

## **Zwischenbericht für das Projekt**

### **In vivo-Experimente unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation**

#### **A. Langzeituntersuchungen**

#### **Forschungsverbund EMVU der TUM/LMU**

Berichtszeitraum 2004

Der Zwischenbericht 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 2004**

Das Projektjahr 2004 war geprägt durch grundlegende Entscheidungen zur Exposition und der Planung der Experimente, der Zeitabläufe, Untersuchungsmethoden, erste Voruntersuchungen und der Genehmigung von Tierexperimenten durch die staatliche Aufsichtsbehörde. Dies waren Aktivitäten, die teilweise alle Projektpartner gemeinsam entwickelt haben, oder die im Rahmen der einzelnen Arbeitsgruppen vorgenommen wurden.

- **Interdisziplinär:**
  - Diskussion alternativer Expositionsmethoden und Entscheidung für ein Verfahren unter Berücksichtigung erforderlicher Tierzahlen und geforderter Expositions- und Tierhaltungsbedingungen.
  - Entscheidung für eine für alle Versuchsgruppen einheitliche Klimatisierung.
- **Projektpartner HF-Technik:**
  - Literaturrecherche und Methodenentwicklung zur Feldexposition.
  - Mathematische Simulation und Machbarkeitsanalyse eines innovativen Befeldungskonzepts.
  - Kostenabschätzungen und Einholung von Angeboten zur Erstellung von drei Expositionskammern.
  - Verantwortliche Projektierung eines Klimatisierungssystems für alle drei Kammern und Kostenabschätzung (Angebote).
  - Federführung bei der Verhandlung, Auftragsvergabe und Realisierung für die Befeldungskammern und der Klimatisierung.
- **Projektpartner Tierphysiologie:**
  - Optimierung der Skinnerschen Testeinrichtungen und Modifikation der elektronischen Steuer- und Datenerfassungseinheiten auf der Basis aktueller  $\mu$ -Prozessortechnologie.
  - Diskussion und Definition der zu untersuchenden Parameter, Festlegung von Zielparametern.
  - Versuchsplanung und detaillierte Ausarbeitung des Versuchsablaufs.
  - Ausarbeitung des Tierversuchsantrags bei der Regierung von Oberbayern, gemeinsam mit der Tierhygiene.
  - Methodenplanung und erste Voruntersuchungen zur Reproduktionsfähigkeit.
  - Untersuchungen zur physischen Entwicklung (developmental landmarks) der Nachkommen.
  - Konzeption der Expositionskammern unter tierärztlichen Gesichtspunkten
  - Bauaufsicht (Frau Dr. Okorn) gemeinsam mit HF-Technik und Koordinator.
- **Projektpartner Tierhygiene**
  - Literaturrecherchen und Fallzahlplanungen für die eigenen Untersuchungen.
  - Ausarbeitung des Tierversuchsantrags bei der Regierung von Oberbayern, gemeinsam mit der Tierphysiologie.

- Vorversuche zur Stressbeurteilung durch andere Faktoren als die Exposition.
- Auswahl geeigneter Narkoseverfahren (Arbeitsschutz)
- Erarbeitung eines Nachweisverfahrens von Corticosteron (ELISA, HPLC).
- **Projektkoordination:**
  - Literaturrecherchen zum Thema Kognition, Lernleistung
  - Leitung der Planung Auftragsabwicklung der Expositionseinrichtungen.
  - Bauaufsicht gemeinsam mit Tierphysiologie und HF-Technik
  - Verwaltung der Forschungsmittel und Abrechnung mit dem BfS
  - Verantwortlich für Berichtswesen.

Berichte der einzelnen Projektpartner:

### **a) Tierphysiologie**

#### **Allgemeine Projektangelegenheiten:**

#### **Versuchsplanung und detaillierte Ausarbeitung des Versuchsablaufs**

Im Laufe des Jahres 2004 wurde unter Berücksichtigung der Erfordernisse der durchzuführenden Teilprojekte ein detaillierter Versuchsplan erarbeitet, der das Gesamtprojekt in seinen zeitlichen und logistischen Einzelheiten darstellt. Die Erstellung des Plans erfolgte kontinuierlich. Anpassungen an ein Mitte des Jahres 2004 notwendig gewordenenes neues Expositions-konzept und an den jeweiligen Erkenntnisstand der einzelnen Arbeitsgruppen (Angaben zu Versuchsgruppengrößen, Versuchsdauer einzelner Teilprojekte, Kompatibilität einzelner Untersuchungen, etc.) führten zu mehreren Versionen. Die Überblicksdarstellung dieses Versuchskonzepts wurde in einem Zwischenbericht im September 2004 kommuniziert.

#### **Neukonzeption der Tierhaltung in den Expositions-kammern**

Im Zuge der Erarbeitung eines neuen Expositions-konzeptes musste das Konzept für die Tierhaltung gänzlich neu entwickelt werden. Hierzu wurden Angebote verschiedener Hersteller zu unterschiedlichen auf dem Markt befindlichen Käfigmodellen und Modellen zur Wasserversorgung eingeholt. Aufgrund der mangelnden Verwendbarkeit (Metallgehalt) herkömmlicher Käfigmodelle und Tränkenippel mussten verschiedene Modifikationen vorgenommen und getestet werden. Als geeignet erwies sich schließlich ein Käfig-Sondermodell der Fa. Tecniplast, das auf Wunsch vollkommen ohne Metallanteile hergestellt wurde. Sein durchbrochener Kunststoffdeckel gewährleistet eine ausreichende Luftzirkulation im Käfiginneren. Die erhöhte Ausführung der Käfigunterschale führt zu einer Gesamtkäfighöhe von 24 cm im Gegensatz zu herkömmlichen 15-18 cm, was das Benagen der Kunststoffstege durch die Versuchstiere erschwert und gleichzeitig eine Verbesserung der Haltungsbedingungen gegenüber herkömmlichen Käfigen bedeutet. Hinsichtlich der Wasserversorgung fiel die Entscheidung aus Gründen der Praktikabilität auf eine Einzelversorgung der Käfige. Verwendet werden Kunststoffflaschen, die über einen Gummistopfen mit Tränkenippeln aus Glas versehen sind.

## **Konzeption der Expositionskammern unter tierärztlichen Gesichtspunkten**

Die Entwicklung eines neuen Expositionskonzeptes machte detaillierte Angaben zur Gestaltung der Expositionskammern im Hinblick auf eine tiergerechte und praktikable Tierhaltung notwendig. In verschiedenen Gesprächen wurden in Zusammenarbeit mit den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Hochfrequenztechnik Lösungen zur optimalen Raumaufteilung, zur Beleuchtung und zur Oberflächengestaltung von Boden- und Ablageflächen erarbeitet. Gemeinsam wurde ein Regalmodell zur Unterbringung der Versuchstierkäfige entwickelt, das eine ausreichende Luftzirkulation über den Käfigen und eine relativ gleichmäßige Ausleuchtung der Regalböden ermöglicht, ohne dabei die Feldverteilung maßgeblich zu beeinflussen.

## **Untersuchungen zur Reproduktionsfähigkeit**

Weiterhin wurden Literaturrecherchen durchgeführt mit dem Ziel der Auswahl von Parametern, die die Reproduktionsfähigkeit von Ratten beschreiben. Eine Voraussetzung für die Bestimmung dieser Parameter stellt die genaue Kenntnis des Besamungszeitpunktes eines Versuchstieres dar. Da die hierzu allgemein verwendete Methode der Plaquekontrolle, die in unserem Fall eine unzulässige Ausstattung der Paarungskäfige mit einem Metallgittereinsatz beinhaltet, nicht in Frage kam, wurde in Vorversuchen die alternative Bestimmung des Besamungszeitpunktes mittels Vaginallavage erprobt. Gleichzeitig wurden für die Versuchsplanung wesentliche Reproduktionsdaten des zu verwendenden Rattenstammes erhoben (durchschnittliche Anzahl der Paarungstage bis zur erfolgreichen Insemination, durchschnittliche Wurfgröße, Geschlechterverhältnis, Überlebensrate der Nachkommen während der Aufzucht, etc.). Die Vorversuche zur Reproduktion dienten zudem der Ermittlung des für Durchführung der Untersuchungen notwendigen Zeit- und Personalaufwandes.

Folgende Reproduktionsparameter wurden für die Untersuchungen an jeweils zwölf Reproduktionspaaren pro Versuchsgruppe und Generation ausgewählt:

- **Anzahl der benötigten Paarungstage** bis zur erfolgreichen Kopulation.
- **Kopulations-Index (%)** für Männchen bzw. Weibchen  
Anzahl der Männchen mit erfolgreicher Kopulation x 100/ Anzahl der verpaarten Männchen bzw. Anzahl der gesamten Weibchen x 100/Anzahl der verpaarten Weibchen
- **Fertilitäts-Index (%)** für Männchen bzw. Weibchen  
Anzahl der Männchen deren Fertilität durch Wurf des Weibchens bestätigt ist x 100/Anzahl der verpaarten Männchen bzw. Anzahl der nachweislich trächtigen Weibchen x 100/Anzahl der verpaarten Weibchen
- **Körpergewichtsveränderung des Muttertieres während der Trächtigkeit**
- **Trächtigkeitsrate (%)**  
Anzahl der trächtigen Weibchen x 100/Anzahl der erfolgreich besamten Weibchen
- **Trächtigkeitsdauer**
- **Frühgeburtenrate (%)**  
Frühgeburt = Geburt vor dem 20. Trächtigkeitstag

- **Verlängerte Tragzeit (%)**  
Verlängerte Tragzeit = Überschreitung des errechneten Geburtstermins (21. Trächtigkeitstag) um mehr als 2 Tage
- **Gestations-Index (%)**  
Anzahl der Muttertiere mit lebenden Nachkommen x 100/Anzahl der trächtigen Muttertiere
- **Wurfgröße**
- **Vitalität des Wurfs**  
Anzahl der lebend geborenen Nachkommen x 100/Anzahl der lebend und tot geborenen Nachkommen
- **Geburtsgewicht** der Nachkommen
- **Geschlechterverhältnis** der Nachkommen
- **Missbildungsrate (%)**  
Prozentsatz lebender Nachkommen mit externen morphologischen Defekten bei der Geburt
- **Körpergewichtsveränderung des Muttertieres während der Laktation**
- **Körpergewichtsveränderung der Nachkommen während der Aufzucht**
- **Überlebens-Index (Tag 0-4)**  
Anzahl der lebenden Nachkommen am 4. Lebenstag x 100/Anzahl der lebenden Nachkommen am Tag der Geburt
- **Überlebens-Index (Tag 4-21)**  
Anzahl der lebenden Nachkommen am 21. Lebenstag x 100/Anzahl der lebenden Nachkommen am 4. Lebenstag.

### **Untersuchungen zur physischen Entwicklung (developmental landmarks) der Nachkommen**

Die Bestimmung des zeitlichen Eintritts von Merkmalen der physischen Entwicklung (developmental landmarks) bei Neonaten ist integraler Bestandteil von in der Verhaltensteratologie und Entwicklungstoxikologie verwendeten screening-Programmen. Die physiologische Differenzierung, das Wachstum und die Migration von Zellen eines Organismus fußt auf einer zeitlich geordneten Sequenz von Ereignissen. Beschleunigungen oder Verzögerungen in der zeitlichen Abfolge des Erscheinens unterschiedlicher Funktionen des Organismus während der Entwicklung können darauf hinweisen, dass eine solche geordnete zelluläre Entwicklung gestört wurde.

Es wurden Literaturstudien zur Auswahl einzelner Parameter durchgeführt. In sich anschließenden Vorversuchen wurden ausgewählte Kriterien vor allem hinsichtlich ihrer Eindeutigkeit und Praktikabilität überprüft und das für den verwendeten Rattenstamm charakteristische Alter des Eintritts der einzelnen Kriterien bestimmt. Anschließend wurden anhand dieser Daten Beobachtungszeiträume festgelegt, die sowohl die Erfassung eines beschleunigten als auch verzögerten Eintritts des jeweiligen Parameters ermöglichen.

Folgende Merkmale der physischen Entwicklung von Ratten wurden schließlich für die Untersuchungen an Wurfgeschwistern der für die Kognitionsversuche eingesetzten Nachkommen ausgewählt:

- **Incisor eruption** = Durchbruch der oberen Schneidezähne (10.-11. Lebenstag)

- **Ear opening** = Öffnung des äußeren Gehörgangs (12.-13. Lebenstag)
  - **Eye opening** = Öffnung der Augen (14.-15. Lebenstag)
- (Beobachtungszeitraum für alle drei Parameter: 7. bis max. 21. Lebenstag)

Weiterhin wurden während der Vortests verschiedene Kennzeichnungsmethoden zur Identifizierung einzelner Nachkommen eines Wurfs getestet. Als vorteilhaft und praktikabel erwies sich ein Kennzeichnungssystem, das die Tätowierung des Fußrückens der Nachkommen am 4. Lebenstag vorsieht.

Zur eindeutigen Kennzeichnung der adulten Versuchstiere ab dem 21. Lebenstag wurde ein Transpondersystem der Fa. Alvetra getestet. Die Verwendung subkutaner Transponder bietet gegenüber der herkömmlichen Ohrmarkierung zum einen die Möglichkeit, eine unbegrenzte Tierzahl eindeutig zu identifizieren. Zum anderen sind Einzeltiere ohne den Einsatz eines Lesegerätes nicht identifizierbar, was vor allem im Hinblick auf eine doppelte Verblindung Vorteile bietet.

## **b) Kognition**

### **Prüfung "kognitiver" Leistungen von Ratten**

Zur Prüfung kognitiver Leistungen bzw. des Lernvermögens von Ratten werden verschiedene operante Verhaltenstests mit allmählich ansteigenden Lernanforderungen eingesetzt. Die Tests werden gleichzeitig mit 10 Tieren in standardisierten Testkammern (Skinner-Boxen) 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 10 ON-Phasen erhältlich. Um eine Belohnung ("reinforcement", Futterkügelchen à 45 mg) zu erhalten, 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.

### **Konventionelle Auswertung**

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

### **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.

### **Mikrostrukturen**

Um die Entwicklung der Hebeldruck-Effizienz eines Versuchstieres während der Testsitzung kontinuierlich verfolgen zu können, werden während der ON-Phasen die zwischen aufeinander folgenden Hebeldrücken auftretenden Zeitintervalle ("inter-response intervals", IRIs) mit einer Auflösung von 1 msec registriert.

## "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 Testsitzung registrierten IRI-Muster als sogenannte "scatter plots" abgebildet (Abb. A)

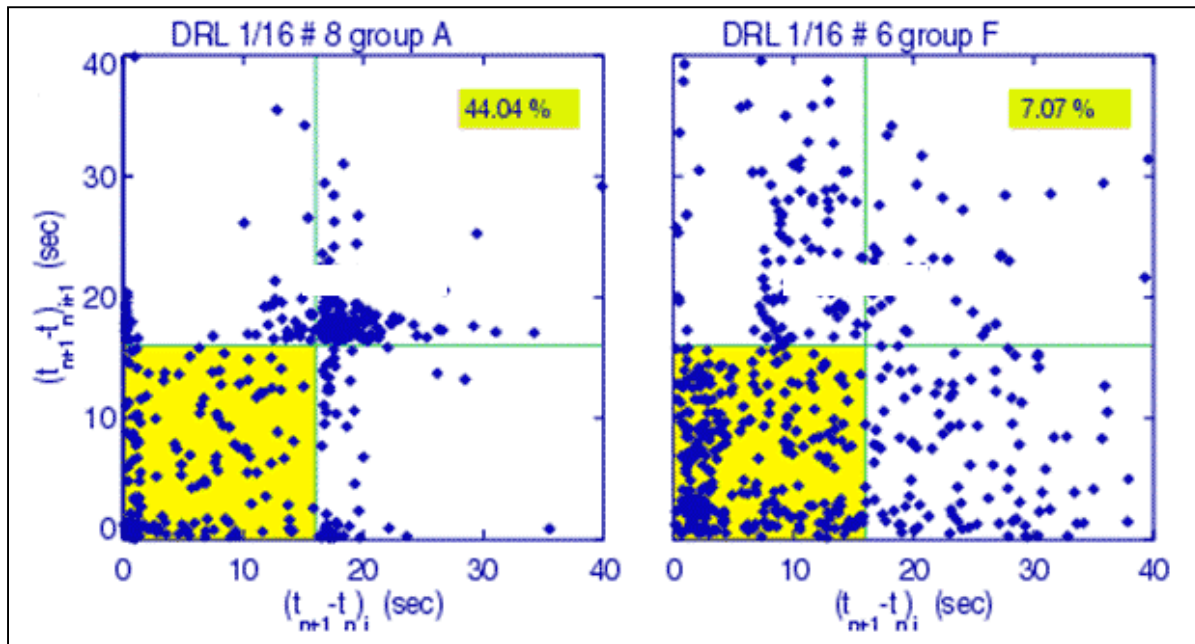


Abb. A.

Dargestellt sind alle IRIs während der 10 ON-Phasen der Testsitzung DRL 1/16. Die Ratte # 8 aus Gruppe A (links) hat das Sperrintervall von 16 sec "gelernt", die Ratte # 5 aus Gruppe F (rechts) hat diese Testaufgabe "nicht gelernt". Hier befinden sich nur 7,07 % der IRIs innerhalb der 16 sec.

Ziel der weiter unten beschriebenen Vorgehensweise war es nun, die visuelle Bewertung der "scatter plots" durch eine reproduzierbare mathematische Bewertungsmethode zu ergänzen. (Abb. B und C, 1-4)

### IRI-Struktur

Während der entscheidenden DRL 1/16-Testsitzung wird nun jedes einzelne IRI unter Berücksichtigung der empirisch gewonnenen IRI-"Normal"-Verteilung (von 0 - 1 normiert) bewertet. Bei diesem Testverfahren liegt das Maximum der testspezifischen IRI-Verteilung ca. 0,7 sec. nach dem Ende des Sperrintervalls von 16 sec (Abb. B). Entsprechend dieser Verteilung wird nun jedem IRI ein spezifischer Wert in "points" zugewiesen (rote Linie in Abb. C, 1-4).

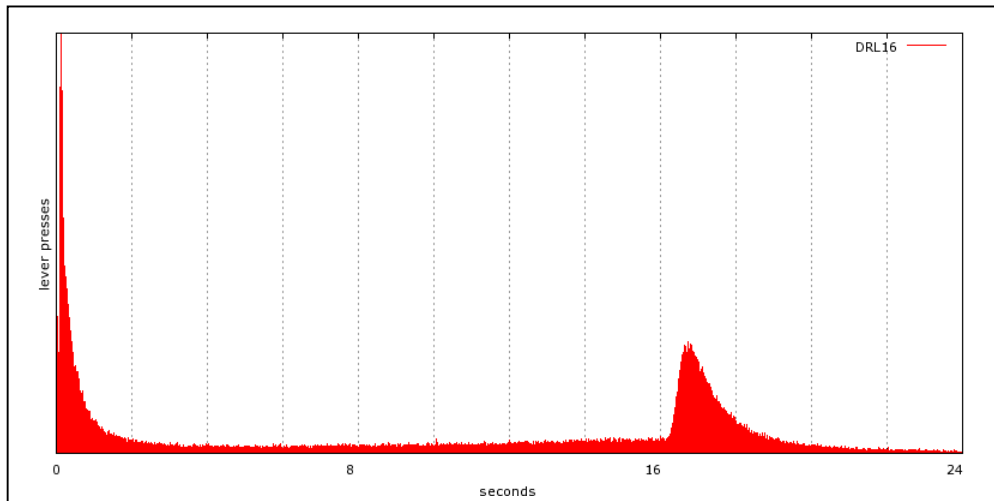


Abb. B.

### IRI-Häufigkeitsverteilung

Zusammenfassung vieler DRL 1/16-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)

### Schritt 1: 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 10 ON-Phasen einer DRL 1/16-Testsitzung

### Schritt 2: 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. C, 1-4).

### 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 (nach 5 % aller Hebeldrücke der Testsitzung, grüne Linie in Abb. C, 1-4) und Wendepunkt errechnet. Die durch den Fit gewonnenen Parameter sind somit:

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

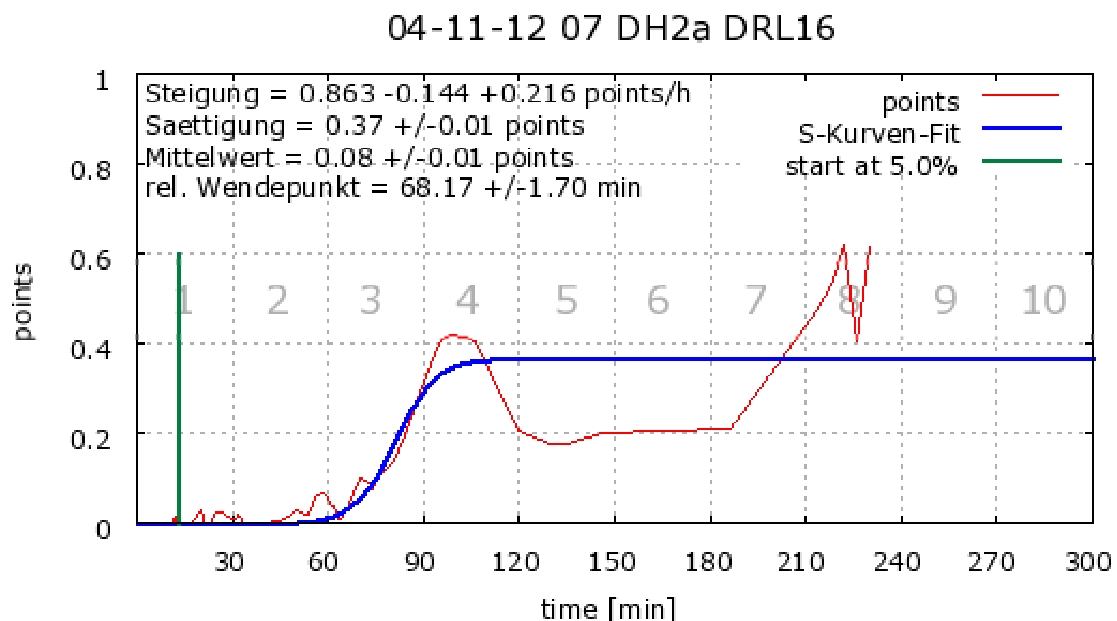


Abb. C, 1.

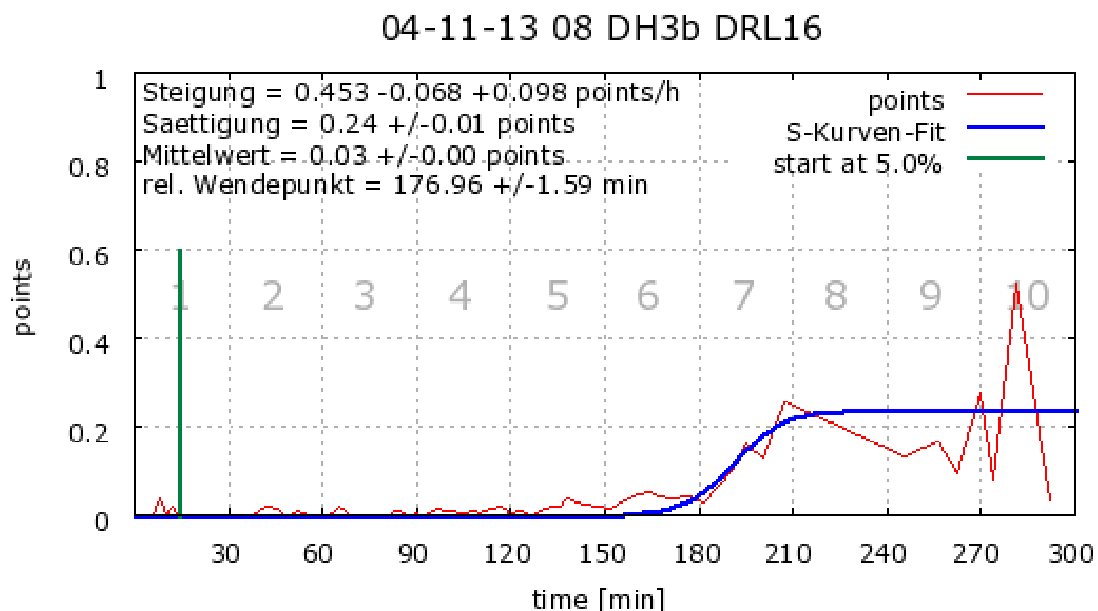


Abb. C, 2.

### 04-11-12 02 K2a DRL16

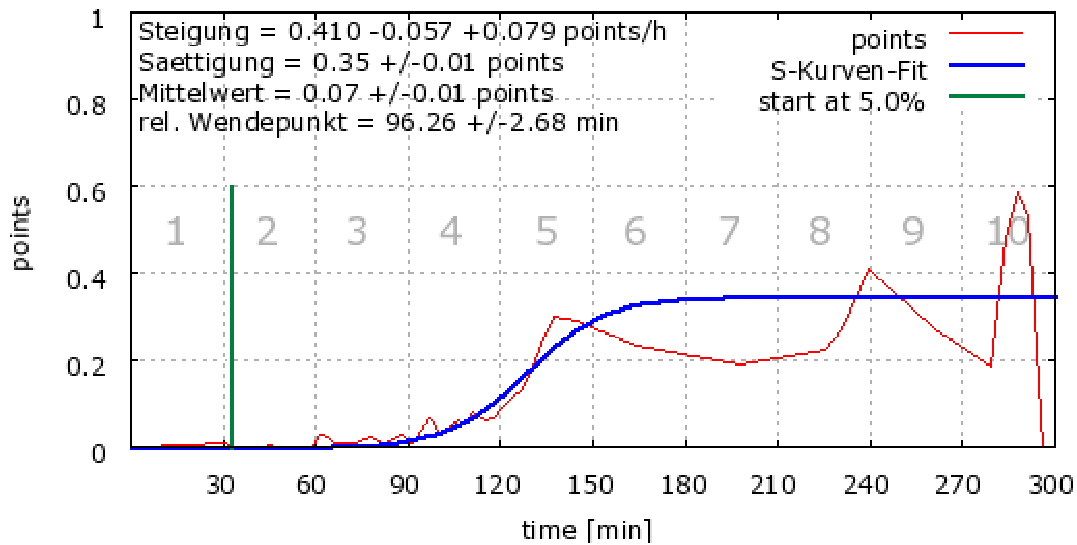


Abb. C, 3.

### 04-11-16 02 K2a DRL16

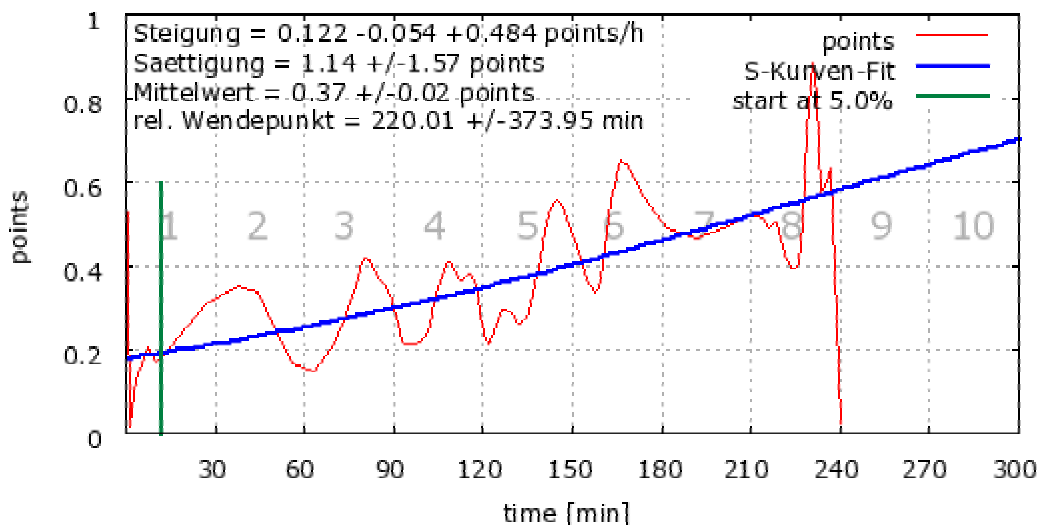


Abb. C, 4.

#### Abb. C, 1-4

0.863 points/Stunde. Unter „points“ wird die Übereinstimmung verstanden, die während einer DRL 1/16-Testsitzung zwischen jedem einzelnen IRI („inter-response interval“, d.h. dem Zeitabstand zwischen aufeinander folgenden Hebeldrücken) und der Gesamtheit aller empirisch gewonnener IRIs besteht. Die weiteren Abbildungen geben Hinweise für das unterschiedliche Das Tier # 07 zeigt am 12.11.04 bereits nach 68,17 min den für sein Lernvermögen typischen Wendepunkt der S-Kurve. Der Start dieser Zeitmessung wurde empirisch auf das Erreichen von 5 % der Hebeldruckaktivität gelegt. Die Steigung im Wendepunkt beträgt Lernvermögen einzelner Tiere. Der S-Kurven-Fit für das Tier # 02 zeigt am 16.11.04 zum Beispiel, dass der Wendepunkt hier erst nach 220,01 min auftritt und die Steigung im Wendepunkt nur 0,122 beträgt. Dieser Wert wird aber weiter eingeschränkt durch erhebliche statistische Streuung.

## **Ausblick zur Analyse**

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

Die vom BfS in Auftrag gegebenen Untersuchungen bei drei Ratten-Generationen zur Wirkung einer Langzeit-Exposition mit elektromagnetischen Feldern (EMFs) der Mobilfunkkommunikation können voraussichtlich im Mai 2005 auf dem Gelände des LMU-Instituts für Tierphysiologie auf dem Oberwiesenfeld (OWF) in München beginnen. Voraussetzung hierfür ist ein erfolgreicher Aufbau der entsprechenden Expositions- und Untersuchungseinrichtungen. Das vom EMVU-Forschungsverbund erarbeitete neue Expositions-konzept des TUM-Lehrstuhls für HF-Technik wurde in der Zwischenzeit weitgehend realisiert. Im neuen OWF-Labor stehen nunmehr drei vollklimatisierte Expositions-kammern (GSM, UMTS, sham à ca. 4x4x4 m<sup>3</sup>) zur Aufnahme von je ca. 120 Ratten und eine zusätzliche, ebenfalls vollklimatisierte Kammer (ca. 4,0x2,5x2,5 m<sup>3</sup>) zur Aufnahme der 10 Testkäfige für die operanten Verhaltensuntersuchungen zur Verfügung.

Am Ende des Berichtszeitraums warten die Untersuchungseinrichtungen noch auf die Installation der HF-Generatoren für das GSM- und das UMTS-Feld, die darauf folgenden messtechnischen Bestätigungen der vorgesehenen SAR-Werte, der Homogenität der entsprechenden EMFs und schließlich der Funktionstüchtigkeit der Testanlage für die Verhaltensuntersuchungen nach dem neuerlichen Umzug. Nach Abschluss dieser Messungen sollen die Testsitzungen zur Selektion der männlichen und weiblichen Wistar-Ratten der F-minus-1-Generation, i.e. den Eltern der 3 zu untersuchenden Ratten-Generationen F0, F1 und F2, am OWF beginnen. Zur Steigerung der Homogenität des experimentellen Ausgangsmaterials ist vorgesehen, ca. 60 männliche und 60 weibliche Tiere zu überprüfen. Die Auswahl wird unter Berücksichtigung verschiedener Parameter der Mikrostruktur-Analyse (siehe oben) je 10 % derjenigen Tiere eliminieren, die entweder über oder unter dem Gruppen-Mittelwert liegen.

## **Logistik**

Da wegen finanzieller Engpässe des EMVU-Forschungsverbunds für den Aufbau der Expositions-kammern und der Holzkammer zur Aufnahme der Testkäfige nur wenige firmeneigene Fachkräfte bezahlt werden konnten, musste ein Grossteil der mechanischen Arbeiten vom jeweiligen technischen und wissenschaftlichen Personal der beteiligten TUM- bzw. LMU-Institute übernommen werden.

## **Antrag für Tierversuche**

Der Antrag zur Genehmigung der für das gesamte BfS-Vorhaben geplanten Tierversuche wurde erarbeitet und der Regierung von Oberbayern vorgelegt. Die Genehmigung wurde unserem Forschungsvorhaben am 01.12.2004 erteilt.

## **Überwachung**

Es wurde ein LINUX-kontrolliertes Überwachungssystem für die operanten Verhaltenstest-einrichtungen konzipiert und aufgebaut, das die Konstanz der Umgebungsbedingungen während der nächtlichen Testsitzungen und die Verlässlichkeit

der jeweiligen Versuchsleiter bei deren Vorbereitung dokumentiert. Nach dem Umzug

der Untersuchungseinrichtungen zum OWF wird 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. registrieren. 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. Es ist vorgesehen, solche Störungen durch den automatischen Versand einer SMS zu signalisieren. Die Überwachung ist am LINUX-Server für das OBC-GUI-System implementiert und unabhängig von anderen Überwachungseinrichtungen, die für die Befeldung und Klimatisierung der Versuchstiere erforderlich sind.

### **Vorträge**

Im Berichtszeitraum wurden zwei Poster (**ICNIRP**, Sevilla, Spanien; **BEMS**, Washington, USA) präsentiert und zwei Vorträge (**EBEA**, Budapest, Ungarn; **FGF**, Immenstaad) gehalten. Ausdrücke der Poster und die dazugehörigen "abstracts" liegen dem BfS vor.

## Blut-Hirn-Schranke und DHA-Vorversuche

### Verhaltensstudien

1. nach Beeinflussung des Hirnstoffwechsels durch DHA-Supplementierung
2. nach Modifikation der Haltungsbedingungen

### Ziele der Untersuchungen

1. Etablierung einer *Methodenkontrolle* für den operanten Verhaltenstest mit Hilfe der Skinner-Boxen: Für den Fall negativer Studienergebnisse (keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und exponierten Tieren) wird es sehr wichtig sein, zum Nachweis der Eignung der gewählten Methoden auf eine Positivkontrolle verweisen zu können. Unter Ausnutzung der bekannten Wirkungen einer nutritiven Docosahexaensäure(DHA)-Supplementierung auf vielschichtige Hirnfunktionen sollte diese Methodenkontrolle erarbeitet werden.
2. *Funktionskontrolle* der Messeinrichtungen (Mechanik, Steuerung und Datenaufzeichnung der Skinner Einrichtungen): Herr Dr. Bornhausen (vergl. Darstellungen von Dr. Bornhausen) hat im Vorfeld der geplanten Untersuchungen die Skinnersche Messtechnik kontinuierlich auf einen neuen zeitgemäßen Stand gebracht. Damit war notwendig geworden, die früher schon mehrfach belegte hohe technische Zuverlässigkeit zu bestätigen. Die unter Punkt 1 geschilderten Tierversuche zur Methodenkontrolle sollten es gleichzeitig ermöglichen, Daten zur technischen Sicherheit der Messeinrichtung zu erheben.

Um für den Ausgang der Skinnerschen Messungen nach DHA-Supplementierung eine zusätzliche skinner-unabhängige Bestätigung zu erhalten, wurde die Durchführung wenigstens eines weiteren Verhaltenstests eingeplant. So wurden alle Versuchstiere nicht nur mit Hilfe

1. *der Skinner-Boxen* im Institut für Tierphysiologie, sondern zusätzlich auch
2. im *Hole-Board-Test* modifiziert nach OHL unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. M. Blobner, Klinikum Rechts der Isar, TU München, untersucht.

Nachdem jedoch mit beiden Tests keine signifikanten Verhaltensunterschiede infolge der DHA-Gabe nachgewiesen werden konnten, wurden weitere Verhaltenstests durchgeführt:

3. ein *Water-Maze-Test*: unterschiedliche Variationen gerade dieses Testsystems sind entsprechend den angegebene Literaturstellen nach DHA-Gabe die am häufigsten eingesetzten Verfahren und
4. die *Social-Discrimination Procedure*: da über wissenschaftliche Kontakte mit dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, Prof. Landgraf und Frau Elisabeth Frank, uns bekannt war, dass diesem Testverfahren eine besondere „Ratten-Eignung“ zugesprochen wird.

Der nachfolgend dargestellte Ausgang dieser 4 verschiedenen Verhaltens-Tests nach DHA-Supplementierung machte es angesichts des von uns selbst gesteckten Zieles einer „positiven Methodenkontrolle“ notwendig, eine weitere Behandlung von Versuchstieren vorzunehmen und deren Auswirkungen mittels des Skinner-Tests und eines weiteren Tests zu untersuchen.

Die Behandlung, welche mit bei uns heranwachsenden Jungratten durchgeführt wurde, bestand in

- Einzelhaltung im Käfig (social deprivation) und in
- Gruppenhaltung mit gestalteter Käfig-Umwelt (environmental enrichment).

Ein wesentlicher Bestandteil aller dieser Voruntersuchungen war die zwingende Vorgabe, dass alle eingesetzten Versuchstiere demselben Rattenstamm entstammen mussten, der auch für den Hauptversuch vorgesehen ist.

### **Verhaltensstudien nach Beeinflussung des Hirnstoffwechsels durch DHA-Supplementierung**

Derzeitiger Kenntnisstand zur DHA-Wirkung auf die Hirnfunktion:

Zu den essentiellen Fettsäuren gehören einerseits die Linolsäure (C<sub>18</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>) und ihr  $\omega$ -6 Derivat Arachidonsäure (ARA, C<sub>20</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>) und andererseits die Linolensäure (C<sub>18</sub>H<sub>30</sub>O<sub>2</sub>) und ihr  $\omega$ -3 Derivat Docosahexaensäure (DHA, C<sub>22</sub>H<sub>32</sub>O<sub>2</sub>). Die biologisch aktiven Verbindungen sind die ARA und DHA. Ein hohes Verhältnis von Linolsäure zu Linolensäure bewirkt aufgrund einer kompetitiven Hemmung der Enzyme zur Dehydrierung und Kettenverlängerung eine Verarmung des Hingewebes an  $\omega$ -3 Fettsäuren, d.h. eine Verminderung an DHA und Anreicherung an ARA. Das durch den Nervenwachstumsfaktor (NGF) stimulierte Neuritenwachstum wird durch DHA angeregt und durch ARA gehemmt (Ikemoto et al., 1997). Dies ist darauf zurückzuführen, dass ARA die für das Nervenwachstum notwendige Phospholipidsynthese hemmt und DHA diese fördert.

Übersicht tierexperimenteller Studien positiver DHA Wirkungen auf das Lernverhalten sowie unsere Studie

Testmodell	Spezies, Alter (Wo)	N	Dosis / Tag (mg DHA/kg KGW)	Behandlungsdauer (Wochen)	Autor
Labyrinth	Maus, 3 u. 60	7	1000, 2000	20	Lim und Suzuki, 2000
Labyrinth	Ratte, 10	7	300	10	Gamoh et al., 2001
Labyrinth	Maus, 12	9	500, 1000 2000	16	Lim und Suzuki, 2002
Labyrinth	Maus, 38	5-7	2000	8	Sugimoto et al., 2002
Gedächtnis/ Lernen	Ratte, 8	4	1000	5	Takeuchi et al., 2002
Gedächtnis/ Lernen	Ratte, 8	15	200	17	Catalan et al., 2002

Skinner-Box, Hole-Board, Labyrinth (Water-Maze), Social- Discrimination	Ratte, 4	12	600	14	unsere Studie
--	----------	----	-----	----	---------------

Für die nachfolgend beschriebenen Versuche zur Methodenkontrolle wurde eine Kontrollgruppe (n=12) mit einer Gruppe von Ratten (n=12), die mit einer mit Decosa-hexaensäure (DHA, 22:6n –3) angereicherten isokalorischen Diät über mehr als 100 Tage gefüttert wurden, in ihrem Lernverhalten verglichen.

Zur Fütterung sind folgende Angaben zu machen:

- DHA-Diät: (5% mit Docosa-hexaensäure angereichertes Fischöl, das 18 % DHA enthält, 2,5 % Kokosnussöl, 2,5 % Maisöl)
- Kontroll-Diät (Fettzusammensetzung: 7,5 % Kokosnussöl, 2,5 % Maisöl)

Für die experimentelle Abwicklung der beiden Verhaltenstests zur Kognition (Skinner-Test und Hole-Boeard-Test) erwies es sich aus praktischen Gründen als vorteilhaft, zunächst den Hole-Board-Test vorzuziehen.

### **Hole-Board-Test, modifiziert nach OHL**

Das modifizierte Hole-Board besteht unter anderem aus einem zentralen Brett (Board), in welches 15 Löcher eingebohrt sind. Diese sind mit Deckeln verschlossen, die von den Tieren geöffnet werden können. Täglich werden 3 verschiedene Deckel mit einem hellen Klebestreifen markiert. Nur unter den markierten Deckeln befinden sich Futterbelohnungen. Das Versuchstier wird an den Rand des Brettes gesetzt und sein Verhalten beobachtet und dokumentiert: Anzahl der gefundenen Futterbelohnungen, Zeit auf dem Board, Latenzzeit bis zum Betreten des Brettes, etc.. (Ohl et al., 1998).

Bei Betrachtung der Ergebnisse - aufgeschlüsselt in 27 Teilbeobachtungen - muss man zur Erkenntnis kommen, dass mit Hilfe des Hole-Board-Testes keine DHA-Wirkung nachgewiesen werden konnte. Es ist nach Meinung von Prof. Blobner dabei zu bedenken, dass alle Versuchstiere (auch die Kontrollen) im Vergleich zu seinen bisher eingesetzten Tieren in ihrem Lernverhalten besser waren, das heißt am oberen Grenzbereich des Testsystems. Bei der üblichen Kalibrierung des Testsystems waren weitere Verbesserungen der Leistungsfähigkeit somit nur schwer zu erfassen. Das Verfahren wurde bisher im Labor von Prof. Blobner nur zum Nachweis von Schädigungen eingesetzt und nicht – wie hier – zum Nachweis einer potentiellen Leistungssteigerung.

Operante Verhaltenstests mit Hilfe der *Skinner-Boxen*

3 Wochen nach diesem Testdurchgang wurden die Tiere in operanten Verhaltenstests mit Hilfe der Skinner-Boxen geprüft.

Die Testsequenz bestand aus jeweils einer aufeinanderfolgenden Nacht, die nach den zu erbringenden Leistungen (s.u.) wie folgt bezeichnet wird:

Training, Training, DRH 2/1, DRH 4/2, DRH 8/4, DRL 1/16, DRL 1/8, DRL 1/16, DRL 1/16, DRL 1/16, DRL 1/16, DRL 1/16, DRL 1/16, DRL 1/16, DRL 1/16

Training: Futterbelohnung alle 5 Minuten und nach jedem Hebeldrücken

DRH 2/1: Futterbelohnung nach mindestens 2 Hebeldrücken in 1 Sekunde

DRL 1/8: Futterbelohnung nach einer Wartezeit von mindestens 8 Sekunden zwischen 2 Hebeldrücken etc..

Die systematische Auswertung der Messdaten konzentrierte sich auf die Parameter Anteil der Aktivität (Hebeldrücke) in der ON-Phase (erfolgreiche Hebeldrücke werden belohnt) und Effizienz (erfolgreiche Hebeldrücke / Gesamtzahl der Hebeldrücke) in der ON-Phase (pro Testnacht 10 mal 30minütige ON-Phasen und 10 mal 60-minütige OFF-Phasen).

Aufgrund der erzielten Ergebnisse ist festzuhalten, dass zwischen den DHA-behandelten Versuchstieren und den Kontrolltieren keine Unterschiede auftraten. In Abb. 1 sind aufeinanderfolgende DRL 1/16 Testnächte dargestellt. Bei beiden Gruppen trat bereits nach den ersten Testtagen eine sehr ähnliche Verbesserung der Effizienz auf. Die angestrebte Positivkontrolle der Skinner-Methode konnte mit diesem Versuch somit nicht etabliert werden, da kein signifikanter Unterschied zwischen den DHA-supplementierten und den Kontroll-Tieren zu verzeichnen war.

Im Hinblick auf die angestrebte Funktionskontrolle der technischen Einrichtungen konnte dagegen die längerfristige Zuverlässigkeit eindeutig bestätigt werden. Darüber hinaus war zu erkennen, dass die einzelnen Tiere sich in ihrem Lernerfolg kontinuierlich von Tag zu Tag entwickelten. Die Beurteilung des Einzeltieres war daher gut wiederholbar. Dies trifft folglich auch für die Mittelwerte der Versuchsgruppen zu.

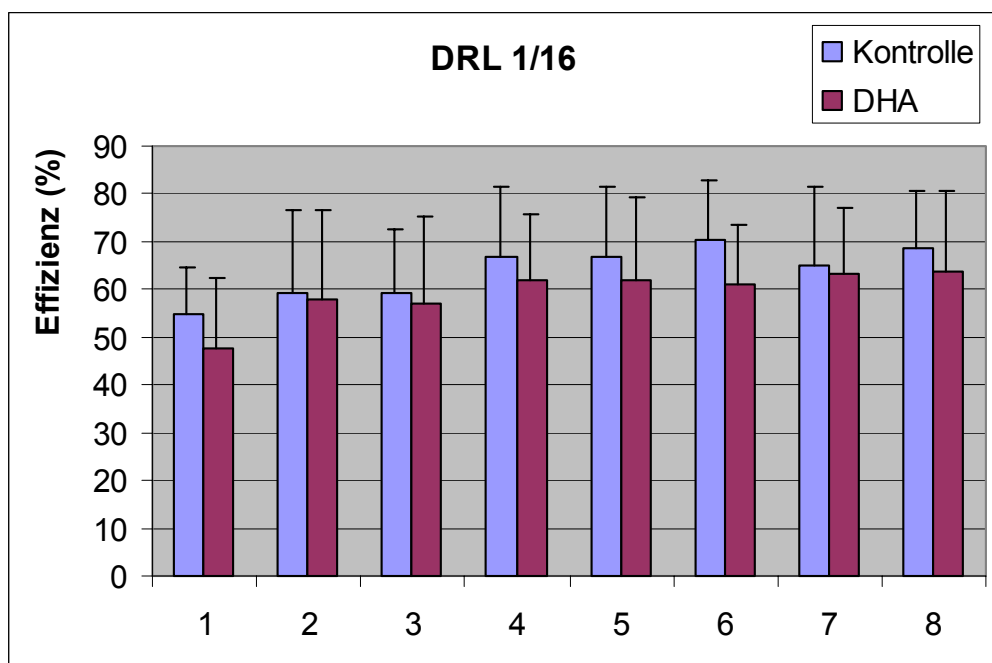


Abbildung 1: Effizienz (%) in der ON-Phase in 8 aufeinanderfolgenden Testnächten mit jeweils DRL 1/16. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 10 Tieren pro Testgruppe dargestellt.



## Water-Maze-Test

Die Versuchseinrichtung bestand aus einem Labyrinth in einem großen Wasserbecken. Die Wassertemperatur wurde auf 22 °C eingestellt. Die Ratten wurden in einer definierten Startposition ins Wasser gesetzt und die Zeit gestoppt, die sie benötigten, um eine nicht sichtbare (knapp unter dem Wasserspiegel befindliche) Insel zu erreichen. Wenn das Tier nach 60 Sekunden die Insel nicht gefunden hatte, wurde es aufgenommen und vor der Insel in das Wasser gesetzt. Es wurde mit einer Inselposition ein Trainingsdurchlauf (jede Ratte schwimmt bis zum Erreichen der Insel, die sich an einer unbekanntenen Position befindet) und dann 6 Testwiederholungen (jede Ratte schwimmt zur Insel, die an derselben Position wie im Trainingslauf verbleibt) durchgeführt.

Die DHA-supplementierten Ratten benötigten weniger Zeit zum Erreichen der Insel. Dieses Ergebnis ist beim ersten Versuchsdurchgang signifikant - wie in der folgenden Graphik (Abb. 2) dargestellt - und konnte in weiteren Tests (hier nicht aufgezeigt) reproduziert werden. Eine differenzierte Auswertung dieses Versuches, der auf Videobändern aufgezeichnet wurde, wird noch mit Hilfe eines dafür entwickelten Computerprogramms am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, Arbeitsgruppe Prof. Landgraf vorgenommen. Dabei können noch weitere Parameter ausgewertet werden. Da das bisher mit einfachen Mitteln ausgewertete Ergebnis eindeutig und reproduzierbar war, ist nicht zu erwarten, dass sich die Grundaussage noch ändern wird.

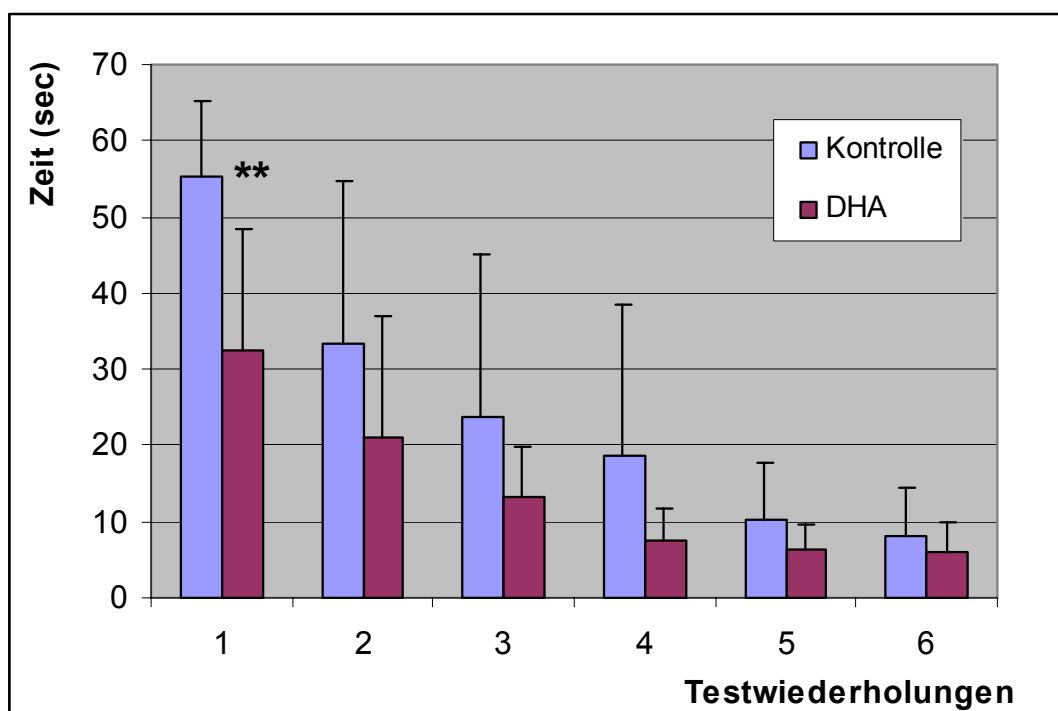


Abbildung 2: Zeit bis zum Erreichen der Insel in 6 aufeinanderfolgenden Tests. Es sind Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 11 Tieren pro Testgruppe dargestellt.

Die deutlich kürzeren Zeiten bis zum Erreichen der Insel zeigen, dass die DHA-Supplementierung zu der erwarteten Wirkung geführt hat. Diese Ratten lernen schneller, wo sich die „rettende“ Insel befindet.

## Social-Discrimination Procedure

Dieses Testsystem wurde von Anwendern wie folgt empfohlen: “Amongst the behavioral tests that are used to investigate learning and memory processes in rats, the social recognition or social memory procedure is one of the most interesting paradigms since it is both elegantly simple and ethologically relevant” (Engelmann et al., 1995).

Die Methode basiert auf der stark ausgeprägten Fähigkeit der Ratten, feine Geruchsunterschiede wahrnehmen zu können. Darüber hinaus nutzt sie den angeborenen Trieb der Tiere, ihre Artgenossen zu untersuchen und zu erkennen. Künstliche Reize müssen hierfür nicht eingesetzt werden. Ausgewertet wird das Verhältnis des jeweiligen Explorationsverhaltens (investigation duration) in 2 aufeinander folgenden Versuchsdurchgängen, die jeweils 4 Minuten dauern. In der ersten Sitzung (über 4 min) wird zu dem zu untersuchenden Tier ein unbekanntes Jungtier (FIRST) in den Käfig gesetzt und sofort registriert, wie lange das Versuchstier das Jungtier beschnüffelt. Nach einem festgelegten Zeitabstand (hier: 15, 30, 60 und 120 min) wird dasselbe Jungtier (SAME, war früher FIRST) wie bei der Erstexposition zusammen mit einem anderen, unbekanntem Jungtier (NOVEL) dem Versuchstier in den Käfig gesetzt.

Bei kürzeren Zeitintervallen (z.B. 15min) zwischen den beiden Versuchsdurchgängen kann das Versuchstier die beiden Jungtiere unterscheiden, d.h. sich an das frühere Jungtier erinnern. Das drückt sich darin aus, dass es sich länger dem neuen Jungtier zuwendet (NOVEL) als dem schon bekannten Jungtier (SAME).

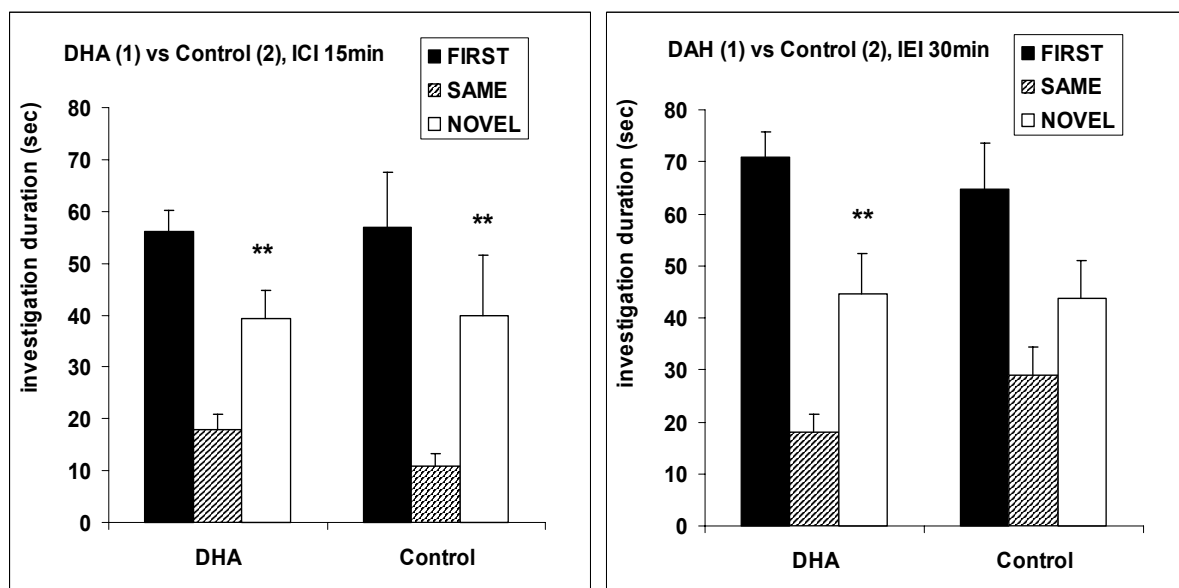


Abbildung 3a und 3b: Explorationsdauer (investigation duration, Mittelwerte + SEM) im Social Discrimination Procedure bei Interexpositionszeiten von 15min (3a) und 30min (3b). \*\*p < 0.01 im Vergleich zur Explorationsdauer des neuen Jungtieres (NOVEL).

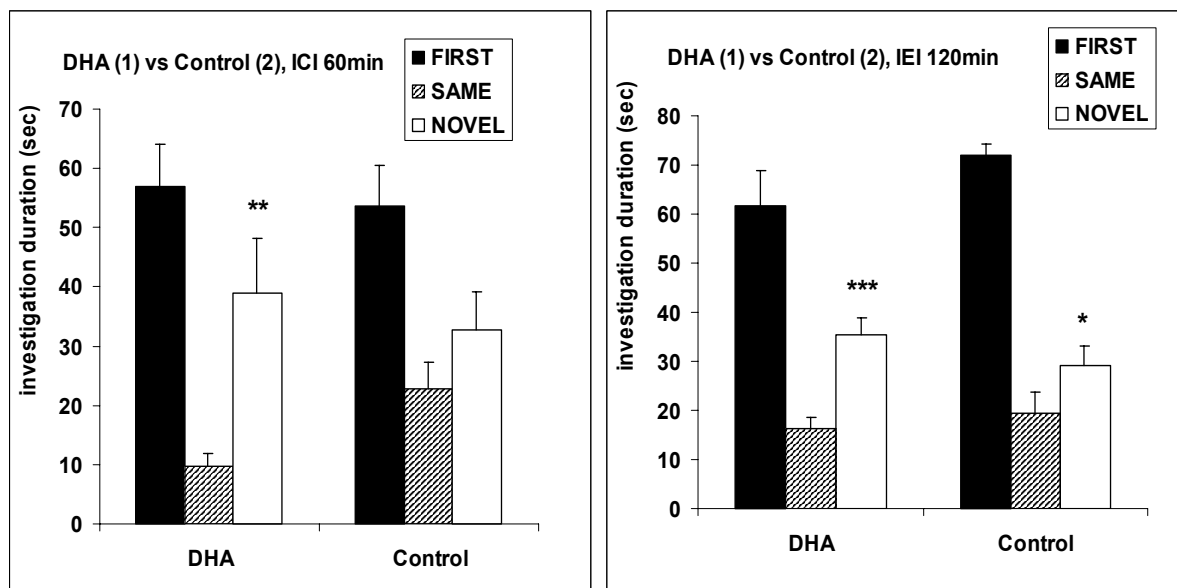


Abbildung 4a und 4b: Explorationsdauer (investigation duration, Mittelwerte + SEM) im Social Discrimination Procedure bei Interexpositionszeiten von 60min (4a) und 120min (4b). \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  im Vergleich zur Explorationsdauer des neuen Jungtieres (NOVEL).

Die Ergebnisse zeigen, dass sich alle Versuchstiere (behandelte und unbehandelte) kurzzeitig – nach einer Interexpositionszeit von 15 Minuten – gleich gut an die Jungtiere erinnern können. Bei Interexpositionszeiten von 30, 60 und 120 Minuten traten jedoch deutlich und signifikant bessere Gedächtnisleistungen bei den DHA-supplementierten Tieren auf.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass mit den zwei gewählten Kognitionstest (Hole-Board und Skinnerboxen) die DHA-Wirkung nicht nachgewiesen werden konnte. Bei den beiden Gedächtnistests (Water-Maze und Social Discrimination Procedure) kam die DHA-Wirkung dagegen klar heraus.

### **Verhaltensstudien nach Modifikation der Haltungsbedingungen: Social Deprivation versus Environmental Enrichment**

In einem zweiten Ansatz wurde ein weiterer Versuch unternommen, Behandlungsunterschiede mit Hilfe der Skinner-Boxen und einer der beiden positiven Testmethoden darzustellen. Da bekannt ist, dass die Haltungsform bei heranwachsenden Jungtieren starke Auswirkungen auf ihr späteres Verhalten hat, wurden für 2 Gruppen (jeweils 12 Tiere) stark unterschiedliche Haltungsformen vorgegeben.

Bei der „Deprived“ -Gruppe wurden die Tiere einzeln in einem üblichen Versuchskäfig gehalten, der nur mit Einstreu, Futter und Wasser ausgestattet war. Zusätzlich wurden die Käfige so aufgestellt, dass die Tiere keinen Sicht- und Geruchskontakt untereinander hatten. Die „Enriched“ -Gruppe wurde gemeinsam in einem großen Käfig gehalten. Darüber hinaus war der Innenraum des Käfigs mit zahlreichen strukturellen und funktionellen Einrichtungen angereichert: Abgedunkelte Box zum Schlafen bzw.

Ruhe- oder Fluchtmöglichkeit der Ratten, Hängematte und Holzstäbe zum Klettern, Holzstückchen zum Nagen, mehrere Ebenen im Großkäfig zum Klettern, Röhren zum Verstecken bzw. Durchlaufen. Diese verschiedenen Haltungsformen wurden ab der 5. Lebenswoche kontinuierlich aufrecht erhalten.

Ab dem Alter von 10 Wochen wurde mit jeweils 10 Tieren pro Haltungsgruppe mit den Skinner-Tests begonnen: Training, Training, DRH 4/2, DRH 8/4, DRL 1/8, DRL 1/8, DRL 1/16, DRL 1/16, DRL 1/16, DRL 1/16, DRL 1/16, DRL 1/16, DRL 1/16.

Die Ergebnisse der 7 DRL 1/16 Tests sind in der folgenden Abbildung dargestellt

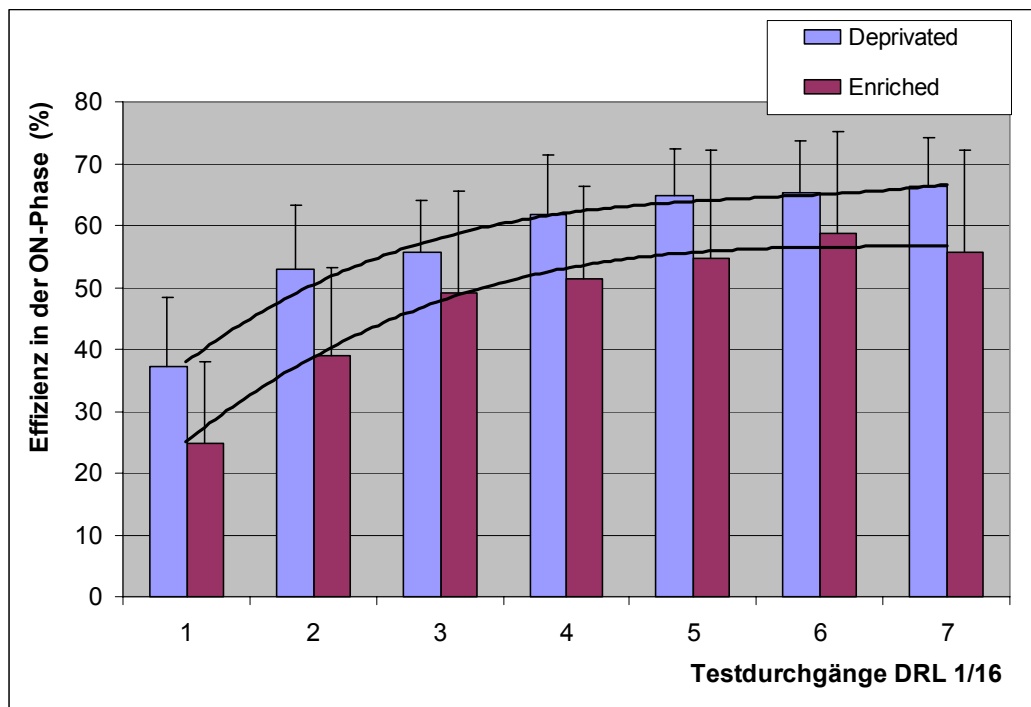


Abbildung 5: Effizienz (%) in der ON-Phase in 7 aufeinanderfolgenden Testnächten mit jeweils DRL 1/16. Es sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils 10 Tieren pro Testgruppe dargestellt.

Es traten systematische und reproduzierbare Unterschiede zwischen den beiden Haltungsgruppen auf, die jedoch bei dieser Art der Darstellung nicht signifikant waren. Nach Transformation der Daten - Berechnung der Abweichung des einzelnen Tieres vom Mittelwert des jeweiligen Testtages - konnten die Daten aller 7 Testdurchgänge zusammengefasst werden. Diese zusammengefassten Effizienzen der beiden Haltungsgruppen unterschieden sich signifikant. Die einzeln gehaltenen Tiere waren in der Lage, die Einzelanforderungen während der Skinner-Sitzungen effizienter zu erledigen.

Die Auswirkungen der unterschiedlichen Haltungsformen auf das Lernverhalten von heranwachsenden Ratten konnten somit im operanten Verhaltenstest mit Hilfe der Skinner-Boxen dargestellt werden. Das von uns angestrebte Ziel einer positiven Methodenkontrolle war damit erreicht.

Eine Bestätigung erfuhr dieses positive Testergebnis für die einzeln gehaltenen Tiere durch ein zweites Testverfahren, das Social Discrimination Procedure (s. Abb. 6).

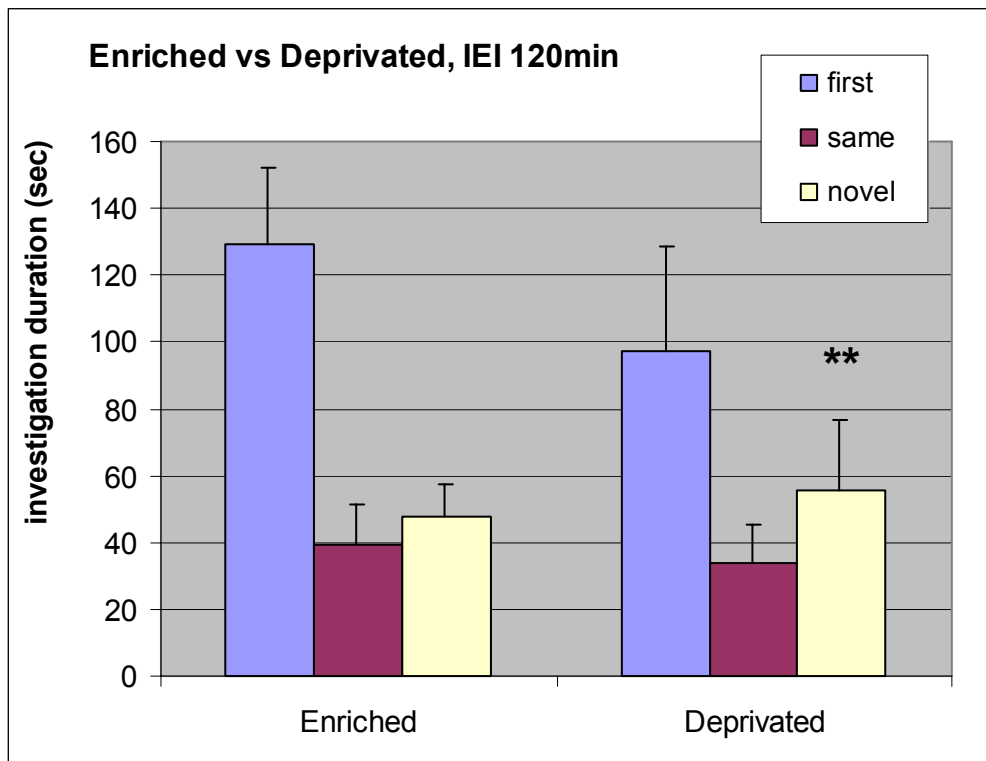


Abbildung 6: Explorationsdauer (investigation duration, Mittelwerte + Standardabweichung) im Social Discrimination Procedure nach einer Interexpositionszeit von 120min.

\*\*p < 0.01 im Vergleich zur Explorationsdauer des neuen Jungtieres (NOVEL).

Bei einer Interexpositionszeit von 120 Minuten haben sich die einzeln gehaltenen Tiere beim zweiten Beobachtungszeitrahmen von 4 Minuten dem neuen Jungtier (NOVEL) signifikant länger zugewendet als dem schon bekannten Jungtier (SAME). Sie konnten sich folglich besser erinnern.

### Literaturauswahl

Catalan, J., Moriguchi, T., Slotnik, B., Murthy, M., Greiner, R. S. and N. Salem Jr., Cognitive deficits in docosahexaenoic acid-deficient rats. *Behav. Neurosci.*, 116(6): 1022-31, 2002

Engelmann, M., Wotjak, C.T. and R. Landgraf, Social Discrimination Procedure: An Alternative Method to Investigate Juvenile Recognition Abilities in Rats. *Physiol. Behav.* 58(2), 315-321, 1995

Gamoh, S., Hashimoto, M., Hossain, S. and S. Masumura, Chronic administration of docosahexaenoic acid improves the performance of radial arm maze task in aged rats. *Clin. Exp. Pharm. Physiol.*, 28: 266-70, 2001

Ikemoto, A., Kobayashi, T., Watanabe, S. and H. Okuyama, Membrane fatty acid modifications of PC12 cells by arachidonate of docosahexaenoate effect neurite outgrowth but not norepinephrine release. *Neurochem. Res.* 22: 671-8, 1997

Lucas. A., Morly, R., Cole, T.J., Lister, G. and C. Leeson-Payne, Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. *Lancet* 339: 261-4, 1992

Lim, S.-Y. and H. Suzuki, Intake of dietary docosahexaenoic acid ethyl ester and egg phosphatidylcholine improve maze-learning ability in young and old mice. *J. Nutr.* 130: 1629-32, 2000

Lim, S.-Y. and H. Suzuki, Dose-response effect of docosahexaenoic acid ethyl ester on maze behavior and brain fatty acid composition in adult mice. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 72(2) : 77-84, 2002

Ohl, F., Oitzl, M.S and E. Fuchs, Assessing cognitive functions in the tree shrews: visuo-spatial and spatial learning in the home cage. *J. Neurosci. Methods* 81, 35-40, 1998

Stordy, B. J., Benefit of docosahexaenoic acid supplements to dark adaptation in dyslexics [letter; comment] *Lancet*, 346: 385, 1995

Sugimoto, Y., Taga, C., Nishiga, M., Fujiwara, M., Konishi, F., Tanaka, K. and C. Kamei, Effect of docosahexaenoic acid-fortified chlorella vulgaris strain CK22 on the radial maze performance in aged mice. *Biol. Pharm. Bull.* 25(8): 1090-2, 2002

Takeuchi, T., Fukumoto, Y. and E. Harada, Influence of a dietary n-3 fatty acid deficiency on the cerebral catecholamine contents, EEG and learning ability in rat. *Behav. Brain Res.* 131: 193-203, 2002

Hibbeln, J.R. and N. Salem, Jr., Dietary polyunsaturated fatty acids and depression: when cholesterol does not satisfy. *Am. J. Clin. Nutr.*, 62: 1-9, 1995

Virkkunen, M. E., Horrobin, D. F., Jenkins, D. K. and M. S. Manku, Plasma phospholipids essential fatty acids and prostaglandins in alcoholic, habitually violent and impulsive offenders. *Biol. Psychiatry*, 22 : 1087-96, 1987

### **Methodische Vorarbeiten zu Messungen an der Blut-Hirn-Schranke**

An dem bisher beschriebenen und bereits vorliegenden tierexperimentellen und methodischen Konzept gab es keine Änderungen. Mit den Vorversuchen zum Aufbau der Tierexperimente zur Labilisierung der Blut-Hirn-Schranke wurde nach der geplanten Vorgehensweise begonnen. Dazu wurde die notwendige Messtechnik aus Mitteln des Institutes für Tierphysiologie aufgebaut und standardisiert. Erste Tierversuche wurden bereits durchgeführt. Methodische Fortschritte im Zusammenhang mit der Erstellung eines zusätzlichen stabilen Challenge (Bluthochdruck) zur Labi

lisierung der Blut-Hirn-Schranke wurden erzielt. Über Ergebnisse kann allerdings noch nichts berichtet werden, da dafür noch zu wenig Daten erhoben sind.

### **Methodische Vorarbeiten zur Darstellung der CA1-Neuronen**

Die Hirne der Tiere aus den Vorversuchen wurden in Formalin fixiert und werden derzeit für den Aufbau der Methode zur histologischen Darstellung der CA1-Neuronen vorbereitet. Die dafür benötigten technischen Einrichtungen – zur Entwässerung des Gewebes, Einbettung der Präparate, Anfertigung histologischer Schnitte, Anfärbung der Gewebeschnitte und Darstellung sowie Auszählung der CA1-Neuronen – sind ebenfalls bereits aufgebaut.

Der Tierversuchsantrag wurde – wie bereits berichtet - ausgearbeitet, eingereicht und genehmigt. Die Beiträge von Frau Dr. Wöhr und Frau Dr. Engmann sind dabei eingeflossen.

### **b) Tierhygiene**

#### **Untersuchungen zum potentiellen Einfluss elektromagnetischer Strahlung auf das Stress- und Immungeschehen bei der Ratte**

In der ersten Jahreshälfte 2004 wurden umfangreiche Literaturrecherchen durchgeführt, um 1. die erforderliche Tierzahl für die unterschiedlichen elektromagnetischen Felder bestimmen zu können, und 2. bekannte Einflussfaktoren auf die zu untersuchenden Hauptzielgrößen (Plasmacorticoosteron und IgG-Titer) in der Versuchsplanung zu berücksichtigen.

Diese Recherchen zeigten u.a., dass zu keiner der beiden Hauptzielgrößen, insbesondere hinsichtlich einer Langzeitexposition ausreichend Datenmaterial vorhanden ist, um potentielle gesundheitliche Gefahren beurteilen zu können. Weitere Recherchen erfolgten hinsichtlich der zur Corticosteronbestimmung anzuwendenden Untersuchungsmethode sowie der Versuchsplanung des ACTH-Tests. Dabei zeigte sich, dass zur Durchführung der ACTH-Belastungstests Vorversuche unumgänglich sind.

Des Weiteren ergab sich aus dem im Juli beim Statistischen-Beratungs-Labor der LMU in Auftrag gegebenen statistischen Gutachtens, dass anhand der bisherigen Veröffentlichungen hinsichtlich des im ACTH-Test zu erwartenden Anstiegs der Plasmacorticoosteronkonzentration von Ratten die erforderliche Tierzahl deutlich höher gewählt werden muss, um potentielle Unterschiede zwischen exponierten und nicht exponierten Tieren auf die Hochfrequenzstrahlung (UMTS, GSM) zurückführen zu können.

Da die geplanten Tierversuche nach § 8 Abs. 1 des Deutschen Tierschutzgesetzes genehmigungspflichtig sind, wurden im Rahmen des `Antrages auf Genehmigung eines Tierversuches` die Versuchsplanungen und Literaturrecherchen sowie die ethische Begründung der Unerlässlichkeit dieses Tierversuches in den Antrag eingearbeitet. Dies musste besonders sorgfältig erfolgen und war sehr aufwendig, da sowohl die Regierung von Oberbayern als auch die Ethikkommission nach § 15 des Tierschutzgesetzes die geplanten Versuche genehmigen mussten.

Im 2. Halbjahr 2004 erfolgte bis zur Entscheidung über die Genehmigung des Gesamtversuchsvorhabens durch die Regierung von Oberbayern im Dezember 2004

die detaillierte Planung der Vorversuche. Da auch diese der Genehmigungspflicht unterlagen, konnten sie im vergangenen Jahr nicht mehr durchgeführt werden. Anhand der Vorversuche soll geklärt werden, ob und in wie weit die Corticosteron-Antwort der NNR durch den handlingbedingten Stress, sowie durch die zur frequenten Blutentnahme erforderliche Narkose beeinflusst wird. Aus Literaturrecherchen hatten sich die Inhalationsnarkotika Halothan und Isofluran als am besten geeignete Narkosemittel hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Zielgröße Plasma-Corticosteron erwiesen. Erst nach diesen Vorversuchen lässt sich der endgültige methodische Aufbau des Hauptversuchs festlegen.

In Bezug auf den Arbeitsschutz der an der Narkotisierung der Tiere beteiligten Personen war die Anschaffung eines geschlossenen Narkosesystems notwendig. Dieses wurde noch im Dezember mit Vorliegen der Genehmigung bestellt, die Einweisung in Betrieb und Handhabung der Geräte erfolgte im Februar 2005.

Des Weiteren wird seit Herbst im institutseigenen Labor daran gearbeitet, eine immunologische Nachweismethode zur Corticosteron-Bestimmung zu entwickeln (ELISA, **Enzyme Linked Immuno-Sorbent Assay**). Parallel zur immunologischen, wird auch an der Etablierung einer physikalisch-chemischen Nachweismethode (HPLC, **High-Performance Liquid Chromatography**) gearbeitet.

Im Januar 2005 wurden beim Versuchstierzüchter Janvier (Le Genest St Isle, Frankreich) insgesamt 57 Ratten für die Durchführung der Vorversuche bestellt. Bei den Tieren handelt es sich entsprechend des Versuchsaufbaus (‚Handlingbedingter Stress‘, ‚Isofluran‘ und ‚Halothan‘) jeweils um 3 weibliche Wurfgeschwister aus 19 Würfen, somit sind die Versuchsgruppen genetisch ausgeglichen. Seit dem 23. Februar 2005 wird täglich ein Handlingprogramm durchgeführt, um die Tiere mit den Versuchsbedingungen vertraut zu machen. Die Versuchsdurchführung erfolgt zwischen 25. April und 7. Mai 2005, anschließend werden die Proben analysiert.

## **c) HF-Technik**

### **Chronological Activities:**

#### **Search for alternatives for the originally planned T-Nova exposure chambers**

The exposure of the animals was originally planned with 9 “T-Nova” exposure chambers, which should be rented from the company “Deutsche Telekom”. At the beginning of the year 2004, the unavailability of those chambers arose. An alternative concept had to be found. Several exposure concepts found in the literature were analysed with respect to their suitability, cost and time-to-acquisition. Due to the particular conditions of the experiment (long term and continuous exposure, high number of animals, minimum size of the cages, etc) none of the found setups was completely satisfactory. A new exposure concept based on the use of parabolic reflectors to convert a spherical wavefront into a plane one was identified as best compromise for our purposes. A detailed description of the setup is given as addendum.

#### **Development of a new exposure concept**

The development of the new exposure setup was supported by simulation tools. Extensive simulations of the electromagnetic field in the setup were carried out with the software package *FEKO* to select key parameters of the setup, like the size of the reflector, the defocusing distance, the optimum distance between reflector and cage zone, etc. Passive key components of the setup like the primary feed have also been



simulated to support their design. Close to reality models have been used to obtain meaningful results. Target of the optimisation process was, of course, a minimum deviation from a pure homogeneous plane wave. At each step of the process additional constraints were taken into account: the long-term and continuous exposure characteristic, the minimum required number of exposed animals per chamber, the possibility to provide an air-conditioned exposure volume, etc.

### **Planning of the necessary RF equipment**

To ensure a defined field and to avoid any possible interference of the exposure field with other services or equipment in the environment, the exposure setup is placed into an electromagnetic shielded anechoic chamber. Different possibilities were analysed and the chambers offered by the company *EMC* were found to be the best option. With the new exposure concept, a Radio Frequency (RF) equipment different from the originally planned one was required. RF amplifiers with the necessary output power to expose a higher number of animals were identified and acquired together with the RF generators for standard GSM and UMTS signals and passive elements such as couplers and cables.

The construction of the three air-conditioned exposure chambers with external dimensions of about  $4 \times 4 \times 4 \text{m}^3$  required a detailed planning of the resources like required electrical power, man power for the construction, coordination of the different activities: construction of the chambers, construction of the shelves, construction of the parabolic reflectors, installation of the air-conditioning equipment, etc.

### **Estimation of the SAR in the animals**

The most used parameter to quantify the exposure in living creatures is the Specific Absorption Rate (SAR). Simulations were carried out to estimate the SAR in the animals. To obtain accurate estimations, high resolved models of the animals were used. High resolved voxel models were available for Wistar rats. In a voxel model the animal is divided into cuboids (voxels) of approx.  $1 \text{mm}^3$  (depending on the specific data set) with a tissue code assigned to each voxel (fat, skin, blood,...). These models can be imported into electromagnetic simulation software tools. The selected software package for these types of simulation was *Microwave Studio* due to the availability of suitable models. Some adaptations of the available voxel models still had to be done in order to import the data sets in the program.

### **Description of the exposure concept**

As in any other biological investigation, controlled, well defined, standard and repeatable conditions are of capital importance in RF exposure experiments. 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 frequencies as well.

The setup is intended for a long-term, continuous and controlled exposure of living rats. Three chambers are built: 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 different experiments. Other requirements are imposed by the *in vivo* characteristic 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.

To achieve the plane wave condition in a radiated field a long distance from the antenna to the observation point is usually required. That allows to approximately consider the spherical wavefront radiated from the source as a plane or quasi plane wave, i.e. a wave with small deviations from the pure plane wave. This approach requires an extended exposure facility, which is also very energy inefficient, as the signal power density decreases with the square of the distance. Other energy efficient approaches found in the literature are not suitable for long-term continuous exposure (e.g. Schönborn et al., 2004) or are based on the propagation of guided transversal electromagnetic waves and may run into problems when frequency increases (e.g. Hansen et al., 1999; Balzano et al., 2000).

The setup presented here is in analogy to the "compact range" concept, which is used in antenna measurement facilities to obtain a plane wave at relative short ranges. The idea behind is to use a parabolic reflector to convert a spherical wavefront emanating from the focus into a plane wave. The less strict error requirements for exposition in comparison to antenna measurements, allows us to use a common reflector instead of a high-precision one. The selected reflector has a diameter of 320cm and a focal distance of 112cm and is a mass-product, which reduces its cost drastically. Assuming a prime focus paraboloid illuminated from the focal point by an ideal source, i.e. a point source radiating only towards the reflector and illuminating it uniformly, the reflected wave would be plane and with a rather constant electric field at the focal plane. The main problems of this focussed approach are those created by the non-ideal feed. The near fields of the primary source are not negligible at the focal plane and to achieve a uniform illumination of the reflector's surface is rather difficult. In this approach, these problems are overcome by moving the exposure zone away from the focal plane and by axially defocusing the feed. If the exposure zone is moved away from the primary feed, the influence of its backradiated/near field becomes negligible as it decreases with the square of the distance. By axially defocusing the feed, moving it towards the reflector, the reflected wave will not be plane but will show spherical phase-fronts with a large curvature (see Fig.1). This resulting wave can be considered as quasi plane in the zone of interest. In addition, the solid angle which must be uniformly illuminated by the feed decreases by this approach, resulting in a simplification of its design. This benefits also the minimization of the diffraction effects caused by the reflector rims, which are illuminated with low intensity.



Figure 1: Reflected wave on a parabolic reflector

As feed an open waveguide operating in the fundamental mode  $TE_{10}$  has been chosen because of its simplicity and wide beam characteristic.

Figure 2 shows the final exposure setup which is placed in a metallicly shielded chamber. The drawing shows the paraboloid, the defocused feed, the cages for the animals and the absorber material on the walls, placed to avoid uncontrolled reflection of the waves propagating in the chamber. The animals are inside polysufan cages with size (HxWxL) 24x28.5x42.5cm<sup>3</sup>. The cages are placed on wood slats with the cage frontal looking towards the reflector and with an horizontal spacing of 30cm. The distance between the slats is 34cm.

Simulation results for the field distribution (without cages and animals) show that a total of 40 cages can be homogeneously exposed. The maximum phase error is  $\pm 12^\circ$  in the volume of a cage and the standard deviation of the absolute value of the electric field is approximately 11%. The power efficiency is approximately 34%.

The advantages of this setup suitable for a large number of animals are its good power efficiency and its relatively small size and low cost.

Measurements results for the field in the finished setup will be carried out after completion in the future.

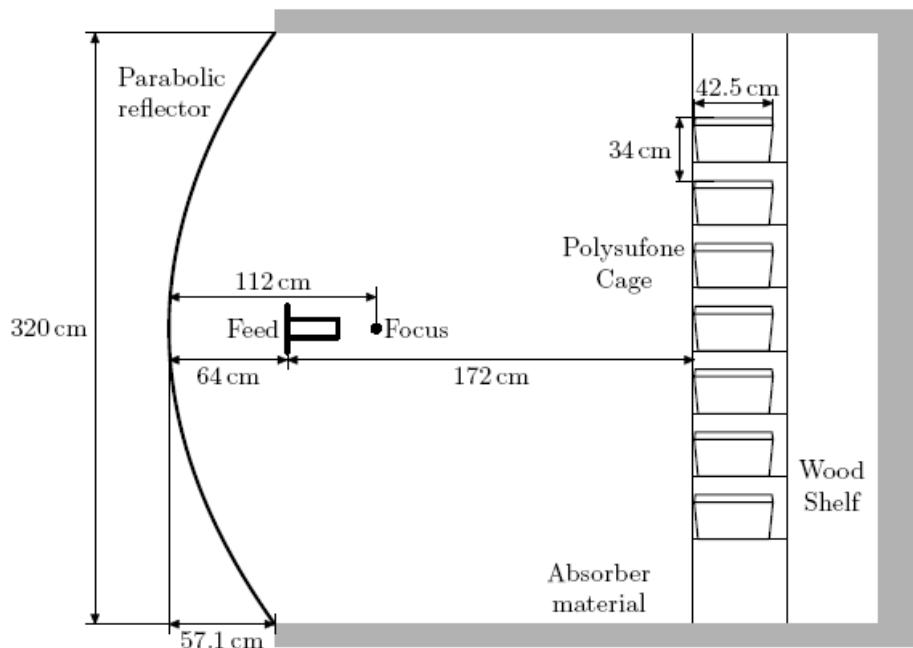


Figure 2: Side view of the exposure setup

## References

Balzano, Q., Chou, C.-K., Cicchetti, R., Faraone, A., and Tay, R.Y.-S.: An Efficient RF Exposure System with Precise Whole-Body Average SAR Determination for in vivo Animal Studies at 900MHz, IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques, 48, 2040-2049, 2000.

Hansen, V. W., Bitz, A. K., and Streckert, J. R.: RF Exposure of Biological Systems in RadialWaveguides, IEEE Transactions on Electromagnetic Compatibility, 41, 487-493, 1999.

Kuster, N. and Schönborn, F.: Recommended Minimal Requirements and Development Guidelines for Exposure Setups of Bio-Experiments Addressing the Health Risk Concern of Wireless Communications, *Bioelectromagnetics*, 21, 508-514, 2000.

Schönborn, F., Pokovic, K., and Kuster, N.: Dosimetric Analysis of the Carousel Setup for the Exposure of Rats at 1.62GHz, *Bioelectromagnetics*, 25, 16-26, 2004.

#### **d) Koordination**

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

- Programmreport 2003,
- Zwischenbericht 2003 und
- Vorläufiger Literaturbericht über Kognition

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

- Mittelanforderung und Verteilung über die Finanzverwaltung der TUM.
- Ausgabenkontrolle/Kassenprüfung.
- Verwendungsnachweis 2003 für BfS.
- Anpassung der Finanzierungspläne.

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 Ablaufpläne zur Projektabwicklung im Zusammenwirken aller beteiligten Institutionen, Verhandlungen mit dem Bauamt der LMU zur Übernahme notwendiger technischer und baulicher Infrastrukturmaßnahmen usw. Anzumerken ist an dieser Stelle, dass diese Infrastrukturmaßnahmen einen Kostenrahmen von mehr als 30.000 € erreicht haben.

#### **Veröffentlichungen und Präsentationen**

Im Berichtjahr 2004 wurden über das Thema des Forschungsvorhabens keine Publikationen eingereicht, jedoch im Rahmen von drei wissenschaftlichen Veranstaltungen, Poster über nachfolgend genannte Themen präsentiert:

- **STUDY OF EVENTUAL CONSEQUENCES OF CONTINUOUS EXPOSURE TO GSM AND UMTS ELECTROMAGNETIC FIELDS IN THREE GENERATIONS OF RATS**  
S. Okorn, M. Bornhausen, M. Stangassinger, M. Erhard, M. Stohrer, J. Detlefsen, S. Schelkshorn, J. Eberle, O. Petrowicz  
Internationaler ICNIRP/WHO NIR Workshop, 20.-22. Mai 2004, Sevilla, Spanien
- **ARE THERE ANY HEALTH CONSEQUENCES OF CHRONIC EXPOSURE TO GSM- OR UMTS-FIELDS?**  
M. Bornhausen, S. Okorn, M. Stangassinger, M. Stohrer, M. Erhard, C. Wöhr, J. Detlefsen, S. Schelkshorn, S. Tejero, J. Eberle, O. Petrowicz  
BIOELECTROMAGNETICS – 26. Jahrestagung, 20. – 24. Juni 2004, Washington DC.
- **CONCEPT FOR THE CONTROLLED PLANE WAVE EXPOSURE FOR LONG-TERM  
IN VIVO EXPERIMENTS USING A PARABOLIC REFLECTOR**

### **Änderungen der Vorhabensziele und Zeitabläufe**

Änderungen in den zentralen Zielsetzungen wurden nicht vorgenommen. Im Vordergrund steht jedoch die Änderung des Expositionskonzepts, das im Berichtteil ausführlich dargelegt wurde und dem BfS als umfangreicher Briefwechsel vorliegt.

### **Neue, für die Durchführung des Vorhabens relevante Erkenntnisse aus der Literatur**

In der provisorischen Literaturstudie zu dem Thema Kognition, Verhalten, Lernfähigkeit und Effekte von EM-RF-Felder auf neurologische Parameter, die dem BfS im Juli 2004 zugeleitet wurde, waren einschlägige Arbeiten bis etwa Mitte 2004 enthalten. Eine neuerliche Durchsicht der Literatur (PubMed, WHO) ergab eine Reihe, ab dem Zeitpunkt Mitte 2004 bis etwa Febr. 2005, erschienener Arbeiten. Zusammengefasst ergibt sich ein ähnliches Bild von Arbeiten, die Effekte dokumentieren und andere, die keine Wirkungen bei Mensch und Tier finden.

Die Arbeitsgruppe um R. Maier et al.<sup>1</sup> (2004) von der Klinik für Kommunikationsstörungen der Universität Mainz beschreibt in eine Pilotstudie Effekte über gepulste niederenergetischer EM-Felder auf die Gedächtnisfunktionen beim Menschen. Präsentiert wurden Kognitionstests an Freiwilligen mit dem so genannten „Auditory Discrimination Test“. Aus den Ergebnissen schlossen die Untersucher, dass die kognitive Leistung durch eine EMF-Exposition beeinträchtigt war und leiteten daraus Empfehlungen ab, die Anwendung von Mobiltelefonen zu beschränken, insbesondere bei Risikogruppen wie Kinder, ältere und kranke Personen. Wie wird die Arbeit bewertet? Kann die Einschätzung der Autoren geteilt werden?

Ein ursprünglich positiver Befund der Arbeitsgruppe um C. Harala et al.<sup>2</sup> über die Wirkung von Mobiltelefonen auf das Kurzzeitgedächtnis bei Menschen konnten in einem eigenen Replikationsversuch nicht nachvollzogen werden<sup>3</sup>. Die Ergebnisse zeigten keinen Effekt der EM-Felder (902 MHz GSM) auf das Kurzzeitgedächtnis und die Reaktionszeit.

Diesen Humanuntersuchungen stehen in vivo Experimente von Lai H. (2004)<sup>4</sup> an Ratten gegenüber. Die Basis der Lernfähigkeitstests war eine Water-Maze-Einrichtung. Es wurden 4 Versuchssituationen beschrieben:

- Mikrowellen (MW) 2,45 GHz CW, 2 mW/cm<sup>2</sup>, 1,2 W/kg,
- Geräuschexposition (Magnetfeld), 60 mG,

---

<sup>1</sup> Maier R, Greter SE, Maier N. (Jul 2004) Effect of pulsed electromagnetic fields on cognitive processes – a pilot study on pulsed field interference with cognitive regeneration. *Acta Neurol Scand.* 110 (1): 46 – 52.

Maier R, Greter SE, Schaller G, Hommel G. (2004). The Effect of pulsed low-level EM-Fields on memory processes. *Z Med Phys.* 14(2):105- 112.

<sup>2</sup> Haarala, C., Bjornberg, L., Ek, M., Laine, M., Revonsuo, A., Koivisto, M., & Hamalainen, H. 2003. Effect of a 902 MHz electromagnetic field emitted by mobile phones on human cognitive function: A replication study. *Bioelectromagnetics*, 24(4): 283-288.

<sup>3</sup> Haarala C, Ek M, Bjornberg L, Laine M, Revonsuo A, Koivisto M, Hamalainen H (2003). 902 MHz mobile phone does not affect short term memory in humans.

<sup>4</sup> Lai H. (2004). Interaction of microwaves and a temporally incoherent magnetic field on spatial learning in the rat. *Physiol Beav.* 15;82(5):785-789.

- Mikrowellen + Geräusche und
- Sham.

Die Ergebnisse waren widersprüchlich. Die MW-Exposition alleine ergab gegenüber Sham signifikante Lerndefizite, die Plattform im Water-Maze aufzufinden. Geräusche alleine hatten augenscheinlich keinen Einfluss. Beides, MW und Geräusch zeigte ein signifikant besseres Lernverhalten als MW alleine, vergleichbar Sham. Die Untersucher haben dies dahingehend interpretiert, dass das Magnetfeld MW-induzierte Lern- und Gedächtnisdefizite blockiert.

Cassel JC et al. (Nov. 2004)<sup>5</sup> geht auf eine frühere<sup>6</sup> und die gerade vorgestellte Arbeit von Lai H. (2004)<sup>4</sup> ein und stellen heraus, dass diese Versuche bisher keine Replikation erfahren haben. Eigene Untersuchungen mit Mikrowellen exponierten Ratten (2,45 GHz, 2 micros pulse width, 500 pps und SAR 0,6 W/kg über 40 Minuten) zeigten gegenüber der Sham-Gruppe keine Unterschiede.

Ebenfalls negative Befunde erbrachte die Arbeit der französischen Arbeitsgruppe um Besset A et al. (Feb. 2005)<sup>7</sup>. In einem aufwändigen Doppel-Blind-Vergleich (GSM 900 Mobiltelefon an- vs. ausgeschaltet), der über 45 Tage dauerte und 55 Probanden umfasste wurden nach Geschlecht, Alter und IQ in Paare (matched pairs) eingeteilt und neurologischen Tests unterzogen. Es gab keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Exposition, Kontrolle).

Als weitere aktuelle Arbeit<sup>8</sup> ist eine in vivo Untersuchung von Cosquer B et al. (Jan 2005) an Ratten zu nennen. In einem Plus-Maze-Testapparat wurden Angstreaktionen von Ratten auf unterschiedliche Lichtintensitäten getestet (200, 30, 10 und 2,5 lux) ebenso wie auf eine Diazepam Behandlung (0.5 und 1 mg/kg i.p. bei 30 lux). Es zeigte sich dass Angstreaktionen mit zunehmender Lichtintensität anstiegen, durch die Diazepam-Gabe aber abgeschwächt werden konnten. Eine separate Gruppe wurde mit Mikrowellen exponiert (2,45 GHz, 2 micros pulse width, 500 pps, Ganzkörper-SAR 0,6 W/kg, Kopf durchschnittlich 0,9 W/kg über 45 Minuten). Diese Gruppe wurde zweigeteilt und eine davon mit 2,5 lux und die andere mit 30 lux Licht ausgesetzt und nur Licht-, Sham-exponierten und normal gehaltenen Labortieren gegenübergestellt. Es zeigte sich kein Einfluss auf die Entwicklung von Angstreaktionen durch EM-Felder in der Testeinrichtung.

Die hier vorgestellten aktuellen Publikationen über Kognition, Beeinflussung der Gedächtnisleistung und des Verhaltens sind als Fortschreibung des bereits im vorläufigen Literaturbericht diskutierten Wissenstands zu sehen. Die vorgestellten Untersuchungen berühren jedoch nur, was in vivo Experimente und beschriebene Testverfahren betrifft das Forschungsvorhaben, die Zielsetzung wird nicht beeinflusst.

---

<sup>5</sup> Cassel JC et al. (Nov. 2004). Whole-body exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields does not alter radial-maze performance in rats. *Behav Brain Res.* 5;155(1):37-43.

<sup>6</sup> Lai H et al. (1994). *Bioelectromagnetics.* 15: 95-104.

<sup>7</sup> Besset A, Espa F, Dauvilliers Y, Billard M, de Seze R. (Febr. 2005). No effect on cognitive function from daily mobile phone use. *Bioelectromagnetics.* 26(2):102-108.

<sup>8</sup> Cosquer B, Galani R, Kuster N, Cassel JC. (Jan 2005). Whole-body exposure to 2.45 GHz electromagnetic fields does not alter anxiety responses in rats: a plus-maze study including test validation. *Behav Brain Res.* 6;156(1):65-74.