Beginn der Immunisierung (Tag 0). Im Abstand von 7 Tagen (Grundimmunisierung) sowie 28 Tagen (Boosterung) wurden die Tiere mit einer Suspension bestehend aus den Antigenen Ovalbumin (OVA) und Hühner IgY, sowie dem Lipopeptid-Adjuvans Pam₃Cys-Ser-Lys₄ (je 1 mg/ml) in phospatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2; davon je 0,2 ml/Tier und Injektion) immunisiert. Weitere Blutentnahmen zur Untersuchung des Impferfolgs und des Titeranstiegs der spezifischen Antikörper erfolgten jeweils an Tag 14 und Tag 35. Die Tiere wurden dabei im Doppelblind-Design immunisiert bzw. beprobt.

Diese Untersuchungen sind derzeit noch nicht abgeschlossen, mit ersten Ergebnissen ist bis Juli 2006 zu rechnen.

Dies trifft auch für die Untersuchungen zum Stressgeschehen zu, die im Januar 2006 begonnen wurden und Gegenstand des nächsten Zwischen- bzw. Abschlußberichtes sind.

Berichte der einzelnen Projektpartner

Tierphysiologie

Vorarbeiten

Nach Abschluss der Entwicklung eines alternativen Expositionskonzeptes konnte Mitte Januar 2005 mit den Aufbauarbeiten der Expositionseinrichtung begonnen werden. Im Anschluss an die Fertigstellung der drei Expositionskammern und der zugehörigen Klimaanlage trafen Anfang April 2005 die aus Frankreich (Züchter Janvier) stammenden N=124 Wistar-Rj:HAN-Ratten der F₋₁-Generation auf dem Versuchsgelände ein.

Die neun Wochen alten Versuchstiere wurden bei ihrer Ankunft auf ihren Gesundheitszustand hin überprüft, gewogen und randomisiert in 2er- (männliche Versuchstiere) bzw. 3er-Gruppen (weibliche Versuchstiere) auf einzelne Käfige aufgeteilt. Bei der Eingangsuntersuchung konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden. Das mittlere Körpergewicht der N=62 weiblichen Versuchstiere betrug $220,20 \pm 11,79\text{g}$, während die N=62 männlichen Versuchstiere im Mittel $332,90 \pm 19,50\text{g}$ wogen.

Die Unterbringung erfolgte zunächst in der Kontrollkammer, da in den beiden für die Befeldung vorgesehenen Expositionskammern zu diesem Zeitpunkt noch Messungen zur Dosimetrie durchgeführt wurden. In den folgenden Tagen wurden alle Versuchstiere zur eindeutigen Identifikation mit subkutanen Transpondern versehen.

Im Zuge der als Folge eines am 10.05.06 aufgetretenen fremdverschuldeten Wasserschaden notwendigen Abbau-, Reparatur- und Wiederaufbaumaßnahmen an den beiden für die Befeldung vorgesehenen Expositionskammern musste die Klimaanlage abgeschaltet und von der Expositionseinrichtung abgekoppelt werden. Die fehlende Klimatisierung machte eine Verlegung sämtlicher Versuchstiere in den Tierstall des Instituts für Tierphysiologie erforderlich. Nach Abschluss der Reparaturmaßnahmen wurden die Versuchstiere zwei Monate später auf das Versuchsgelände zurücktransportiert. Nach dem Wiedereinstellen in der Kontrollkammer und einer kurzen Habituationszeit konnte der ursprünglich geplante Versuchsablauf wieder aufgenommen werden. Die Versuchstiere waren in der Zwischenzeit 17 Wochen alt. Das mittlere Körpergewicht der N=62 weiblichen (f) Versuchstiere betrug bei ihrer Rückkehr $280,76 \pm 17,49\text{g}$, während die N=62 männlichen (m) Versuchstiere jetzt im Mittel $508,09 \pm 32,25\text{g}$ wogen.

Aus logistischen Gründen wurden N=120 (60m, 60f) der 124 Versuchstiere randomisiert in zwei den gesamten Versuchsablauf getrennt und um ca. einen Monat versetzt durchlaufende Tiergruppen (Tiergruppe 1: 30m, 30f, Tiergruppe 2: 30m, 30f) eingeteilt. Die restlichen N=4 (2m, 2f) Versuchstiere wurden als Reservetiere gehalten.

Selektion (Kognitionstest)

Zwischen Mitte Juli und Anfang September 2005 fanden Kognitionstests zur Selektion der F₋₁-Elterngeneration statt. Aus ursprünglich jeweils N=60 (30m, 30f) Tieren einer Tiergruppe wurden N=46 (23m, 23f) Tiere in der Tiergruppe 1 und N=48 (24m, 24f) Tiere in der Tiergruppe 2 anhand ihrer Testleistung für die Reproduktion ausgewählt. Insgesamt wurde die Versuchstierzahl somit von ursprünglich N=120 (60m, 60f) um ca. 23% auf insgesamt N=94 (47m, 47f) Versuchstiere mit durchschnittlicher Testleistung reduziert.

Reproduktion (Frau Dr. S. Okorn)

Vor Beginn der Reproduktion wurden die F₋₁-Versuchstiere der Tiergruppen 1 und 2 randomisiert in drei Versuchsgruppen GSM, UMTS und SHAM eingeteilt (Tab. 1).

Tiergruppe	F ₋₁ -Generation: Versuchsgruppengröße (N)		
	GSM	UMTS	SHAM
1	14 (7m, 7f)	14 (7m, 7f)	18 (9m, 9f)
2	14 (7m, 7f)	14 (7m, 7f)	20 (10m, 10f)
Insgesamt	28 (14m, 14f)	28 (14m, 14f)	38 (19m, 19f)

Tabelle 1 F₋₁-Generation: Versuchsgruppengröße (N)

Anschließend wurden die männlichen und weiblichen Tiere einer Tiergruppe innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen randomisiert zu N=47 Zuchtpaaren (1m:1f) zusammengefasst (Tab. 2).

Tiergruppe	F ₋₁ -Generation: Anzahl der Zuchtpaare (N) pro Versuchsgruppe		
	GSM	UMTS	SHAM
1	7	7	9
2	7	7	10
Insgesamt	14	14	19

Tabelle 2 F₋₁-Generation: Anzahl (N) der pro Versuchsgruppe für die Reproduktion eingesetzten Zuchtpaare

Mitte August bzw. Mitte September 2005 konnte mit der Verteilung der Zuchtpaare der Tiergruppe 1 (Alter 22 Wochen) bzw. der Tiergruppe 2 (Alter 26 Wochen) auf die einzelnen Expositionskammern die Exposition und Reproduktion der F₋₁-Generation begonnen werden. Die Zuchtpaare der F₋₁-Generation wurden vor der Paarung (1:1-Paarung primiparer Weibchen) gewogen (Tab. 3) und anschließend in Käfige mit Gittereinsatz gesetzt.

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

Ergebnisse der Untersuchungen zur Reproduktionsfähigkeit (Frau Dr. S. Okorn)

Für die Untersuchungen zur Reproduktionsfähigkeit (Tab. 4) wurden nach dem Zufallsprinzip pro Versuchsgruppe (GSM, UTMS, SHAM) jeweils N=14 Zuchtpaare ausgewählt.

F ₋₁ -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)	591,23 ± 62,38	558,53 ± 32,92	583,47 ± 40,79
Weibchen (f)	300,05 ± 18,86	305,76 ± 19,55	297,12 ± 15,04

Tabelle 3 F₋₁-Generation: Mittleres Körpergewicht (g) der männlichen und weiblichen Versuchstiere bei Paarungsbeginn

F₋₁-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	85,71	100	92,85
Fertilitäts-Index (%) = Anzahl der Weibchen mit positiver Trächtigkeitskontrolle am Tag 14 der Gravidität x 100/Anzahl der zur Paarung eingesetzten Zuchtpaare	85,71	92,85	92,85
Trächtigkeitsrate (%) = Anzahl der trächtigen Weibchen x 100/Anzahl der besamten Weibchen	100	92,85	100
	GSM (N=12)	UMTS (N=14)	SHAM (N=13)
Paarungsdauer (d) = durchschnittliche Paarungsdauer in Tagen	2,42 ± 0,67	2,43 ± 0,94	2,54 ± 1,13
	GSM (N=12)	UMTS (N=13)	SHAM (N=13)
Trächtigkeitsdauer (d) = durchschnittliche Trächtigkeitsdauer in Tagen	22,17 ± 0,39	22,54 ± 0,52	22,62 ± 0,51
Durchschnittliches Körpergewicht während der Trächtigkeit (g) (Abb. 1):			
Tag 0 der Trächtigkeit	299,35 ± 18,58	300,82 ± 11,97	297,41 ± 15,07
Tag 7 der Trächtigkeit	324,23 ± 18,69	324,80 ± 12,97	320,88 ± 17,54
Tag 14 der Trächtigkeit	358,09 ± 23,11	356,15 ± 14,30	352,64 ± 16,25
Tag 20 der Trächtigkeit	446,84 ± 35,52	430,28 ± 30,02	440,05 ± 23,14
Durchschnittliche Körpergewichtsveränderung während der Trächtigkeit (g) (Abb. 2):			
Tag 0 bis Tag 7	24,88 ± 6,47	23,98 ± 6,28	23,47 ± 8,58
Tag 7 bis Tag 14	33,87 ± 7,65	31,35 ± 7,85	31,76 ± 6,37
Tag 14 bis Tag 20	88,75 ± 16,58	74,13 ± 22,23	87,41 ± 12,08
Tag 0 bis Tag 20	147,49 ± 21,94	129,46 ± 30,29	142,64 ± 12,94
Frühgeburtenrate (%) = Anzahl der Frühgeburten x 100/Anzahl der trächtigen Muttertiere (Frühgeburten = Geburt vor dem 20. Trächtigkeitstag)	0	0	0

Untersuchungsparameter	GSM (N=12)	UMTS (N=13)	SHAM (N=13)
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...)	1/12	2/13	2/13
	GSM (N=11)	UMTS (N=11)	SHAM (N=11)
Wurfgröße (N)			
Gesamtzahl der lebend geborenen Nachkommen (NK)	137	101	133
Anzahl der lebend geborenen männlichen NK	67	49	59
Anzahl der lebend geborenen weiblichen NK	70	52	74
Anzahl tot geborener NK	1	2	5
Durchschnittliche Wurfgröße (N) = durchschnittliche Anzahl der pro Wurf lebend geborenen Nachkommen (NK)	12,45 ± 2,81	9,42 ± 3,80	12,09 ± 3,14
Durchschnittliche Anzahl der lebend geborenen weiblichen NK	6,09 ± 1,92	4,25 ± 2,22	5,36 ± 2,01
Durchschnittliche Anzahl der lebend geborenen männlichen NK	6,36 ± 2,42	5,17 ± 2,52	6,73 ± 2,76
Durchschnittliche Anzahl der tot geborenen NK	0,09 ± 0,30	0,17 ± 0,39	0,45 ± 1,21
Vitalität der Würfe (%) = Anzahl der lebend geborenen NK x 100/Anzahl der lebend und tot geborenen NK	99,27	98,05	96,37
Durchschnittliches Geburtsgewicht (g) = durchschnittliches Geburtsgewicht der lebend geborenen NK	6,60 ± 0,61	6,90 ± 0,80	6,49 ± 0,70
Durchschnittliches Geburtsgewicht (g) der lebend geborenen männlichen NK	6,75 ± 0,71	7,08 ± 0,83	6,72 ± 0,54
Durchschnittliches Geburtsgewicht (g) der lebend geborenen weiblichen NK	6,46 ± 0,48	6,73 ± 0,73	6,32 ± 0,76
Geschlechterverhältnis der lebenden NK (m:f)	1:1,04	1:1,06	1:1,25

Untersuchungsparameter	GSM (N=11)	UMTS (N=11)	SHAM (N=11)
Durchschnittliches Körpergewicht der Muttertiere während der Laktation (g) (Abb. 3):			
Tag 0 der Laktation (Wurftag)	341,38 ± 17,47	345,83 ± 20,52	331,52 ± 25,24
Tag 4 der Laktation	341,77 ± 29,40	357,57 ± 20,96	344,11 ± 20,86
Tag 7 der Laktation	365,22 ± 28,45	362,09 ± 18,15	356,05 ± 25,27
Tag 11 der Laktation	368,47 ± 28,10	359,54 ± 13,73	358,32 ± 22,13
Tag 14 der Laktation	360,72 ± 21,45	362,54 ± 16,00	362,44 ± 14,56
Tag 17 der Laktation	356,43 ± 21,91	361,41 ± 16,18	354,22 ± 19,71
Tag 21 der Laktation	331,12 ± 28,01	337,95 ± 16,04	342,21 ± 14,47
Durchschnittliche Körpergewichtsveränderung der Muttertiere während der Laktation (g) (Abb. 4):			
Tag 0-7	23,84 ± 18,00	16,26 ± 14,55	24,53 ± 22,58
Tag 7-14	-2,67 ± 11,61	0,45 ± 9,77	6,39 ± 22,21
Tag 14-21	-29,60 ± 21,74	-24,95 ± 19,80	-20,23 ± 15,92
Tag 0-21	-10,26 ± 26,57	-7,88 ± 18,72	10,69 ± 23,34
Durchschnittliches Körpergewicht (g) der Nachkommen während der Aufzucht (g) (Abb. 5):			
Lebenstag 4	11,00 ± 1,01	12,51 ± 2,19	11,53 ± 1,42
Lebenstag 7	15,57 ± 1,71	17,90 ± 3,83	16,82 ± 2,19
Lebenstag 11	23,52 ± 2,73	26,96 ± 5,59	24,68 ± 3,34
Lebenstag 14	28,90 ± 3,42	33,47 ± 6,84	29,73 ± 4,43
Lebenstag 17	33,68 ± 4,44	39,96 ± 8,57	34,96 ± 5,25
Lebenstag 21	45,56 ± 7,92	54,42 ± 10,66	48,71 ± 7,82
Durchschnittliche Körpergewichtsveränderung der NK während der Aufzucht (g) (Abb. 6):			
Lebenstag 4- 7	4,57 ± 1,05	5,40 ± 2,30	5,29 ± 1,05
Lebenstag 7-11	7,95 ± 1,38	9,06 ± 1,99	7,86 ± 1,74
Lebenstag 11-14	5,38 ± 1,13	6,51 ± 1,48	5,06 ± 1,58
Lebenstag 14-17	4,78 ± 1,37	6,49 ± 1,94	5,23 ± 1,74
Lebenstag 17-21	11,88 ± 4,36	14,46 ± 3,07	13,74 ± 3,13
Lebenstag 4-21	34,56 ± 7,42	41,91 ± 9,29	37,18 ± 6,85

Untersuchungsparameter	GSM (N=11)	UMTS (N=11)	SHAM (N=11)
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...)	1,45	1,98	2,25
Überlebens-Index I (%) = Anzahl der lebenden NK am 4. Lebenstag x 100/Anzahl der lebenden NK am Wurfstag	95,62	99,00	90,97
Überlebens-Index II (%) = Anzahl der lebenden NK am 21. Lebenstag x 100/Anzahl der lebenden NK am 4. Lebenstag	100	99,00	100

Tabelle 4: F₁-Generation: Ergebnisse der Untersuchungen zur Reproduktionsfähigkeit

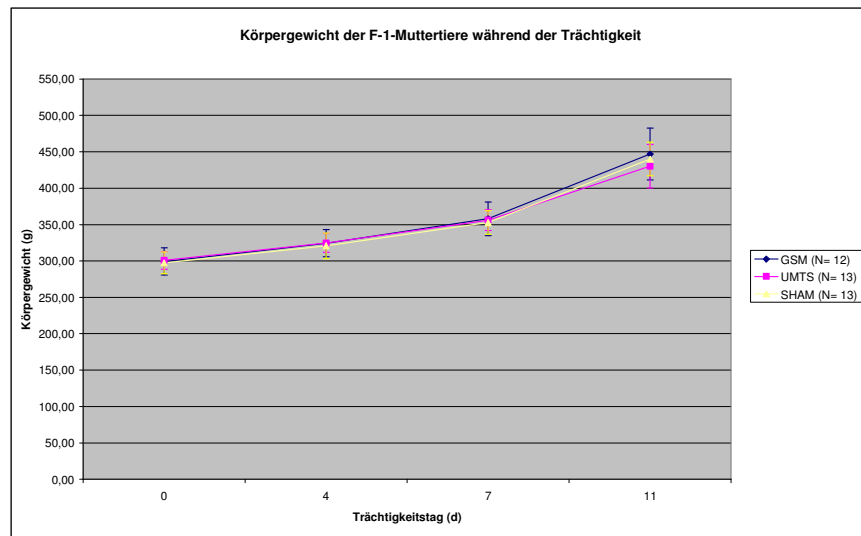


Abbildung 1: F₁-Generation: Mittleres Körpergewicht der Muttertiere während der Trächtigkeit

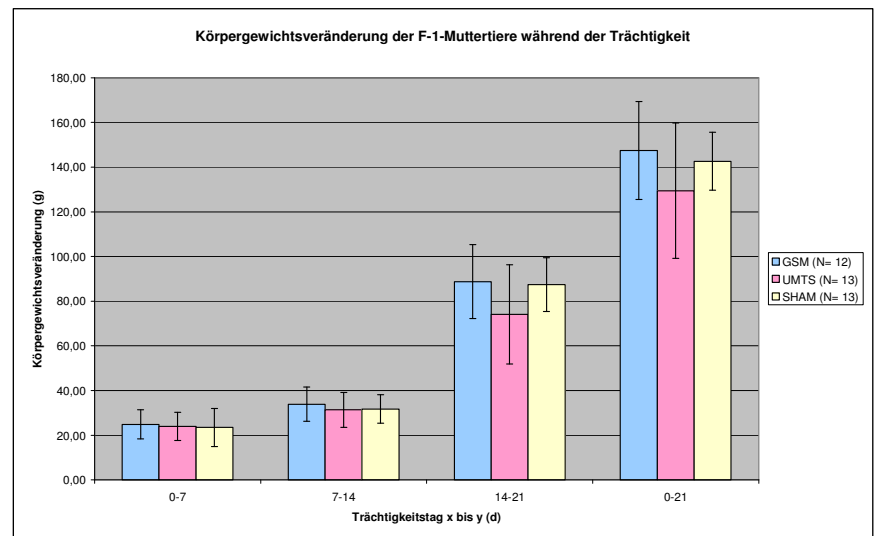


Abbildung 2: F₁-Generation: Durchschnittliche Körpergewichtsveränderung der Muttertiere während der Trächtigkeit

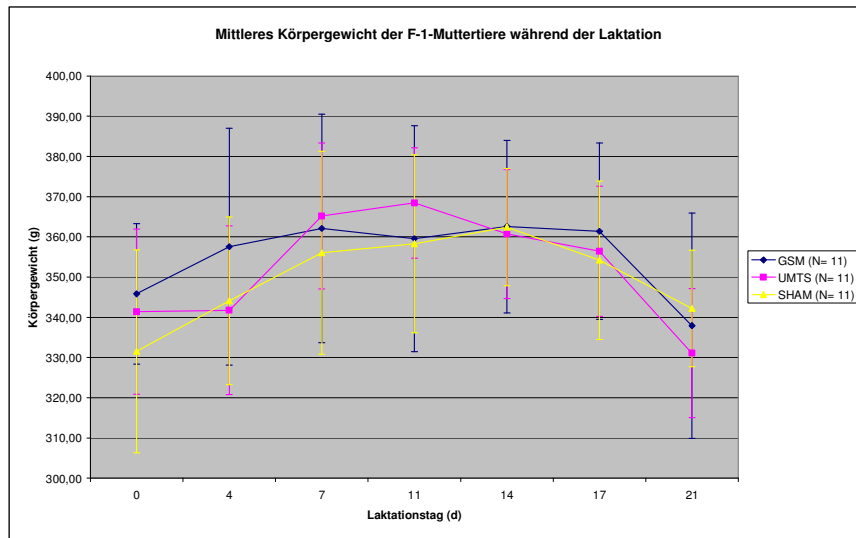


Abbildung 3: F₁-Generation: Mittleres Körpergewicht der Muttertiere während der Laktation

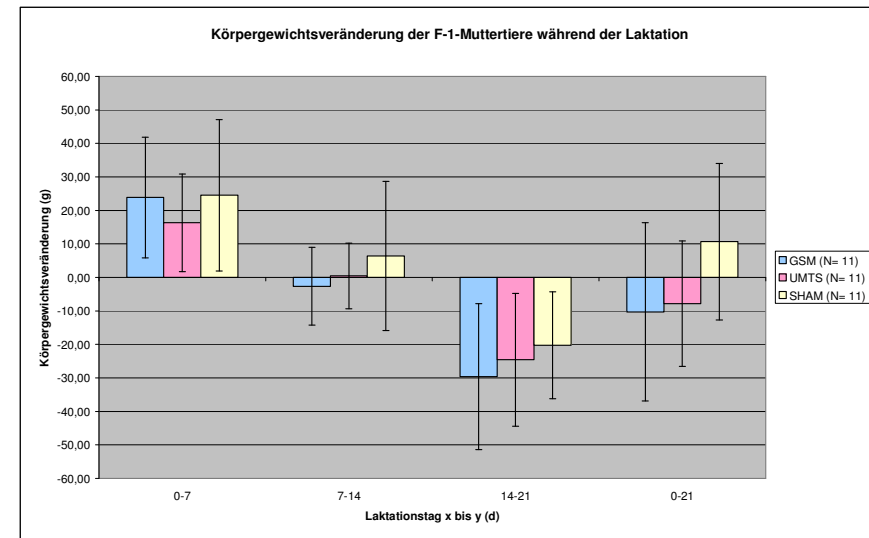


Abbildung 4: F₁-Generation: Durchschnittliche Körpergewichtsveränderung der Muttertiere während der Laktation

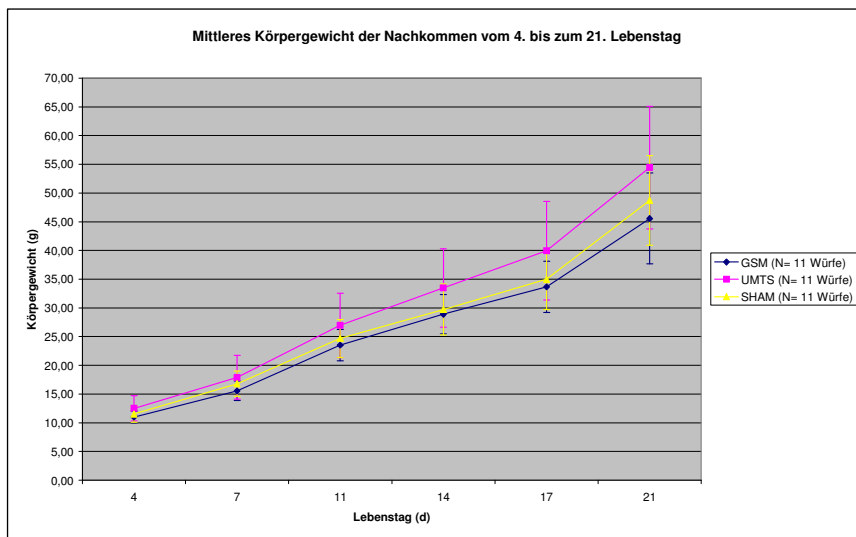


Abbildung 5: F₁-Generation: Mittleres Körpergewicht der Nachkommen vom 4. bis zum 21. Lebenstag

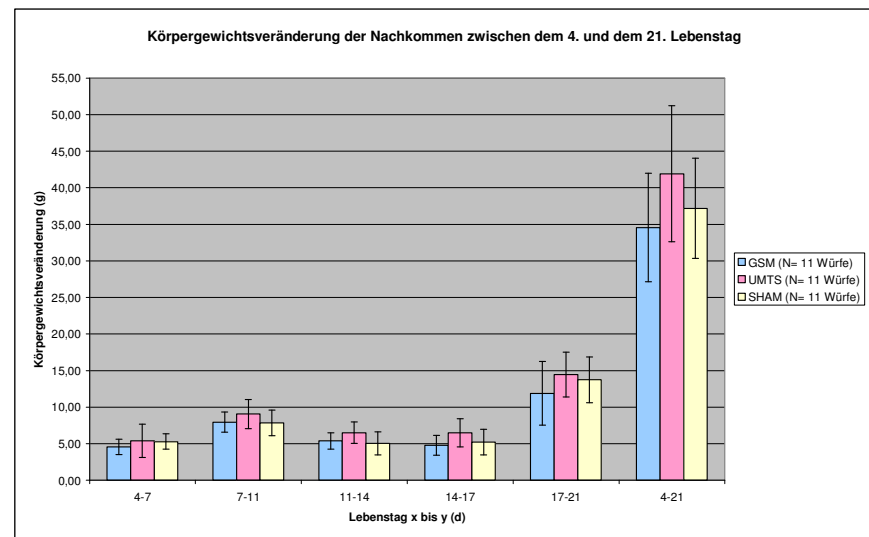


Abbildung 6: F₁-Generation: Durchschnittliche Körpergewichtsveränderung der Nachkommen zwischen dem 4. und dem 21. Lebenstag

F0-Generation

Untersuchung zur physischen Entwicklung

Entwicklungsparameter

Während der Aufzucht der F0-Generation wurden bei allen Nachkommen von N=11 F₋₁-Zuchtpaare pro Versuchsgruppe (GSM, UMTS, SHAM) ab dem 7. bis maximal dem 21. Lebenstag täglich die drei folgenden Entwicklungsparameter bestimmt:

1. Incisor eruption (IE) = Durchbruch beider oberer Schneidezähne durch das Zahnfleisch
2. Ear opening (EAO) = Öffnung beider äußerer Gehörgänge
3. Eye opening (EO) = Öffnung beider 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 (Tab. 5).

Entwicklungsparameter	F0-Generation: Mittleres Lebensalter in Tagen und mittleres Körpergewicht (KG) bei Erreichen des jeweiligen Entwicklungsparameters					
	GSM (N=11 Zuchtpaare)		UMTS (N=11 Zuchtpaare)		SHAM (N=11 Zuchtpaare)	
	Lebensalter (d)	KG (g)	Lebensalter (d)	KG (g)	Lebensalter (d)	KG (g)
Incisor eruption (IE)	8,79 ± 0,92	19,38 ± 2,85	8,28 ± 0,64	21,35 ± 3,10	8,68 ± 0,95	20,57 ± 3,00
Ear opening (EAO)	10,94 ± 0,70	23,66 ± 3,01	10,60 ± 0,74	26,85 ± 3,00	10,64 ± 0,64	24,20 ± 3,87
Eye opening (EO)	14,38 ± 0,55	29,65 ± 3,63	14,05 ± 1,24	34,66 ± 5,05	13,66 ± 0,63	29,47 ± 4,32

Tabelle 5 F0-Generation: Mittleres Lebensalter in Tagen (d) und mittleres Körpergewicht (g) der F0-Jungtiere bei Erreichen der drei Entwicklungsparameter incisor eruption (IE), ear opening (EAR) und eye opening (EO)

Körpergewichtsentwicklung

Bei allen Versuchstieren der F0-Generation wurde ab dem 21. Lebenstag einmal wöchentlich eine Körpergewichtsbestimmung durchgeführt (Tab. 6, Abb. 13, Abb. 14).

Versuchsgruppe			F0-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=48)	MW	47,82	85,64	128,88	189,09	242,29	298,22	329,84	363,55	394,15	419,68
		SD	7,66	15,64	19,55	24,19	29,11	27,35	30,01	31,36	32,68	32,26
	f (N=48)	MW	47,25	76,99	111,69	149,59	175,61	197,39	209,90	223,84	233,96	242,70
		SD	8,07	11,12	13,32	14,20	15,83	14,62	15,51	18,22	19,13	19,69
UMTS	m (N=47)	MW	55,90	100,67	134,65	192,59	242,98	304,74	328,81	364,43	388,44	417,73
		SD	9,08	9,33	11,76	14,19	19,75	21,85	22,67	23,60	24,04	26,42
	f (N=48)	MW	54,82	91,26	117,54	154,49	178,88	204,87	213,95	227,33	236,54	247,95
		SD	9,29	8,97	10,33	12,53	12,29	12,92	13,52	15,73	16,05	16,71
SHAM	m (N=48)	MW	49,66	90,45	127,97	182,19	232,60	285,26	322,38	354,50	377,43	399,36
		SD	8,57	21,87	29,40	29,35	32,21	35,45	31,46	34,96	37,93	40,76
	f (N=48)	MW	46,64	83,56	115,45	152,46	178,23	199,58	213,20	227,17	235,29	242,35
		SD	8,24	15,90	21,26	16,99	17,18	17,90	16,99	19,61	19,23	20,12

Tabelle 6 F0-Generation: Körpergewicht (g) männlicher und weiblicher Versuchstiere von der 3. bis zur 12. Lebenswoche

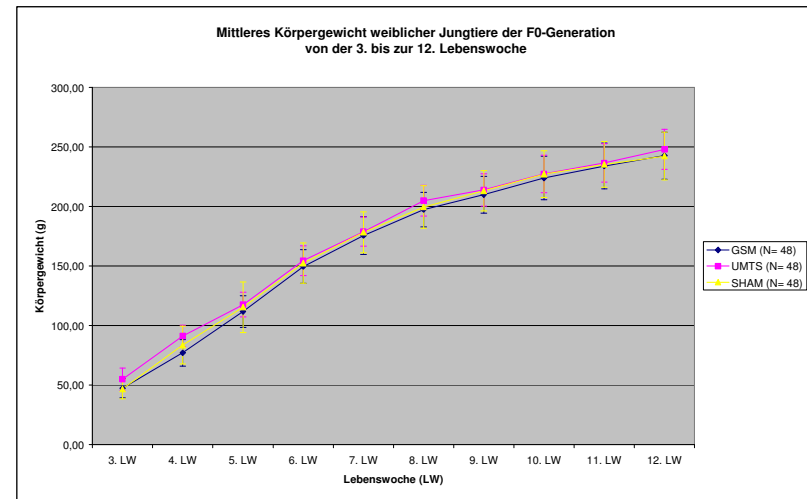
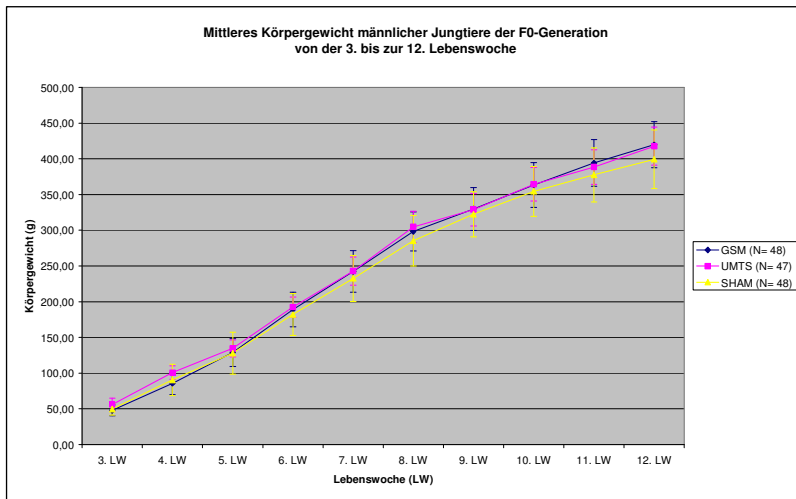


Abbildung 13, Abbildung 14: F0-Generation: Mittleres Körpergewicht männlicher bzw. weiblicher Jungtiere von der 3. bis zur 12. Lebenswoche

Unterteilung der F0-Generation in zwei Teilgenerationen F0a und F0b

Am Tag des Absetzens (Lebenstag 21) wurde die F0-Jungtiere innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen randomisiert in zwei Teilgenerationen F0a (N=153 Versuchstiere, N=13 Reservetiere) und F0b (N=151 Versuchstiere, N=10 Reservetieren) aufgeteilt (Tab. 6). Überzählige Jungtiere wurden dem Versuch entnommen.

Generation		GSM		UMTS		SHAM	
		Versuchstiere	Reservetiere	Versuchstiere	Reservetiere	Versuchstiere	Reservetiere
F0a	Tiergruppe 1	N=24 (12m, 12f)	N=5 (2m, 3f)	N=24 (12m, 12f)	N=3 (3f)	N=27 (12m, 15f)	N=5 (2m, 3f)
	Tiergruppe 2	N=24 (12m, 12f)		N=24 (12m, 12f)		N=30 (12m, 18f)	
F0a insgesamt		N=48 (24m, 24f)	N=5 (2m, 3f)	N=48 (24m, 24f)	N=3 (3f)	N=57 (24m, 33f)	N=5 (2m, 3f)
F0b	Tiergruppe 1	N=24 (12m, 12f)	N=5 (2m, 3f)	N=23 (11m, 12f)		N=27 (12m, 15f)	N=5 (2m, 3f)
	Tiergruppe 2	N=24 (12m, 12f)		N=23 (12m, 11f)		N=30 (12m, 18f)	
F0b insgesamt		N=48 (24m, 24f)	N=5 (2m, 3f)	N=46 (23m, 23f)		N=57 (24m, 33f)	N=5 (2m, 3f)

Tabelle 7 F0a- und F0b-Generation: Versuchsgruppengröße (N)

Die der F0a-Generation zugeordneten Versuchstiere durchlaufen zweimal in ihrem Leben einen Kognitionstest zur Überprüfung ihrer Lern- und Gedächtnisleistung. Der erste Kognitionstest erfolgt im Alter von 10 Wochen, während der zweite Kognitionstest in einem Abstand von ca. 7 1/2 Monaten im Alter ca. 10 Monaten durchgeführt wird. Weiterhin wird ein Teil der F0a-Versuchstiere im Alter von ca. 17 Wochen zur Reproduktion eingesetzt. Die finalen Untersuchungen zum Immunsystem, zum Stressgeschehen und zur Blut-Hirn-Schranke erfolgen bei dieser Teilgeneration im Alter von ca. 12 Monaten.

Die der F0b-Generation zugeordneten Versuchstiere hingegen gehen bereits im Alter von ca. 17 Wochen in die Untersuchungen zum Immunsystem, zum Stressgeschehen und zur Blut-Hirn-Schranke ein.

Kognitionstest I. der F0a-Generation

Die Durchführung des ersten von zwei Kognitionstests der F0a-Generation begann Mitte November 2005 mit den Versuchstieren der Tiergruppe 1 und konnte Anfang Januar 2006 mit den Versuchstieren der Tiergruppe 2 beendet werden. Hierbei wurden jeweils N=10 (5m, 5f) Versuchstiere pro Versuchsgruppe (GSM, UMTS, SHAM) einer Sequenz von operanten Lerntests unterzogen.

Immunisierung der F0b-Generation

Auch die Immunisierung der Tiergruppe 1 der F0b-Generation konnte Ende November 2005 begonnen und Anfang Januar 2006 zeitgemäß abgeschlossen werden.

Kognitionstest (Herr Dr. M. Bornhausen)

Expositions- und Untersuchungseinrichtungen

Für die vom BfS in Auftrag gegebenen Untersuchungen bei drei Ratten-Generationen (F0, F1, F2) zur Wirkung einer Langzeit-Exposition mit elektromagnetischen Feldern (EMF) der Mobilfunkkommunikation waren vollklimatisierte Expositions- und Untersuchungseinrichtungen aufgebaut und geprüft worden. Die vorgesehenen Untersuchungen konnten jedoch erst im Frühjahr 2005 beginnen. Wegen eines zwischenzeitlich aufgetretenen Wasserschadens, der die HF-Dichte einer der drei Expositions-kammer (GSM, UMTS, Scheinexposition [sham] à ca. 4x4x4 m³) beeinträchtigte, hatte sich der Beginn der experimentellen Untersuchungen erneut verzögert. Die WISTAR-Ratten der F₋₁-Generation (Eltern der F0-Generation) wurden somit im Mai 2005 zum Versuchsgelände gebracht.

Prüfung "kognitiver" Leistungen von Ratten

Erläuterung der methodischen Vorgehensweise

Die kognitiven Leistungen der Versuchstiere werden mit Hilfe verschiedener operanter Verhaltenstests mit allmählich ansteigenden Lernanforderungen in standardisierten Testkammern ("Skinner-Boxen") überprüft. Die Tests werden gleichzeitig mit zehn Tieren unter Rechner-Kontrolle während der Nacht durchgeführt. Die 15-stündigen Testsitzungen werden unterteilt in alternierende 30 min dauernde ON- und 60 min dauernde OFF-Phasen. Belohnungen sind nur während der zehn ON-Phasen erhältlich. Um eine Belohnung ("reinforcement", Futterkügelchen à 45 mg) zu erhal-

ten, müssen 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 sahen für jede Rattengruppe insgesamt zehn Testnächte vor. Um Zeit zu sparen, wurde erprobt, ob eine differenzierte Aussage zur individuellen Verhaltensleistung bereits nach einer geringeren Zahl von Testnächten zu erzielen ist. Dies gelang. Die im Auftrag des BfS durchzuführenden Prüfungen der operanten Verhaltensleistung werden nun mit Hilfe der folgenden Testsequenz durchgeführt:

- DR0 (Jeder Hebeldruck wird belohnt. Alle fünf Minuten wird zusätzlich automatisch belohnt.)
- DRH 2/1 (Belohnung, wenn innerhalb von einer Sekunde zweimal der Hebel gedrückt wird.)
- DRH 4/2 (Belohnung, wenn innerhalb von zwei Sekunden der Hebel vier mal gedrückt wird.)
- DRL 1/16 (Belohnung, wenn ein Sperrintervall von 16 Sekunden nach einer Belohnung berücksichtigt wird. Vorzeitige Hebeldrücke lassen das Sperrintervall von neuem beginnen.)

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

Um die Entwicklung der Hebeldruck-Effizienz eines Versuchstieres während der Testsitzung kontinuierlich verfolgen zu können, werden während der ON- und OFF-Phasen die zwischen aufeinander folgenden Hebeldrücken auftretenden Zeitintervalle ("inter-response intervals", IRIs) mit einer Auflösung von einer Millisekunde registriert.

Operantes Testverfahren "differential reinforcement of low rate" (DRL)

Die Analyse von Mikrostrukturen der operanten Verhaltensleistung erfolgt in unserer Versuchsanordnung mit Hilfe des Testverfahrens DRL 1/16. Dieses Verfahren verlangt von den Versuchstieren die Berücksichtigung eines Sperrintervalls von 16 Sekunden. Die Dauer des Intervalls wird durch ein Signallicht angezeigt. Vorschnelle Hebeldrücke lassen das Sperrintervall von neuem beginnen.

"scatter plots"

In Zusammenarbeit mit Dr. H. Scheingraber, Max-Planck-Institut für extraterrestrische Physik (MPE), Garching, war von uns eine Methode entwickelt worden, die bei der Lösung operanter Verhaltenstestaufgaben "Lerner" von "Nicht-Lernern" unterscheiden kann (Bornhausen and Scheingraber, *Bioelectromagnetics* 2000). Hierzu werden die während der ON-Phasen einer Testsitzung registrierten IRI-Muster als sogenannte "scatter plots" abgebildet (Abb.1).

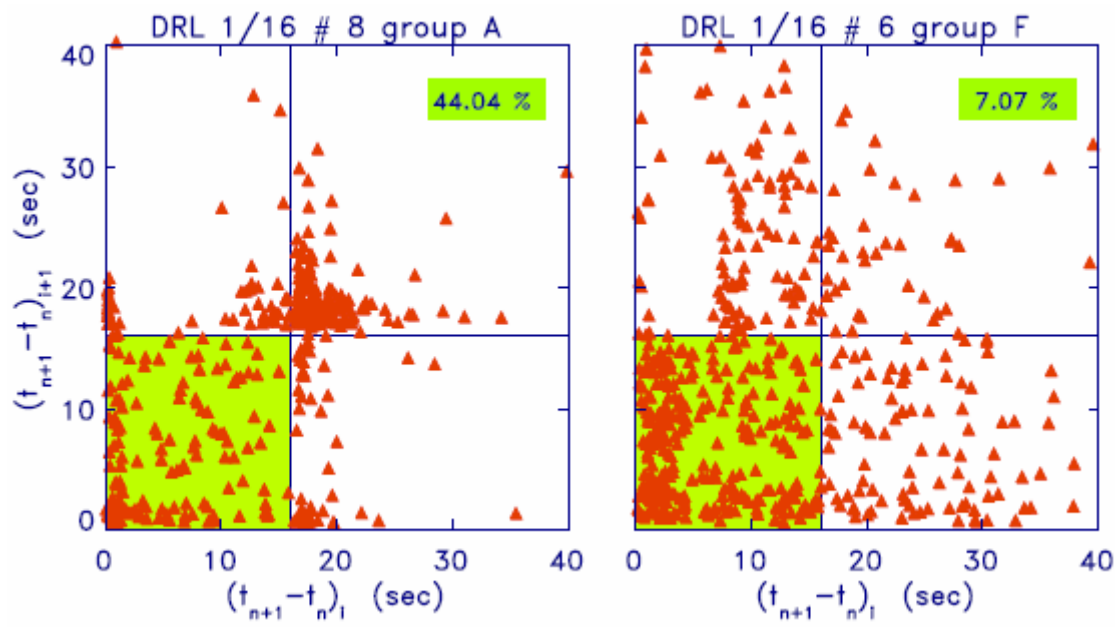


Abb. 1

Dargestellt sind die während der ersten 40 sec aufgetretenen IRIs während der 10 ON-Phasen der Testsitzung DRL 1/16. Die Ratte # 8 aus Gruppe A (links) hat das Sperrintervall von 16 sec offensichtlich "gelernt"; 44,04 % der IRIs sind ausserhalb des Sperrintervalls.

Die Ratte # 6 aus Gruppe F (rechts) hat 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 projiziert.

Mathematische Bewertungsmethode

Ziel der weiter unten beschriebenen Vorgehensweise war es nun, die visuelle Bewertung der "scatter plots" durch eine reproduzierbare mathematische Bewertungsmethode zu ergänzen, die eine Skalierung der individuellen operanten Verhaltensleistung erlauben würde.

IRI-Struktur

Während der entscheidenden DRL 1/16-Testsitzung wird jedes einzelne IRI unter Berücksichtigung einer empirisch gewonnenen IRI-"Normal"-Verteilung (von 0-1 normiert) bewertet. Bei diesem Testverfahren liegt das Maximum der testspezifischen IRI-Verteilung ca. 0,7 Sekunden nach dem Ende des Sperrintervalls von 16 Sekunden. Entsprechend dieser Verteilung wird nun jedem IRI ein spezifischer Wert in "points" zugewiesen.

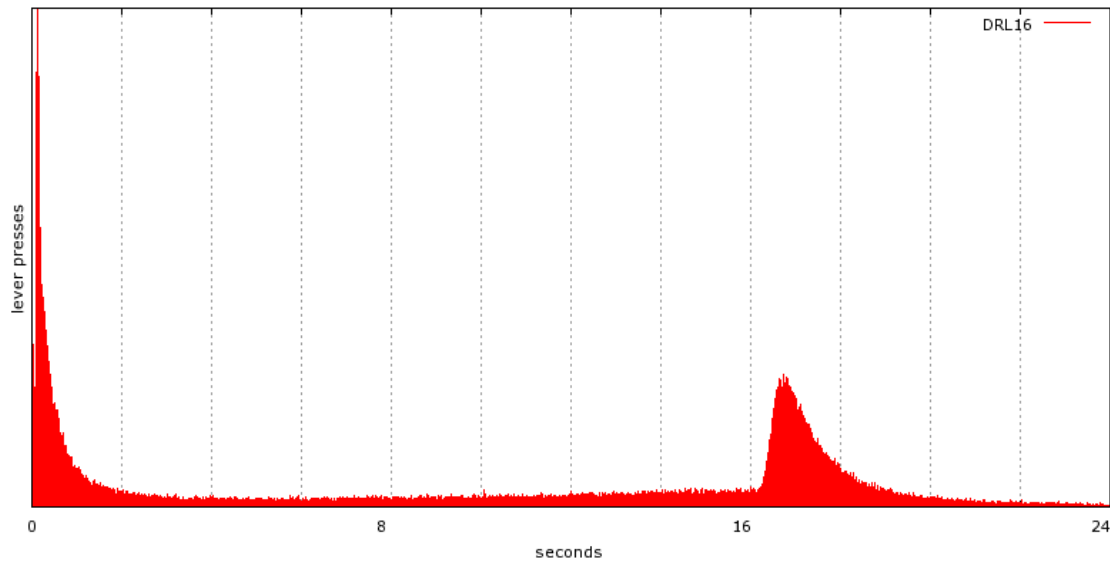


Abb. 2 IRI-Häufigkeitsverteilung

Zusammenfassung vieler DRL1/16-Testsitzungen. Das Maximum der Hebeldrücke liegt ca. 0,7 sec nach dem eingestellten Sperrintervall von 16 sec.

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

(Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. (FH) Chr. Kögler, Universität der Bundeswehr, Neubiberg) Eigene Untersuchungen der letzten Jahre und umfangreiche Nachforschungen in der einschlägigen Literatur lassen erkennen, dass das Phänomen des Lernens am besten durch eine Annäherung an eine S-Kurve beschrieben werden kann. Für die Mikrostruktur-Analyse unserer Untersuchungsergebnisse wird nun folgendermaßen vorgegangen:

Statische Analyse

Unter der Bezeichnung "points" (Anzahl von dimensionslosen Punkten, Wertebereich zwischen 0 und 1) wird die Übereinstimmung erfasst zwischen jedem einzelnen IRI und der empirisch - an Hand von mehreren Hundert Testsitzungen - gewonnenen IRI-Häufigkeitsverteilung während der zehn ON-Phasen einer DRL 1/16-Testsitzung.

Dynamische Analyse

In der dynamischen Analyse wird die Entwicklung der "points" über die Zeit betrachtet. Zur Bewertung dieser Entwicklung wird ein S-Kurven-Fit durchgeführt (dunkelblaue Linie in Abb. 3b und 4b).

Lernkurve

Natürliche Lernvorgänge werden 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 gekennzeichnet durch:

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

In welcher Zeit die Ratte gelernt hat, wird aus der Differenz zwischen Testbeginn (empirisch gesetzt auf den Zeitpunkt des Erreichens von 5 % aller Hebeldrücke der

Testsitzung, grüne Linie in Abb. 3b und 4b) und Wendepunkt errechnet. Die durch den Fit gewonnenen Parameter sind somit:

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

Beispiele für die Mikrostruktur-Analyse

Die folgenden Abbildungen geben Hinweise für das unterschiedliche Lernvermögen einzelner Tiere und die Aussagekraft der hier vorgestellten, vom Forschungsvorhaben erarbeiteten, neuen Mikrostruktur-Analyse.

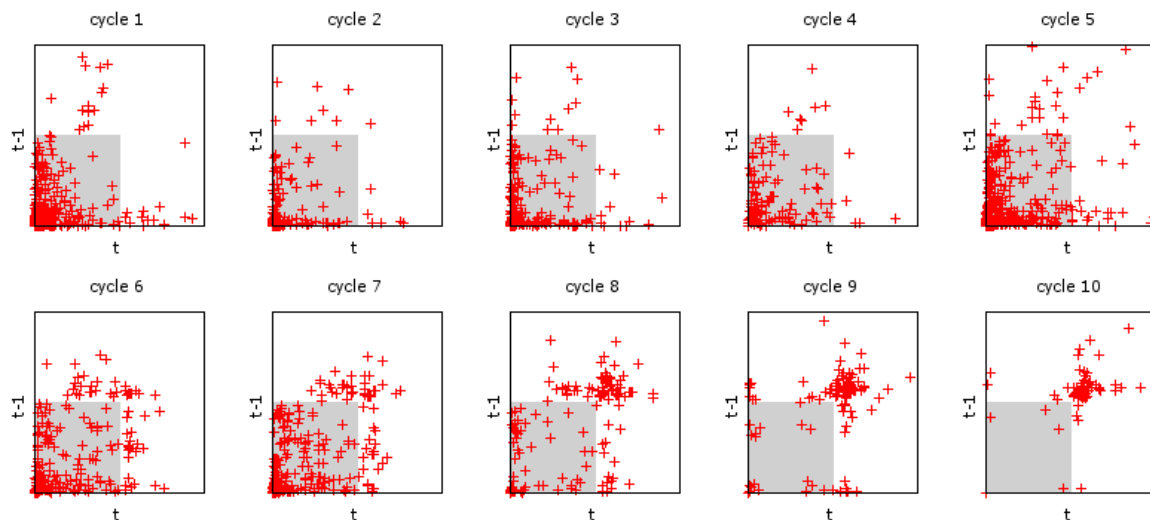


Abb. 3a "scatter plot"

Dargestellt sind IRI-"scatter plots" der 10 ON-Phasen (cycles 1-10) der DRL 1/16-Testsitzung vom 29.08.2005. Die Ratte # 01 (Transponder Nr. 266033) berücksichtigt in den letzten Phasen zunehmend das Sperrintervall von 16 Sekunden und macht damit immer weniger Fehler.

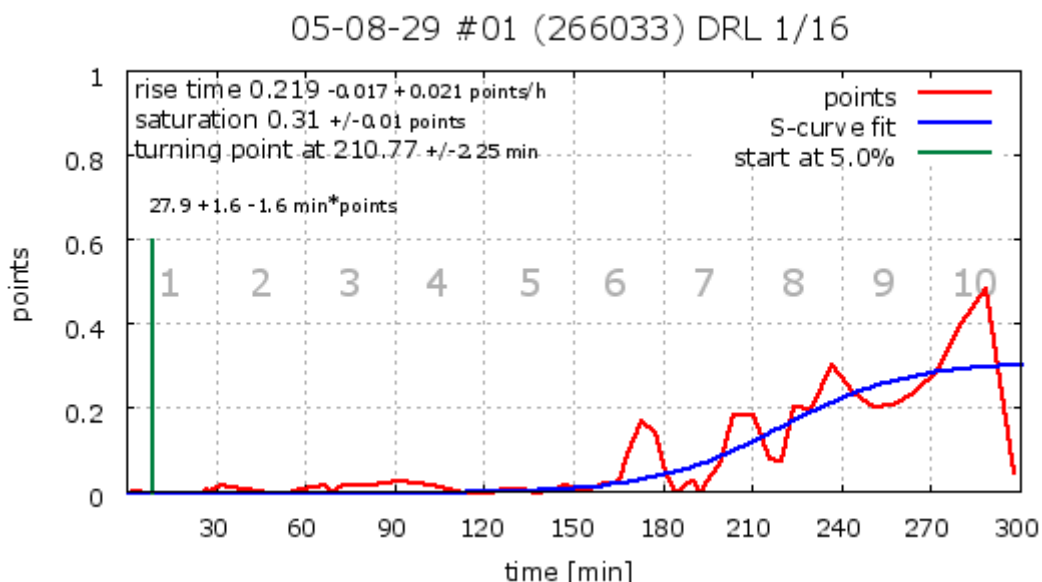


Abb. 3b S-Kurven-Fit

S-Kurven-Fit der in Abb. 3a dargestellten Verteilung der IRI-points während 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 $27.9 \pm 1.6 \text{ min} \times \text{points}$.

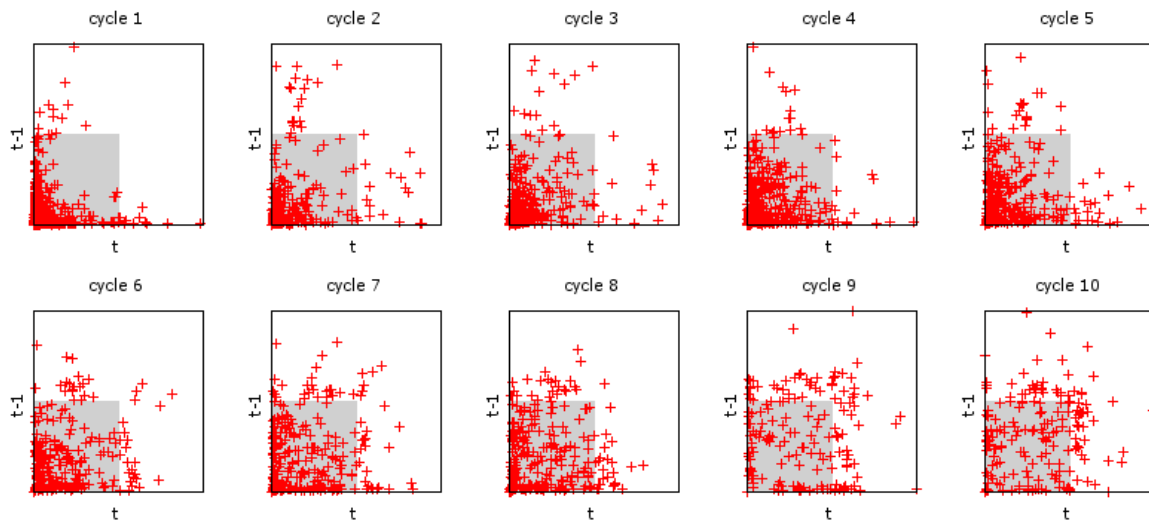


Abb. 4a "scatter plot"

Dargestellt sind IRI-"scatter plots" der zehn ON-Phasen (cycles 1-10) der DRL 1/16-Testsitzung vom 02.09.2005. Die Ratte # 05 (Transponder Nr. 273934) hat offensichtlich die Testaufgabe nicht "erlernt". Auch in den letzten ON-Phasen der Testsitzung zeigen die IRI-Verteilungsmuster keine Änderung.

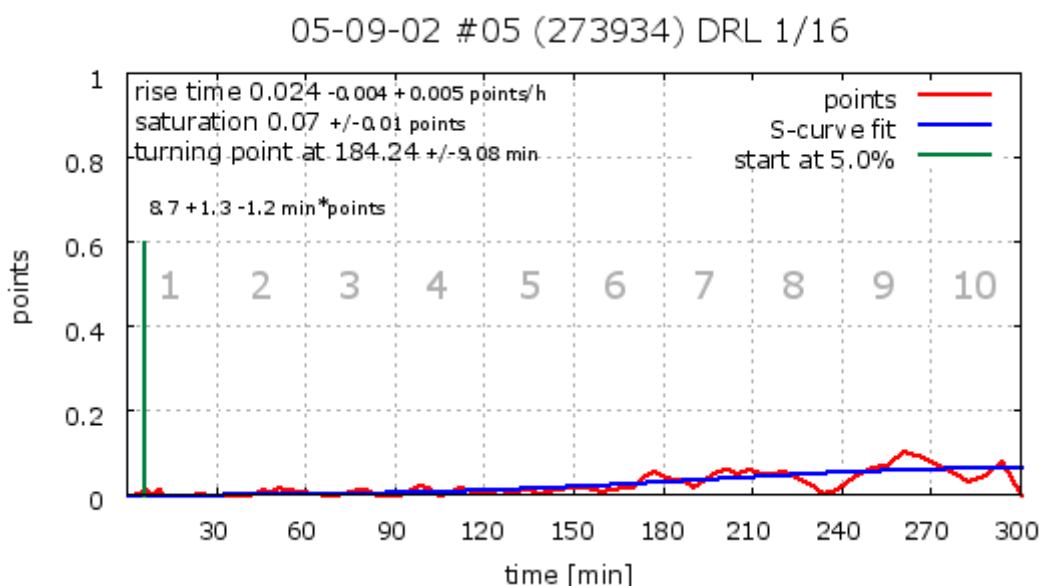


Abb. 4b S-Kurven-Fit

S-Kurven-Fit der in Abb. 4a dargestellten Verteilung der IRI-points während 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).

Ausblick zur Analyse

Weitere Erfahrungen mit dieser neuen Analysetechnik werden auch eine Wichtung der hier aufgelisteten Parameter erlauben.

Unterteilung der Versuchstiere in zwei Hauptgruppen

Um während der Verhaltenstests vergleichbare Altersgruppen zu haben und auch um identische Zeiten zwischen aufeinander folgenden Verhaltenstests bei allen Rattengenerationen gewährleisten zu können, mussten die Versuchstiere unseres Forschungsvorhabens in zwei Hauptgruppen unterteilt werden. Dies führte dazu, dass die F0-Ratten (F0aGr1 und -Gr2) das erste Mal im November bzw. Dezember 2005 untersucht wurden. Weitere Untersuchungen zur Kognition bei diesen Tieren sollen im Juli bzw. August 2006 folgen. Hieran schließen die Untersuchungen der F1-Ratten. Die letzten Untersuchungen der Verhaltensleistung werden bei den Tieren der F2-Generation Programm gemäß erst im Oktober bzw. November 2006 erfolgen. Die Logistik dieser Unterteilung und die jeweiligen Untersuchungszeiten für jede Versuchstiergruppe wurden unter verantwortlicher Leitung von Frau Dr. Okorn erarbeitet (siehe ihren Berichtsbeitrag).

Selektion

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

Ratten der F₁-Generation

Während des Berichtszeitraums wurden daher zunächst die kognitiven Leistungen der F₁-Generation geprüft. Aus den 60 männlichen und 60 weiblichen Ratten dieser Generation konnten diejenigen Versuchstiere ausgewählt werden, die zur Zucht der F0-Rattengeneration herangezogen werden sollten. Als Selektionskriterium dienten die oben beschriebenen Mikrostrukturen der operanten Verhaltensleistung. Nach Skalierung der registrierten Mikrostrukturen wurden von allen 120 geprüften F₁-Ratten auf Grund ihrer spezifischen Testleistung insgesamt 26 „besonders schlechte“ und „besonders gute“ Tiere (13 Männchen und 13 Weibchen) von einer Paarung ausgeschlossen.

Ratten der F0-Generation

Die Ratten dieser Generation wurden im September bzw. Oktober 2005 geboren. Die Prüfung der operanten Verhaltensleistung dieser Tiere erfolgte im November bzw. Dezember 2005 jeweils im Alter von zehn Wochen. Alle Versuchstiergruppen bestanden aus fünf codierten Weibchen und fünf codierten Männchen. Die Untersuchungen wurden somit unter "blinden" 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 F₁-Ratten. Um die Dynamik eventueller Lernleistungsstörungen noch besser erfassen zu können, wurden diese Tiere nach drei Tagen mit einer weiteren nächtlichen DRL1/16-Testsitzung geprüft. Während der verschiedenen nächtlichen 15-stündigen Testsitzungen wurde bei allen Tieren die spezifische operante Verhaltensleistung registriert. Die Daten der DRL 1/16-Testsitzungen wurden darüber hinaus eingesetzt, um Mikrostrukturen der Test-

Akquisition ("Lernen") aufzuzeichnen. Es bleibt der endgültigen Analyse der Versuchsergebnisse am Ende aller Untersuchungen vorbehalten, Aussagen zur Lernleistung der untersuchten Tiere zu machen und eine Bewertung zu finden hinsichtlich der Frage, ob EMFs der Mobilfunkkommunikation hier einen Einfluss zeigen.

Überwachung

Das in Zusammenarbeit mit Dipl.-Ing. (FH) Chr. Kögler entwickelte LINUX-kontrollierte Überwachungssystem für die operanten Verhaltenstesteinrichtungen hat sich bewährt. Es überwacht und dokumentiert die Konstanz der Umgebungsbedingungen während der nächtlichen Testsitzungen. Nach dem Umzug der Untersuchungseinrichtungen zum OWF registriert 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 bietet darüber hinaus ein blinkendes Warnlicht an der Tür zum Testraum an, das während der Testsitzungen eingeschaltet bleibt. Auf diese Weise wird sichergestellt, dass alle Versuche unter identischen Bedingungen durchgeführt und eventuelle Störungen oder Änderungen der Umgebungsbedingungen während der nächtlichen Testsitzungen erkannt werden. Die Überwachung ist am LINUX-Server für das Operant Behavior Control-Graphic User Interface (OBC-GUI)-System implementiert und unabhängig von anderen Überwachungseinrichtungen, die für die Befeldung und Klimatisierung der Versuchstiere erforderlich sind.

Zusätzliche handschriftliche Aufzeichnungen des jeweiligen Versuchsleiters bei jedem Test protokollieren das Auftreten eventueller Funktionsstörungen einzelner Elemente und deren Reparatur.

Weitere Untersuchungen

Seit Ende 2005 steht dem Forschungsvorhaben Frau Janine Schneider zur Verfügung. Frau Schneider ist Diplom-Biologin und wird sich im Rahmen der von ihr angestrebten Promotion zum Dr. rer.vet.biol. vorwiegend mit den operanten Verhaltensuntersuchungen und deren Analyse beschäftigen. In Zusammenarbeit mit Dr. Stohrer (siehe dessen Berichtsteil) wurden von ihr Untersuchungen zur olfaktorisch bedingten sozialen Diskrimination begonnen, die an die früheren Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe anschließen.

Vorträge

Wegen des finanziellen Aufwands insbesondere für die Beschaffung und Konstruktion der Expositionskammern mussten die genehmigten Reisegelder für das BfS-EMVU-Vorhaben eingespart und im Jahre 2005 auf den Besuch weiterer wissenschaftlicher Veranstaltungen verzichtet werden.

Blut-Hirn-Schranke und CA1-Neuronen (Herr Dr. M. Stohrer)

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 Lernver-

suchen (Skinner-Boxen) auftretende Defizite auch durch eine Abnahme dieser Neuronen zu erklären sein (Geinisman et al., 1995).

Die Integrität der Blut-Hirn-Schranke ist eine wesentliche Grundbedingung für die uneingeschränkte Funktion des Gehirns, da sie eine konstante Zusammensetzung des die Nervenzellen umgebenden Mikromilieus gewährleistet und dadurch neuroprotektiv wirkt, weil sie die Nervenzellen vor zahlreichen, im Blut vorkommenden toxischen Stoffen abschirmt. Dies ist besonders folgenschwer in Anbetracht der Tatsache, dass abgestorbene Nervenzellen in der Regel nicht wieder ersetzt werden können.

Unsere Untersuchungen sollen prüfen, ob eine lang andauernde, sogar lebenslange HF-Bestrahlung zu einer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke und/oder zu einer Schädigung empfindlicher Neuronen führt. Darüber hinaus werden durch pränatale und über mehrere Generationen durchgeführte Befeldungen potentiell induzierte teratogene Effekte erfasst.

Bei den angewandten Methoden werden im Gegensatz zu den bisher publizierten Untersuchungen zwei wesentliche Weiterentwicklungen eingesetzt, die dazu beitragen, pathophysiologisch relevante und eindeutige Ergebnisse zu erarbeiten, selbst dann, wenn nur kleinste Schädigungen der BHS durch die Befeldung auftreten sollten. Einerseits soll die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke quantitativ als unidirektionale Influxkonstante (K_{in}) gemessen und berechnet werden. Dadurch können geringfügige Öffnungen der BHS, die physiologisch sein können, von strahlenbedingten relevanten Beeinträchtigungen der BHS unterschieden werden. Andererseits soll mit Hilfe von „Challenge“-Versuchen die Nachweisempfindlichkeit von Einflüssen auf die Funktion der BHS deutlich erhöht und dadurch auch eine sehr geringe Öffnung der Blut-Hirn-Schranke nachweisbar werden.

Ausarbeitung der Challenge Bedingungen

Die Blut-Hirn-Schranke ist keine absolut dichte Barriere. Hirnareale wie der Plexus choroideus weisen höhere Permeabilitäten auf, die den Übertritt von Hormonen aus dem Hirngewebe in das Blut ermöglichen. 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, sollte eine Methode gewählt werden, die die BHS reproduzierbar latent schwächt. Dies könnte über eine Erhöhung des Blutdruckes (über die Auslösung des Cushing-Reflexes oder Infusion vasoaktiver Hormone) oder über die Infusion hyperosmolarer Lösungen erreicht werden.

Cushing-Reflex

In einem ersten Ansatz sollte dies über die Auslösung des Cushing-Reflexes erreicht werden. Dabei wird eine reflektorische Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdruckes durch eine Steigerung des intrakranialen Drucks (ICD, Cushing-Reflex) ausgelöst. Cushing führte seine klassischen intrakranialen Experimente schon 1902 in einer Vorlesung vor. Er steigerte den intrakranialen Druck durch eine Kochsalzinfusion oder Aufblasen eines Ballons. Damit imitierte er die raumfordernenden Schäden infolge

einer subarachnoidalen Blutung. Er zeigte, dass dadurch eine Blutdrucksteigerung ausgelöst wurde, die zur Überwindung der intrakranialen Drucksteigerung, d.h. zur Aufrechterhaltung der Hirndurchblutung ausreichte (Cushing 1902, Cushing 1903).

In Vorversuchen wurde narkotisierten Ratten zunächst ein kleines Loch (Durchmesser < 1 mm) durch den Schädelknochen gebohrt. Über einen mit Knochenzement eingeklebten Katheter wurde dann während der „challenge“-Phase physiologische Kochsalzlösung infundiert. Gleichzeitig wurde über einen weiteren Katheter in der A. carotis communis kontinuierlich der Blutdruck kontrolliert und aufgezeichnet.

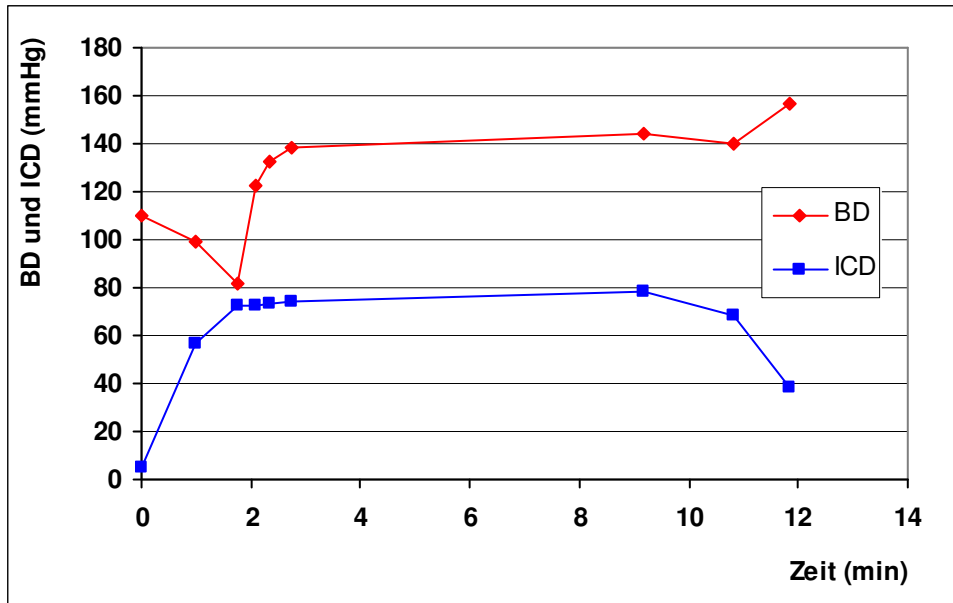


Abb.1 Beispiel für den Verlauf des Blutdruckes (BD) als Reaktion auf eine experimentelle Erhöhung des intrakranialen Druckes (ICD).

Die individuelle Reaktion der Tiere war äußerst variabel. Bei einzelnen Tieren waren nur geringe Blutdruckanstiege zu erkennen, bei anderen waren diese deutlicher ausgeprägt. Teilweise waren intrakraniale Druckerhöhungen von bis zu 80 mmHg notwendig, um den Blutdruck um nur 30-40 mmHg zu steigern (Abb. 1).

Das angestrebte Ziel einer starken Blutdrucksteigerung nach geringer Erhöhung des intrakranialen Druckes konnte systematisch nicht erreicht werden.

Insgesamt zeichnete sich die Tendenz unter den gewählten experimentellen Bedingungen 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.

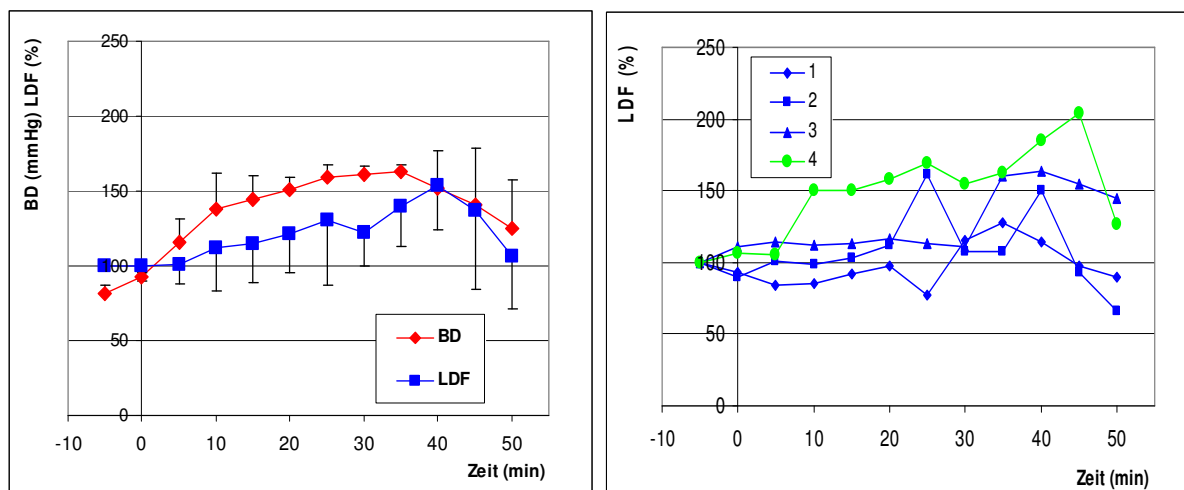
Bluthochdruck nach Adrenalininfusion

Da die über den oben beschriebenen Reflex ausgelösten Blutdruckerhöhungen individuell sehr variabel und daher nicht ausreichend standardisierbar waren, wurde angestrebt, den Blutdruck durch Adrenalininfusionen 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 die könnte die autoregulatorische Kapazität überschritten werden und große Hirngefäße dilatieren (Kantos et al.; 1978, Kantos et al.; 1981). Dann wäre auch über einen weiten Blutdruckbereich keine Labilisierung der BHS zu erwarten. Erst bei sehr hohen Blutdrücken (über 180 mmHg) würde die BHS 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.

Dazu wurde narkotisierten Ratten nach Wirkung ca. 0,5 ml einer Adrenalinlösung (Konzentration: 0,3 mmol/l) infundiert. Die Reaktion des Blutdruckes und der Hirndurchblutung wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Die Durchblutung wurde als Laser-Doppler-Flux registriert.



A

B

Abb. 2 Verlauf des Blutdruckes (BD, A) und des Laser-Doppler-Fluxes (LDF, A und B) nach Beginn der Adrenalininfusion (zum Zeitpunkt 0 min). Die Mittelwerte der LDF (A) sind in der rechten Abbildung (B) als Einzelverläufe dargestellt.

Beim Vergleich der Anstiege von Blutdruck und Hirndurchblutung (Abb. 2 A) fällt auf, dass der Blutfluss geringer ansteigt. Dies deutet darauf hin, dass die Autoregulation der Hirndurchblutung tatsächlich den Druckanstieg in den Hirngefäßen begrenzt. Wenn man die einzelnen Durchblutungsverläufe (Abb. 2 B) betrachtet, wird deutlich, dass bei den meisten Tieren Blutdruckanstiege bis 150 mmHg noch keine Auswirkungen auf die Hirndurchblutung haben.

Da zusätzlich zu diesem Problem auch große Unterschiede zwischen den einzelnen Tieren auftraten, wurde auch dieser experimentelle Ansatz als ungeeignet betrachtet.

Hyperosmolare Lösungen

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 10 Minuten nach der Infusion am stärksten ausgeprägt und nach 2 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.

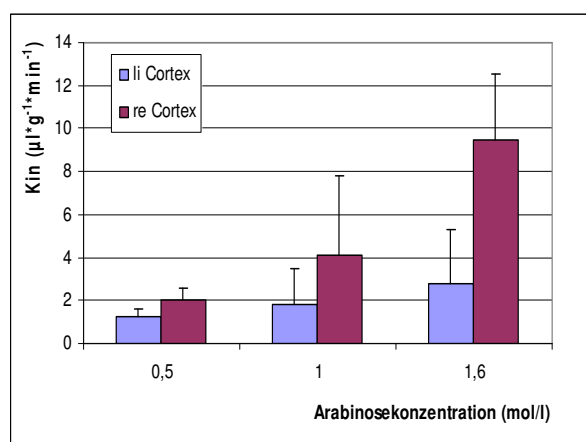
Rapoport (1980), der die Methode als erster beschrieben hat, gibt als „threshold“ 1,6 mol/l Arabinose an. Bei höheren Konzentrationen wurde in seinen Untersuchungen die BHS geöffnet, bei Konzentrationen unter 1,4 mol/l blieb sie geschlossen. Diese Angaben treffen für ein Infusionsvolumen von 3,6 ml,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

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

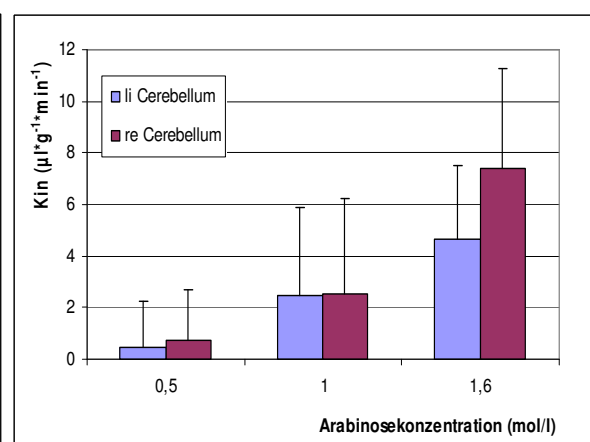
In einem ersten Ansatz wurden die in der Literatur beschriebenen Grenzwerte (1,6 mol/l Arabinose) überprüft. Die Infusion erfolgt streng standardisiert einseitig über eine A. carotis interna (in unserer Studie rechts). Die Öffnung der BHS ist dann in dieser Hirnhälfte deutlich stärker ausgeprägt. Dabei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

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

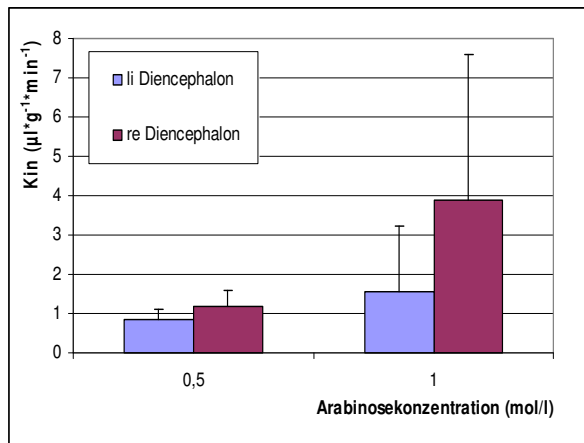
Das Tier wird in tiefer Narkose getötet, das Gehirn entnommen und aus jeder Hemisphäre definierte Areale entnommen und analysiert.



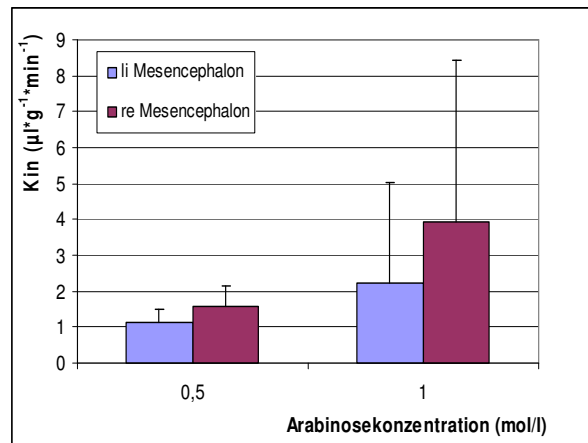
A



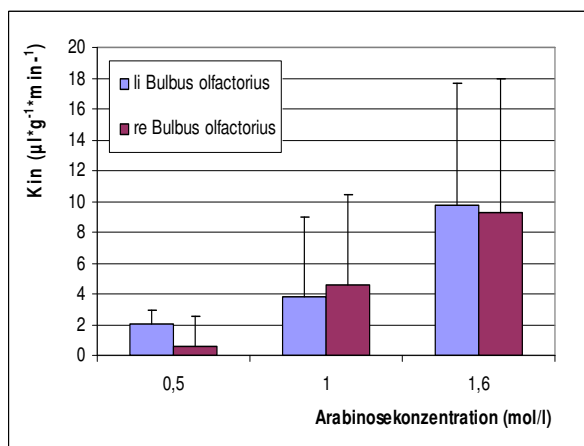
B



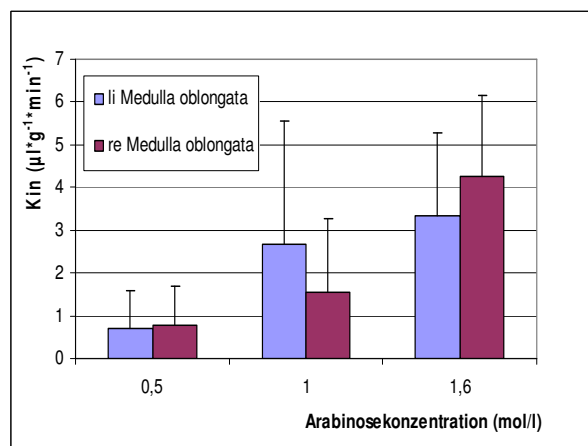
C



D



E



F

Abb. 3 Unidirektionale Influxkonstante (K_{in}) in Abhängigkeit von der Arabinosekonzentration der Infusionslösung. In den Hirnarealen, die vor allem von der A. cerebri media versorgt werden, ist K_{in} in der rechten Hemisphäre (Infusionsseite der Arabinose) stärker erhöht als in der linken (Cortex: A, Cerebellum: B, Diencephalon: C, Mesencephalon: D). Aufgrund der abweichenden Blutversorgung ist dieser Unterschied zwischen den Hemisphären im vorderen Hirnbereich (Bulbus olfactorius: E) und hinteren Hirnbereich (Medulla oblongata: F) 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, auf der Kontrollseite (hier links) bleibt die BHS intakt. Die 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 und setzen diesen für die Untersuchung der bestrahlten Tiere ein. Die erste Gruppe der bestrahlten Tiere wurde unter diesen Versuchsbedingungen bereits untersucht. Die Ergebnisse werden derzeit noch ausgewertet.

CA1-Neuronen

Die Untersuchung der CA1-Neuronen 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, hätte man nach 3 Monaten einen 24%igen Zellverlust.

Mittels der physikalischen Disektormethode ist es möglich, die Zahl der CA1-Neuronen sehr genau und unverfälscht zu bestimmen (Miki et al., 2004). Hierzu wurde eine geeignete Kunststoffeinfettung der Gehirne etabliert, bei der keine Schrumpfung des Gewebes auftritt, die bei Parafineinfettung bis zu 70% beträgt. Anschließend werden 1,5 µm dicke Schnitte durch das ganze Gehirn von rostral nach kaudal angefertigt. Der Beginn und das Ende der CA1-Region des Hippocampus wird dargestellt. In systematischen Stichproben über die CA1-Region wird sowohl die Fläche ausgemessen (zur Berechnung des gesamten Hippocampusvolumens und des Volumens der CA1-Region), als auch die Zelldichte ausgezählt (zur Berechnung der Zellzahl). Damit wird zwar eine relativ aufwändige Methode gewählt im Vergleich zu einfachen Dichtemessungen von CA1-Neuronen in exemplarischen Hirnschnitten. Andererseits sind damit optimale Voraussetzungen geschaffen, sehr präzise und fehlerfreie Zellzahlen der hochempfindlichen CA1-Neuronen zu erfassen.

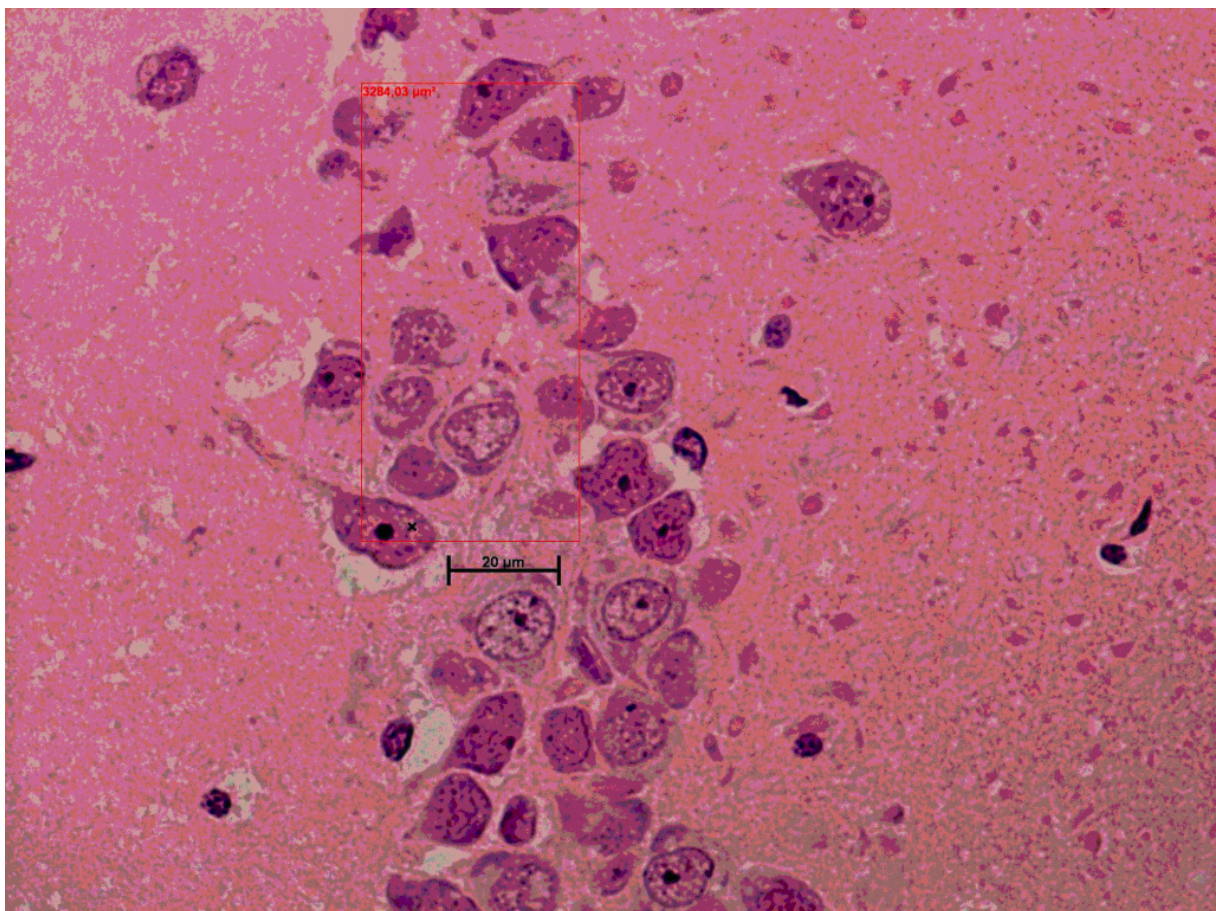


Abb. 4 exemplarischer Schnitt durch die CA1-Region des Hippocampus mit eingezeichnetem Disektorbereich.

Literaturauswahl

Albert EN, Kerns JM. Reversible microwave effects on the blood–brain barrier. *Brain Res* 230:153–164, 1981

Baumbach GL, Heistad DD. Effects of sympathetic stimulation and changes in arterial pressure in segmental resistance of cerebral vessels in rabbits and cats. *Circ Res* 52:527-533, 1983

Begley D.J., Methods of determining CNS drug transport in animals. Alfred Benzon Symposium 45, 91-109, 1999

Brightman, M.W., M.Hori, S.I. Rapoport, T.S. Reese, and E. Westgaard. Osmotic opening of tight junctions in cerebral endothelium. *J. Comp. Neurol.* 152: 317-326, 1973

Byus CV, Kartun K, Pieper S, Adey WR. Increased ornithine decarboxylase activity in cultured cells exposed to low energy modulated microwave fields and phorbol ester tumor promoters. *Cancer Res* 48:4222–4226, 1988

Byus CV, Pieper S, Adey WR. The effects of low-energy 69-Hz environmental electromagnetic fields upon the growth-related enzyme ornithine decarboxylase. *Carcinogenesis* 8:1385–1389, 1987

Cushing H. Some experimental and clinical observations concerning states of increased intracranial pressure. *Am J Med Sci.* 1902;124:375-400.

Cushing H. The blood-pressure reaction of acute cerebral compression, illustrated by cases of intracranial hemorrhage. *Am J Med Sci.* 1903;125:1017-1045.

Frey AH, Feld SR, Frey B. Neural function and behaviour: Defining the relationship. *Ann NY Acad Sci* 247:433–439, 1975

Fritze K, Wiessner C, Kuster N, Sommer C, Gass P, Hermann DM, Kiessling M, Hossmann K-A.. Effect of GSM microwave exposure on the genomic response of the rat brain. *Neuroscience* 81:627–639, 1997

Geinisman Y, deToledo-Morrell L, Morrell F, Heller RE. Hippocampal markers of age-related memory dysfunction: behavioral, electrophysiological and morphological perspectives. *Prog Neurobiol* 45(3):223–52, 1995

Goldman H, Lin JC, Murphy S, Lin MF. Cerebrovascular permeability to Rb-86 in the rat after exposure to pulsed microwaves. *Bioelectromagnetics* 5:323–330, 1984

Gruenau SP, Oscar KJ, Folker MT, Rapoport SI. Absence of microwave effect on blood–brain barrier permeability to ¹⁴C-sucrose in the conscious rat. *Exp Neurol* 75:299–307, 1982

Heistad DD, Marcus ML, Abboud FM. Role of large arteries in regulation of cerebral blood flow in dogs. *J Clin Invest* 62:761-768, 1978

- Kantos HA, Wei EP, Dietrich WD. Mechanism of cerebral arteriolar abnormalities after acute hypertension. *Am J Physiol* 240:H511-H527, 1981
- Kantos HA, Wei EP, Navari RM, Levassure JE, Roseblum WI, Patterson JL. Responses of cerebral arteries and arteriols to acute hypotension and hypertension. *Am J Physiol* 234:H371-H383, 1978
- Kniesel U, Wolburg H. Tight junctions of the blood brain barrier. *Cell Mol Neurobiol*, 20(1): 57-76, 2000
- Knudsen, G.M., Paulsen, O.B., Blood-brain barrier measurements by double indicator method using intravenous injection. *Am. J. Physiol.*: 266, H987-999, 1994
- Koenig H, Goldstone AD, Lu CY, Trout JJ. Polyamines and Ca²⁺ mediated hyperosmolar opening of the blood-brain barrier: In vitro studies in isolated rat cerebral capillaries. *J Neurochem* 52:1135-1142, 1989
- Leszczynski D, Joenväärä S, Reivinen J, Kuokka R, 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, 2002
- Lin-Lui S, Adey WR. Low frequency amplitude modulated microwave fields change calcium efflux rates from synaptosomes. *Bioelectromagnetics* 3:309-322, 1982
- Merritt JH, Chamness AP, Allen SJ. Studies on blood-brain barrier permeability after microwave radiation. *Radiat Environ Biophys* 15:367-377, 1978
- Miki T, Harris SJ, Wilce PA, Takeuchi Y, Bedi KS. Effects of age and alcohol exposure during early life on pyramidal cell numbers in the CA1-CA3 region of the rat hippocampus. *Hippocampus*. 14(1):124-34, 2004
- Moriyama E, Salzman M, Broadwell RD. Blood-brain barrier alteration after microwave-induced hyperthermia is purely a thermal effect: I. Temperature and power measurements. *Surg Neurol* 35:177-182, 1991
- Mullins JM, Penafiel LM, Juutilainen J, Litovitz TA. Dose-response of electromagnetic field-enhanced ornithine decarboxylase activity. *Bioelectrochem Bioenerg* 48:193-199, 1999
- Neubauer C, Phelan AM, Kues H, Lange DG. 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, 1990
- Oscar KJ, Hawkins TD. Microwave alteration of the blood-brain barrier system of rats. *Brain Res* 126:281-293, 1977

Persson BRR, Salford LG, Brun A, Eberhardt JL, Malmgren L. Increased permeability of the blood–brain barrier induced by magnetic and electromagnetic fields. *Ann NY Acad Sci* 649:356–358, 1992

Preston E, Vavasour EJ, Assenheim HM. Permeability of the blood–brain barrier to mannitol in the rat following 2,450 MHz microwave irradiation. *Brain Res* 174:109-117, 1979

Quock RM, Fujimoto JM, Ishii TK, Lange DG. Microwave facilitation of methylatropine antagonism of central cholinomimetic drug effects. *Radiat Res* 105:328–340, 1986

Rapoport, S.I., W.R. Fredericks, K. Ohno, and K.D. Pettigrew, Quantitative aspects of reversible osmotic opening of the blood-brain barrier. *Am. J. Physiol.* 238 (Regulatory integrative Comp. Physiol. 7): R421-R431, 1980

Salford LG, Brun AE, Eberhardt JL, Malmgren L, Persson BR. Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones. *Environ Health Perspect.* 111(7):881-3, 2003

Salford LG, Brun AE, Stureson K, Eberhardt JL, Persson BRR. 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, 1994

Schirmacher A, Winters S, Fischer S, Goeke J, Galla HJ, Kullnick U, Ringelstein EB, Stögbauer F. Electromagnetic fields (1.8 GHz) increase the permeability to sucrose of the blood–brain barrier in vitro. *Bioelectromagnetics* 21:338–345, 2000

Sutton CH, Carrol FB. Effects of microwave-induced hyperthermia on the blood–brain barrier of the rat. *Radiat Sci* 14:329–334, 1979

Ward TR, Elder JA, Long MD, Svendsgaard D. Measurement of blood–brain barrier permeation in rats during exposure to 2450-MHz microwaves. *Bioelectromagnetics* 3:371–383, 1982

Williams WM, Lu S-T, del Cerro M, Michaelson SM. Effect of 2450 MHz microwave energy on the blood–brain barrier to hydrophilic molecules. D. Brain temperature and blood–brain barrier permeability to hydrophilic tracers. *Brain Res Rev* 7:191–212, 1984

Tierhygiene

„Untersuchungen zum potentiellen Einfluss elektromagnetischer Strahlung auf das Stress- und Immungeschehen bei der Ratte“ (Dr. C. Engmann, Dr. C. Wöhr und Prof. M. Erhard)

Vorbereitungen zur Versuchsdurchführung:

Im **Januar 2005** wurden beim Versuchstierzüchter Janvier (Le Genest St Isle, Frankreich) 57 weibliche Ratten für die **Durchführung der Vorversuche** bestellt, und im Februar im Alter von drei Wochen geliefert. Die Tiere wurden unter SHAM-Bedingungen in Gruppen zu je drei Tieren gehalten und im **Mai 2005** in einem den Hauptversuchstieren entsprechenden Alter untersucht. Anhand der Vorversuche sollte der für den Hauptversuch zu wählende methodische Aufbau hinsichtlich der Zielgröße ‚Corticosteronkonzentration im Rattenserum‘ festgelegt werden, da keine vergleichbaren Veröffentlichungen existieren. In den Vorversuchen wurde untersucht, ob die Narkose per se einen Stressor darstellt, der eine medikamentelle, ACTH-induzierte^[1] Stressantwort beeinflussen könnte; welches Inhalationsnarkotikum (Halothan vs. Isofluran) das Mittel der Wahl darstellt, und welche Corticosteronkonzentrationen bei wachen Tieren auftreten. Dazu erhielten je 10 Tiere eine Isofluran- bzw. Halothannarkose, an 30 weiteren Tieren wurden Blutentnahmen im wachen Zustand durchgeführt. Nach Entnahme der Basalprobe erfolgte die Applikation synthetischen ACTHs (Synacthen®; 100 µg/kg). Serielle Blutproben wurden bei den narkotisierten Tieren jeweils 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten nach ACTH entnommen; während bei den wachen Tieren nur eine weitere Blutprobe nach 15, 30 oder 60 Minuten gewonnen wurde. Die Probenanalyse erfolgte mittels ELISA durch Professor Palme (Institut für Biochemie, Veterinärmedizinische Universität Wien), da dieses Institut über etablierte Methoden zur Bestimmung der Corticosteronkonzentration bei zahlreichen Säugetierspezies incl. Ratten und Mäusen, sowie über Publikationen dieser Daten verfügt.^[2]

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 seitdem auch in den Hauptversuchen angewandt wird. Da sich die beiden Narkotika hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Corticosteronkonzentration nicht unterscheiden, wird in den Hauptversuchen Isofluran verwendet. Diese Ergebnisse wurden im Rahmen des Biologiekolloquiums vom 11./12. Oktober 2005 im BfS präsentiert.

Parallel zur Probenanalyse in Wien erfolgte im Juli und August 2005 die Validierung eines kommerziell erhältlichen Ratten-Corticosteron-ELISAs im institutsinternen Labor. Nachdem die Ergebnisse dieses ELISAs mit jenen des ‚Wiener ELISAs‘ vergleichbar waren, wird er seitdem zur Messung der Serum-Corticosteronkonzentration eingesetzt.

Durchführung der Untersuchungen: Tiere, Material und Methoden

Am 30. November 2005 konnten die **Untersuchungen des Immunsystems** der F0b-Gruppe1-Generation – bestehend aus 43 weiblichen Ratten (13 UMTS, 15 GMS, 15 SHAM) – begonnen werden. Der gesamte Immunisierungszeitraum dieser

F0b-Gr.1-Tiere erstreckte sich vom 30.11.05 bis zum 4.01.2006, und ging nahtlos über in den Immunisierungszeitraum der F0b-Gr.2-Tiere (41 Tiere, davon 11 UMTS, 12 GSM, 18 SHAM) vom 4.01. bis 8.02.06. Am 30.11.05 (sowie am 4.01.06) erfolgte jeweils die 1. Blutentnahme vor Beginn der Immunisierung (Tag 0). Im Abstand von 7 Tagen (Grundimmunisierung) sowie 28 Tagen (Boosterung) wurden die Tiere mit einer Suspension bestehend aus den Antigenen Ovalbumin (OVA) und Hühner IgY, sowie dem Lipopeptid-Adjuvans Pam₃Cys-Ser-Lys₄ (je 1 mg/ml) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS, pH 7,2; davon je 0,2 ml/Tier und Injektion) immunisiert. Weitere Blutentnahmen zur Untersuchung des Impferfolgs und des Titeranstiegs der spezifischen Antikörper erfolgten jeweils an Tag 14 und Tag 35. Die Tiere wurden dabei im Doppelblind-Design immunisiert bzw. beprobt.

Somit wurden in der F0b-Generation von insgesamt 84 Tieren jeweils 3 Blutproben gewonnen. Diese 252 Serumproben werden seit März 2006 mittels spezifischen ELISAs analysiert. Neben der Gesamt-IgG-Konzentration werden dabei auch die spezifischen Antikörpertiter gegen OVA sowie gegen IgY bestimmt. Diese Untersuchungen sind derzeit noch nicht abgeschlossen, mit ersten Ergebnissen ist bis Juli 2006 zu rechnen.

Nach Abschluss der Immunisierung konnten am 18. Januar 2006 die **Untersuchungen zum Stressgeschehen** begonnen werden. Diese wurden bei den 43 Tieren der F0b-Gr.1-Generation vom 18.01. bis zum 1.02.06; und bei den 41 Tieren der F0b-Gr.2-Generation vom 22.02. bis 9.03.06 jeweils täglich (incl. aller Wochenenden) durchgeführt, wobei hier terminliche Überschneidungen mit den Untersuchungen zum Immunsystem auftraten. Auch hier wurde entsprechend eines kodierten Versuchsplanes im Doppelblind-Design gearbeitet. Analog zu den Vorversuchen erhielten jeweils alle drei Tiere eines Käfigs im Anschluss an die Bestimmung ihres aktuellen Gewichts eine zweistündige Isoflurananästhesie (Einleitung 5 Vol%, Aufrechterhaltung 1-2 Vol%). Nach Entnahme der 1. Blutprobe (t₀) wurden jeder Ratte 100 µg/kg Körpergewicht ACTH intraperitoneal injiziert, und die weiteren Blutproben analog dem Vorversuch zu t₁₅, t₃₀, t₄₅, t₆₀, t₉₀ und t₁₂₀ entnommen. Sämtliche Zeitspannen der Blutentnahmen wurden im dazugehörigen Narkoseprotokoll notiert, um auch zu einem späteren Zeitpunkt potentielle Auffälligkeiten in der Ergebnisinterpretation berücksichtigen zu können.

Somit wurden in der F0b-Generation von insgesamt 84 Tieren jeweils 7 Blutproben gewonnen. Diese 588 Serumproben werden ebenfalls seit März 2006 mittels ELISA analysiert. Auch diese Untersuchungen sind derzeit nicht abgeschlossen, erste Ergebnisse liegen voraussichtlich bis Juli 2006 vor.

Ausblick auf den weiteren Zeitplan: Tiere, Material und Methoden

F0a-Generation

Die **Immunisierung** der am längsten exponierten F0a-Generation erfolgt bei den Gr.-1-Tieren (47 Tiere, davon 14 UMTS, 15 GSM, 18 SHAM) vom 19.07. bis 23.08.06; und bei den Gr.-2-Tieren (42 Tiere, davon 12 UMTS, 12 GSM, 18 SHAM) vom 23.08. bis 27.09.06. Die Untersuchungen zur Stressbelastung werden bei den Gr.1-Tieren voraussichtlich vom 28.08. bis 11.09.06, und bei den Gr.2-Tieren vom 2.10. bis 14.10.06 durchgeführt. Von dieser insgesamt 89 Tiere umfassenden F0a-Generation werden insgesamt 267 Proben zur Untersuchung des Immunsystems und 623 Proben zur Untersuchung der Stressbelastung gewonnen. Diese werden voraussichtlich

ab Mitte Oktober gemessen, sodass ihre Auswertung möglichst bis zum Beginn der ACTH-Tests der F2-Generation am 3.12.06 abgeschlossen ist.

F2-Generation

Die Immunisierung der F2-Generation erfolgt bei den Gr.-1-Tieren (53 Tiere, davon 18 UMTS, 18 GSM, 18 SHAM) vom 18.10. bis 22.11.06; und bei den Gr.-2-Tieren (51 Tiere, davon 18 UMTS, 18 GSM, 15 SHAM) vom 22.11. bis 27.12.06. Die Untersuchungen zur Stressbelastung werden bei den Gr.1-Tieren voraussichtlich vom 3.12. bis 20.12.06, und bei den Gr.2-Tieren vom 7.01.2007 bis 30.01.2007 durchgeführt. Von dieser insgesamt 105 Tiere umfassenden F2-Generation werden insgesamt 315 Proben zur Untersuchung des Immunsystems und 735 Proben zur Untersuchung der Stressbelastung gewonnen.

Weitere Aktivitäten:

Parallel zu den Vorversuchen wurden im Mai 2005 die zur Klimamessung und Aufzeichnung notwendigen Geräte bereitgestellt, die sich seitdem in Dauerbetrieb befinden. Der permanente Geräuschpegel der HF-Verstärker wurde gemessen, sowie auch die Lichtverhältnisse in den Befeldungskammern des Hauptversuchs, die zwischen den Kammern weitestgehend homogen eingestellt wurden. Im gleichen Zeitraum haben sich neben den Projektmitarbeiterinnen Frau Dr. Wöhr und Frau Dr. Engmann auch zwei Doktorandinnen in die Methodik der Blutentnahme bei Ratten an verschiedenen Punktionsstellen eingearbeitet. Im September 2005 beteiligte sich Frau Engmann auch nachts an den Notdiensten, die aufgrund von Geburtskomplikationen bei den F-1 Tieren erforderlich waren; und übernahm im November 2005 neben der 3-wöchigen Urlaubsvertretung von Frau Dr. Okorn auch die Mitarbeit an den Verhaltenstests von Dr. Bornhausen. Im Oktober 2005 wurden die bis dahin von Frau Dr. Engmann ausgearbeiteten Hygienevorschriften zur ‚Vermeidung der Einschleppung von Infektionen‘ bei den Versuchstieren im Rahmen einer projektinternen Schulung präsentiert, und seitdem laufend aktualisiert. Alle neu zum Projekt hinzukommenden Personen (Mitarbeiter, Tierpfleger, Hilfskräfte) werden seitdem durch Frau Engmann theoretisch und praktisch eingewiesen, und das Einhalten der Hygienevorschriften jeweils durch Unterschrift bestätigt. Des Weiteren wurden von Mai bis Dezember 2005 die wöchentlichen Gewichtsbestimmungen aller Versuchstiere durch Frau Engmann unterstützt.

HF-Technik

Der technische Report des Lehrstuhls für Hochfrequenztechnik der TUM ist als Anlage beigefügt.

Zwischenbericht über die erzielten Befeldungszeiten in den GSM und UMTS Kammern

Die Befeldung hat in beiden Kammern in der Kalenderwoche 32 im Jahr 2005 begonnen und ist prinzipiell als durchgehende (24 h, 7 Tage pro Woche) kontinuierliche Befeldung vorgesehen. Dieser Befeldungsvorgang wird regelmäßig durch die Arbeiten für die Tierpflege und auch durch Wartungsarbeiten unterbrochen. Weitere Unterbrechungen geschehen durch Bedienungsfehler, z.B. durch versehentliches Nichtwiedereinschalten der Befeldung nach Tierpflegearbeiten. Die unter diesen Bedingungen normal erreichten Befeldungszeiten liegen bei 96,5 % der möglichen Gesamtzeit für den GSM Verstärker und bei etwa 95 % für den UMTS Verstärker.

Weiterhin traten im Zeitraum bis zum heutigen Tage mehrfach technisch bedingte Ausfälle der Leistungsverstärker für die GSM und UMTS Signale auf. Diese technisch bedingten Ausfälle hatten jeweils Reparaturmaßnahmen zur Folge, die typischerweise innerhalb eines Tages durchgeführt werden konnten. Die Berücksichtigung dieser Ausfälle führt zu Befeldungsraten, die bei GSM bei 95,8% der Gesamtzeit und bei UMTS insgesamt bei 90,4% der Gesamtzeit liegen. Diese Werte sind nicht erheblich niedriger als die durch reine Pflege und Wartungsarbeiten bedingten Werte und können für das Versuchsziel als ausreichend angesehen werden.

Koordination

Neben den allgemeinen administrativen Aufgaben bei der Projektverwaltung wie die Erstellung von

- Programmreport 2004,
- Zwischenbericht 2004 und

wurden alle erforderlichen Maßnahmen zum finanziellen Geldtransfer und zur Mittelabrechnung durchgeführt:

- Mittelanforderung und Verteilung über die Finanzverwaltung der TUM.
- Ausgabenkontrolle/Kassenprüfung.
- Verwendungsnachweis 2004 für BfS.
- Anpassung der Finanzierungspläne.
- Kommunikation mit den Verwaltungen der Technischen Universität München, der Ludwig-Maximilians-Universität und dem Bay. Staatsministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst

Als Schwerpunkt oblag der Projektleitung die Kommunikation mit den einzelnen Projektpartnern der TUM und LMU und die Koordination bei den beschriebenen Projektstadien, insbesondere die Leitung der Planung, Auftragsvergabe und –abwicklung zur Realisierung des Expositions-konzepts, gemeinsam mit dem HF-Technik Partner und der Tierphysiologie, Erstellung von Ablaufplänen zur Projektabwicklung im Zusammenwirken aller beteiligten Institutionen, Verhandlungen mit dem Bauamt der

LMU zur Übernahme notwendiger technischer und baulicher Infrastrukturmaßnahmen usw.

Veröffentlichungen und Präsentationen

- S. Tejero, S. Schelkshorn, J. Detelefsen, S. Okorn, M. Bornhausen, O. Petrowicz: Setup for the controlled plane wave exposure at GSM and UMTS bands for in vivo experiments using a parabolic reflector. BioEM-Meeting, 19. bis 25.06.2005, Dublin, Irland.
- Biologie-Kolloquium des BfS, 11. und 12. Okt. 2005
 - V. Hansen, J. Detlefsen: Expositionsanlagen für Langzeitstudien in vivo (Langzeitstudie UMTS, Langzeitstudie Kognition).
 - M. Bornhausen, M. Stohrer, C. Wöhr: In vivo Experimente unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation A. Langzeituntersuchungen.

Anlage

Technical Report HF-Technik TUM

Lehrstuhl für Hochfrequenztechnik
der Technischen Universität München

– Technical Report –

**In Vivo-Experimente unter Exposition mit
hochfrequenten elektromagnetischen
Feldern der Mobilkommunikation.
A Langzeituntersuchungen**

Simón Tejero Alfageme Simon Schelkshorn
Jürgen Detlefsen

December 2005

1 Introduction

This report describes the exposure setup developed and constructed by the *HFS* group of the institute for highfrequency engineering of the *Technische Universität München* within the frame of the *Bundesamt für Strahlenschutz* (BfS) project “In Vivo-Experimente unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilkommunikation. A Langzeituntersuchungen”.

The setup is intended for a controlled, long-term and continuous exposition (20 Months, 24 h/day) of Wistar rats with standard GSM and UMTS signals, at 900 MHz and 1966 MHz, respectively. Three chambers are required: for GSM-, UMTS- and sham-exposure, with high isolation between them. A minimum of 100 rats per setup should be exposed simultaneously to provide sufficient statistic support for the biological experiments. Other requirements are imposed by the *in vivo* nature of the exposure: the chamber must be air-conditioned and the access to the cages must be assured for the daily animal care. The animals will be exposed by a linear polarized plane wave. Of course, the local variations of the exposure dose must be kept as small as possible. These conditions are fulfilled by the exposure system presented here, which is based on a mass-production parabolic reflector. Although the setup is designed for GSM and UMTS bands, the concept can be applied to any other frequency as well.

2 Exposure concept

The setup presented in this document is in analogy to the “compact range” concept, which is used in antenna measurement facilities to obtain a plane wave at relative short ranges. A parabolic reflector is used to convert a spherical wavefront emanating from the focus of the paraboloid into a plane wave. The less strict error requirements for exposition in comparison to antenna measurements allows us to use a standard reflector instead of a high-precision one. The selected reflector has a diameter of 320 cm and a focal distance of 112 cm and is a mass-product, which reduces its cost drastically.

Due to the low focal distance-to-diameter ratio, it is rather difficult to achieve a uniform illumination across the reflector’s surface when illuminating from the focus.

Table 1: Exposure setup requisites

Controlled linear polarized plane wave exposure
Identical construction of three setups: GSM at 900 MHz, UMTS at 1966 MHz and sham
Appropriate conditions for animal well-being and animal care
Exposition of a high number of animals (> 100) simultaneously
Low-cost setup with standard components

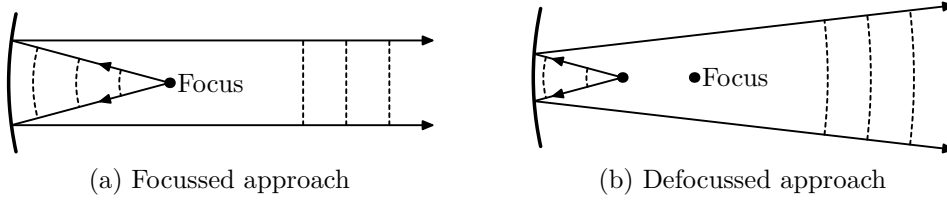


Figure 1: Reflected wave on a parabolic reflector

The required beamwidth for the primary feed would be 142° . In this approach, this problem is overcome by moving the exposure zone away from the focal plane and axially defocussing the feed, by placing it closer to the reflector.

As shown in figure 1, in the defocussed approach, the reflected wave shows spherical wavefronts with a slight curvature—it can be considered as quasi-plane wave within the volume of a cage—and also an increase of the usable volume of the reflected beam. The defocussing together with the placement of the exposure zone far enough from the reflector are used to reduce the primary source’s beamwidth requirements. This is of benefit also for the minimization of the diffraction effects caused by the reflector rims, which are illuminated with less intensity. In addition, if the exposure zone is moved away from the primary feed, the influence of the backward radiated and the near field becomes smaller, as they decrease with distance.

As primary feed an open waveguide operating in the fundamental mode TE_{10} has been used due to its wide beamwidth and its relative simplicity. The waveguide is fed by a monopole and, to reduce the back-radiated field, a conducting plane surrounds the aperture. The dimensions of the primary feed for both setups are given in figure 2.

The optimum defocussing distance has been selected based on simulations. For this purpose the setup was simulated in a high-frequency electromagnetic solver, as described in section 4.1. The electric field for a cylindrical exposure volume, with space for 40 cages, was obtained for different defocussing distances d_z . The distance which led to

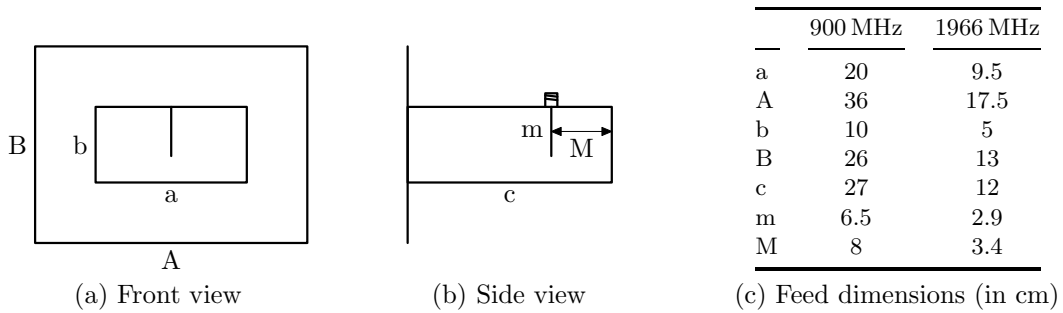


Figure 2: Primary feed

minimum relative deviation of $|\vec{E}|$ was found to be $d_z = -48$ cm for the GSM setup and $d_z = -60$ cm for the UMTS setup.

Figure 3 shows the final exposure setup. It is placed in a metallicly shielded chamber to avoid external influences and to decouple the different exposed groups. The inner walls are covered with absorber material to avoid uncontrolled reflection of the waves propagating in the chamber. The animals are kept inside polysulfone cages with a size of $(H \times W \times L)$ $24 \times 28.5 \times 42.5$ cm³. The cages are placed on wooden slats with the cage frontal looking towards the reflector.

3 Setup construction

Three exposure chambers have been installed in the premises of the veterinary faculty of the *Ludwig Maximilian Universität* in Munich.

Due to the closed metallic construction a high electromagnetic shielding is achieved. The measured electromagnetic shielding of the chambers lies over 100 dB, i. e. external signals like the TV signal coming from the neighbor TV-tower are attenuated by a factor of at least 100 dB.

The 50 Hz magnetic field in the chambers has also been measured and it lies under 100 nT everywhere in the chambers.

The s_{11} parameters at the RF input port to the exposure chambers—measured at the input of the coaxial cable and connected to the primary feed—have been measured and are 14 dB for the GSM setup and 22 dB for the UMTS one.

4 Exposure field characterization

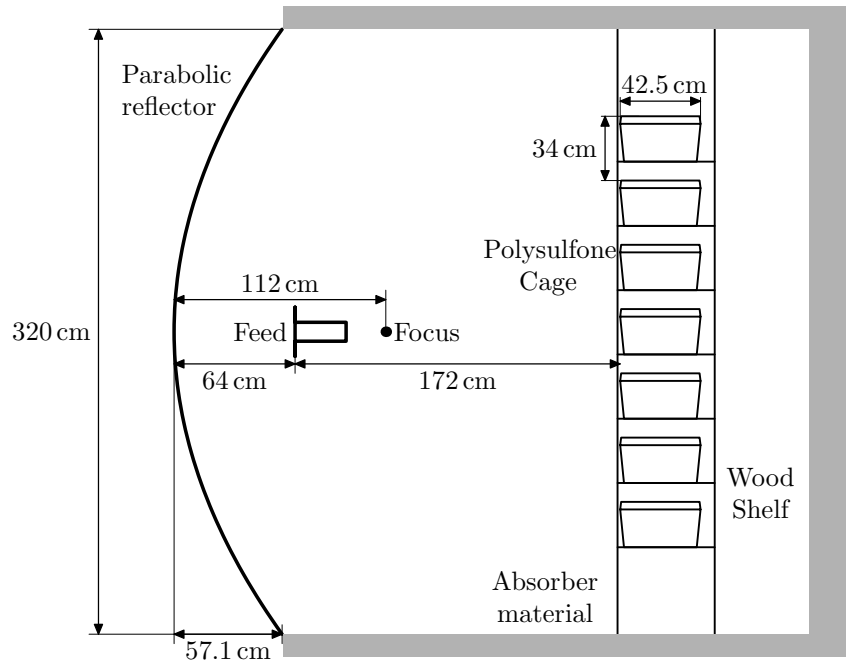
For the exposure setup assessment, simulations of the electromagnetic field in the exposure volume have been carried out. Also a measurement campaign to validate the simulations and to characterize the influence of the neighbor animals was carried out.

4.1 Field simulation

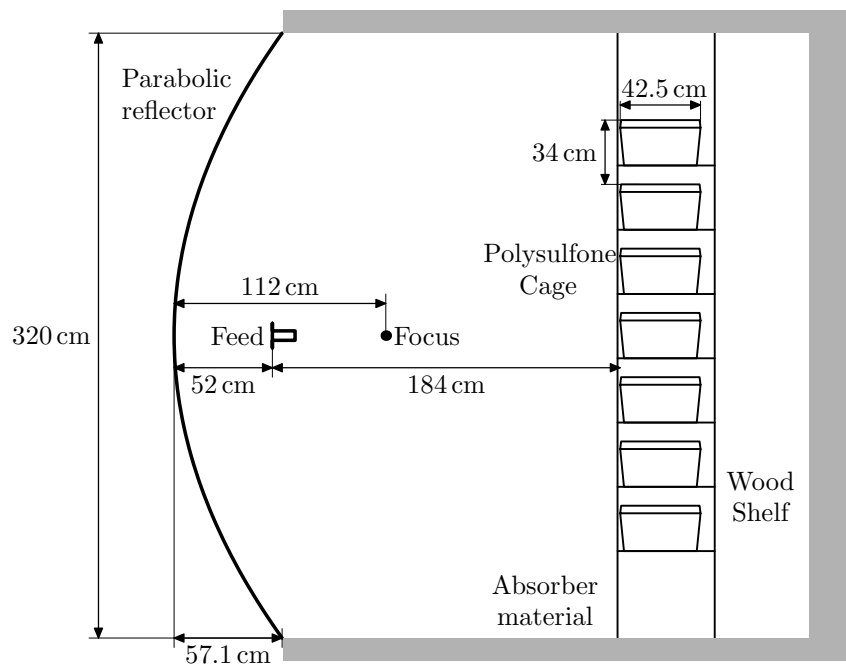
The exposure setup model shown in figure 5—with feed dimensions as in figure 2—has been simulated with the software package *FEKO*¹, which is a high frequency electromagnetic solver based on the *Method of Moments* (MoM). The discretization of the structure was better than $\lambda_0/12$ for the waveguide—being $\lambda_0/15$ 5 cm around the feed point—and better than $\lambda_0/5$ for the reflector—with $\lambda_0/12$ 25 cm around the paraboloid's vertex.

Figure 6 shows the simulation results for the field at the shelf front and at the $x = 0$ plane. A summary of important results can be found in table 2. It can be noted that the plane wave condition has been fulfilled with a phase deviation from the plane wave

¹Version 4.2



(a) GSM 900 MHz



(b) UMTS 1966 MHz

Figure 3: Exposure setups



Figure 4: Exposition chambers

in the volume of a cage of max. 12° . The standard deviation of the power density \mathcal{P} within the whole exposure volume—for place for 40 cages—is 14.9% for the GSM setup and 15.5% for the UMTS one.

4.2 Field distribution measurement

For the field measurement campaign open waveguides operating in the fundamental mode TE_{10} have been used. The dimensions of the apertures were $20 \times 10 \text{ cm}^2$ for the 900 MHz antenna and $8.6 \times 4.3 \text{ cm}^2$ for the 1966 MHz one. The receiving apertures have an integration effect with respect to the local field distribution. The dimensions were chosen

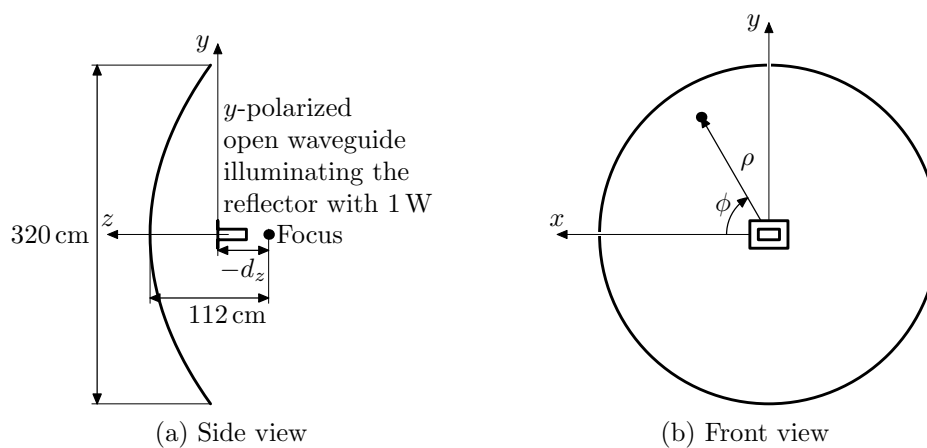


Figure 5: Simulated setup. The feed dimensions are given in figure 2 and the final defocussing distances are: $d_z = -48 \text{ cm}$ for GSM and $d_z = -60 \text{ cm}$ for UMTS

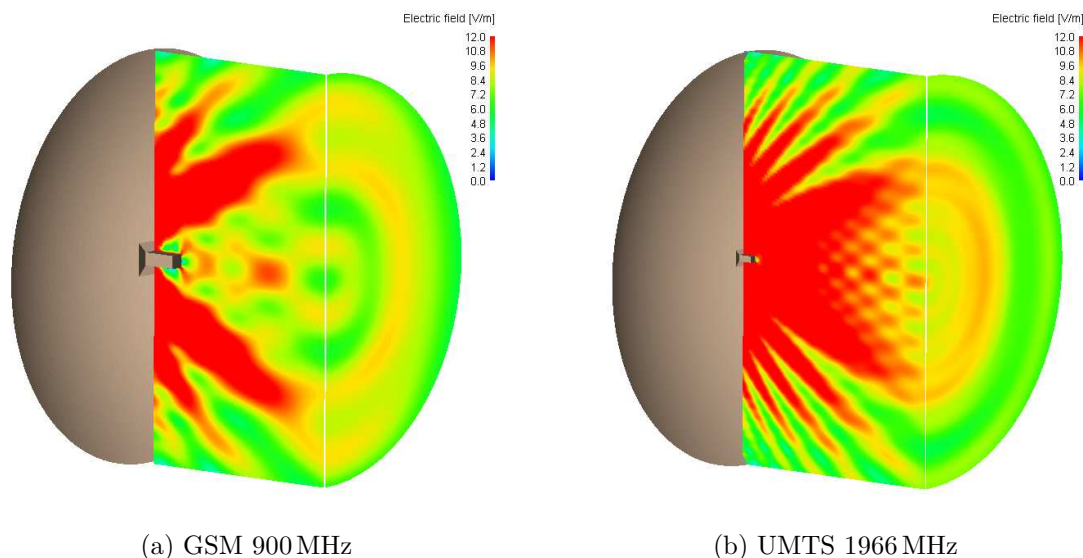


Figure 6: Simulation result for the setup from figure 5. $|\vec{E}|$ at the plane $x = 0$ and $z = -172$ cm (GSM) and $z = -184$ cm (UMTS)

to be comparable to the size of the animals and thus the measured results are expected to be in accordance with the total animal exposure. Two different measurements were carried out: without animals in the chamber to characterize the power density coming from the reflector and with animals surrounding the measuring antenna to characterize the power density coming from the neighbor rats and the further equipment.

For the measurements without animals the antennas were placed at each possible

Table 2: Simulation result for the setup from figure 5

Parameter	GSM setup	UMTS setup
Frequency	900 MHz	1966 MHz
Exposure volume	$-222 \text{ cm} < z < -172 \text{ cm}$ $15 \text{ cm} < \rho < 125 \text{ cm}$	$-234 \text{ cm} < z < -184 \text{ cm}$ $15 \text{ cm} < \rho < 125 \text{ cm}$
Defocussing distance d_z	-48 cm	-60 cm
$ \vec{E} $ mean value	7.15 V/m	7.96 V/m
$ \vec{E} $ standard deviation	7.50%	7.85%
\mathcal{P} standard deviation	14.9%	15.5%
Max. phase deviation from a plane wave in a cage volume	12°	12°
s_{11}	-20 dB	-20 dB



(a) UMTS antenna placed for measurements without animals. Position “front”



(b) GSM antenna placed for measurements with animals. Position “left”

Figure 7: Field measurement in the chambers

cage position in the wooden shelf, with its aperture aligned to the front of the shelf and pointing to the reflector, as shown in figure 7(a). The standard deviation of the measured power density for the best 40 cage positions—those with higher exposure levels—was 14% for the GSM setup and 27% for the UMTS setup.

For the measurements with animals full populated cages were placed surrounding the antenna. Four different measurements were carried out: with the antenna pointing to the reflector, to the cage at his left side, to the one at his right side and with the antenna pointing to the reflector but placed with the aperture aligned with the back side of the cage, i. e. 42 cm behind the shelf front. Measurements during several hours were carried out. Mean values for measurements with and without animals for the “front” antenna orientation are coincident. The total standard deviation in the exposure dose due to the presence of the animals has been calculated as

$$\sqrt{\sigma_{\text{front}}^2 + \sigma_{\text{left}}^2 + \sigma_{\text{right}}^2}$$

Table 3: Power density measurements without animals in the chamber normalized to $P_{\text{feed}} = 1$ W. Results are given for the best 40 cage positions

Parameter	GSM Setup	UMTS Setup
Frequency	900 MHz	1966 MHz
$ \vec{E} $ mean value	7.8 V/m	8.2 V/m
\mathcal{P} standard deviation	14 %	27 %

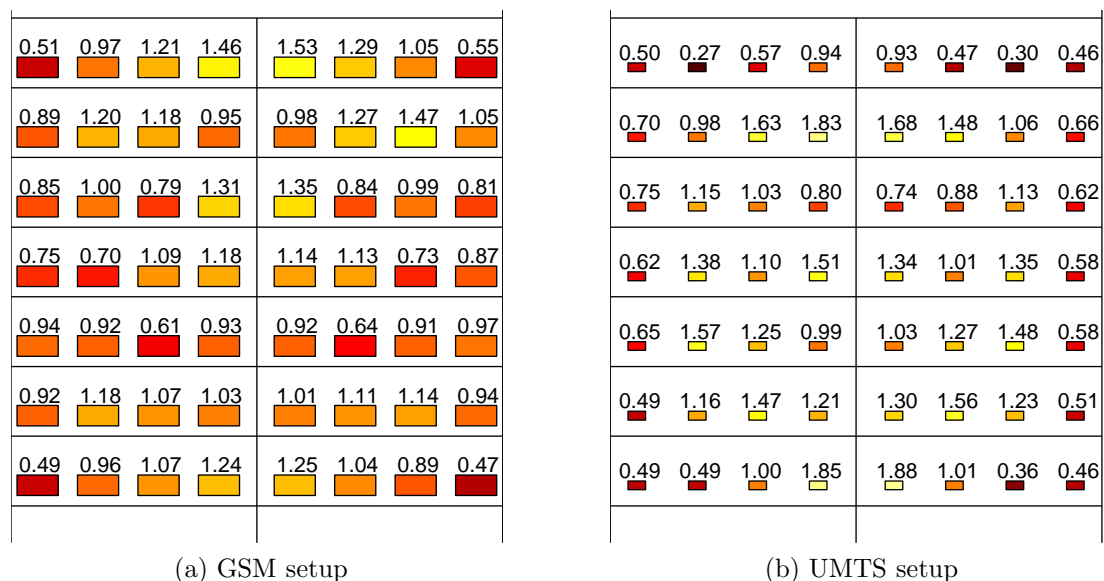


Figure 8: Measured power density normalized to the global mean value at each cage position in the wooden shelf

and resulted in a deviation of 7% for GSM and of 4% for UMTS (normalized to the measurement without animals).

5 Signal characterization

The animals are exposed with standard GSM and UMTS signals. The GSM signal is generated by a vector signal generator Rohde & Schwarz SMIQ and the UMTS signal by a Generic UMTS Signal Generator GUS 6960S of the University of Wuppertal. The center frequency of the GSM signal is 900 MHz and all eight time slots are used, filled with random data and with equal power. The UMTS signal is a generic UMTS signal with a center frequency of 1966 MHz [1, 2]. Both signals are amplified by RF amplifiers of Bonn Elektronik GmbH and are fed into the chambers.

As the UMTS signal has not a constant amplitude, it is affected by nonlinearities of the RF amplifier. To characterize the signal's distortion, the crest factor has been compared between the input and the output of the amplifier. Depending on the specific signal period, the crest factor is reduced by max. 3 dB at maximum output power.

The signal power fed in each chamber is monitored and recorded every 10 s for 24 h/day.

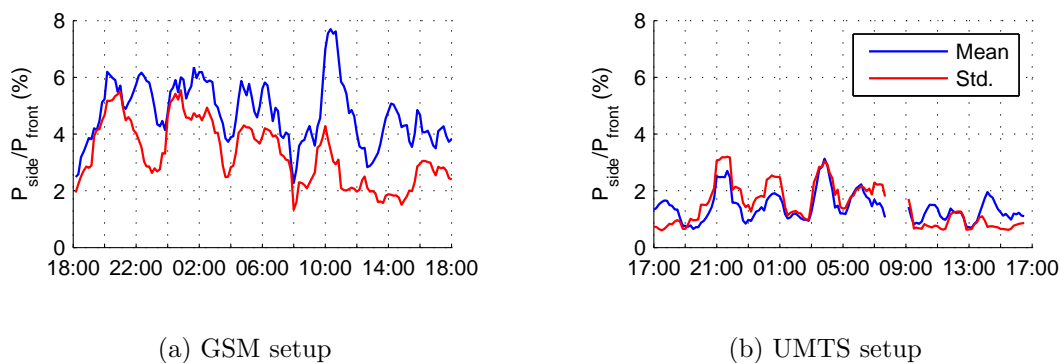


Figure 9: Measured power density with full populated cages surrounding the measured position. Statistics obtained with data sets of 1 hour. Results normalized to the measurement without animals

6 SAR Simulation

The standard exposure measure is the *Specific Absorption Rate* (SAR). The exposure rate on the rats should be 0.4 W/kg *Whole Body SAR* (WB-SAR), i. e. the SAR averaged over the whole body. The relation between the measured power density and the WB-SAR in the rats is obtained by means of numerical simulations. High resolution inhomogeneous voxel models of the rats are imported into CST Microwave Studio²—a high frequency electromagnetic simulation tool based on the *Finite Integrations Technique* (FIT)—where different problems of animal scenarios exposed by a plane wave can be solved.

Three different voxel models of Sprague-Dawley³ rats were available for the simulations: an adult male, an adult female and a 7-days old baby rat. Based on these voxel models several scenarios with different arrangements of the animals have been created: one male rat, one female rat, one baby rat, four scenarios with three female rats, two scenarios with two male rats and two scenarios with one female rat and eight baby rats. Each scenario has been simulated with a plane wave coming from the three main axes at

²Version 5.02

³Rat model identical to Wistar rats for SAR simulation purposes

Table 4: Single-animal voxel models

Model	Weight (g)	Voxel resolution ($dx \times dy \times dz \text{ mm}^3$)
Sprague-Dawley male rat	370	$0.39 \times 0.39 \times 0.43$
Sprague-Dawley female rat	275	$0.5 \times 0.5 \times 0.5$
Sprague-Dawley 7 days old rat	15	$0.5 \times 0.5 \times 0.5$

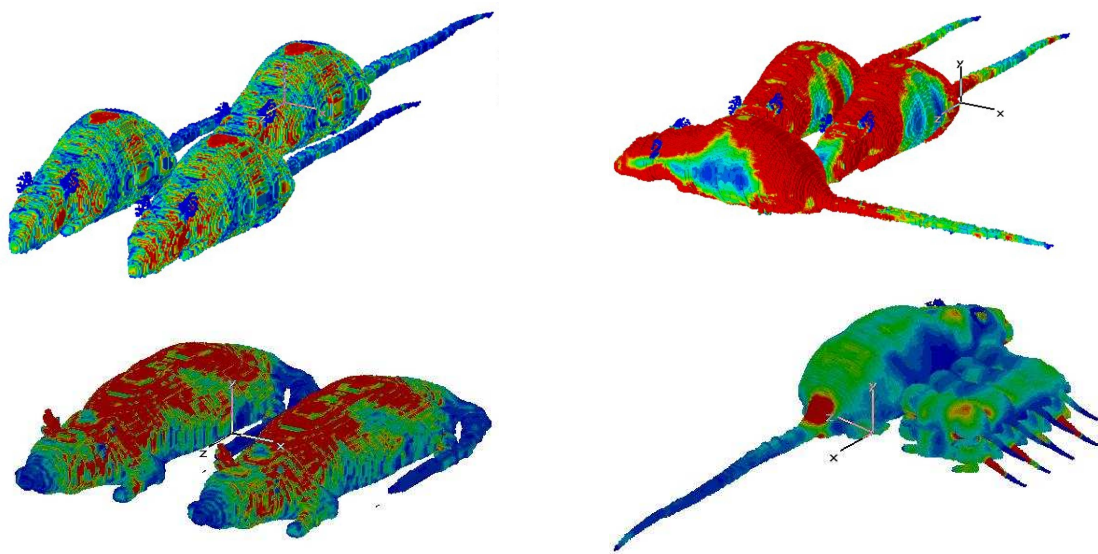


Figure 10: Example of the simulated scenarios

900 MHz and 1966 MHz, i.e. six times. The WB-SAR results have been analyzed and are summarized in table 5. It can be noted that the variation in the WB-SAR under ideal exposure conditions is 45%. The variation in scenarios with only one adult animal is 50% and 26% for 900 MHz and 1966 MHz, respectively. It can be concluded, that the main factor of WB-SAR variation in the rats is due to the free movement of the animals in the exposed cage, which is an indispensable requirement for continuous, long-term, *in-vivo* experiments.

Also the influence of a subcutaneous transponder⁴ with dimensions $12 \times 2 \times 2 \text{ mm}^3$ on a single rat has been simulated. The maximum deviation in the WB-SAR due to the

⁴A small receiver/transmitter used to identify the animals

Table 5: WB-SAR simulation results. Statistics of the four three-female and two two-male rat scenarios (48 cases per frequency)

Parameter	900 MHz	1966 MHz
WB-SAR Mean value for $ \vec{E} = 1 \text{ V/m}$	$3.82 \cdot 10^{-5} \text{ W/Kg}$	$3.68 \cdot 10^{-5} \text{ W/Kg}$
Standard deviation	41 %	45 %
Required $ \vec{E} $ for WB-SAR = 0.4 W/Kg	102 V/m	104 V/m
Required input Power [†] for WB-SAR = 0.4 W/Kg	172 W	161 W
SAR efficiency	$0.0023 \text{ W} \cdot \text{Kg}^{-1} / \text{W}$	$0.0025 \text{ W} \cdot \text{Kg}^{-1} / \text{W}$

[†]Ratio input power P_{in} to mean $|\vec{E}|$ from table 3

Table 6: Variation of the WB-SAR

Origin	GSM Band	UMTS Band
Cage position in the chamber	14 %	27 %
Animals in the neighborhood	7 %	4 %
Size and change in attitude of the animals in the cage	> 42 %	> 45 %

transponder was 0.6 % at 1966 MHz and 1.25 % at 900 MHz. This means that transponders to identify the animals can be used without major influence on the exposure dose.

7 Summary

The exposure concept using a defocussed 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.

References

- [1] Ndoumbè Mbonjo Mbonjo, H., J. R. Streckert, A. K. Bitz, V. W. Hansen, A. Glas-machers, S. Gencol, and D. Rozic: *A generic UMTS test signal for RF bio-electromagnetic studies*. *Bioelectromagnetics*, 25:415–425, September 2004.
- [2] Streckert, J. R., H. Ndoumbè Mbonjo Mbonjo, A. K. Bitz, and V. W. Hansen: *Ein UMTS-Testsignal für bio-elektromagnetische Experimente*. Newsletter Forschungsgemeinschaft Funk, pages 11–17, March 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 present 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.