

Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

**Einfluss niederfrequenter elektromagnetischer Felder auf das
sich entwickelnde blutbildende System, das Immunsystem und
das ZNS in vivo - Vorhaben 3608S30006**

Band 1: Hauptbericht

Auftragnehmer:

**Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der angewandten Forschung e.V.
Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM), München**

**G. Lewin
T. Tillmann
H. Ernst
A. Kolling
T. Hansen
M. Müller
A. Bahr
R. Kellner**

Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) und im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz (BfS) durchgeführt.

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMU (UFOPLAN) in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BfS übereinstimmen.

BfS-RESFOR-81/13-Bd.1

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:
urn:nbn:de:0221-2013081310990

Salzgitter, August 2013

Abschlussbericht zum Vorhaben: StSch 30006

Einfluss niederfrequenter elektromagnetischer Felder auf das sich entwickelnde blutbildende System, das Immunsystem und das ZNS in vivo

Fraunhofer ITEM Prüf-Nr.: 12N10503, 12N10504, 12N10505

Original 1 von 2

Prüfeinrichtung:

Fraunhofer-Institut für Toxikologie
und Experimentelle Medizin
Nikolai-Fuchs-Str. 1
30625 Hannover
Tel: 0511 5350-0
Fax: 0511 5350-155

in Kooperation mit:

IMST GmbH
Carl-Friedrich-Gauß-Str. 2
D-47475 Kamp-Lintfort, Germany

Auftraggeber:

Bundesamt für Strahlenschutz
AG-F 3
Willy-Brandt-Str. 5
38226 Salzgitter

Studienbetreuung::

Dr. Monika Asmuß
Bundesamt für Strahlenschutz, FB Strahlenschutz und Gesundheit
Ingolstädter Landstraße 1
85764 Oberschleißheim
Mail: masmuss@bfs.de
Tel.: 03018/333 2147

Datum: 28. Januar 2013

Prüfungsnummern: 12N10503, 12N10504, 12N10505

Projektnummer BfS: StSch 30006

Tierversuchsnummer: 09/1761

Inhaltsverzeichnis

1	Erklärungen	5
1.1	Erklärung der Prüfleiterin	5
1.2	Erklärung der wissenschaftlichen Mitarbeiter	6
2	Einleitung	7
2.1	Prüfplanübersicht	7
2.2	Zweck der Prüfung	8
2.3	Richtlinien für die Durchführung der Prüfung	8
2.4	Personal	9
3	Prüfgegenstand	9
3.1	Aufbau der Anlage	9
3.2	Schutzmaßnahmen und Handhabung der Expositionsanlagen	12
4	Prüfsystem	13
4.1	Auswahl des Tiermodells	13
4.2	Tiere	13
4.3	Tierzahlen	13
4.4	Identifikation	14
4.5	Tierhaltung	15
4.6	Futter und Trinkwasser	15
4.7	Klima	16
4.8	Akklimatisierung	16
5	Durchführung der Prüfung	16
5.1	Randomisierung	16
5.2	Gruppeneinteilung	16
5.3	Expositionsbedingungen	17
5.3.1	Kontrolle der Expositionsdaten	17
5.3.2	Auswahl der Feldstärke	17
5.3.3	Entblindung des Versuchsaufbaus	18
5.4	Prüfungsdauer	18
5.5	Biologische Endpunkte	18
5.5.1	Untersuchungen im Vorversuch	18
5.5.2	Untersuchungen der Muttertiere	19
5.5.2.1	Interkurrente Beobachtungen	19
5.5.2.1.1	Verpaarung	19
5.5.2.1.2	Klinische Befunde	19
5.5.2.1.3	Körpergewicht	19
5.5.2.2	Post Mortem Untersuchungen	19
5.5.3	Untersuchungen an den Nachkommen	19
5.5.3.1	Interkurrente Beobachtungen	19
5.5.3.1.1	Lebensfähigkeit und klinische Befunde	19
5.5.3.1.2	Körpergewicht	20
5.5.3.2	Geschlechtsbestimmung, Identifizierung und Absetzen der Jungtiere	20
5.5.3.2.1	Geschlechtsbestimmung und Identifizierung	20
5.5.3.2.2	Wurfstandardisierung und Absetzen	20
5.5.3.3	Post Mortem Untersuchungen	20
5.5.3.4	Untersuchung der Reflexontogenese, körperlichen und sexuellen Reife	22
5.5.3.4.1	Ausbildung von Reflexen	22
5.5.3.4.2	Functional Observational Battery (FOB)	22
5.5.3.4.3	Erreichen der sexuellen Reife	22
5.5.3.5	Untersuchungen zur Reifung des Zentralnervensystems	22
5.5.3.5.1	Untersuchungen des Verhaltens anhand der lokomotorischen Aktivität	22
5.5.3.5.2	Untersuchungen von Signalverarbeitung und Lernfähigkeit	23
5.5.3.6	Untersuchungen des blutbildenden Systems	23
5.5.3.6.1	Differentialblutbild und Retikulozytenauswertung	23
5.5.3.6.2	Bestimmungen im kleinen Blutbild	23

5.5.3.7	Untersuchungen des Immunsystems	24
5.5.3.7.1	Durchflusszytometrische Messung des Immunstatus in Blut und Milz	24
5.5.3.7.2	Messung der Proliferation von Milzzellen	25
6	Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungen	27
7	Datenaufzeichnung	28
8	Statistische Methoden	28
9	Archivierung	28
10	Ergebnisse	29
10.1	Überwachung der Expositionsbedingungen	29
10.1.1	Magnetfeldstärke	30
10.1.2	Raumparameter	34
10.2	Biologische Endpunkte	36
10.2.1	Ergebnisse des Vorversuches	36
10.2.2	Ergebnisse des Teilversuches A bis zum Alter von 90 Tagen	38
10.2.2.1	Untersuchungen der Muttertiere	38
10.2.2.1.1	Mortalität und klinische Befunde	38
10.2.2.1.2	Körpergewicht	38
10.2.2.1.3	Reproduktionsdaten	39
10.2.2.1.4	Sektionsbefunde	40
10.2.2.2	Untersuchungen der Nachkommen	41
10.2.2.3	In-live Untersuchungen	41
10.2.2.3.1	Mortalität und klinische Befunde	41
10.2.2.3.1.1	Jungtiere bis zum Absetzen der Würfe vom Muttertier	41
10.2.2.3.1.2	Juvenile und adulte Tiere	41
10.2.2.3.2	Körpergewicht	41
10.2.2.3.2.1	Jungtiere bis zum Absetzen der Würfe vom Muttertier	41
10.2.2.3.2.2	Juvenile und adulte Tiere	42
10.2.2.4	Post-mortem Untersuchungen	43
10.2.2.4.1	Untersuchungen des blutbildenden Systems	43
10.2.2.4.1.1	Differentialblutbild und Retikulozytenauswertung	43
10.2.2.4.1.2	Bestimmungen im kleinen Blutbild	47
10.2.2.4.2	Untersuchungen des Immunsystems	47
10.2.2.4.2.1	Durchflusszytometrische Messung des Immunstatus in Blut und Milz	47
10.2.2.4.2.2	Messung der Proliferation von Milzzellen	50
10.2.2.4.3	Sektionsbefunde	50
10.2.3	Ergebnisse des Teilversuches B bis zum Alter von 18 Monaten	51
10.2.3.1	Untersuchungen der Muttertiere	51
10.2.3.1.1	Mortalität und klinische Befunde	51
10.2.3.1.2	Körpergewicht	51
10.2.3.1.3	Reproduktionsdaten	52
10.2.3.1.4	Sektionsbefunde	53
10.2.3.2	Untersuchungen der Nachkommen	54
10.2.3.2.1	In-live Untersuchungen	54
10.2.3.2.1.1	Mortalität und klinische Befunde	54
10.2.3.2.1.1.1	Jungtiere bis zum Absetzen der Würfe vom Muttertier	54
10.2.3.2.1.1.2	Juvenile und adulte Tiere	54
10.2.3.2.1.2	Körpergewicht	55
10.2.3.2.1.2.1	Jungtiere bis zum Absetzen der Würfe vom Muttertier	55
10.2.3.2.1.2.2	Juvenile und adulte Tiere	57
10.2.3.2.1.3	Reflexontogenese, körperliche und sexuelle Reife	57
10.2.3.2.1.3.1	Ausbildung von Reflexen	57
10.2.3.2.1.3.2	Functional Observational Battery (FOB)	59
10.2.3.2.1.3.3	Erreichen der sexuellen Reife	59
10.2.3.2.1.4	Reifung des Zentralnervensystems	60
10.2.3.2.1.4.1	Lokomotorische Aktivität	60
10.2.3.2.1.4.2	Signalverarbeitung und Lernfähigkeit	62
10.2.3.2.2	Post-mortem Untersuchungen	64
10.2.3.2.2.1	Untersuchungen des blutbildenden Systems	64
10.2.3.2.2.1.1	Differentialblutbild und Retikulozytenauswertung	64
10.2.3.2.2.1.2	Bestimmungen im kleinen Blutbild	66
10.2.3.2.2.2	Untersuchungen des Immunsystems	67
10.2.3.2.2.2.1	Durchflusszytometrische Messung des Immunstatus in Blut und Milz ...	67

10.2.3.2.2.2	Messung der Proliferation von Milzzellen.....	68
10.2.3.2.2.3	Sektionsbefunde.....	68
10.2.3.2.2.4	Histopathologie.....	70
10.2.3.2.2.4.1	Neoplasien.....	71
10.2.3.2.2.4.2	Nicht-neoplastische Veränderungen.....	73
10.2.3.2.2.4.3	Sonstige Befunde.....	74
11	Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	76
12	Summary and Conclusion.....	80
13	Literatur.....	84
14	Anhang.....	86
14.1	Abschlußbericht der IMST GmbH.....	87
14.2	Tabellen.....	102
14.2.1	Vorversuch.....	103
14.2.2	Teilstudie A.....	111
14.2.3	Teilstudie B.....	162
14.3	Annexes der individuellen Daten.....	405
14.3.1	Vorversuch.....	406
14.3.2	Teilstudie A.....	423
14.3.3	Teilstudie B.....	746

1 Erklärungen

1.1 Erklärung der Prüfleiterin

Prüfungsnummern: 12N10503, 12N10504, 12N10505

Prüfgegenstand: Linear polarisierte sinusförmige 50 Hz elektromagnetische Felder

Titel: Einfluss niederfrequenter elektromagnetischer Felder auf das sich entwickelnde blutbildende System, das Immunsystem und das ZNS in vivo

Als Prüfleiterin erkläre ich hiermit, dass die Prüfungen in Anlehnung an die GLP-Grundsätze des Chemikaliengesetzes § 19a, Anhang 1 in der Fassung der Bekanntmachung vom 02.07.2008 durchgeführt wurden. Die Prüfungen erfolgten nach den Bestimmungen des Deutschen Tierschutzgesetzes vom 18.05.2006.

Dieser Bericht ist eine exakte und vollständige Wiedergabe aller Ergebnisse.

Als Prüfleiterin übernehme ich die Verantwortung für die Zuverlässigkeit der durchgeführten Prüfungen.

Datum 14.01.2013

Unterschrift 

Dr. G. Lewin, Prüfleiterin

1.2 Erklärung der wissenschaftlichen Mitarbeiter

Prüfungsnummern: 12N10503, 12N10504, 12N10505

Prüfgegenstand: Linear polarisierte sinusförmige 50 Hz elektromagnetische Felder

Titel: Einfluss niederfrequenter elektromagnetischer Felder auf das sich entwickelnde blutbildende System, das Immunsystem und das ZNS in vivo

Die Unterzeichner erklären hiermit, dass diese Prüfungen durch sie oder unter ihrer Aufsicht entsprechend den beschriebenen Methoden durchgeführt wurden und dass dieser Bericht eine exakte und vollständige Wiedergabe aller Ergebnisse darstellt.

	Datum	Unterschrift
Tierarzt: Dr. med. vet. T. Tillmann	<u>08/01/13</u>	<u>T. Tillmann</u>
Pathologie: Dr. med. vet. H. Ernst	<u>8.1.2013</u>	<u>H. Ernst</u>
Dr. med. vet. A. Kolling	<u>22.1.2013</u>	<u>A. Kolling</u>
Klinische Chemie/Hämatologie: Dr. med. vet. T. Hansen	<u>8.1.13</u>	<u>T. Hansen</u>
Immunologie: Dr. rer. nat. M. Müller	<u>9.1.13</u>	<u>M. Müller</u>
Expositionstechnik: Dr. Ing. A. Bahr, IMST GmbH	<u>7.1.2013</u>	<u>A. Bahr</u>
Dosimetrie: Dr. Ing. A. Bahr, IMST GmbH	<u>7.1.2013</u>	<u>A. Bahr</u>
Biostatistik: Dr. rer. nat. R. Kellner	<u>8.1.2013</u>	<u>R. Kellner</u>

2 Einleitung

2.1 Prüfplanübersicht

Prüfungsnummern:	12N10503 bis 12N10505
Titel: sich	Einfluss niederfrequenter elektromagnetischer Felder auf das entwickelnde blutbildende System, das Immunsystem und das ZNS in vivo
Ort der Durchführung:	Tierräume T1.036, T1.049
Prüfsignal:	Niederfrequentes elektromagnetisches Testsignal
Prüfleiterin:	Dr. G. Lewin
Projektleiterin BfS:	Dr. M. Asmuß
Projektbeginn / Auftragserteilung:	01.05.2009
Prüfbeginn:	13.01.2010
Dauer der tierexp. Durchführung:	24 Monate (Jan 2010 bis Dez 2011)
Prüfende:	10.12.2012 (letzte histopathologische Befundung)
Abschlussbericht Fertigstellung d. Entwurfs:	Mai 2012

2.2 Zweck der Prüfung

In diesen tierexperimentellen Studien sollte geklärt werden, ob eine Langzeitexposition mit niederfrequenten elektromagnetischen Feldern in der prä- und postnatalen Entwicklung die Parameter Blutbildung, Immunsystem und Reifung des Zentralnervensystems bei Labornagern beeinflusst.

Die Prüfung wurde an freibeweglichen Mäusen durchgeführt, die während einer möglichst langen Zeit (20 Stunden täglich) befördert wurden. Die Untersuchungen fanden in insgesamt 3 Teilstudien statt. In einem Vorversuch wurden akute Effekte auf das Körpergewicht, die Körpertemperatur und den Wasserverbrauch in der Hochdosis im Vergleich zur Kontrollgruppe an adulten weiblichen Tieren über einen Zeitraum von 16 Tagen untersucht. In den darauffolgenden Teilstudien A und B wurden trächtige Muttertiere ab dem 10 Tag *post conceptionem* und die Nachkommen in ihrer Entwicklung weiter verfolgt. In Teilstudie A wurden an Tieren im Alter von 28 und 90 Tagen Untersuchungen des hämatopoietischen Systems und des Immunsystems durchgeführt. In der anschließenden Teilstudie B zur Untersuchung möglicher kanzerogener Effekte wurden an den Tieren Interimsuntersuchungen zu physiologischen Parametern und zum Verhalten durchgeführt und am Ende der Studiendauer nach 18 Monaten Exposition neben den pathologischen Untersuchungen weitere Untersuchungen am blutbildenden und Immunsystem angefügt.

Die Exposition wurde bei unterschiedlichen Intensitäten durchgeführt.

2.3 Richtlinien für die Durchführung der Prüfung

Die Exposition, die tierexperimentelle Durchführung und die Auswertung der Prüfung erfolgten in Anlehnung an die GLP-Grundsätze des Chemikaliengesetzes §19a (Anlage 1) vom 20. Juli 2008 sowie nach den Regelungen des Tierschutzgesetzes vom 18.5.2008. Weiterhin wurden die Prüfungen in Anlehnung an die OECD-Guideline 415 "One-Generation Reproduction Toxicity Study", die OECD-Guideline 407 "Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents", die OECD-Guideline 408 "Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents" und die OECD-Guideline 451 "Carcinogenicity Studies" durchgeführt.

Alle tierpflegerischen Arbeiten, Sektionen und experimentellen Arbeiten folgten den gültigen Standard-Arbeitsanweisungen am Fraunhofer ITEM.

Bei den Prüfungen handelte es sich um Non-GLP-Versuche.

2.4 Personal

Prüfleiter:	Dr. rer. nat. G. Lewin
Stellv. Prüfleiter:	Dr. rer. nat. J. Buschmann
Tierarzt:	Dr. med. vet. T. Tillmann
Pathologie:	Dr. med. vet. H. Ernst Dr. med. vet. A. Kolling
Klinische Chemie/Hämatologie:	Dr. med. vet. T. Hansen
Immunologie:	Dr. rer. nat. M. Müller
Expositionstechniker:	Dr.-Ing. A. Bahr, IMST GmbH
Dosimetrie:	Dr.-Ing. A. Bahr, IMST GmbH
Statistiker:	Dr. rer. nat. R. Kellner

3 Prüfgegenstand

Linear polarisierte sinusförmige 50 Hz elektromagnetische Felder.

3.1 Aufbau der Anlage

Die komplette Expositionseinrichtung für Mäuse wurde von der IMST GmbH, Kamp-Lintfort, entwickelt, am Fraunhofer ITEM aufgebaut und in Betrieb genommen.

Der Aufbau der Expositionseinrichtung beinhaltet, wie in **Abb. 1** dargestellt:

1. PC zur Automatisierung und Expositionsüberwachung
2. 50 Hz Spulensysteme zur Exposition der Versuchstiere
3. Schaltschränke mit Stelltrafos zur Einstellung der erforderlichen Stromstärken
4. Kondensatoren zur Kompensation der Blindwiderstände der Spulen
5. Schalter zur Abschaltung der Expositionseinrichtung
6. Datenakquisitionsgerät (DAQ) und Sonden zur Expositionsüberwachung
7. Einrichtungen zur Kühlung der Spulensysteme
8. Lautsprecher zur Beschallung

Die Expositionseinrichtung setzte sich zusammen aus einem PC zur Automatisierung und Expositionsüberwachung, 2 Schaltschränken (bestehend aus Stelltrafos zur Einstellung der erforderlichen Stromstärken und Kondensatoren zur Kompensation der Blindwiderstände der Spulen

sowie Schaltern zur Abschaltung der Expositionseinrichtung), vier 50-Hz-Spulensystemen zur Exposition der Versuchstiere, einem Datenakquisitionsgerät (DAQ) und Sonden zur Expositionsüberwachung, einer Einrichtung zur Kühlung der Spulensysteme und Lautsprechern zur Beschallung. Mit diesen 4 Spulensystemen, die sich im Erdgeschoss des Gebäudes befanden, ließen sich drei verschiedene Expositionsfeldstärken zzgl. scheinexponierter Kontrolle realisieren. Jeweils zwei Spulensysteme waren in einem Versuchsraum untergebracht. Der Steuer-PC, die Schaltschranke und das Datenakquisitionsgerät wurden im darüber liegenden Technikgeschoss installiert.

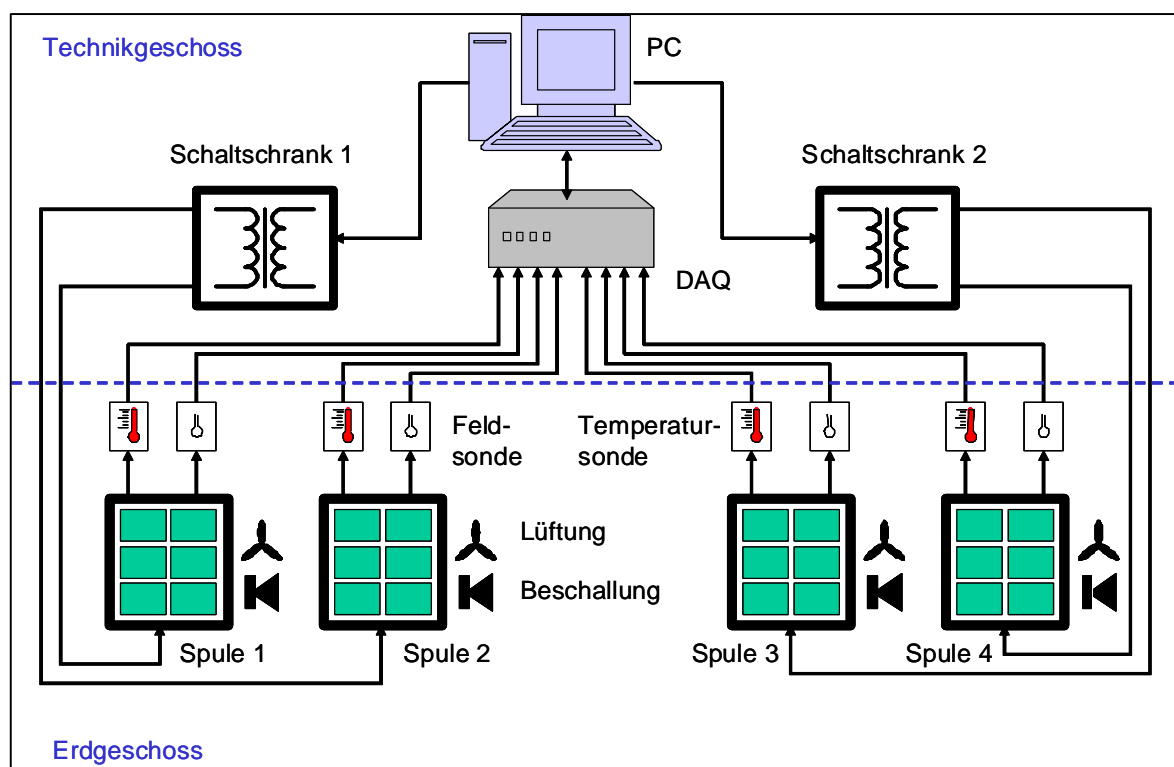


Abb. 1: Schematische Darstellung der Expositionseinrichtung

Elektrische Felder wurden in allen vier Einrichtungen geschirmt. Eventuell auftretende Vibrationen der Käfige wurden durch eine externe Aufhängung der Käfigsysteme vermieden. Zur Gewährleistung gleicher Umgebungstemperaturen wurden die Spulensysteme gekühlt. Hierzu wurde die Umluft für die Spulen der Klimaanlage des Gebäudes entnommen. Zur Vermeidung unterschiedlicher Geräuschpegel fand eine Beschallung aller Spulensysteme statt.

Umgebungsparameter wie Licht, Vibration, Geräuschpegel und Luftfeuchtigkeit wurden nach Installation der Spulensysteme geprüft.

Bedingt durch den identischen Aufbau der Spulensysteme und der Sicherstellung gleicher Umgebungsbedingungen (Licht, Temperatur, Vibration, Geräuschpegel und Luftfeuchtigkeit) bei Kontrollen und exponierten Tieren war eine verblindete Versuchsdurchführung gewährleistet.

Die Anlage wurde per Software automatisch gesteuert und überwacht. Hierzu wurden die Temperatur- und die Feldstärkewerte im Rhythmus von 5 Minuten im Expositionsvolumen der Spulen erfasst, ausgewertet und aufgezeichnet. Im Falle eines gravierenden Fehlers wurde die Anlage

automatisch abgeschaltet. Die Überprüfung der Expositionsdaten erfolgte täglich durch die IMST GmbH.

Abb. 2 zeigt an Hand der Konstruktionszeichnung den inneren Aufbau eines Spulenkörpers, der aus Holz besteht und außen mit einer Kunststoffbeschichtung versehen ist. Auf den Innenkorpus wurde eine 0,5 mm dicke Kupferplatte aufgebracht, die zur Schirmung gegenüber elektrischen Feldern verwendet wurde. Zur Vermeidung von Wirbelströmen war die Kupferschirmung an einer Stelle mit einem Schlitz versehen. Danach folgte eine Isolierung, die zur thermischen Isolation des Expositionsvolumens vom Spulendraht dient. Dieser wurde auf dem eigentlichem Spulenkörper mit den Abmessungen 920 mm x 900 mm x 900 mm gewickelt. Die Kühlung des Spulendrahts erfolgte durch Luftkühlung. Die Luft wurde mit Hilfe der äußeren Spulenabdeckung um den Spulendraht geführt, gleichzeitig dient die äußere Spulenabdeckung als Berührungsschutz.

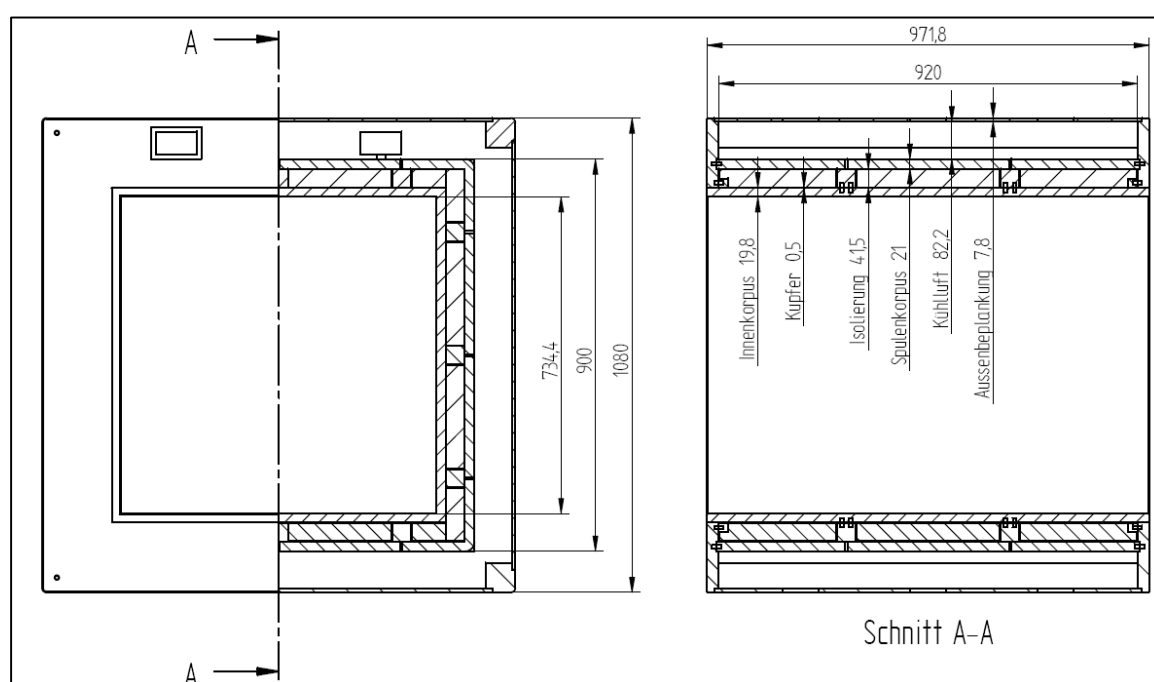


Abb. 2: Konstruktionszeichnung eines Spulenkörpers.

Abb. 3 zeigt ein realisiertes Spulensystem mit Tierkäfigen, Halterung für die Käfige und Schläuchen für die Luftzirkulation. Das Expositionsvolumen betrug 682 mm x 620 mm x 605 mm. Die Versuchstiere waren in nichtmetallischen Spezialkäfigen mit nichtmetallischen Trinkflaschen untergebracht, das Regalsystem zur Halterung der Käfige war ebenfalls nichtmetallisch. Pro Expositionseinheit konnten somit maximal 18 Käfige (Macrolon Typ II, 350 cm² Grundfläche) mit jeweils maximal 4 Tieren positioniert werden. Hieraus ergab sich eine maximale Anzahl von 72 Tieren pro Expositionseinheit.



Abb. 3: Realisierung eines Spulensystems mit Tierkäfigen, Halterung für die Käfige und Schläuchen für die Luftzirkulation.

Insgesamt wurden vier Spulensysteme für drei Expositionsfeldstärken zzgl. scheinexponierter Kontrolle installiert, wobei jeweils zwei Spulensysteme in einem Versuchsraum untergebracht waren. Die Feld- und Temperaturüberwachung wurde während der Exposition durchgeführt und dokumentiert.

Die Betreuung der Expositionseinrichtung erfolgte während der gesamten Untersuchungsdauer durch die IMST GmbH. Die aufgezeichneten Parameter der Expositionseinrichtung wurden zeitnah von der IMST GmbH ausgewertet.

3.2 Schutzmaßnahmen und Handhabung der Expositionsanlagen

Nach Anlagenaufbau und -einmessung erfolgte die Handhabung der Expositionsanlagen und Schutzmaßnahmen entsprechend den Vorgaben der IMST GmbH durch das Fraunhofer ITEM anhand eines Manuals.

Es waren besondere Maßnahmen im Rahmen des Personenschutzes einzuhalten.

Ein Betreten der Tierräume oder der Hygieneschleuse zum SPF-Bereich war nur nach Abschaltung der Expositionsanlagen gestattet. Es erfolgte eine automatische Abschaltung der Anlage täglich zwischen 8 Uhr und 12 Uhr. Aus Sicherheitsgründen erfolgte eine zusätzliche Abschaltung der Anlage an den Überwachungsdisplays neben den Tierräumen T1.049 und T1.036 bevor die Hygieneschleuse betreten wurde. Nach Beendigung aller Arbeiten im SPF-Bereich musste die Anlage über beide Displays wieder freigeschaltet werden. Diese Freischaltung muss-

te unbedingt wieder erfolgen, da sonst die Anlage gesperrt blieb und keine Exposition der Tiere erfolgte. Musste der SPF-Bereich außerhalb der Zeiten von 8-12 Uhr betreten werden, war analog zu verfahren.

Bei den Expositionseinheiten handelte es sich um Starkstromanlagen. Bei der Reinigung der Räume war strengstens darauf zu achten, dass kein Spritzwasser an oder in die Anlagen kam.

4 Prüfsystem

4.1 Auswahl des Tiermodells

Als Tierstamm wurden CD-1 (CrI:CD-1(ICR)) Mäuse gewählt. Bei diesem Stamm handelt es sich um ein langjährig etabliertes Tiermodell und es liegen umfangreiche Daten zur Inzidenz spontan auftretender Neoplasien (Charles River Laboratories, 2005) sowie zu Verhaltenstestungen in Langzeitstudien vor (Charles River Laboratories, 2007). Die Überlebensrate von Kontrollgruppen-Tieren über einen Zeitraum von 18 Monaten lag dabei bei 72 % der weiblichen und 74 % der männlichen Tiere. Diese Werte belegen, dass die Tiere sich im Alter von 18 Monaten bereits in der seneszenten Phase befinden aber die Anzahl der überlebenden Tiere noch hoch genug ist, ausreichende Tierzahlen für statistische Auswertungen zu gewährleisten. Auf Grund der expositionsbedingt limitierten Tierzahlen wurden die Studien nur am weiblichen Geschlecht durchgeführt. Die Beschränkung auf das weibliche Geschlecht ermöglichte eine Gruppenhaltung von 4 Tieren pro Käfig gegenüber einer notwendigen Einzelhaltung bei männlichen Tieren. Die Gruppenhaltung wirkt sich dabei erfahrungsgemäß positiv auf das natürliche Verhalten der Tiere aus und wird tierschutzrechtlich grundsätzlich gewünscht.

4.2 Tiere

Bei Expositionsbeginn ca. 10 Wochen alte weibliche spermienpositive CD1-Mäuse (Züchter: Charles River, Sulzfeld, Deutschland) wurden ab dem zehnten Gestationstag in dieser Prüfung eingesetzt. Im Gegensatz zu Standardteratogenitätsstudien (Expositionsbeginn: 6. Trächtigkeitstag) wurde in den Teilstudien A und B der Expositionsbeginn auf den 10. Trächtigkeitstag verschoben, um mögliche schädigende Effekte auf die Implantation (Tag 6 p.c.) zu vermeiden. Der Expositionsbeginn korrelierte mit dem Beginn der fetalen Blutbildung in der Leber bei Mäusen und lag vor der Besiedlung der primären Immunorgane wie Knochenmark und Thymus.

4.3 Tierzahlen

In Teilstudie A begann die Prüfung mit 75 spermienpositiven weiblichen Tieren, die je einer Expositionsgruppe zugeteilt wurden. Die eingesetzten 15 Weibchen/Gruppe warfen ihre Jungen, wobei aus jeder Gruppe 40 weibliche Jungtiere für die Untersuchungen in der F1-Generation bis zu einem maximalen Alter von 90 Tagen weitergeführt wurden.

In Teilstudie B begann die Prüfung mit 100 spermienpositiven weiblichen Tieren, die je einer Expositionsgruppe zugeteilt wurden. Die eingesetzten 20 Weibchen/Gruppe warfen ihre Jungen, wobei aus jeder Gruppe 70 weibliche Jungtiere für die Untersuchungen in der F1-Generation bis zu einer maximalen Expositionsdauer von 18 Monaten weitergeführt wurden.

Die Etablierung einer gesonderten ersten Teilstudie beruhte auf der Tatsache, dass Manipulationen an den Tieren, wie z.B. Blutentnahmen, starken Einfluss auf parallel durchgeführte physio-

logische und Verhaltensteste haben und eine Induktion von neoplastischen Prozessen nicht ausgeschlossen werden konnte. Darüber hinaus konnte eine Rückwirkung von Blutentnahmen auf die Entwicklung des hämatopoietischen Systems nicht ausgeschlossen werden. Somit wurden alle Testungen zur Reifung und Funktionalität des Zentralnervensystems in Teilstudie B und alle Interimparameter für das blutbildende und Immunsystem in Teilstudie A erhoben.

Um eine statistische Absicherung der Studienergebnisse zu gewährleisten, wurden die Tierzahlen so gewählt, dass in Teilstudie A jeweils im Alter von 28 und 90 Tagen 20 weibliche Tiere für die Untersuchungen am blutbildenden und Immunsystem getötet werden konnten und in Teilstudie B 70 weibliche Jungtiere bis zu einer Expositionsdauer von 18 Monaten gehalten und anschließend pathologisch untersucht werden konnten. Von diesen 70 Tieren je Expositionsgruppe wurden zu diesem Zeitpunkt wiederum 20 immunologisch und hämatologisch untersucht.

4.4 Identifikation

Jedes Tier erhielt eine individuelle Tiernummer, mit welcher der entsprechende Käfig neben der Prüfungsnummer gekennzeichnet wurde. Alle Daten eines Tieres wurden unter dieser Nummer gesammelt.

Die neugeborenen Jungtiere wurden an Tag 0 p.p. (*post partum*) (Teilstudie B) bzw. Tag 4 p.p. (Teilstudie A) durch Fußtätowierung individuell gekennzeichnet. Nach dem Absetzen vom Muttertier an Tag 21 p.p. wurden die Jungtiere mittels unterschiedlich farbigen Markierungen auf dem weißen Rückenfell gekennzeichnet. Gleichzeitig wurden sie zu viert pro Käfig neu aufgeteilt (jedes Tier im Käfig wies eine andere Rückenfarbe auf). Diese Markierungen wurden für die folgenden etwa 10 Tage aufrechterhalten und ab Tag 35 wurden die Tiere mittels Ohr- und Schwanztätowierung individuell gekennzeichnet. Die Schwanztätowierung kodierte hierbei die Versuchsgruppe, die Ohrmarkierung die individuelle Tiernummer innerhalb der Gruppe.

Tabelle 1: Zuordnung der Tiernummern

Untersuchungsgruppe	Tiernummern (Muttertiere)	Tiernummer (Jungtiere)
1	101 - 120	10101, 10102 - 101xx 10201, 10202 - 102xx ... 12001, 12002 - 120xx
2	201 - 220	20101, 20102 - 201xx 20201, 20202 - 202xx ... 22001, 22002 - 220xx
3	301 - 320	analog
4	401 - 420	
5 (Käfigkontrolle)	501 - 520	
Nach dem Absetzen (PND 21) wurden aus logistischen Gründen neue Tiernummern an die Jungtiere vergeben (101-170, 201-270, 301-370, 401-470, 501-570). Die Zuordnung der jeweiligen Tiernummern zu den jeweiligen Jungtieren wurde dokumentiert und ist Annex 6 des Anhangs zu entnehmen.		

4.5 Tierhaltung

Die Haltung der Tiere erfolgte während der gesamten Prüfungsdauer einzeln (trächtige Weibchen und Weibchen mit Würfen) bzw. in Gruppen von bis zu 4 Tieren (Jungtiere nach dem Absetzen) in speziellen Polycarbonat - Käfigen (modifizierter Typ II: 350 cm²) in den Räumen T1.036 und T1.049 des Tierhauses. Für die Einstreu wurde Weichholzeinstreu (Lignocel BK 8-15, Ssniff GmbH, Soest, Germany) verwendet. Die Käfige wurden zweimal wöchentlich, wenn nötig öfter, gewechselt. Bei den Käfigen handelte es sich expositionsbedingt um Spezialanfertigungen ohne den Einsatz metallischer Materialien. Die Käfige wurden in eigens entwickelten Spezialhalterungen gelagert, welche vom Spulenkörper entkoppelt waren, um eine Übertragung von möglichen Vibrationen von der Magnetspule auf die Tierkäfige zu verhindern.

Die Haltung der Tiere erfolgte unter SPF-Bedingungen (specific pathogen free), daher waren besondere Hygieneanforderungen und Verhaltensregeln einzuhalten.

4.6 Futter und Trinkwasser

Die Tiere erhielten pelletiertes Zuchtfutter Ssniff M-Z (V1124) bis zum Absetzen der Jungtiere sowie danach Haltungsfutter R/M-H (V1534) der Fa. Ssniff ad libitum. Das Futter wurde mindestens einmal wöchentlich gewechselt. Keine Futtercharge wurde länger als vier Monate nach Herstellungsdatum verwendet. Das Futter wurde im Raum T1.015 bei einer Temperatur von 15 - 21 °C und 15 - 55 % rel. Feuchte gelagert.

Die Tiere erhielten Trinkwasser der Stadtwerke Hannover in modifizierten 150 ml Makrolon[®] - Flaschen ad libitum. Bei den Flaschen handelte es sich expositionsbedingt um Spezialanfertigungen ohne den Einsatz der metallischen Materialien. Das Trinkwasser wurde einmal wöchentlich gewechselt.

4.7 Klima

Die Temperatur und Luftfeuchtigkeit in den Tierräumen wurden elektronisch überwacht und kontinuierlich aufgezeichnet. Die Aufzeichnungen wurden als Rohdaten aufbewahrt. Die Temperatur in den Tierräumen wurde auf 20 - 24 °C eingestellt, die relative Luftfeuchtigkeit auf 40 - 70 %. Der Luftwechsel erfolgte 15 - 20fach pro Stunde. Die Beleuchtung der Tierräume und der Expositionsanlagen erfolgte in einem 12-stündigen Hell/Dunkel-Rhythmus. Zusätzliche Temperaturfühler in den Expositionsröhren überwachten die Temperatur im Magnetfeld im Bereich der Tierkäfige. Bei einem möglichen Überschreiten einer Käfigtemperatur von 28°C konnte somit eine Alarmmeldung ausgelöst und das Magnetfeld automatisch abgeschaltet werden.

4.8 Akklimatisierung

Die Weibchen der Eltern-Generation wurden spermien-positiv vom Züchter bezogen und am Tag 2-6 (mindestens 4 Tage vor Expositionsbeginn) in den Tierraum gebracht, um eine Akklimatisierung an die Haltungsbedingungen im Institut zu erreichen.

Die Tiere wurden während der Akklimatisationsphase täglich hinsichtlich klinischer Veränderungen geprüft, die Befunde dokumentiert. Vor Expositionsbeginn (Tag 10 p.c.) wurde das Körpergewicht aller Tiere bestimmt. Die Tiere wurden nur dann für die Prüfung verwendet, wenn während der Akklimatisierungszeit keine auffälligen Befunde festgestellt worden waren.

5 Durchführung der Prüfung

5.1 Randomisierung

Vor Beginn der Prüfung wurden die Muttertiere, gestaffelt nach ihrem Verpaarungstermin, gleichmäßig den Gruppen zugeteilt.

5.2 Gruppeneinteilung

Für die Teilstudie A wurden die spermien-positiven Muttertiere in 5 Gruppen zu je 15 Tieren, in Teilstudie B in 5 Gruppen mit je 20 Tieren, so eingeteilt, dass die Verpaarungstermine gleichmäßig über alle Gruppen verteilt waren.

Aus jeder Gruppe wurden 40 bzw. 70 weibliche Jungtiere (Teilstudie A bzw. B) für die Untersuchung der F1-Generation weitergeführt.

Tabelle 2: Anzahl der Tiere pro Teilstudie

Gruppe	Teilstudie A bis 90 Tage		Teilstudie B bis 18 Monate	
	Tierzahl F0 Muttertiere	Tierzahl F1 Jungtiere	Tierzahl F0 Muttertiere	Tierzahl F1 Jungtiere
1	15	40 w	20	70 w
2	15	40 w	20	70 w
3	15	40 w	20	70 w
4	15	40 w	20	70 w
5 Käfigkontrolle	15	40 w	20	70 w

5.3 Expositionsbedingungen

Die Tiere wurden täglich in insgesamt 4 identischen Expositionseinheiten (3 Expositionsfeldstärken und 1 Scheinexposition) mit je bis zu 18 Käfigen befeldet.

Die Kontrollgruppe (Scheinexposition) war in einem bis auf das fehlende Magnetfeld identischen Spulensystem untergebracht und diente in der statistischen Auswertung als Referenzgruppe. Alle Spulen waren bezüglich Größe und Aufstellung der Käfige völlig äquivalent aufgebaut. Es war für das betreuende Personal des Fraunhofer ITEM nicht erkennbar, in welchem das Spulensystem die exponierten Gruppen bzw. die scheinexponierte Gruppe gehalten wurde. Eine zusätzliche Kontrollgruppe (Käfigkontrolle) wurde unter Standardbedingungen (herkömmliche Macrolon-Käfige Typ II) in Raum T1.036 mitgeführt und diente dem Vergleich mit historischen Kontrolldaten.

Die Käfige wurden in den Spulensystemen nach einem festgelegten Schema weitergerückt, um über die jeweilige Studiendauer ähnliche Expositionsbedingungen für alle Tiere zu gewährleisten. Diese Rotation der Käfige in den Expositionseinheiten erfolgte jeweils zum Zeitpunkt der Käfigreinigung (mind. 2 x pro Woche).

Die Expositionsdauer betrug täglich 20 Stunden (12:00 - 8:00 Uhr). Eine tägliche Unterbrechung der Exposition war für tierpflegerische Arbeiten notwendig. An den Tagen der Verhaltensuntersuchungen erfolgte tagsüber keine Befeldung der Tiere.

Die genaue technische Charakterisierung der Expositionsanlage erfolgte durch die IMST GmbH.

5.3.1 Kontrolle der Expositionsdaten

Die Gesamteinrichtung war automatisiert. Dies umfasste neben der Ansteuerung der Spulen der Expositionseinrichtung die Aufzeichnung von Parametern zur Expositionsüberwachung. Folgende Parameter wurden von der IMST GmbH kontinuierlich aufgezeichnet: Temperatur der Spulen und des Expositionsraumes im Bereich der Tierkäfige sowie die Magnetfeldstärke. Vom Fraunhofer ITEM wurden die Temperatur des Tierraumes und die Luftfeuchtigkeit aufgezeichnet, die Temperatur im Käfigbereich wurde zusätzlich noch einmal überwacht. Die Steuerung des Lichtregimes (12 h hell/dunkel) erfolgte zentral für alle Tierräume per Zeitschaltuhr. Lichtstärke (in der Spule im Käfigbereich), Vibration und Geräuschpegel wurden nach der Installation bei Übergabe der Expositionsanlage von der IMST GmbH an das Fraunhofer ITEM gemessen und dokumentiert.

Die Verantwortung für die Erzeugung und Kontrolle des Feldes lag bei der IMST GmbH, Kamp-Lintfort.

5.3.2 Auswahl der Feldstärke

Die Exposition der Tiere erfolgte verblindet mit den drei Feldintensitäten 9,6 μT , 961 μT und 9608 μT . Die Feldintensitäten waren so gewählt, dass im Körper der Tiere Stromdichten erzielt wurden, die denen entsprechen, die beim Menschen unter Exposition mit magnetischen Flussdichten von 1, 100 und 1000 μT auftreten. Außerdem wurde eine Gruppe von Tieren scheinexponiert und eine weitere Gruppe von nicht-exponierten Tieren als Käfigkontrolle mitgeführt.

5.3.3 Entblindung des Versuchsaufbaus

Der gesamte Versuchsablauf in Teilstudie A und B erfolgte verblindet, so dass den Durchführenden die Zuordnung der Versuchsgruppen zur jeweiligen Expositionsfeldstärke nicht ersichtlich war.

Die Entblindung erfolgte am 15.03.2012 durch die IMST GmbH.

Tabelle 3: Zuordnung der Spulensysteme und Magnetfeldstärken

Versuchsgruppe	Raum	Magnetfeldstärke
Spule 1	T1.049	1 mT
Spule 2	T1.049	10 mT
Spule 3	T1.036	10 μ T
Spule 4	T1.036	Scheinexposition
Käfigkontrolle	T1.036	

5.4 Prüfungsdauer

Die Exposition der Mäuse erfolgte täglich über 20 Stunden an sieben Tagen pro Woche. Die Exposition begann in der Eltern-Generation mit 15 bzw. 20 spermien-positiven Weibchen ab Tag 10 *post conceptionem* (p.c., Tag des Auffindens von Spermien bzw. Vaginalpfropf = Tag 1 p.c.) und wurde über die Geburt, die Laktationsphase, das Absetzen und die Entwicklung bis zum Versuchsende, in Teilstudie A bis zum Alter von 90 Tagen, in Teilstudie B bis zu einer Expositionsdauer von 18 Monaten fortgesetzt.

5.5 Biologische Endpunkte

5.5.1 Untersuchungen im Vorversuch

In einem Vorversuch wurden akute Effekte einer Hochdosisexposition (10 mT) im Vergleich zur Käfigkontrolle untersucht. Hierzu wurden 24 junge adulte weibliche CD-1-Mäuse in Gruppenhaltung eingesetzt.

Nach einer Akklimatisierungsphase von 1 Woche wurden die Tiere randomisiert auf die Käfigkontrollgruppe (8 Tiere, 2 Standard-Käfige) oder die Expositionsgruppe (16 Tiere, 4 modifizierte metallfreie Käfige) verteilt und für 16 Tage exponiert.

Es wurden tägliche klinische Befundungen vorgenommen. An Tag 0 vor Expositionsbeginn sowie an Tag 2, 5, 7, 9, 12, 14 und 16 wurde das individuelle Körpergewicht der Tiere und der Wasserverbrauch pro Käfig ermittelt. In der zweiten Expositionswoche wurde die Körpertemperatur der Tiere erfasst. Dies erfolgte ca. 15 min nach Expositionsende. Diese Zeitspanne war notwendig, da ein Betreten der Versuchsräume nur nach Abschalten der Expositionsanlage gestattet war und die entsprechenden Hygienemaßnahmen vor Betreten der SPF-Haltung einzuhalten waren.

Alle Befunde, Wägungen und Temperaturmessungen wurden digital erfasst und ausgewertet.

5.5.2 Untersuchungen der Muttertiere

5.5.2.1 Interkurrente Beobachtungen

5.5.2.1.1 Verpaarung

Die Tiere wurden über Nacht beim Züchter verpaart. Der Morgen des Auffindens von Spermien oder Vaginalpfropf galt als Tag 1 p.c.. In Teilstudie A wurden die Tiere in 4 Gruppen (mit je 18-19 Tieren) an 4 aufeinander folgenden Tagen verpaart, in Teilstudie B in 8 Gruppen (mit je 12-13 Tieren) an jeweils 4 aufeinander folgenden Tagen in 2 aufeinanderfolgenden Wochen verpaart. Hierdurch war eine logistisch notwendige Staffelung der Verpaarungs- und Wurftermine gewährleistet.

5.5.2.1.2 Klinische Befunde

Der Gesundheitszustand aller Tiere wurde täglich mindestens einmal kontrolliert und digital dokumentiert. Alle Tiere, die Veränderungen aufweisen, wurden vom zuständigen Tierarzt oder seinem Stellvertreter untersucht. Die Käfige dieser Tiere wurden gekennzeichnet und die Tiere besonders beobachtet. Während der Prüfung wurden Tiere nur dann getötet, wenn es zu einer hochgradigen Verschlechterung des Gesundheitszustandes kam.

5.5.2.1.3 Körpergewicht

Die Körpergewichte der Tiere wurden am Tag 10 p.c. vor Expositionsbeginn sowie an Trächtigkeitstag 14 und 18 individuell ermittelt. Während der Laktationsphase wurde das individuelle Körpergewicht an Tag 4, 7, 10, 14, 17, und 21 p.p. ermittelt. Der Tag, an welchem der Geburtsvorgang abgeschlossen war, stellte Tag 0 p.p. dar.

5.5.2.2 Post Mortem Untersuchungen

Nach dem Absetzen der Jungtiere wurden alle Muttertiere mit einer Überdosis CO₂ betäubt und anschließend entblutet. Die Sektion wurde von erfahrenen Biologielaboranten und VMTA unter Aufsicht eines Tierarztes durchgeführt. Bei der Sektion wurden alle makroskopischen Organveränderungen dokumentiert. Die Anzahl von Implantationsstellen in den Uteri wurde ermittelt als Grundlage für die Bestimmung von Post-Implantationsverlusten während der Trächtigkeit.

5.5.3 Untersuchungen an den Nachkommen

5.5.3.1 Interkurrente Beobachtungen

5.5.3.1.1 Lebensfähigkeit und klinische Befunde

Der Gesundheitszustand aller Jungtiere wurde täglich mindestens einmal kontrolliert und digital dokumentiert. Alle Tiere, die Veränderungen aufwiesen, wurden vom zuständigen Tierarzt oder seinem Stellvertreter untersucht. Die Käfige dieser Tiere wurden gekennzeichnet und die Tiere besonders beobachtet. Während der Prüfung wurden Tiere nur dann getötet, wenn es zu einer

hochgradigen Verschlechterung des Gesundheitszustandes kam. Die Untersuchung auf äußerlich sichtbare Fehlbildungen und Variationen der Jungtiere erfolgte am Tag der Geburt und wurde an Tag 4 überprüft. Von der Norm abweichende Befunde wurden individuell dokumentiert. Die Anzahl der Jungtiere und das Auffinden toter oder abnormaler Jungtiere wurden registriert.

5.5.3.1.2 Körpergewicht

Die individuellen Körpergewichte der Tiere wurden am Tag 4, 7, 10, 14, 17 und 21 p.p., danach bis zum Alter von 90 Tagen wöchentlich und anschließend monatlich mit einer Genauigkeit von 0.1 g bestimmt.

5.5.3.2 Geschlechtsbestimmung, Identifizierung und Absetzen der Jungtiere

5.5.3.2.1 Geschlechtsbestimmung und Identifizierung

Die Dokumentation der Jungtiere erfolgte am Tag der Geburt, hierbei wurden Wurfgröße sowie die Anzahl von lebenden und toten Jungtieren erfasst. Eine individuelle Identifizierung durch Tätowierung an den Füßen und die Geschlechtsbestimmung erfolgten in Teilstudie A an Tag 4 und auf Grund der positiven Erfahrungen in Teilstudie B an Tag 1. Durch diese Vorgehensweise konnten mögliche postnatale Verluste durch ein zu frühes Handling der Mutter- und Jungtiere nach der Geburt und die Auslösung von adversen Verhalten reduziert werden.

5.5.3.2.2 Wurfstandardisierung und Absetzen

Alle Würfe wurden an Tag 4 p.p. auf 8 Jungtiere (unter Einbehaltung möglichst vieler Weibchen) standardisiert. Standardisierung erfolgte nur durch randomisierte Reduktion, nicht durch Auffüllen von Würfen. Die Jungtiere wurden an Tag 21 p.p. abgesetzt. In Teilstudie A wurden aus jeder Gruppe 40 weibliche Jungtiere weitergeführt, in Teilstudie B jeweils 70 weibliche Jungtiere. Hierbei wurden die weiblichen Tiere aus möglichst vielen Würfen innerhalb der jeweiligen Expositionsgruppe gewählt und die Tiere zu jeweils 4 Tieren aus unterschiedlichen Würfen pro Käfig neu zusammengesetzt. Alle nicht für weiterführende Untersuchungen zugeteilten Tiere wurden nach dem Absetzen mit einer Überdosis CO₂ betäubt und anschließend entblutet. Die weiterzuführenden Tiere wurden um Tag 35 p.p. mittels Ohr- und Schwanztätowierung individuell gekennzeichnet. Die Schwanztätowierung kodierte hierbei die Versuchsgruppe, die Ohrmarkierung die individuelle Tiernummer innerhalb der Gruppe. Vom Absetzen (Tag 21p.p.) bis zum Tätowieren (um Tag 35 p.p.) erfolgte die Individualisierung durch farbige Fellmarkierungen. Hierdurch sollte das Aufeinandertreffen zu vieler Stressfaktoren (Absetzen vom Muttertier, Hierarchieausbildung in neuen Käfigen, Verhaltensversuche, Narkose zur Tätowierung) reduziert werden. Die individuelle Zuordnung der Jungtiere nach dem Absetzen wurde dokumentiert und ist dem Anhang als **Annex 6** beigefügt.

5.5.3.3 Post Mortem Untersuchungen

Alle Tiere, die während der Studien starben oder aus Tierschutzgründen schmerzlos getötet werden mussten, wurden seziert. Die schmerzlose Tötung erfolgte durch Betäubung mit einer Überdosis CO₂ und anschließendes Entbluten. Jungtiere, welche bis zum Tag 21 p.p. starben, wurden in toto in Ethanol fixiert und aufbewahrt. Jungtiere, welche ab Tag 21 starben, wurden

seziert, auf makroskopische Veränderungen untersucht und in Formaldehyd konserviert. Nach 18 Monaten Exposition wurden alle überlebenden Tiere seziert. Bei der Sektion wurden alle makroskopischen Organveränderungen dokumentiert und die Organgewichte von Leber, Milz, Niere, Nebennieren und Gehirn bestimmt. Folgende Organe sowie alle beobachteten makroskopischen Veränderungen wurden in Formaldehyd fixiert:

Aorta	Leber	Pharynx
Augen mit optischem Nerv	Luftröhre	Schädel mit Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen
Brustdrüsen	Lunge	Schilddrüse und Nebenschilddrüsen
Caecum/Colon/Rektum	Lungen-assoziierte Lymphknoten (tracheobronchial)	Skelettmuskulatur
Duodenum/Jejunum/Ileum	Magen	Speicheldrüsen (mandibular, sublingual und parotid)
Femur mit Kniegelenk	Mandibuläre Lymphknoten	Submandibuläre Lymphknoten (unilateral)
Gehirn (3 Ebenen)	Mesenterium und mesenteriale Lymphknoten	Thymus
Hardersche Drüsen	Milz	Tränendrüsen
Harnblase und Harnleiter	Nebennieren	Uterus
Haut	Nieren	Vagina
Herz	Oesophagus	Wirbelsäule und Rückenmark
Hypophyse	Ovarien	Zunge
Knochen mit Knochenmark (Sternum und Femur)	Pankreas	
Larynx	Peripherer Nerv (N. ischiadicus)	

In Teilstudie A wurde bei den Sektionen an Tag 28 und 90 jeweils die komplette Milz der Tiere für immunologische Untersuchungen eingesetzt. In Teilstudie B wurde bei den Sektionen nach 18 Monaten Exposition die Milz von 20 Tieren je Gruppe geteilt, ein Teil diente der immunologischen Untersuchung, der zweite Teil der pathologisch/histologischen Untersuchung. Die Milz der übrigen Tiere wurde *in toto* histologisch aufgearbeitet.

Die Sektion wurde von erfahrenen Biologielaboranten und VMTA unter Aufsicht eines Tierarztes durchgeführt.

Folgende Gewebe wurden im Anschluss histopathologisch aufgearbeitet und untersucht: Thymus, Milz, mesenteriale Lymphknoten (LK), LK der Leistenbeuge, Lungen-assoziierte LK, Femur und Sternum mit Knochenmark, Leber, Gehirn, Lunge, Nieren sowie alle beobachteten Makroveränderungen. Die histologische Untersuchung erfolgte an allen nach Tag 21 p.p. verstorbenen oder moribund getöteten Tieren sowie an allen überlebenden Tieren nach 18 Monaten Exposition.

5.5.3.4 Untersuchung der Reflexontogenese, körperlichen und sexuellen Reife

Die Zuordnung der weiblichen Jungtiere zu den einzelnen Verhaltenstestungen (FOB, lokomotorische Aktivität, ASR) erfolgte so, dass in jeder Gruppe Tiere aus möglichst vielen Würfen vertreten waren.

5.5.3.4.1 Ausbildung von Reflexen

Folgende Parameter wurden bei allen Jungtieren in Teilstudie B untersucht: Umdrehreflex (Tag 1-3 p.p.) und negative Geotaxis (Tag 10-12 p.p.).

5.5.3.4.2 Functional Observational Battery (FOB)

Die sogenannte Functional Observational Battery (FOB), basierend auf den Untersuchungen von Moser et al. (1991) dient der Bestimmung sowohl physiologischer Parameter (Körpertemperatur, Muskelkraft, Speichelfluß, Atemfrequenz, Harnabsatz, Kotabgabe, Tränenfluß, Auftreten von Mundatmung, Krämpfen, Tremor, Piloerektion, Stereotypien, Schmerzempfindlichkeit, Begutachtung von Gliedmaßenbeweglichkeit, des Ganges, des Fußabstandes/der Fußstellung und der Aktivität) als auch der Evaluierung verschiedener Reflexe (Geotaxis, Hangelreflex, Rückziehreflex, Schreckreflex, Pinnareflex, Pupillenreflex, Orientierungsreflex) und möglichen entsprechenden pathologischen Veränderungen. Die Beobachtungen und Messungen zur FOB wurden an jeweils 20 weiblichen Tieren der Teilstudie B pro Expositionsgruppe zu 3 verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt: um den Tag 20, 30 und 60 p.p. Hierzu wurden die Tiere 1-20 einer jeden Versuchsgruppe eingesetzt.

5.5.3.4.3 Erreichen der sexuellen Reife

Als Parameter für das Erreichen der sexuellen Reife wurden bei weiblichen Jungtieren der Tag und das Körpergewicht bei Vaginalöffnung dokumentiert. Die Untersuchungen erfolgten von Tag 22 p.p. bis Tag 30 p.p. an allen weiblichen Tieren der Teilstudie B.

5.5.3.5 Untersuchungen zur Reifung des Zentralnervensystems

Die folgenden Untersuchungen zur Funktionalität des Zentralnervensystems waren so geplant, dass sie sowohl den Zeitraum des Absetzens der Jungtiere von der Mutter (Tag 21 p.p.) als auch die frühe pubertäre (um Tag 30 p.p.) und die post-pubertäre Phase (Tag 60 p.p.) abdeckten.

5.5.3.5.1 Untersuchungen des Verhaltens anhand der lokomotorischen Aktivität

Die Begutachtung der spontanen lokomotorischen Aktivität über einen Zeitraum von 60 min erfolgte mit dem computergesteuerten Lichtschrankensystem "Actimot" (TSE, Homburg/Ts., Deutschland) zu 3 verschiedenen Zeitpunkten um den Tag 20, 30 und 60 p.p. Hierzu wurden in 15minütigen Intervallen die zurückgelegte Distanz, die Zeiten in Ruhe und Bewegung und die Anzahl und Dauer der Zeitpunkte, in denen sich das Tier aufrichtet, erfasst. Die Untersuchungen

erfolgten an 20 weiblichen Tieren für jede Expositionsgruppe der Teilstudie B. Hierzu wurden die Tiere 21-40 einer jeden Versuchsgruppe eingesetzt.

5.5.3.5.2 Untersuchungen von Signalverarbeitung und Lernfähigkeit

Bei der Messung des akustischen Schreckreflexes (ASR) wurden die Tiere einzeln, in schalldämmten Kammern, einem kurzen lauten akustischen Signal ausgesetzt und die Stärke und Dauer der darauf folgenden Schreckreaktion (Zusammenzucken) über einen schwingungsempfindlichen Sensor computergesteuert gemessen (Startle Response System, TSE, Homburg/Ts., Deutschland). Durch die initiale Reaktion auf diesen Impuls konnte eine mögliche Schädigung des Gehörs ermittelt werden. Mit dem Wiederholen dieser Signalkette konnte ein Gewöhnungseffekt (Habituation) ausgelöst werden, dessen Auftreten ein Zeichen einer geregelten zerebralen Datenverarbeitung im Sinne einer Schutzreaktion und eines Lerneffektes darstellt. Durch das Vorschalten schwächerer "Vorwarn"signale konnte eine Abschwächung der Reaktion ausgelöst werden. Das Auftreten dieser sogenannten "Pre-Pulse Inhibition" stellte eine weitere Schutzreaktion des ZNS dar und gilt als Zeichen einer geregelten zerebralen Signalverarbeitung. Die Untersuchungen zur Reifung von Habituation und Pre-Pulse-Inhibition wurden zu 2 Zeitpunkten um den Tag 20 p.p. und Tag 60 p.p. an jeweils 20 Tieren pro Expositionsgruppe in Teilstudie B durchgeführt. Hierzu wurden die Tiere 41-60 einer jeden Versuchsgruppe eingesetzt. Eine weitere Testung an Tag 30 erfolgte nicht, da der zeitliche Abstand zu Tag 20 zu kurz war und durch einen Memory-Effekt die Ergebnisse verfälscht worden wären.

5.5.3.6 Untersuchungen des blutbildenden Systems

Bei den Sektionen im Alter von 28 und 90 Tagen sowie nach 18 Monaten Exposition wurde 20 weiblichen Tieren je Expositionsgruppe Blut entnommen. Das Blut wurde sofort nach der Entnahme mit EDTA versetzt. Es wurde so verfahren, dass eine möglichst hohe Anzahl von Würfen in jeder Gruppe vertreten war.

5.5.3.6.1 Differentialblutbild und Retikulozytenauswertung

Von jedem Tier wurden 2 Blutaussstriche zur Anfertigung eines Differentialblutbildes (zelluläre Zusammensetzung der Leukozyten: neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten) und einer Retikulozytenauswertung (jugendliche Erythrozyten, Möglichkeit der Erfassung von Störungen der Hämatopoese/Anämien) erstellt. Die Differenzierung der Leukozyten erfolgte manuell in May-Gruenwald-Giems gefärbten Blutaussstrichen.

5.5.3.6.2 Bestimmungen im kleinen Blutbild

Zusätzlich erfolgte anhand der Blutprobe die Bestimmung von Leukozyten-, Erythrozyten- und Thrombozytenanzahl, Hämoglobingehalt, Hämatokrit, mittlerem korpuskulärem Volumen (MCV) und mittlerer korpuskulärer Hämoglobinkonzentration (MCHC).

Leukozytenzahl, Erythrozytenzahl, Thrombozytenzahl, Hämoglobin, Hämatokrit sowie die Erythrozytenindizes (MCV, MCH, MCHC) wurden mit dem Analysegerät Sysmex KX-21 N bestimmt.

5.5.3.7 Untersuchungen des Immunsystems

Analog zu den Untersuchungen des blutbildenden Systems erfolgten die Untersuchungen des Immunsystems an jeweils 20 weiblichen Tieren pro Expositionsgruppe im Alter von 28 und 90 Tagen sowie nach 18 Monaten Exposition.

Die Tiere wurden schmerzlos getötet und es wurden Blut und Milzproben entnommen für die nachfolgenden Untersuchungen. Im Alter von 28 und 90 Tagen wurde hierzu die gesamte Milz eingesetzt, im Alter von 18 Monaten jeweils nur die distale Hälfte des Organs, um mit dem proximalen Bereich auch von diesen Tieren eine histopathologische Auswertung der Milz zu ermöglichen. Das Blut wurde sofort nach der Entnahme mit EDTA versetzt, die Milz wurde in eisgekühlte Pufferlösung überführt. Es wurde so verfahren, dass eine möglichst hohe Anzahl von Würfen in jeder Gruppe vertreten war.

5.5.3.7.1 Durchflusszytometrische Messung des Immunstatus in Blut und Milz

Der Immunstatus der Tiere wurde anhand von Zellen aus dem peripheren Blut und der Milz mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dafür wurden die Zellen wie unten beschrieben isoliert und mit 5 verschiedenen, jeweils unterschiedlich markierten Antikörpern inkubiert. Die Expression der verschiedenen Oberflächenmarker diente als Nachweis für Zahl und Aktivierungsstand der jeweiligen immunologisch bedeutsamen Zellpopulationen. Die folgenden Antikörper wurden in der Prüfung verwendet: CD4 = T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen, CD8 = Zytotoxische T-Zellen, CD45R = Leukozyten, pre-B-Lymphozyten, B-Zellen, CD8 = T-Lymphozyten, Subset von CD4-Helfer Lymphozyten, B220 = B-Lymphozyten. Die erhaltenen Messergebnisse wurden anschließend als Dot Plot grafisch aufgetragen. Damit konnten Zellen bezüglich ihrer Positivität hinsichtlich eines oder mehrerer Marker prozentual ausgewertet werden.

Messung des Immunstatus an Zellen des peripheren Blutes

Für die Bestimmung des Immunstatus jedes Tieres wurden je 100 µl EDTA-versetztes Vollblut in FACS-Röhrchen überführt. Für die Isotypkontrolle wurden je Tier 20 µl Blut abgenommen und dies gruppenweise gepoolt. Zu jedem Röhrchen wurden 2 ml Hämolysepuffer zugefügt und für 5 Minuten bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 ml Wasch-Puffer (PBS+5%FCS) gestoppt und die Röhrchen bei 1200 UpM für 5 min bei 4°C abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet aufgeschüttelt. Die Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen erfolgte durch die Zugabe von 100 µl CD16/CD32 (1:100 in Wasch-Puffer verdünnt) in jedes Röhrchen und einer Inkubation für 20 Minuten bei 4°C.

Die Zellen wurden durch Zugabe von 2 ml Waschpuffer, Abzentrifugieren für 5 Minuten bei 1200 UpM und Verwerfen des Überstandes, gewaschen.

Die Antikörper wurden entsprechend folgender Verdünnungen zupipettiert:

AK	Vorverdünnung	µl pro Röhrchen
PE-Cy5 IgG2a	1:40	5
Biotin IgG2b	1:100	5
Isotype-Cocktail	Pur	20
PE-Cy5 CD45R/B220	1:40	5
Biotin CD45	1:100	5
T-Lymphocyte-Cocktail	Pur	20
PE-TexasRed Streptav.	1:40	5
Block: CD16/32	1:100	100

Dabei wurden die Isotyp-Kontrollen in das Pool-Röhrchen jeder Gruppe pipettiert, die Leukozyten-Antikörper in das entsprechende Röhrchen jeden Tieres. Die Röhrchen wurden kurz gevortext und dann für 30 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert.

Anschließend erfolgte ein weiterer Wasch-Schritt. In jedes Röhrchen wurden im Anschluss daran 500 µl Waschpuffer zugefügt und die Expressionsstärke der jeweiligen Oberflächenmarker auf den Zellen in einem Beckman Coulter FC500 Durchflußzytometer gemessen.

Messung des Immunstatus an Zellen der Milz

Die Milzproben wurden keimarm entnommen, in 2 ml PBS überführt und in einem Glaspotter unter Zugabe von 200 µl DNase (2 mg/ml in PBS) homogenisiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit 4 ml Hämolysepuffer für 5 Minuten hämolysiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 500µl Kulturmedium (RPMI1640, 10%FCS) aufgenommen und im CASY1-TT gezählt.

Die Zellen wurden auf 1×10^7 Zellen pro ml eingestellt und 100 µl je Tier ($=1 \times 10^6$ Zellen) in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Für die Isotypkontrolle wurden je 20 µl der Zellsuspension von jedem Tier gruppenweise gepoolt.

Die Zellen wurden anschließend mit 2 ml Waschpuffer gewaschen und der Überstand verworfen. Die weiteren Schritte für die Blockierung, die Antikörper-Färbung und Messung wurden analog wie oben für die Blut-Zellen beschrieben, durchgeführt.

5.5.3.7.2 Messung der Proliferation von Milzzellen

Die Isolierung muriner Lymphozyten erfolgte aus der Milz exponierter Tiere. Die Zellen wurden sowohl hinsichtlich der Spontanproliferation als auch nach Stimulation mit Concanavalin, Pokeweed Mitogen und Lipopolysaccharid untersucht. Die isolierten Zellen wurden sowohl hinsichtlich der Spontanproliferation als auch in Gegenwart verschiedener Mitogene (Concanavalin A, ConA; Pokeweed Mitogen (PWM), Lipopolysaccharid, LPS) kultiviert. Auf Grund der geringen Organgröße der Milz an Tag 28 wurden zu diesem Zeitpunkt nur die Spontanproliferation und die Proliferation nach Stimulierung durch ConA und LPS untersucht. Zum Zeitpunkt Tag 90, wurden alle 3 Mitogene getestet. ConA stimuliert das T-Lymphozytenkompartiment außerordentlich effektiv über eine Kreuzvernetzung des T-Zellrezeptors. LPS aktiviert die Zellen des Monozyten/Makrophagensystems zur Zytokinsekretion und induziert eine sekundäre proliferative Antwort, die in ihrem Ausmaß nicht ganz so hoch erwartet wird wie die Con A induzierte Reakti-

on. Die Proliferationsrate wurde über den Einbau von ^3H -Thymidin in neu synthetisierte DNA bestimmt.

Für die Proliferation wurden entweder 100 μL Kulturmedium oder 100 μL der aus Stocklösung entsprechend angefertigten Verdünnung folgender Stimuli in einer 96-Well Rundbodenplatte vorgelegt: 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Concanavalin A (Con A = 1:125), 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Lipopolysaccharid (LPS = 1:500), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Pokeweed Mitogen (PWM = 1:10). Die Verdünnungen wurden in Kulturmedium angefertigt.

Anschliessend wurden die Milzzellen auf 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt und 100 μl pro Well pipettiert (1×10^5 Zellen). Die Ansätze wurden in Triplikaten angefertigt und die Zellen für 48 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden 10 μl ^3H -Thymidin je Well zugefügt und die Platten für weitere 18 h inkubiert. Die Kulturplatten wurden danach bei -20°C eingefroren und so bis zur Messung gelagert. Mit einem Harvester wurden die Zellen auf Filterplatten übertragen. Die Filter wurden getrocknet, mit 20 μl Szintillationsflüssigkeit versetzt und im β -Counter Top-Count gemessen.

6 Zusammenfassende Darstellung der Untersuchungen

Tabelle 4: Zusammenfassung der Untersuchungen pro Teilstudie

Parameter	Teilstudie A	Teilstudie B	Anmerkungen
Untersuchungen der Muttertiere	15w/Gruppe	20w/Gruppe	klinische Befunde, Körpergewicht, <i>post mortem</i> Untersuchungen
Untersuchungen der F1-Generation			
Mortalität, klinische Befunde	< Tag 21: alle Tiere > Tag 21: 40w/Gr.	< Tag 21: alle Tiere > Tag 21: 70w/Gr.	
Körpergewicht	< Tag 21: alle Tiere > Tag 21: 40w/Gr.	< Tag 21: alle Tiere > Tag 21: 70w/Gr.	
Reflexontogenese		< Tag 21: alle Tiere	Tag 1-3: Umdrehreflex Tag 10-12: Negative Geotaxis
Functional Observational Battery		~ Tag 20, 30, 60: 20w/Gr.	
Sexuelle Reife		> Tag 22: alle weiblichen Tiere	Alter und Körpergewicht bei Vaginalöffnung
Lokomotorische Aktivität		~ Tag 20, 30, 60: 20w/Gr.	
Akustischer Schreckreflex		~ Tag 20, 60: 20w/Gr.	Hörvermögen, Signalverarbeitung, Lernfähigkeit
Hämatologie	Tag 28: 20w/Gr. Tag 90: 20w/Gr.	18 Monate: 20w/Gr.	Differentialblutbild, Retikulozytenauswertung, kleines Blutbild
Immunsystem	Tag 28: 20w/Gr. Tag 90: 20w/Gruppe	18 Monate: 20w/Gr.	Immunstatus in Blut und Milz, Milzzellproliferation
Endsektion, Fixierung von Geweben		18 Monate: alle Tiere	inklusive aller während der Studie verstorbenen oder moribund getöteten Tiere
Histopathologische Untersuchung		18 Monate: alle Tiere	Thymus, Milz, mesenteriale Lymphknoten (LK); LK der Leistenbeuge, Lungen-assoziierte LK, Femur und Sternum mit Knochenmark, Leber, Gehirn, Lunge, Nieren, alle Makroveränderungen

7 Datenaufzeichnung

Alle anfallenden Daten wurden elektronisch erfasst oder in Laborbücher / Formblätter eingetragen. Die Speicherung und Auswertung von Tierdaten, wie Körpergewichte, klinische Befunde und Mortalität erfolgte mit Hilfe des Programms PROVANTIS Version 8.

8 Statistische Methoden

Als statistisch signifikant wurden Unterschiede zwischen den Gruppen mit $p < 0,05$ betrachtet. Es wurden Varianzanalysen durchgeführt. Wenn sich in der Varianzanalyse der Gruppendurchschnitt signifikant unterschied, wurde der Gruppendurchschnitt der Behandlungsgruppen mit der scheinexponierten Kontrollgruppe über den nach Dunnett modifizierten t-Test verglichen. Bei Häufigkeitsvergleichen wurden die statistischen Signifikanzberechnungen mit Hilfe des 2-seitigen Fisher-Tests durchgeführt.

Zur Analyse der kumulativen Daten zur Reflexontogenese auf Basis des Wurfs als Grundeinheit wurde eine „Analysis of clustered time-to-event data“ durch Cox-Proportional-Hazard-Modelle angewandt.

9 Archivierung

Der Prüfplan einschließlich der Ergänzungen und Abweichungen, der Originalabschlussbericht, die individuellen und Gruppenkörpergewichte, die Protokolle der Gesundheitskontrolle, Sektionsprotokolle, die histopathologischen Befunde sowie die Tierraumprotokolle, die immunologischen und hämatologischen Daten sowie die Aufzeichnungen der Verhaltensparameter werden nach Abschluss der Prüfung in Anlehnung an die GLP-Grundsätze in den dafür vorgesehenen Archiven des Fraunhofer ITEM für 15 Jahre aufbewahrt.

Das BfS, als Sponsor, hat das Fraunhofer ITEM vor Ablauf dieser Zeit darüber zu informieren, ob eine weitere Archivierung benötigt wird.

10 Ergebnisse

10.1 Überwachung der Expositionsbedingungen

Während der durchgeführten Studien war die Expositionseinrichtung täglich 24 Stunden lang im Betrieb. Zur Untersuchung und Pflege der Tiere wurden die Felder in den Spulen für den Zeitraum von 8 Uhr bis 12 Uhr abgeschaltet. Die Datenakquisition erfolgte auch in diesen Pausen. In **Abb. 4** ist als Beispiel für einen typischen Expositionstag der zeitliche Verlauf der magnetischen Flussdichte der 10 mT-Spule dargestellt. Nach Einschalten der Expositionseinrichtung um 12 Uhr vergehen ca. 60 Minuten, bis sich ein stationäres Verhalten einstellt.

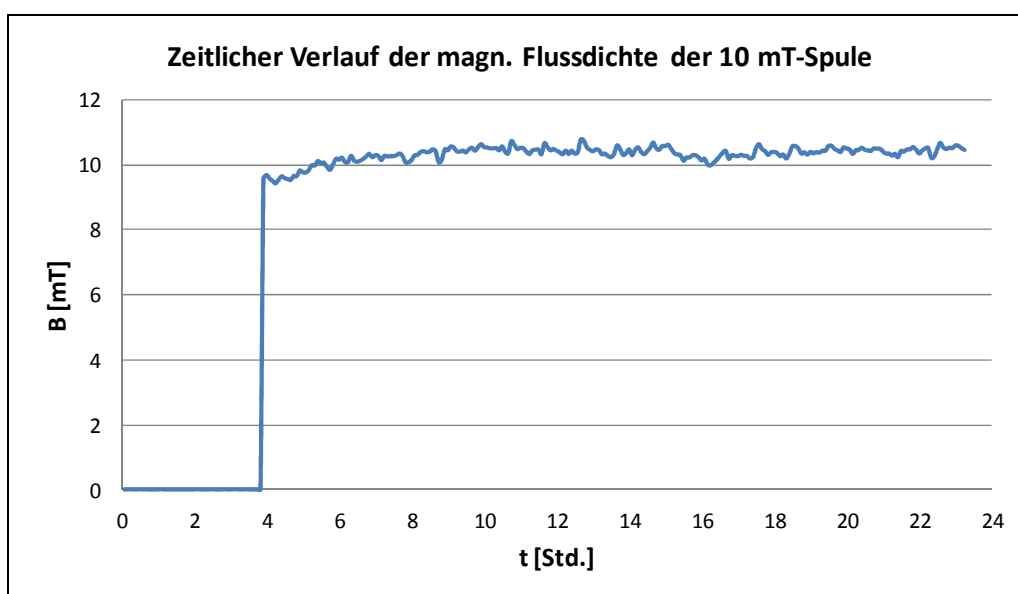


Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der magnetischen Flussdichte der 10 mT-Spule für einen typischen Expositionstag.

Die Auswertung der Expositionsdaten erfolgte für eine Vorstudie im Zeitraum vom 13.01.2010 bis zum 29.01.2010 und für zwei Teilstudien, die in den Zeiträumen vom 08.02.2010 bis zum 28.05.2010 und vom 11.06.2010 bis zum 20.12.2011 durchgeführt wurden. Hierzu wurden für jeden einzelnen Expositionstag der zeitliche Mittelwert und die Standardabweichung für die Temperatur und die magnetische Flussdichte im Expositionsvolumen der Spulen berechnet. Für die monatliche Darstellung der Ergebnisse wurde der zugehörige Mittelwert aus den zeitlichen Mittelwerten der Tagesexpositionen ermittelt. Dies entspricht dem monatlichen Mittelwert. Als Standardabweichung für den jeweiligen Monat wurde die größte Standardabweichung aus den zugehörigen Tagesexpositionen zugrunde gelegt. Dieser Wert stellt damit einen worst-case für die monatliche Standardabweichung dar. Die Datenauswertung erfolgte unmittelbar nach dem Einschalten der Felder um 12 Uhr.

Zusätzlich zur Überwachung der Expositionseinrichtung erfolgte parallel die Überwachung und Dokumentation der Umgebungsparameter der Tierräume. Die Datenaufzeichnung erfolgte in 5minütigen Intervallen für das Lichtregime (EIN/AUS), die Raumtemperatur und die relative Luftfeuchtigkeit. Die SOLL-Parameter lagen hier bei 12h/12h Hell/Dunkelregime, 22 ± 2 °C Raum-

temperatur und 40-70 % relativer Luftfeuchtigkeit. In **Abb. 5** sind die Daten eines typischen Expositionstages dargestellt.

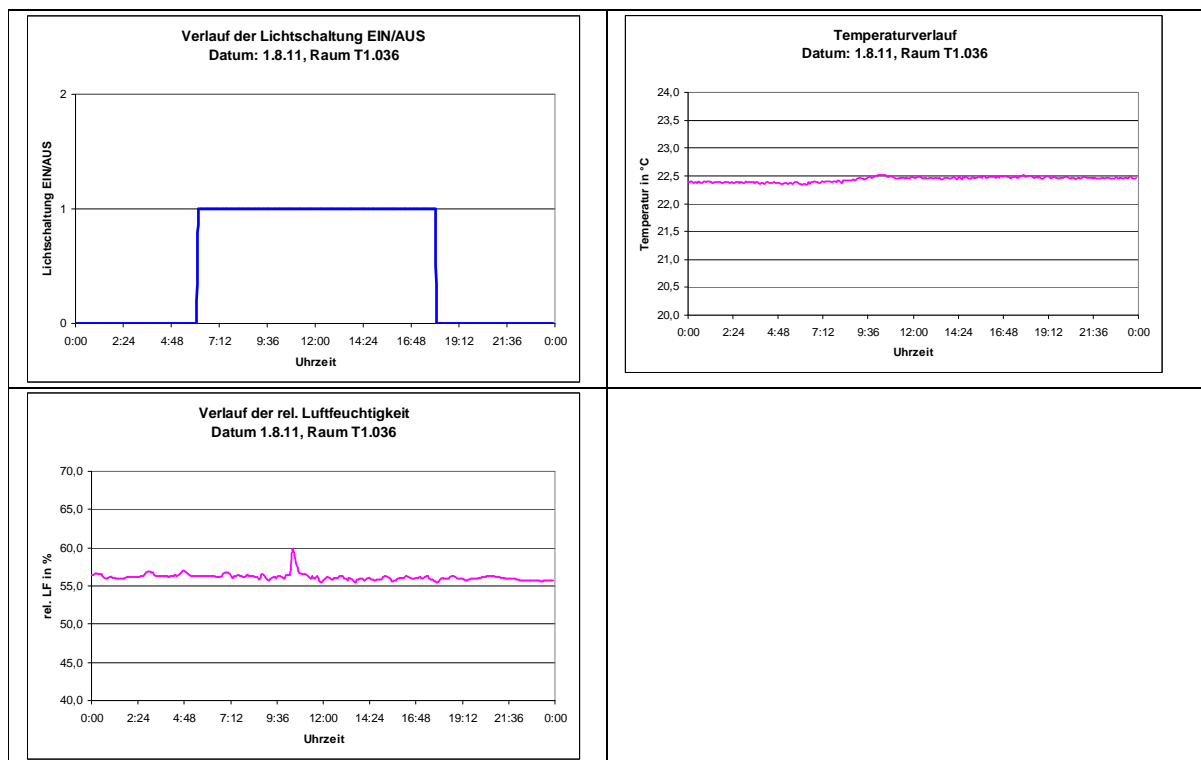


Abb. 5: Zeitlicher Verlauf von Lichtregime, Raumtemperatur und rel. Luftfeuchtigkeit an einem typischen Expositionstag. Der Anstieg der rel. LF am späten Vormittag korreliert mit der täglichen Reinigung des Versuchsraumes

10.1.1 Magnetfeldstärke

Im Rahmen der **Vorstudie** wurden nur die 10 mT-Spule und die Spule für die Scheinexposition (0 T) verwendet. In der **Tabelle 5** sind die ermittelten Ergebnisse für den Mittelwert und die maximale Standardabweichung der Temperatur und der magnetischen Flussdichte im Expositionsvolumen der Spulen für den Monat Januar 2010 zusammengefasst. In Bezug auf die unter 5.3.2. genannten Zielfeldstärken weist die 10 mT-Spule ein um 8,6% erhöhtes magnetisches Feld im Expositionsvolumen auf. Der geringe Wert für die maximale Standardabweichung der magnetischen Flussdichte im Expositionsvolumen der Spulen weist auf eine hervorragende Feldkonstanz während der Expositionstage hin.

Spule	T_{avg} [°C]	$STD_{max}(T)$ [°C]	B_{avg}	$STD_{max}(B)$
0 T	26,29	0,41	721,49 nT	15,77 nT
10 mT	24,79	0,69	10,43 mT	0,2 mT

Tabelle 5: Monatlicher Mittelwert und maximale Standardabweichung (STD) der Temperatur und der magnetischen Flussdichte im Expositionsvolumen der Spulen für die Vorstudie.

Für **Teilstudie A** wurden die ermittelten Ergebnisse der monatlichen Mittelwerte und der maximalen Standardabweichungen für die Temperatur und die magnetische Flussdichte in den Expositionsvolumen der Spulen A bis D in **Tabelle 17** des Anhangs zusammengefasst.

In **Abb. 6** ist der Verlauf der monatlichen Temperaturmittelwerte im Expositionsvolumen der Spulen grafisch dargestellt. Der Temperaturunterschied in den Spulen ist kleiner als 1°C.

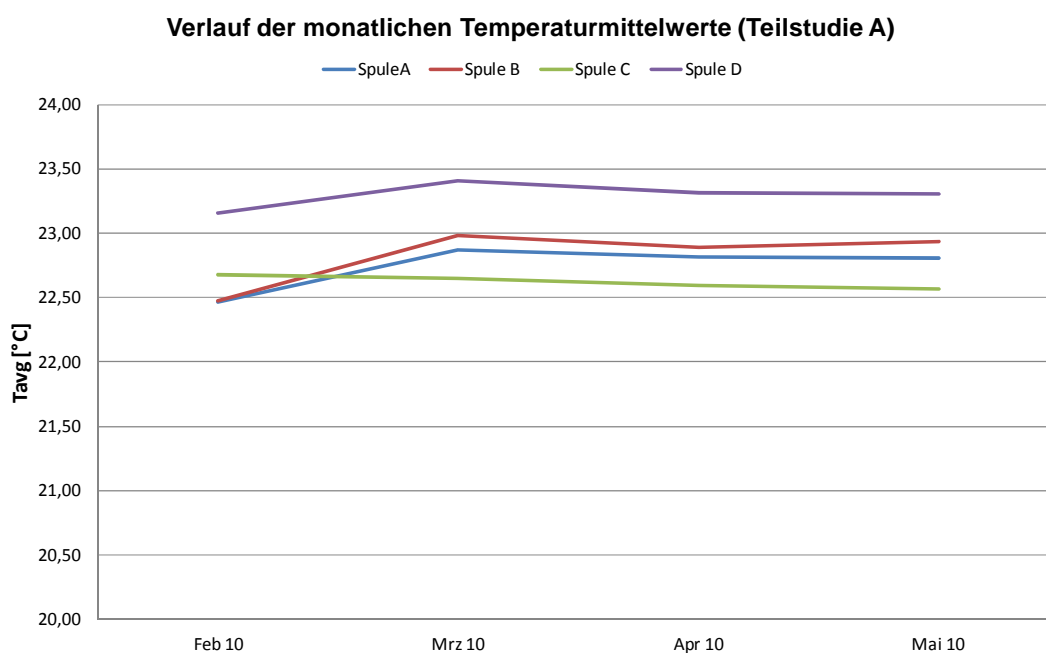


Abb. 6: Verlauf der monatlichen Temperaturmittelwerte im Expositionsvolumen der Spulen für die Teilstudie A.

Abbildung 7 zeigt den Verlauf der monatlichen und auf die zugehörige Zielfeldstärke B_n normierten magnetischen Flussdichtemittelwerte im Expositionsvolumen der aktiven Spulen. Die Felder in den Spulen weisen eine exzellente zeitliche Konstanz während der Teilstudie A auf.

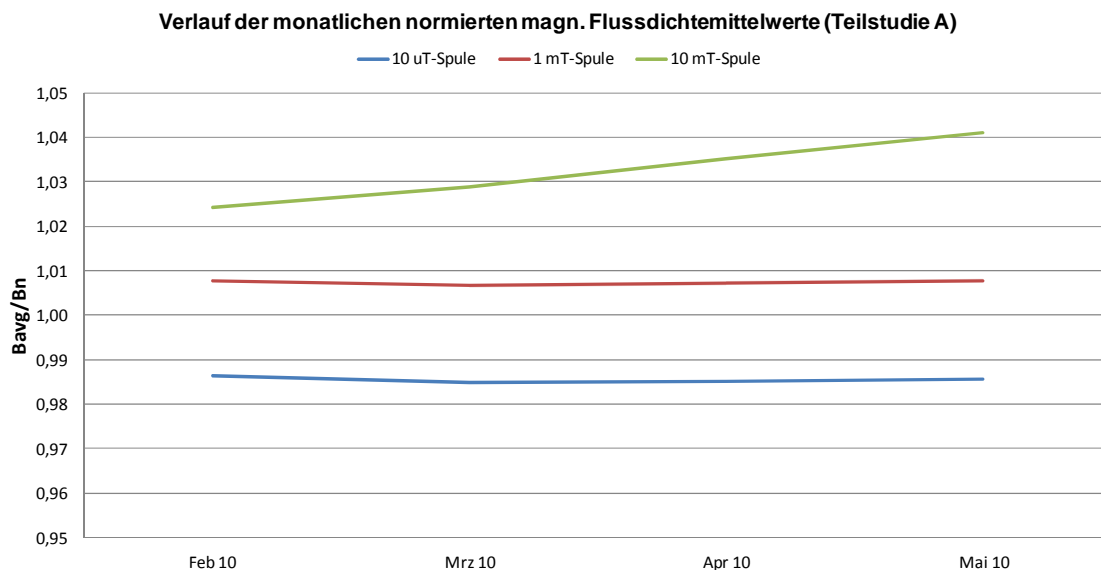


Abb. 7: Verlauf der monatlichen und auf die Zielfeldstärke B_n normierten magnetischen Flussdichtemittelwerte im Expositionsvolumen der aktiven Spulen für die Teilstudie A.

Der Verlauf der monatlichen Mittelwerte der magnetischen Flussdichte im Expositionsvolumen der Spule für die Scheinexposition ist in **Abb. 8** gezeigt.

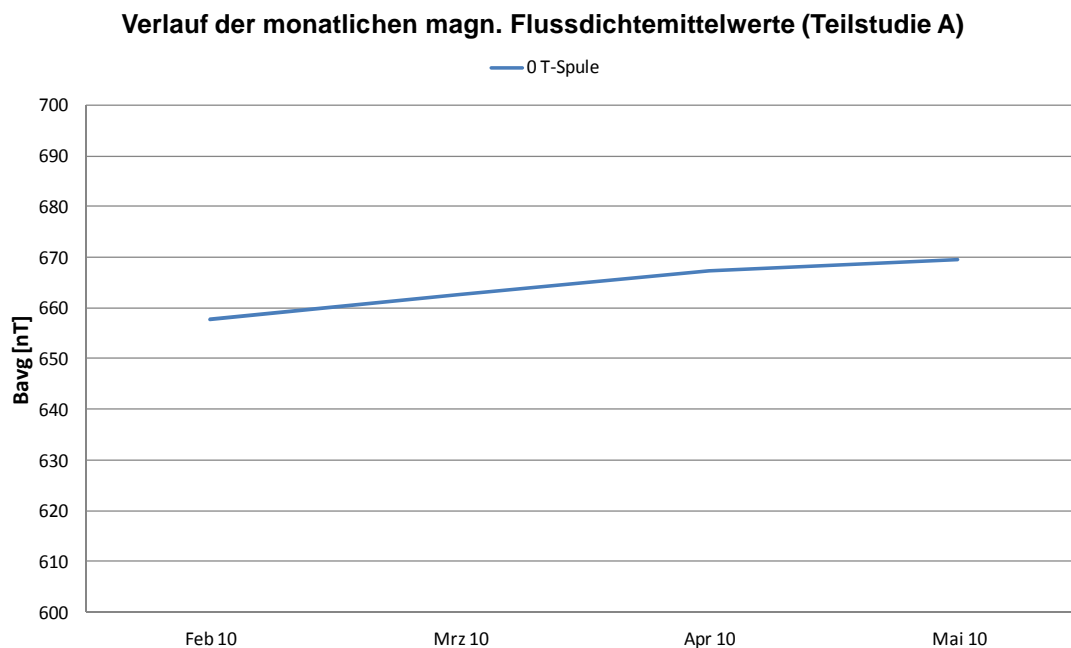


Abb. 8: Verlauf der monatlichen magnetischen Flussdichtemittelwerte im Expositionsvolumen der Spule für die Scheinexposition (Teilstudie A).

Während der Teilstudie A gab es keine Ausfälle der Expositionseinrichtung.

Die ermittelten Ergebnisse der monatlichen Mittelwerte und der maximalen Standardabweichungen für die Temperatur und die magnetische Flussdichte in den Expositionsvolumen der Spulen A bis D für die **Teilstudie B** sind in **Tabelle 47** des Anhangs aufgelistet.

In **Abbildung 9** ist der Verlauf der monatlichen Temperaturmittelwerte im Expositionsvolumen der Spulen grafisch dargestellt.

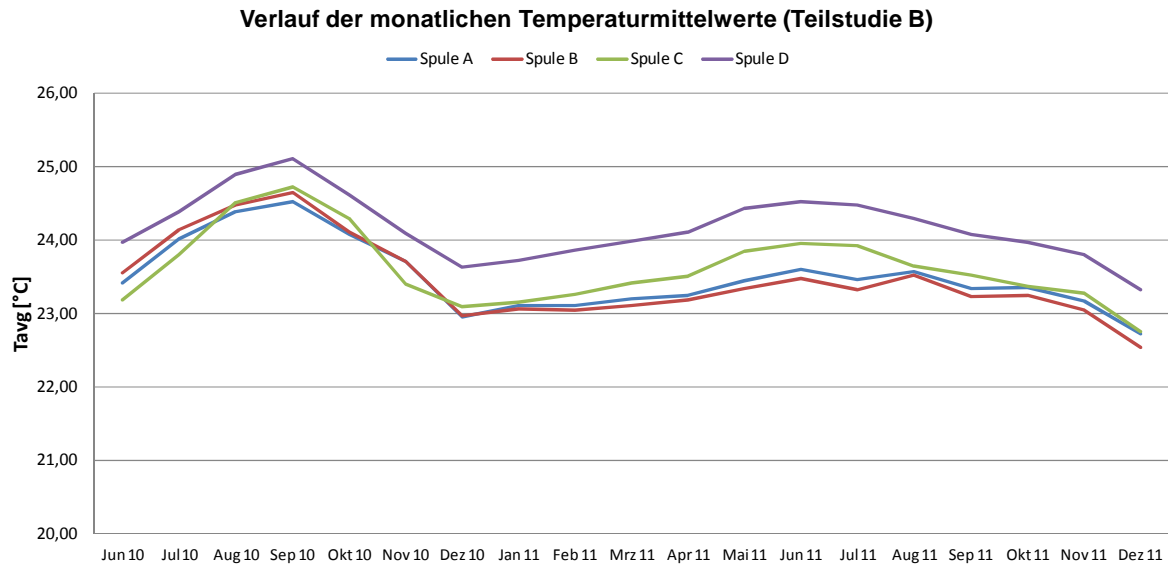


Abb. 9: Verlauf der monatlichen Temperaturmittelwerte im Expositionsvolumen der Spulen für die Teilstudie B.

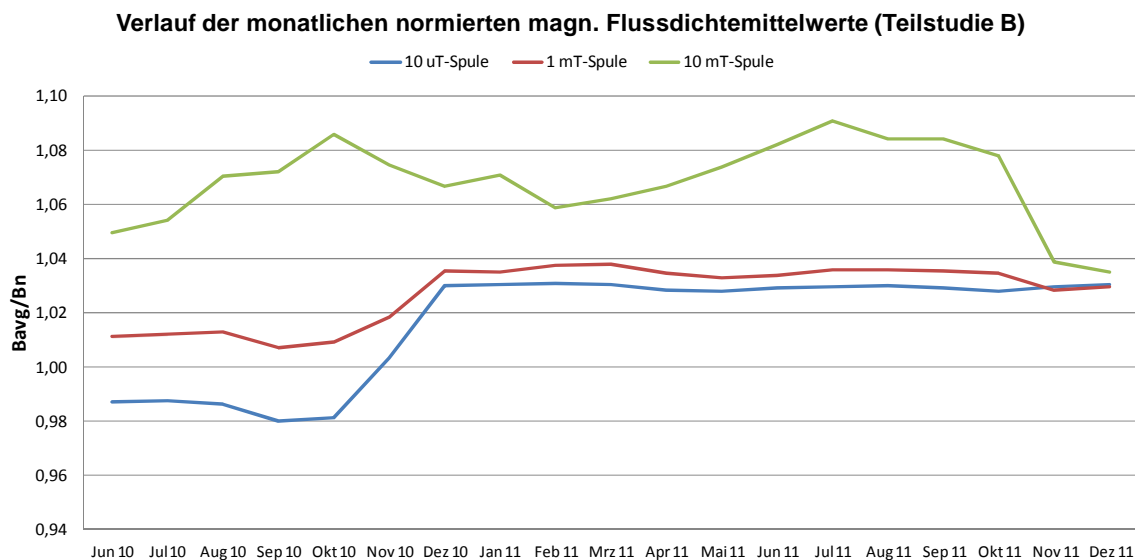


Abb. 10: Verlauf der monatlichen und auf die Zielfeldstärke B_n normierten magnetischen Flussdichtemittelwerte im Expositionsvolumen der aktiven Spulen für die Teilstudie B.

Abbildung 10 zeigt den Verlauf der monatlichen und auf die zugehörige Zielfeldstärke B_n normierten magnetischen Flussdichtemittelwerte im Expositionsvolumen der aktiven Spulen. Auch

in dieser Teilstudie weisen die magnetischen Felder in den Spulen eine gute zeitliche Konstanz auf.

Der Verlauf der monatlichen Mittelwerte der magnetischen Flussdichte im Expositionsvolumen der Spule für die Scheinexposition ist in **Abb. 11** dargestellt.

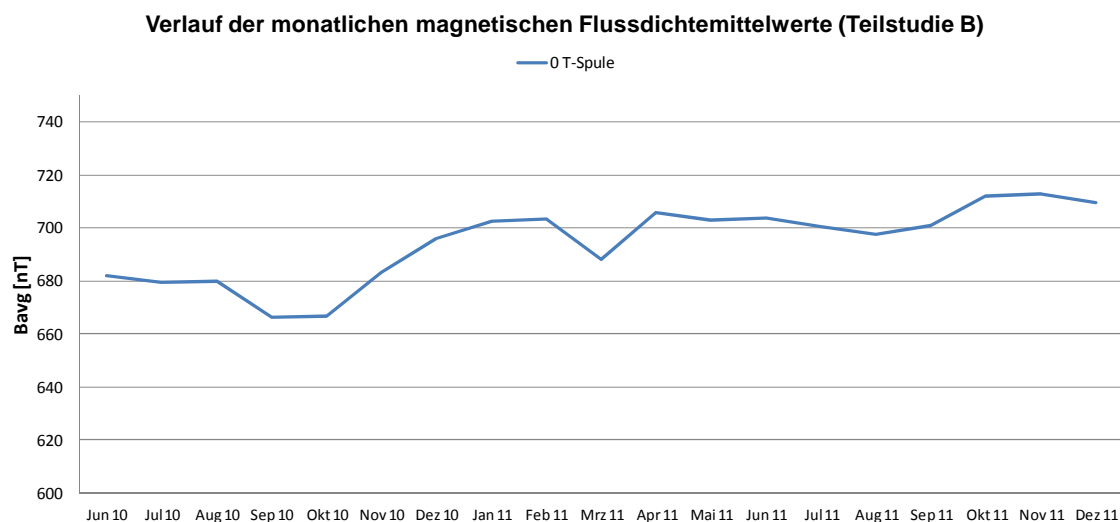


Abb. 11: Verlauf der monatlichen magnetischen Flussdichtemittelwerte im Expositionsvolumen der Spule für die Scheinexposition (Teilstudie B).

Während der Teilstudie B wurden nur wenige Ausfälle registriert, wobei in 3 Fällen ein technischer Defekt vorlag. In der Tabelle 6 sind das Datum und die Dauer des Ausfalls der Spulen zusammengefasst.

Tabelle 6: Datum und Dauer des Ausfalls der Spulen während der Teilstudie B.

Datum des Ausfalls	Dauer des Ausfalls [Std.]	Spule
21.07.2010	24	10 mT
10.09.2010	24	0 T, 10 μ T
19.10.2010	21	0 T, 10 μ T, 1 mT, 10 mT
11.10.2011	24	0 T, 10 μ T
06.11.2011	24	10 mT

10.1.2 Raumparameter

Die Steuerung und Kontrolle der Raumparameter erfolgte ordnungsgemäß. Es traten keine gravierenden Störungen auf. Über den gesamten Versuchsverlauf bestand ein konstantes Lichtregime von jeweils 12h Hell- und 12h Dunkelphase zwischen 6:00 und 18:00 Uhr. Abweichungen der Raumtemperatur über die SOLL-Grenzen von 22 ± 2 °C traten nicht auf. Die SOLL-Grenze der rel. Luftfeuchtigkeit von 40-70 % wurde an 3 Einzeltagen innerhalb des gesamten Untersuchungszeitraumes kurzzeitig leicht über- bzw. unterschritten auf Grund von Wartungsarbeiten in

der Gebäudeleittechnik. Es traten keine für das Wohlergehen der Tiere kritischen Werte oder Zeiträume auf.

10.2 Biologische Endpunkte

10.2.1 Ergebnisse des Vorversuches

Alle Daten der Voruntersuchung in Form von Gruppenvergleichen (**Tabellen 12-16**) und Einzel-tierdaten (**Annex 1-5**) für Körpergewicht, Körpergewichtszunahme, Körpertemperatur und Wasserverbrauch sind im Anhang als beigefügt.

Im Laufe des Versuches wurden keine, von der Norm abweichenden, klinischen Befunde bei den Tieren beobachtet. Kein Tier verstarb oder musste moribund getötet werden. Käfigkontrolle und Expositionsgruppe unterschieden sich nicht im Verhalten.

Das Körpergewicht und die Körpergewichtszunahme verliefen in beiden Versuchsgruppen parallel. Zu Versuchsbeginn lag das durchschnittliche Körpergewicht in der Kontrollgruppe bei 27,1 g und in der exponierten Gruppe bei 26,8 g. Nach 17tägiger Versuchsdauer erreichte die Kontrollgruppe 29,8 g und die exponierte Gruppe 30,0 g (siehe **Abb. 12**).

Die Körpertemperatur der Tiere wurde etwa 20 min nach Abschalten des Magnetfeldes gemessen. Dieser Zeitraum war notwendig, um den sicheren Zugang des Personals durch die Hygieneschleuse in den SPF-Bereich zu gewährleisten. Die Körpertemperatur der Versuchsgruppen unterschied sich nicht: Kontrollgruppe $39,01 \pm 0,44$ °C, Expositionsgruppe mit 10 mT $39,26 \pm 0,32$ °C (siehe **Abb. 13**).

Beim Wasserverbrauch pro Käfig zeigten sich, z.T. signifikante, Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Der Wasserverbrauch der 10 mT-exponierten Tiere war hierbei geringfügig niedriger als in der Kontrollgruppe. Die beobachteten Werte von 4-6 ml Wasser pro Tag pro Tier entsprechen allerdings der natürlichen Schwankungsbreite und da die Tiere weder klinische Befunde noch eine eingeschränkte Körpergewichtszunahme aufwiesen, werden diese Daten als nicht studienrelevante Zufallsbefunde angesehen.

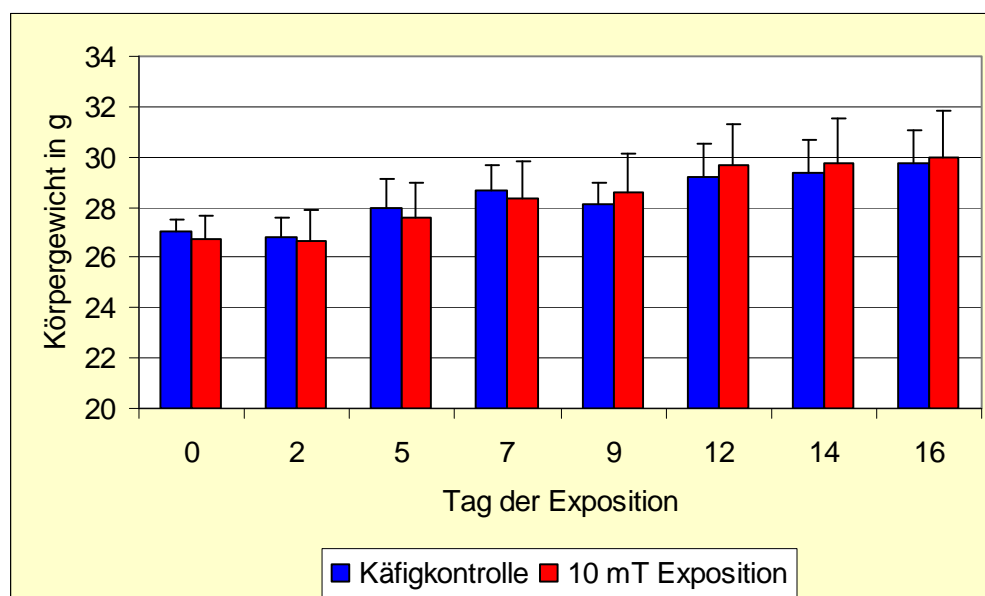


Abb. 12: Darstellung der Körpergewichtsentwicklung in der Käfigkontrolle und bei 10mT-exponierten weiblichen CD-1-Mäusen im Vorversuch

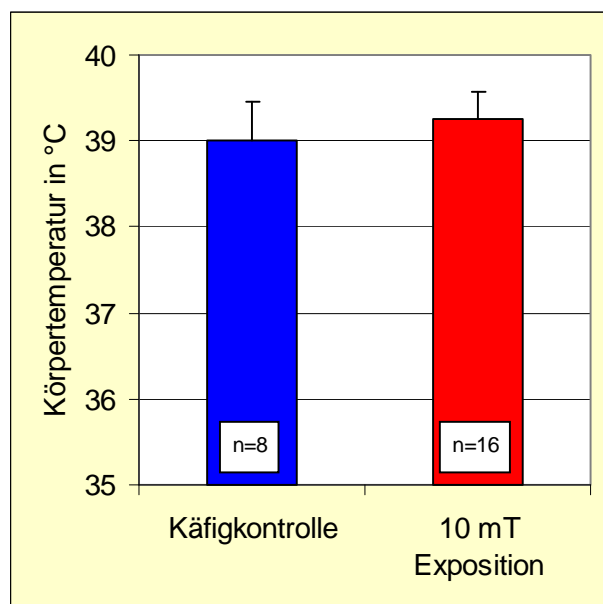


Abb. 13: Vergleich der Körpertemperatur in der Käfigkontrolle und bei 10mT-exponierten weiblichen CD-1-Mäusen im Vorversuch

10.2.2 Ergebnisse des Teilversuches A bis zum Alter von 90 Tagen

10.2.2.1 Untersuchungen der Muttertiere

10.2.2.1.1 Mortalität und klinische Befunde

Während der Trächtigkeit traten keine Todesfälle und keine von der Norm abweichenden klinischen Befunde der Muttertiere auf (**Tabelle 18** und **Annex 7**).

Während der Laktationsphase kam es ebenso zu keinen Todesfällen oder Verschlechterungen des Allgemeinzustandes. Ein Tier der Scheinexposition zeigte eine Verletzung des Schwanzes, ein bei Mäusen häufiger und nicht expositionsbedingter Befund (**Tabelle 19** und **Annex 8**).

10.2.2.1.2 Körpergewicht

Das Körpergewicht und die Körpergewichtsveränderung (**Tabellen 20-21** und **Annex 9-10**) entwickelten sich während der Trächtigkeit über die Erfassungszeitpunkte Tag 10, 14 und 18 in allen Gruppen einheitlich und zeigten keine statistischen Unterschiede (s. **Abb. 14**).

Auch während der Laktationsphase entwickelten sich das Körpergewicht und die Körpergewichtsveränderung in allen Untersuchungsgruppen einheitlich (**Tabellen 22-23** und **Annex 11-12**). Eine leichte Gewichtsabnahme in der Laktationsphase in allen Gruppen ist auf die erhöhte physische Belastung der Muttertiere durch die hohe Milchproduktion in der zweiten Hälfte der Laktationsphase zurückzuführen und ein häufiger Befund in Reproduktionsstudien (s. **Abb. 15**).

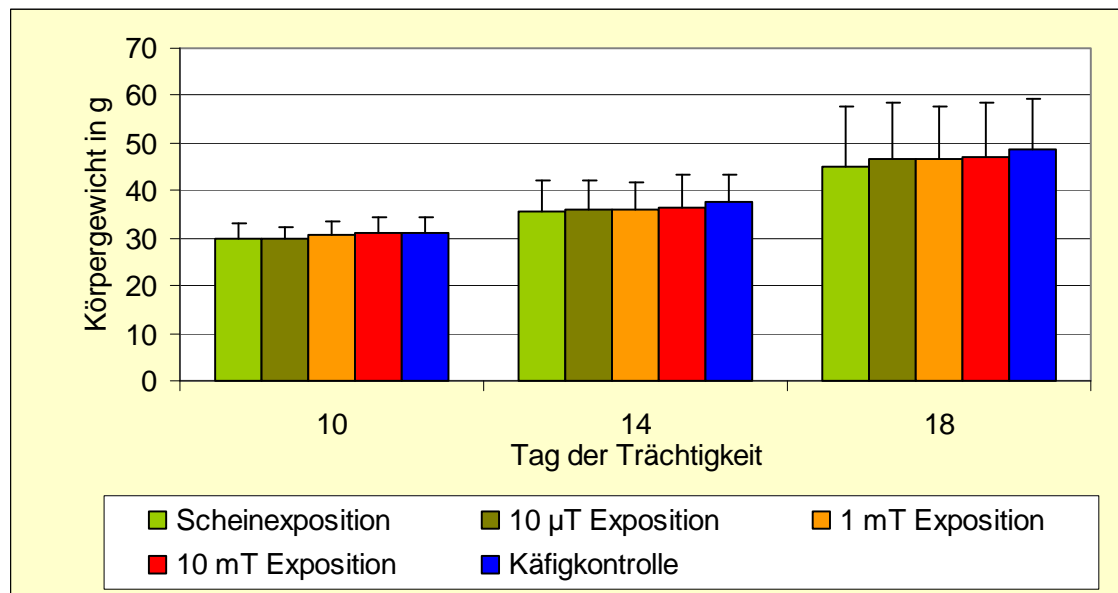


Abb. 14: Entwicklung des Körpergewichtes der Muttertiere während der Trächtigkeit

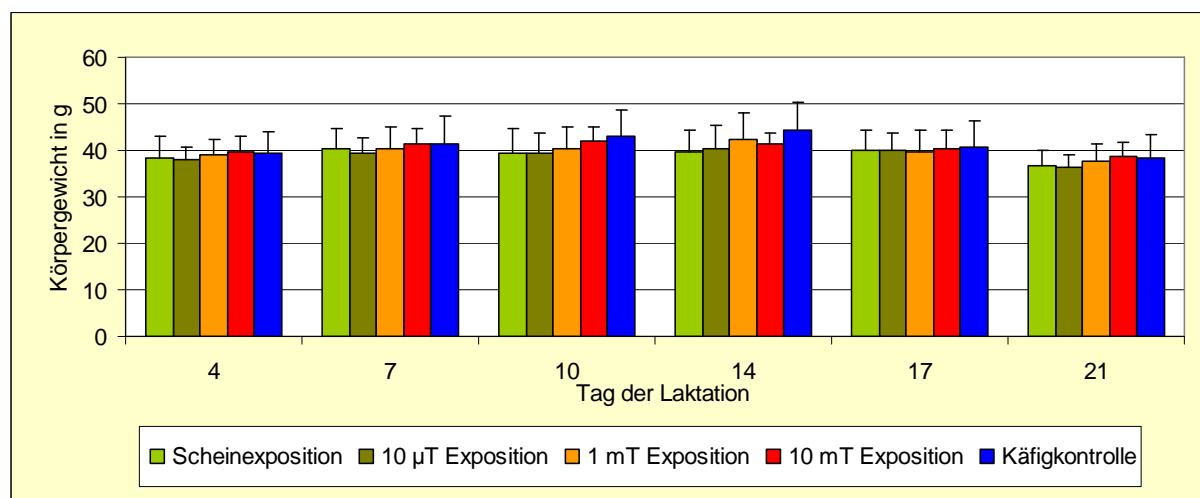


Abb. 15: Entwicklung des Körpergewichtes der Muttertiere während der Laktationsphase

10.2.2.1.3 Reproduktionsdaten

Die Zusammenfassung der Reproduktions- und Wurfdaten ist **Tabelle 24** zu entnehmen. Eine Einzelaufstellung der individuellen Trächtigkeitsdauer, Anzahl von Implantationsstellen sowie lebenden und totgeborenen Jungtieren an Tag 0 ist **Annex 13** zu entnehmen.

Es zeigten sich keine statistischen Unterschiede in den Trächtigkeitsdaten inklusive der Trächtigkeitsdauer, der prä- und postnatalen Mortalität oder der durchschnittlichen Anzahl von Jungtieren pro Wurf bei Geburt oder während der Laktationsphase (s. **Abb. 16**).

Die Trächtigkeitsrate lag zwischen 73 % (Scheinexposition) und 87 % (Käfigkontrolle), mit 80 % in allen drei Dosisgruppen. Der Anteil der Lebendgeborenen lag auf sehr hohem Niveau zwischen 95 % (Scheinexposition) und 100 % (Hochdosisgruppe). Die durchschnittlichen Postimplantationsverluste betragen zwischen 3,1 % in der Niedrigdosis und 8,8 % in der Käfigkontrolle. Hiermit korrelierte die durchschnittliche Wurfgröße mit 10,2 Jungtieren pro Wurf in der Käfigkontrolle und 11,4 in der Niedrigdosis.

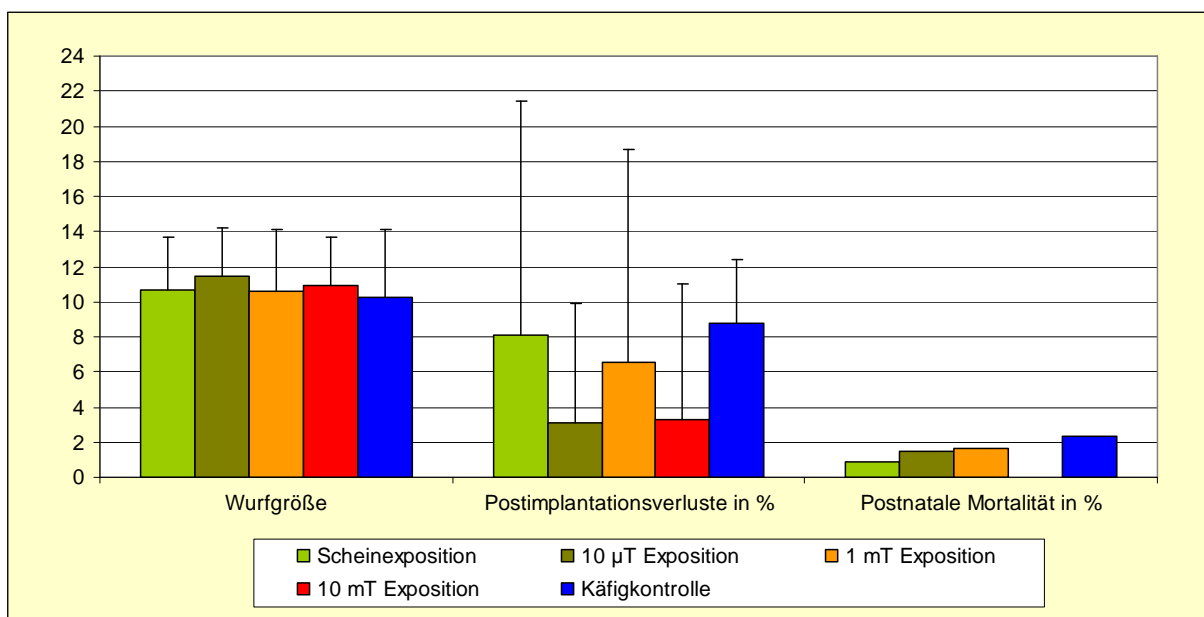
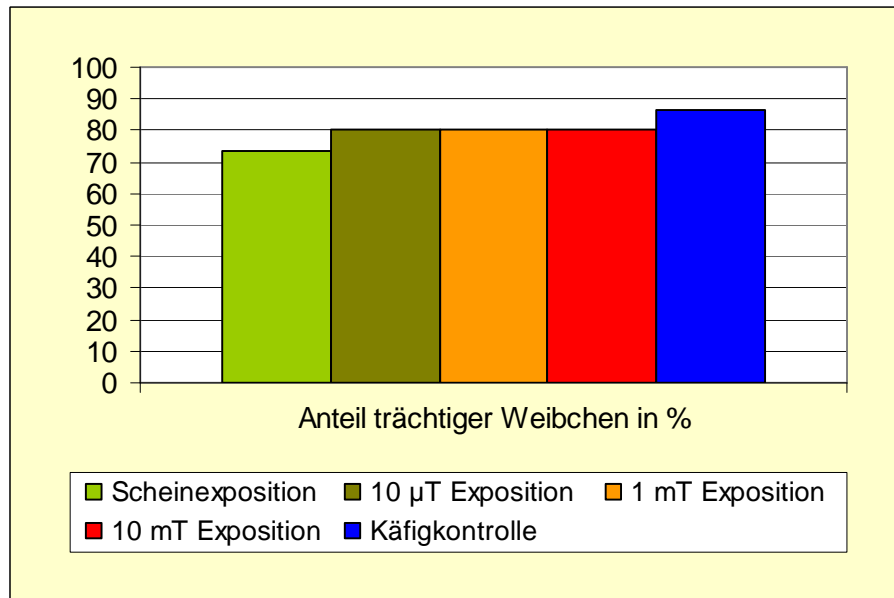


Abb. 16: Darstellung von Anteil der trächtigen Weibchen, durchschnittlicher Wurfgröße, Postimplantationsverlusten und postnataler Mortalität

10.2.2.1.4 Sektionsbefunde

Zum Zeitpunkt der Sektion der Muttertiere an Tag 21 nach der Geburt zeigten sich keine Unterschiede des terminalen Körpergewichtes (**Tabelle 25** und **Annex 14**).

Wie bereits unter den klinischen Befunden erwähnt, zeigte ein Tier der Scheinexpositionsgruppe eine Verletzung des Schwanzes, welche sich bei der Sektion als Fraktur der Schwanzspitze herausstellte. Ein weiteres Muttertier der Scheinexpositionsgruppe zeigte eine dilatative Erweiterung von Zervix und beiden Uterushörnern mit gleichzeitigen Anzeichen einer Eiteransammlung, ein weiteres Muttertier der Scheinexpositionsgruppe nur eine dilatative Erweiterung beider Uterushörner ohne Entzündungszeichen. Zwei Tiere der Käfigkontrolle wiesen ebenfalls eine geringgradige Erweiterung beider Uterushörner auf (**Tabelle 26** und **Annex 15**). Alle Befunde werden als Zufallsbefunde angesehen.

10.2.2.2 Untersuchungen der Nachkommen

10.2.2.3 In-live Untersuchungen

10.2.2.3.1 Mortalität und klinische Befunde

10.2.2.3.1.1 Jungtiere bis zum Absetzen der Würfe vom Muttertier

Die Ergebnisse der klinischen Befundungen sind in **Tabelle 27** und **Annex 16** aufgeführt. Die Jungtiere der Magnetfeld-exponierten Gruppen sowie der Scheinexposition und in der Käfigkontrolle entwickelten sich gut und ohne besondere Auffälligkeiten. Jeweils 1 Jungtier in der Niedrigdosisgruppe (10 μ T) und in der Käfigkontrolle wurde zwischen dem 4. und 8. Tag post partum tot aufgefunden. Diese Mortalitätsrate ist als sehr gering für Studien in Mäusen anzusehen. Zwei Jungtiere in der Hochdosisgruppe (10 mT) waren klein im Vergleich zu den Durchschnittswerten. Ein Jungtier in der mittleren Dosisgruppe (1 mT) zeigte in der dritten Lebenswoche eine Verletzung des Schwanzes. Beide Befunde stellen keine ungewöhnliche Symptomatik dar und werden als nicht expositionsbedingt angesehen.

10.2.2.3.1.2 Juvenile und adulte Tiere

Die Ergebnisse der klinischen Befundungen der juvenilen Tiere sind in **Tabelle 28** und **Annex 17** aufgeführt. Die Jungtiere in allen untersuchten Gruppen entwickelten sich ohne besondere Auffälligkeiten. Ein Tier in der Scheinexpositionsgruppe verlor ab der 6. Woche nach der Geburt an Gewicht und musste an Tag 48 moribund getötet werden. Bei der Untersuchung stellten sich Wachstumsveränderungen/Fehlstellungen der Zähne dar, die eine ausreichende Futteraufnahme einschränkten. Dies wird als Zufallsbefund angesehen.

10.2.2.3.2 Körpergewicht

10.2.2.3.2.1 Jungtiere bis zum Absetzen der Würfe vom Muttertier

Die Ergebnisse der Körpergewichtsmessungen auf Jungtierbasis und Wurfbasis sind in den **Tabellen 29-32** und **Annex 18-21** aufgeführt. Die Jungtiergewichte der Scheinexpositionsgruppe und der Magnetfeld-exponierten Gruppen entwickelten sich ohne statistische Unterschiede. Ab Tag 10 zeigte sich, ermittelt auf Basis der Einzeltierdaten, ein statistisch leicht erhöhtes Jungtiergewicht in der Käfigkontrolle. Dies beruhte auf einer, zufallsbedingt, erhöhten Anzahl kleiner Würfe in der Käfigkontrollgruppe mit einem hierdurch erhöhten Einzeltiergewicht. Auf Basis der Gesamtwurfgewichte zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Ein analoges Bild zeigte sich bei Berechnung der Körpergewichtszunahmen. Zwischen Tag 10 und 14 war hierbei die Körpergewichtszunahme auf Basis der Einzeltierdaten in der Käfigkontrolle statistisch signifikant leicht erhöht. Bei Betrachtung auf Basis der Gesamtwurfkörpergewichtszunahmen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (s. **Abb. 17 + 18**).

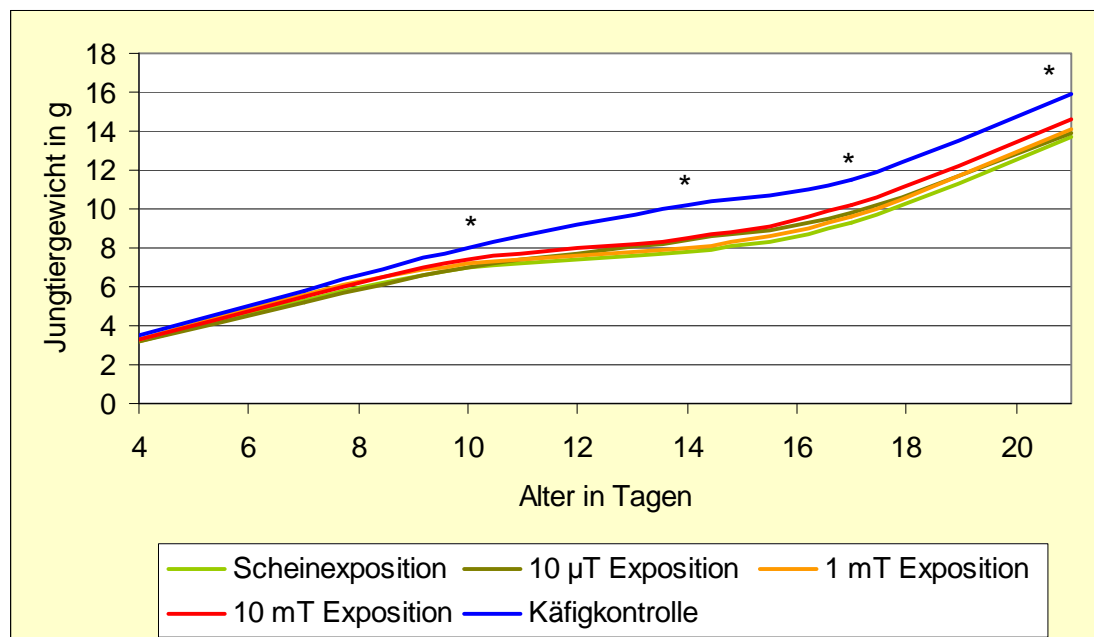


Abb. 17: Entwicklung der Jungtiergewichte während der Laktation auf Einzeltierbasis, * $p < 0,05$ vs. Scheinexposition

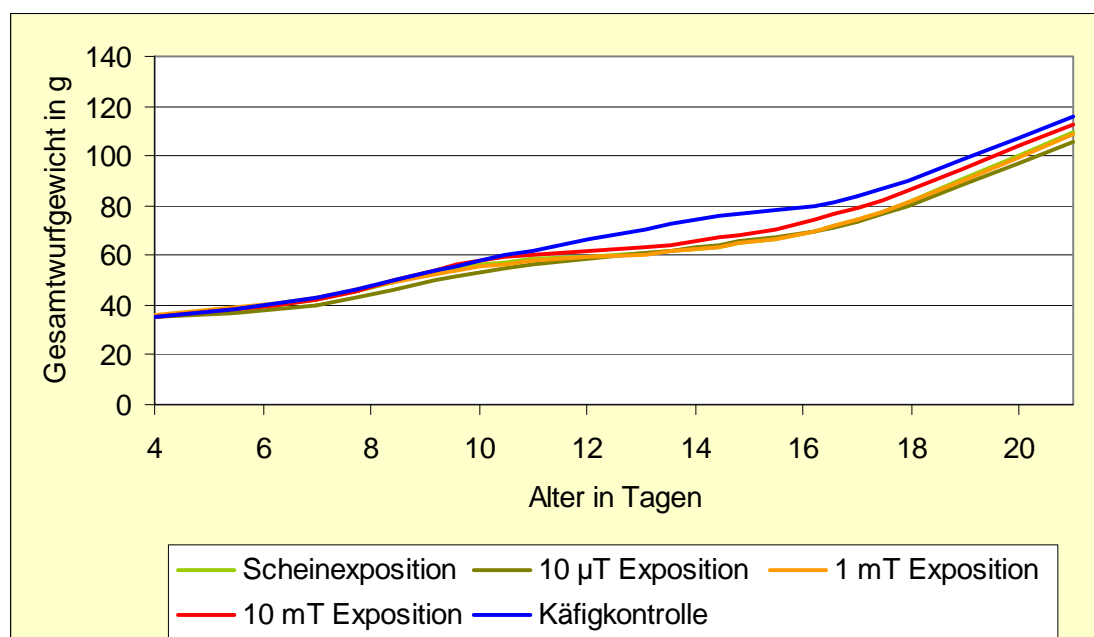


Abb. 18: Entwicklung der Jungtiergewichte während der Laktation auf Wurfbasis

10.2.2.3.2.2 Juvenile und adulte Tiere

Die Ergebnisse der Körpergewichtsmessungen sind in den **Tabellen 33-34** und **Annex 22-23** aufgeführt. Die Körpergewichtsentwicklung von der 4. bis 13. Lebenswoche war zwischen der Scheinexpositionsgruppe und den Magnetfeld-exponierten Gruppen vergleichbar. Nur zu einem

Zeitpunkt (Ende der 4. Woche) zeigte sich ein statistisch signifikant leicht erhöhtes Körpergewicht in der Hochdosisgruppe (10 mT). Da es sich um einen isolierten und transienten Effekt handelte, wird dieser Befund als nicht expositionsbedingt angesehen. Die Tiere der Käfigkontrolle zeigten, wie schon in der Phase vor dem Absetzen vom Muttertier, ein leicht erhöhtes Körpergewicht im Vergleich zur Scheinexposition, beruhend auf einem erhöhten Ausgangsgewicht. Bei Betrachtung der Körpergewichtsveränderungen über den Zeitraum zeigen sich keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen (Scheinexposition, Magnetfeld-exponierte Gruppen, Käfigkontrolle) in der Gesamtgewichtszunahme in Gramm und der prozentualen Zunahme. Eine einzelne signifikant reduzierte Gewichtszunahme zwischen der 4. und 5. Woche in der Niedrigdosisgruppe (10 μ T) gegenüber der Scheinexposition wird als nicht expositionsbedingt angesehen (s. **Abb. 19**).

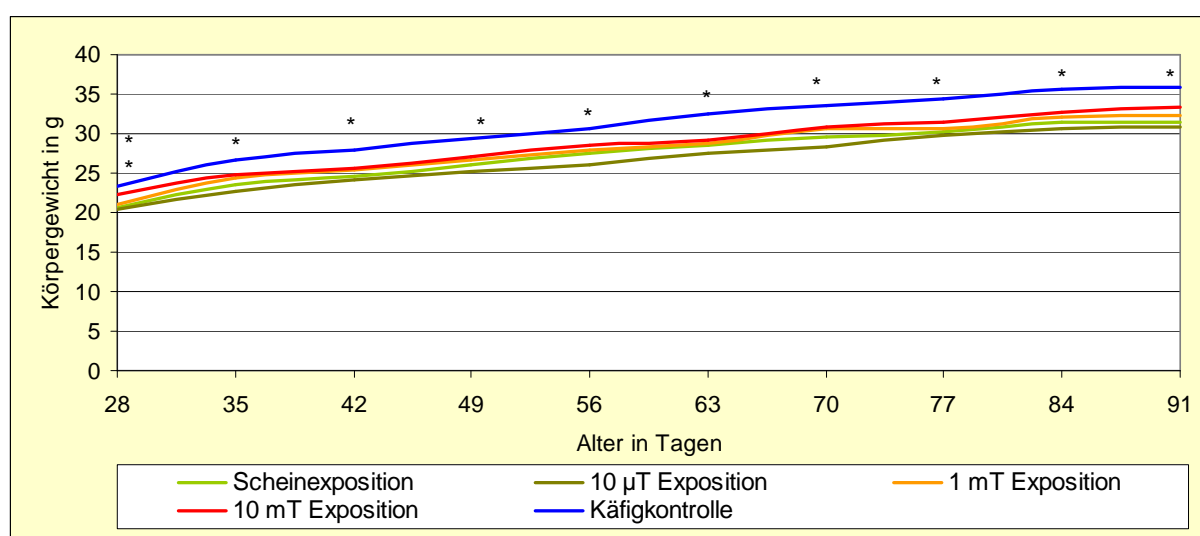


Abb. 19: Entwicklung der Jungtiergewichte nach dem Absetzen vom Muttertier bis zu einem Alter von 90 Tagen, * $p < 0,05$ vs. Scheinexposition

10.2.2.4 Post-mortem Untersuchungen

10.2.2.4.1 Untersuchungen des blutbildenden Systems

Die Ergebnisse der Blutbilduntersuchungen sind in den **Tabellen 35-37** und **Annex 24-26** aufgeführt. Die hämatologischen Daten entsprachen den natürlichen Schwankungen, welche für diese Tierspezies, Rasse, Geschlecht und Alter zu erwarten waren. Daher werden die nachfolgend beschriebenen Befunde, obwohl z.T. statistisch signifikant unterschiedlich von den Scheinexpositionsdaten, als nicht toxikologisch relevant eingestuft.

10.2.2.4.1.1 Differentialblutbild und Retikulozytenauswertung

An Tag 28 waren die Anzahl der weißen Blutzellen (WBC), die Anzahl der Lymphozyten (LYMC) und die Anzahl der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (SEGC) in der mittleren Dosisgruppe (1 mT) verringert. Die Anzahl der weißen Blutzellen (WBC) und die Anzahl der Lympho-

zyten (LYMC) in der Käfigkontrolle waren hingegen statistisch signifikant erhöht. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Anzahl der stabkernigen neutrophilen Granulozyten, bei den eosinophilen und basophilen Granulozyten, sowie bei den Monozyten, den reaktiven Lymphozytenformen und den Retikulozyten. Bei Auswertung der relativen Anzahl der Zelltypen zeigten sich keinerlei Unterschiede (s. **Abb. 20**).

An Tag 90 zeigte sich lediglich eine leicht verringerte absolute Anzahl von Retikulozyten in der mittleren (1 mT) und Hochdosisgruppe (10 mT). Bei Betrachtung der relativen Retikulozytenanzahl war dieser Wert nur in der mittleren Dosisgruppe (1mT) statistisch signifikant verändert. Es zeigten sich keine Unterschiede in den absoluten und relativen Werten für die Anzahl der weißen Blutzellen, Lymphozyten, segment- und stabkernigen neutrophilen Granulozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten oder den Monozyten und reaktiven Lymphozytenformen (s. **Abb. 21**).

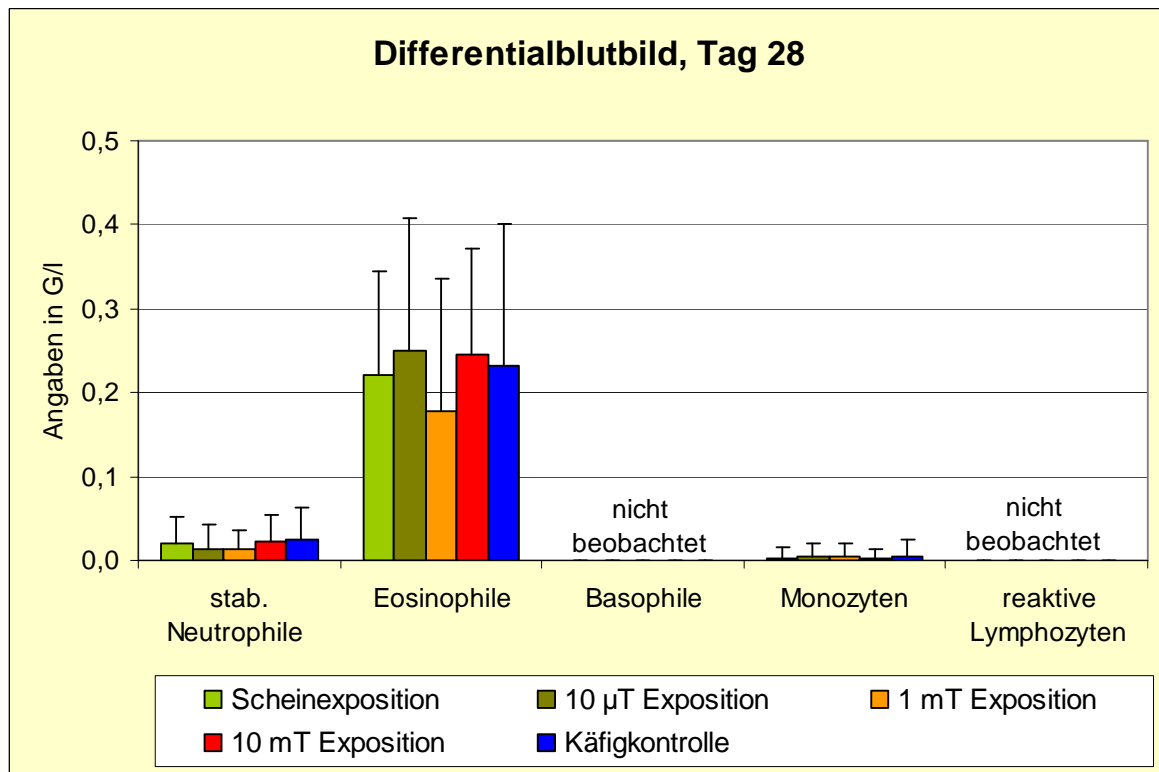
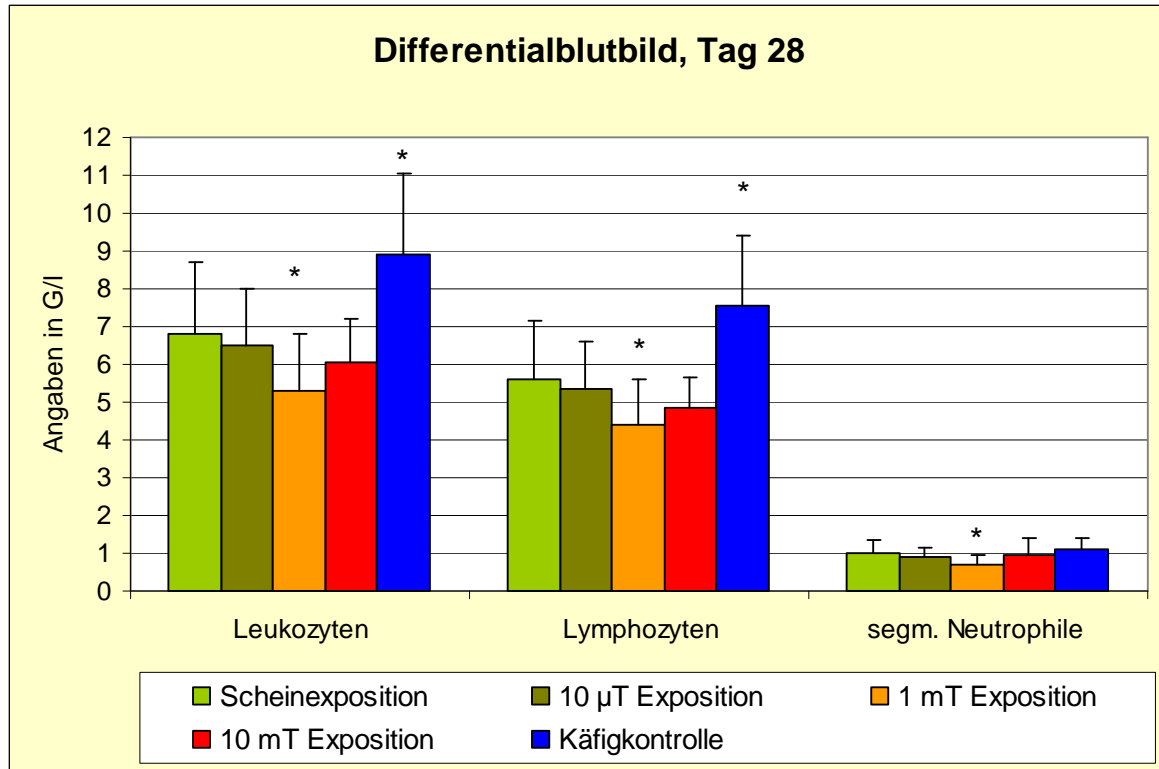


Abb. 20: Darstellung der Ergebnisse des Differentialblutbildes im Alter von 28 Tagen, Angaben als absolute Werte, * $p < 0,05$ vs. Scheinexposition

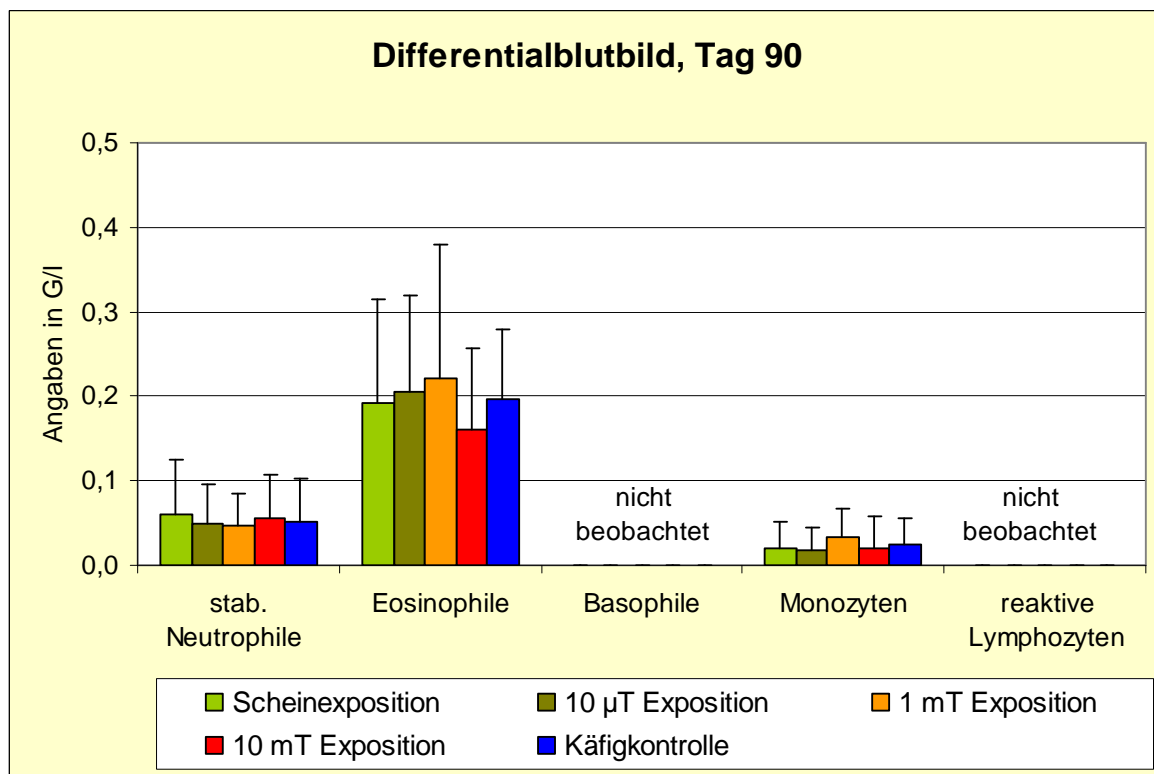
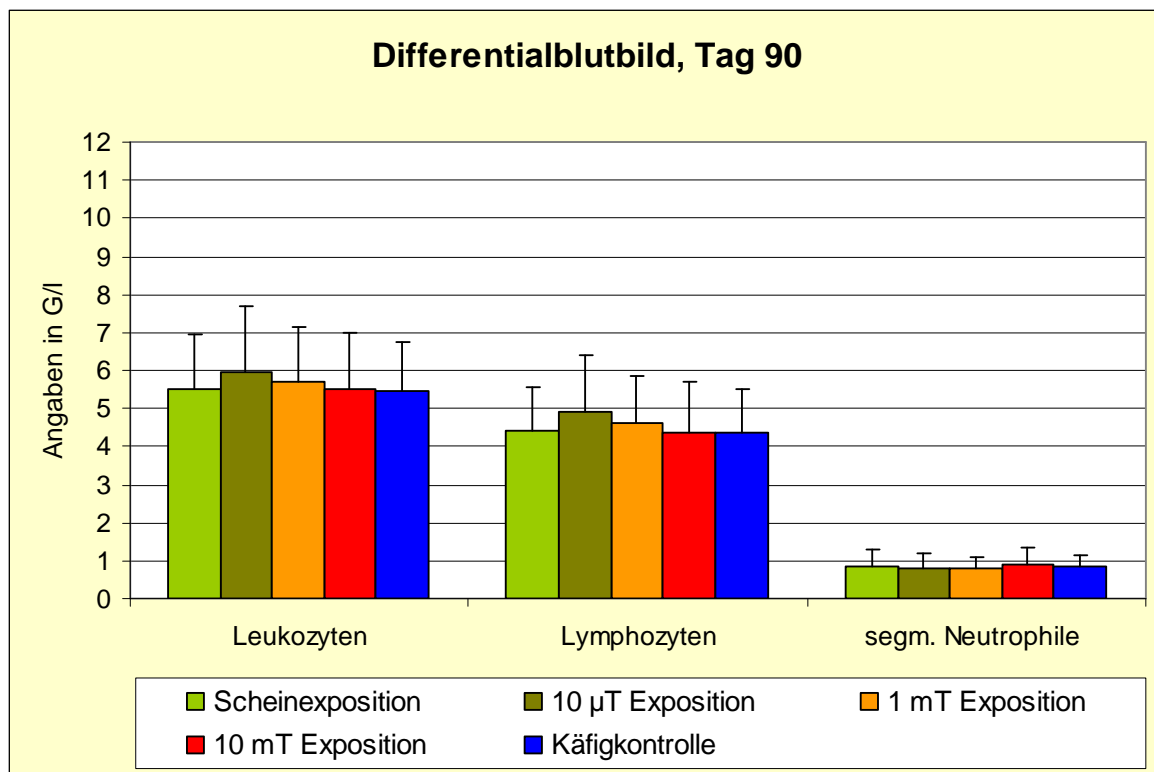


Abb. 21: Darstellung der Ergebnisse des Differentialblutbildes im Alter von 90 Tagen, Angaben als absolute Werte

10.2.2.4.1.2 Bestimmungen im kleinen Blutbild

An Tag 28 wurde eine marginale aber statistisch signifikante Abnahme des Erythrozyten-Hämoglobin-Wertes (MCH) und der mittleren Erythrozyten-Hämoglobin-Konzentration (MCHC) in der Hochdosisgruppe (10 mT) beobachtet. Es zeigten sich keine Unterschiede in der Anzahl der roten Blutzellen (RBC), im Hämoglobingehalt (HB) und Hämatokrit (HCT), im mittleren Erythrozytenvolumen (MCV) und in der Anzahl der Thrombozyten (PLT).

10.2.2.4.2 Untersuchungen des Immunsystems

10.2.2.4.2.1 Durchflusszytometrische Messung des Immunstatus in Blut und Milz

Die Mittelwerte der Rohdaten abzüglich der Isotyp-Kontrollen aus dem Blut sind in **Tabelle 38 (Tag 28)** und **Tabelle 39 (Tag 90)** dargestellt und die Mittelwerte der Rohdaten abzüglich der Isotyp-Kontrollen aus der Milz sind in **Tabelle 40 (Tag 28)** und **Tabelle 41 (Tag 90)** dargestellt. Die Einzeltierdaten sind **Annex 27-30** zu entnehmen.

Niederfrequente elektromagnetische Felder mit verschiedenen Feldintensitäten hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die prozentuale Zusammensetzung folgender Lymphozyten-Subpopulationen aus dem peripheren Blut 28 Tage alter Mäuse: (1) 31.2 bis 34.9 % der Leukozyten waren CD4⁺ T-Helferzellen; (2) 9.4 bis 10.2 % der Leukozyten waren CD8⁺ zytotoxische Zellen/Suppressorzellen; (3) 27.1 bis 32.4 % der Leukozyten waren B220⁺ B-Lymphozyten; (4) 40,4 bis 45,1 % der Leukozyten waren CD3⁺ T-Lymphozyten. Die Anzahl MHCII⁺ Zellen, die antigenpräsentierende Zellen darstellen, lag zwischen 50,6 bis 60,1 % und war zwischen der Scheinexpositionsgruppe und der niedrigen Dosisgruppe (10 µT) statistisch signifikant verändert. Darüber hinaus wurde eine tendenzielle Reduktion einzelner Zellpopulationen (besonders der B-Lymphozyten und CD3⁺ T-Lymphozyten) in der mittleren (1 mT) und Hochdosisgruppe (10 mT) beobachtet. Zudem zeigte sich eine deutlich stärkere Streuung der einzelnen Zellpopulationen von Magnetfeld-exponierten Tieren.

In 90 Tage alten Tieren zeigte sich nach Exposition mit niederfrequenten elektromagnetischen Feldern verschiedener Feldintensitäten eine ähnliche Zusammensetzung der Lymphozyten-Subpopulationen im peripheren Blut wie in 28 Tage alten Tieren. Es waren statistisch signifikante Veränderungen im prozentualen Anteil der CD8⁺ bzw. CD3⁺/CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen/Suppressorzellen zu beobachten. Eine Befeldung mit 10 mT reduzierte den prozentualen Anteil CD8⁺ bzw. CD3⁺/CD8⁺ Lymphozyten im peripheren Blut von 13.7 % bzw. 13.2 % (schein-exponierte Tiere) auf ca. 10 % (s. **Abb. 22**).

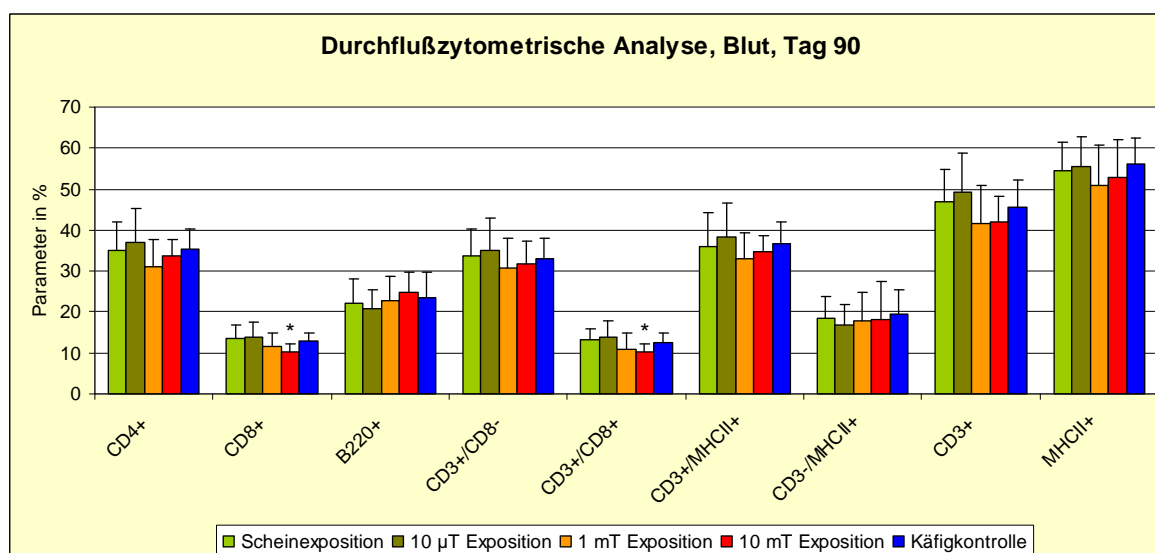
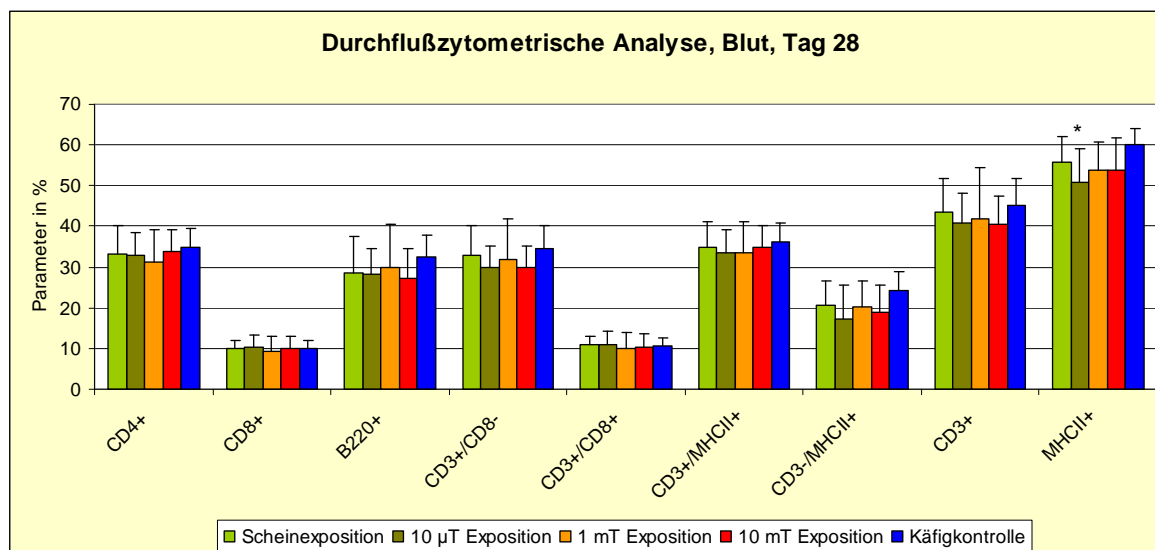


Abb. 22: Darstellung der Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchungen des peripheren Blutes im Alter von 28 und 90 Tagen, * $p < 0,05$ vs. Scheinexposition

Die Immunphänotypisierung der isolierten Milzzellen aus 28 Tage alten Mäusen, die niederfrequenten elektromagnetischen Feldern verschiedener Feldintensitäten ausgesetzt waren, ergab folgende Resultate: (1) 10,5 bis 12,4 % der Zellen waren $CD4^+$ T-Helferzellen; (2) < 3 % waren $CD8^+$ zytotoxische Zellen/Suppressorzellen und (3) 20,1 bis 23,5 % waren $B220^+$ B-Lymphozyten. Die Lymphozytentypisierung zeigte einen Anteil $CD3^+$ T-Lymphozyten zwischen 10,5 und 13,6 %. Die Anzahl $MHCII^+$ Zellen war in allen Gruppen relativ konstant zwischen 28,4 und 31,7 %. Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Veränderungen der Zusammensetzung der Lymphozyten-Subpopulationen. Auch $MHCII^+$ Zellen (antigenpräsentierende Zellen) waren nicht beeinflusst.

In 90 Tage alten Tieren zeigte sich in der Milz nach Exposition mit niederfrequenten elektromagnetischen Feldern verschiedener Feldintensitäten folgende Zusammensetzung der Lymphozy-

ten-Subpopulationen: (1) 17,1 bis 22,6 % der Leukozyten waren CD4⁺ T-Helferzellen; (2) 4,3 bis 6,8 % waren CD8⁺ zytotoxische T-Lymphozyten; (3) 27,0 bis 30,0 % der Zellen waren B-Lymphozyten; (4) ca. 50 % waren MHCII⁺ antigenpräsentierende Zellen. Statistisch signifikante Veränderungen waren im prozentualen Anteil der CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen/Suppressorzellen zu beobachten. Eine Befeldung mit 10 mT und 1 mT reduzierte den prozentualen Anteil CD8⁺ in der Milz von 6,8 % (scheinexponierte Tiere,) auf 3,8 % (Hochdosisgruppe, 10 mT) bzw. 4,3 (mittlere Dosisgruppe, 1 mT,). Zudem wurde eine tendenzielle Reduktion der MHCII⁺ Zellpopulation durch niederfrequente elektromagnetische Felder mit verschiedenen Feldintensitäten beobachtet (s. **Abb. 23**).

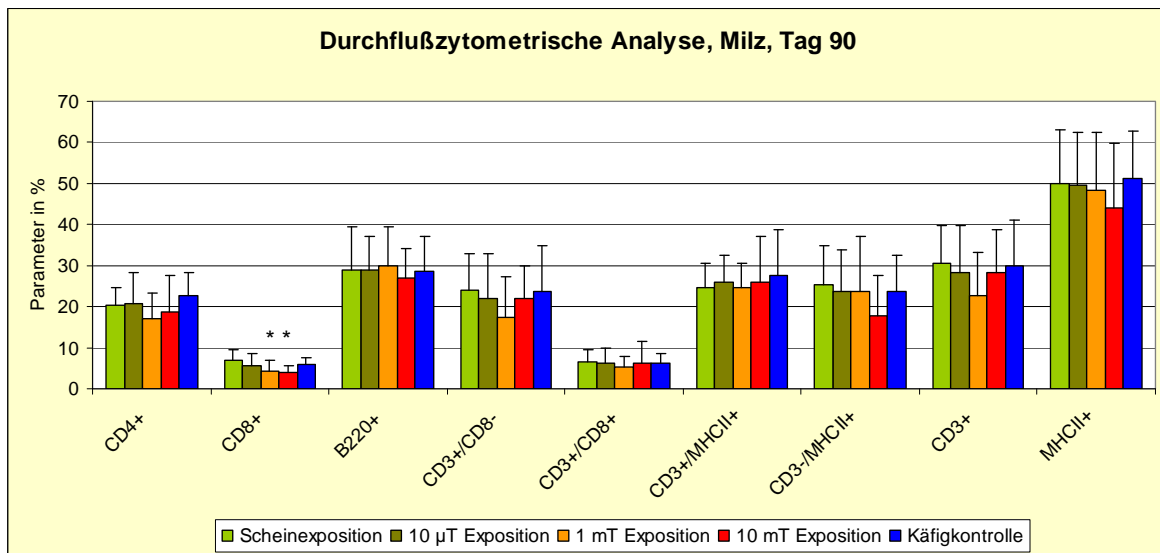
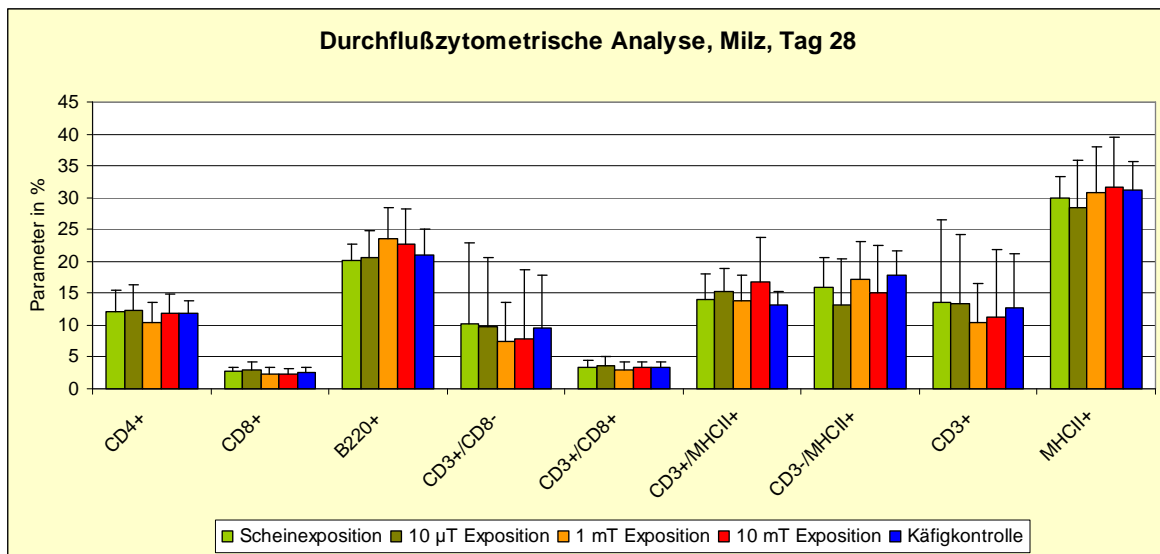


Abb. 23: Darstellung der Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchungen von Milzzellen im Alter von 28 und 90 Tagen, * $p < 0,05$ vs. Scheinexposition

10.2.2.4.2 Messung der Proliferation von Milzzellen

Die Einzeltierrohdaten sind im **Annex 31** (28 Tage) und **32** (90 Tage) dargestellt. Die Mittelwerte der Rohdaten sind in **Tabelle 42** (28 Tage) und **Tabelle 43** (90 Tage) dargestellt. Zusätzlich ist in den Tabellen jeweils das Wachstum als Proliferationsindex (PI = Proliferation stimulierter Zellen/Proliferation unstimulierter Zellen) angegeben.

Auf Grund des geringen Körpergewichtes der Tiere nach 28 Tagen und damit einhergehend einer geringen Größe der juvenilen Milz reichte die Zellzahl nach Aufbereitung des Milzgewebes nicht aus, alle 4 Untersuchungsansätze (Medium, ConA, PWM und LPS) in den notwendigen Triplikaten durchzuführen. Im Vergleich zum Lektin Pokeweed Mitogen wird das Lektin Concanavalin A häufiger eingesetzt und es liegen sowohl in der Literatur als auch am Institut mehr Vergleichs- und Kontrolldaten vor. Daher wurde auf den Stimulationsversuch mit PWM zu Gunsten von ConA verzichtet. Die Untersuchungen zur Spontanproliferation und nach Stimulation mit Lipopolysaccharid wurden wie geplant durchgeführt. Die Aussagekraft der Untersuchungen wurde hierdurch nicht eingeschränkt.

Niederfrequente elektromagnetische Felder mit verschiedenen Feldintensitäten hatten keinen Einfluss auf ConA-, PWM- und LPS-induziertes Proliferationsverhalten von Milz-Lymphozyten aus 28 und 90 Tage alten Mäusen nach Exposition.

10.2.2.4.3 Sektionsbefunde

Die Ergebnisse sind den **Tabellen 44 und 45**, sowie die Einzeltierdaten dem **Annex 33** zu entnehmen. Jeweils um Tag 28 und 90 wurden 20 weibliche Jungtiere pro Gruppe getötet, die terminalen Körpergewichte ermittelt und eine makroskopische Befundung der Tiere vorgenommen. Es zeigten sich bei den Körpergewichten keine Unterschiede zwischen der Scheinexposition und den Magnetfeld-exponierten Gruppen. Die Tiere der Käfigkontrolle wiesen, wie auch schon bei den interimären Körpergewichtsbestimmungen, ein statistisch signifikant leicht erhöhtes Körpergewicht auf.

Bei der makroskopischen Befundung zeigte das bereits beschriebene, moribund an Tag 48 getötete Tier aus der Scheinexposition Fehlstellungen der Zähne sowie eine zusätzliche Knochenverdickung an einer Extremität. Ein Tier der Hochdosisgruppe 2 (10 mT) zeigte eine vergrößerte Milz. Dies wird als Zufallsbefunde bewertet. Einzelne Tiere aus allen Gruppen wiesen zyklusbedingte Dilatationen oder Verdickungen der Uteri auf. Dies wird ebenfalls als biologisch und toxikologisch nicht relevanter Befund angesehen. Die Zusammenfassung der Sektionsbefunde ist Tabelle 46 und die Einzeltierdaten sind Annex 34 zu entnehmen.

10.2.3 Ergebnisse des Teilversuches B bis zum Alter von 18 Monaten

10.2.3.1 Untersuchungen der Muttertiere

10.2.3.1.1 Mortalität und klinische Befunde

Während der Trächtigkeit traten keine Todesfälle und keine von der Norm abweichenden klinischen Befunde der Muttertiere auf (**Tabelle 48** und **Annex 35**).

Während der Laktationsphase wurden jeweils in der Niedrigdosisgruppe (10 μ T) an Tag 14, in der mittleren Dosisgruppe (1 mT) an Tag 15 und in der Käfigkontrolle an Tag 21 ein Muttertier tot aufgefunden. Diese Todesfälle werden auf den erhöhten physiologischen Streß während der Jungtieraufzucht zurückgeführt. Die Todesfälle stellen keinen außergewöhnlichen Befund in Nagerstudien dar und werden als nicht expositionsbedingt angesehen. Die Würfe an Tag 14 und 15 mussten schmerzlos getötet werden, da ein Überleben der Jungtiere ohne die maternale Versorgung zu diesem frühen Zeitpunkt der Entwicklung nicht gewährleistet war. Der Wurf des am Tag 21 verstorbenen Muttertieres aus der Käfigkontrolle wurde beibehalten, da hier die Jungtiere bereits weit genug entwickelt waren und Tag 21 dem Standard-Absetzdatum vom Muttertier entsprach. Ein weiteres Muttertier der Niedrigdosisgruppe (10 μ T) zeigte eine Verletzung des Schwanzes, einen ebenfalls häufig vorkommenden Zufallsbefund in Nagerstudien. Die Gruppenzusammenfassung ist Tabelle 49 und die Einzeltierdaten Annex 36 zu entnehmen.

10.2.3.1.2 Körpergewicht

Das Körpergewicht und die Körpergewichtsveränderung (**Tabellen 50-51** und **Annex 37-38**) entwickelten sich während der Trächtigkeit über die Erfassungszeitpunkte Tag 10, 14 und 18 in allen Gruppen einheitlich und zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede (s. **Abb. 24**).

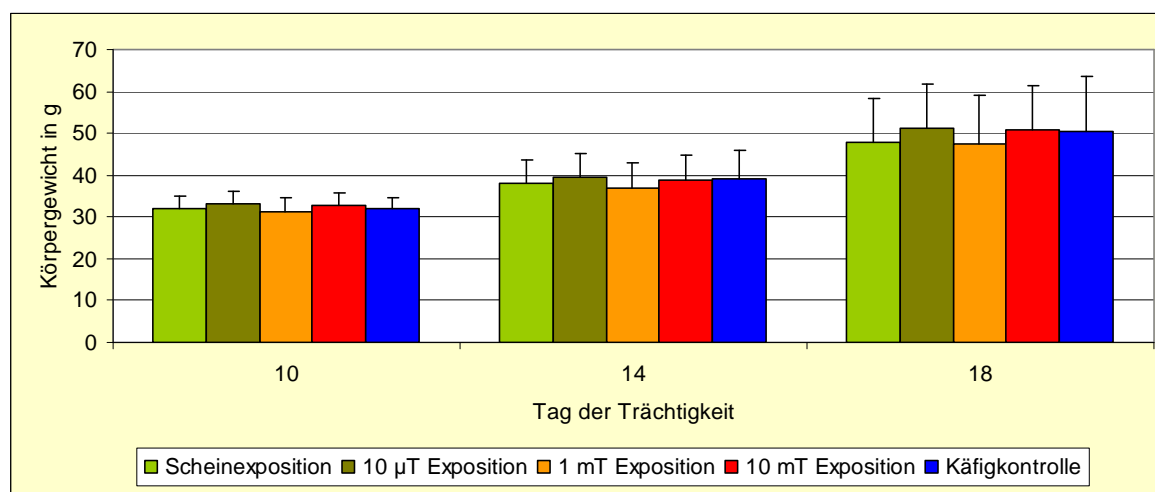


Abb. 24: Entwicklung des Körpergewichtes der Muttertiere während der Trächtigkeit

Auch während der Laktationsphase entwickelten sich das Körpergewicht und die Körpergewichtsveränderung in allen Untersuchungsgruppen weitgehend einheitlich (Tabellen **52-53** und **Annex 39-40**). Ein statistisch signifikantes transient leicht erhöhtes Körpergewicht der Muttertiere an Laktationstag 7 in der Käfigkontrolle wird als nicht expositionsbedingt bewertet. Eine leichte Gewichtsabnahme in der Laktationsphase in allen Gruppen ist auf die erhöhte physische Belas-

zung der Muttertiere durch die hohe Milchproduktion in der zweiten Hälfte der Laktationsphase zurückzuführen und ein häufiger Befund in Reproduktionsstudien (s. **Abb. 25**).

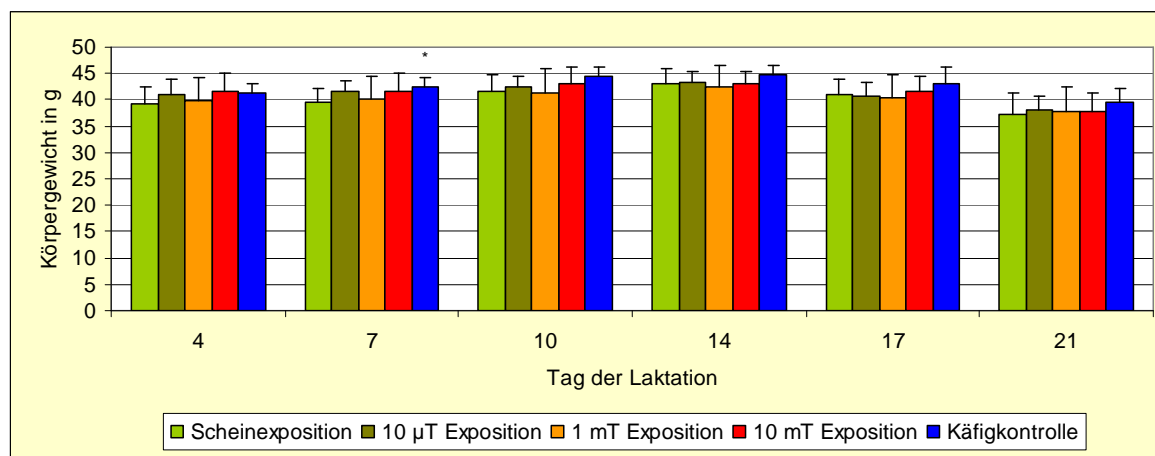


Abb. 25: Entwicklung des Körpergewichtes der Muttertiere während der Laktationsphase, * $p < 0,05$ vs. Scheinexposition

10.2.3.1.3 Reproduktionsdaten

Die Zusammenfassung der Reproduktions- und Wurfdaten ist **Tabelle 54** zu entnehmen. Eine Einzelaufstellung der individuellen Trächtigkeitsdauer, Anzahl von Implantationsstellen sowie lebenden und totgeborenen Jungtieren an Tag 0 ist **Annex 41** zu entnehmen.

Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Trächtigkeitsdaten inklusive der Trächtigkeitsdauer, der prä- und postnatalen Mortalität oder der durchschnittlichen Anzahl von Jungtieren pro Wurf bei Geburt oder während der Laktationsphase. Lediglich die durchschnittliche Anzahl an uterinen Implantationsstellen war in der Käfigkontrolle gegenüber der Scheinexpositionsgruppe erhöht. Dies stellt einen Zufallsbefund ohne toxikologische Relevanz dar.

Die Trächtigkeitsrate lag zwischen 75 % (Käfigkontrolle) und 85 % (10 µT- und 10 mT-Gruppe), mit 80 % in der Scheinexposition und der mittleren Dosisgruppe (1 mT). Der Anteil der Lebendgeborenen lag auf außergewöhnlich hohem Niveau bei 99,5 - 100 %. Die durchschnittlichen Postimplantationsverluste betrugen zwischen 2,8 % in der mittleren Dosisgruppe (1 mT) und 9,2 % in der Hochdosisgruppe (10 mT). Die durchschnittliche Wurfgröße variierte zwischen 11,8 Jungtieren pro Wurf in der Scheinexposition und 13,8 Jungtieren pro Wurf in der Käfigkontrolle. Dies korreliert mit der erhöhten durchschnittlichen Anzahl an Implantationsstellen in der Käfigkontrolle (s. **Abb. 26**).

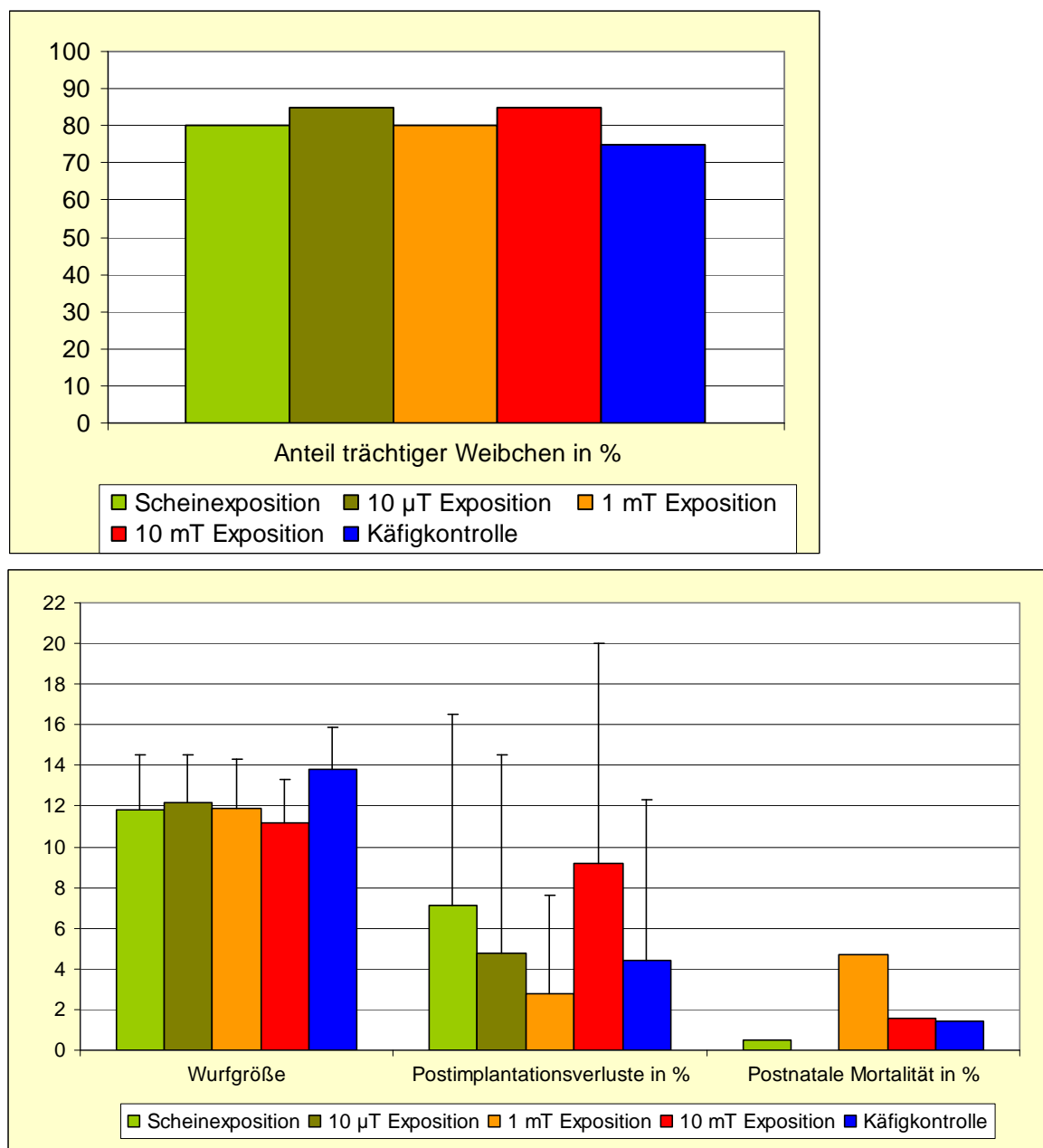


Abb. 26: Darstellung von Anteil der trächtigen Weibchen, durchschnittlicher Wurfgröße, Postimplantationsverlusten und postnataler Mortalität

10.2.3.1.4 Sektionsbefunde

Zum Zeitpunkt der Sektion der Muttertiere an Tag 21 nach der Geburt zeigten sich keine Unterschiede des terminalen Körpergewichtes (**Tabelle 55** und **Annex 42**).

Wie bereits unter den klinischen Befunden erwähnt, wurden insgesamt 3 Muttertiere während der Laktationsphase tot aufgefunden. Diese Tiere zeigten in der makroskopischen Untersuchung Anzeichen einer Kachexie durch den erhöhten physiologischen Streß während der Jungenaufzucht. Jeweils 1 Muttertier wies multiple, beidseitig auftretende renale Zysten auf (Hochdosis-

gruppe, 10 mT) beziehungsweise eine Vergrößerung beider Nieren (Niedrigdosisgruppe, 10 μ T). Ein weiteres Muttertier der Niedrigdosisgruppe zeigte eitrige Veränderungen beider Uterushörner, ein Muttertier der Scheinexposition wies eine isolierte eitrige Veränderung eines der beiden Uterushörner auf. Einzelne Tiere aller Gruppen zeigten dilatative Veränderungen oder Verdickungen der Uteri bei der Sektion. Alle Befunde werden als nicht expositionsbedingte Zufallsbefunde angesehen (**Tabelle 56** und **Annex 43**).

10.2.3.2 Untersuchungen der Nachkommen

10.2.3.2.1 In-live Untersuchungen

10.2.3.2.1.1 Mortalität und klinische Befunde

10.2.3.2.1.1.1 Jungtiere bis zum Absetzen der Würfe vom Muttertier

Die Ergebnisse der klinischen Befundungen sind in **Tabelle 57** und **Annex 44** aufgeführt. Die Jungtiere in allen Gruppen entwickelten sich gut und ohne besondere Auffälligkeiten. In der Niedrigdosisgruppe (10 μ T) und in der mittleren Dosisgruppe (1 mT) musste jeweils ein Wurf getötet werden nachdem das Muttertier zu einem Zeitpunkt verstorben war, zu welchem die Jungtiere noch zu jung waren, um selbständig zu überleben. In der Hochdosisgruppe (10 mT) und in der Käfigkontrolle fanden sich vereinzelt auffällig kleine Jungtiere im Vergleich zu den Durchschnittswerten. In der Käfigkontrolle zeigte ein Jungtier in der frühen postpartalen Phase subkutane Einblutungen, einen häufigen Befund. In 4 der 5 Untersuchungsgruppen (mit Ausnahme der Niedrigdosisgruppe 10 μ T) verstarben einzelne Jungtiere im Verlauf der Aufzuchtphase. Eine Dosisabhängigkeit konnte hierbei nicht festgestellt werden und die Befunde werden als nicht expositionsbedingt angesehen. Insgesamt waren der Viability Index (Überleben bis Tag 4) und der Laktationsindex (Überleben bis Tag 21) mit über 90 % in allen Gruppen sehr hoch.

10.2.3.2.1.1.2 Juvenile und adulte Tiere

In **Tabelle 58** und **59** sind die klinischen Befunde und die Sterblichkeit (kumulativ) der untersuchten Gruppen gelistet. In **Annex 45** sind die individuellen Daten der Tiere aufgeführt. Im Laufe der langen Studiendauer von 18 Monaten wurde eine Reihe sehr unterschiedlicher Befunde beobachtet. Einige Befunde, wie Verletzungen des Schwanzes, der Ohren oder der Hornhaut des Auges mit anschließender Trübung der Hornhaut oder Augenausfluss bzw. lokaler Haarausfall stellen häufige Befunde in Nagerstudien dar. Bei insgesamt 3 Tieren (Scheinexposition und Käfigkontrolle) wurde ein Vaginalvorfall verzeichnet. Es wurde ein vereinzelt Auftreten von Stereotypen im Verhalten beobachtet. Diese Verhaltensauffälligkeiten ließen nach, nachdem alle Käfige mit Nagehölzern im Sinne eines *behavioural enrichment* ausgestattet wurden. Im Laufe der Studie wurden vereinzelt Tiere tot aufgefunden (Scheinexposition: 4; Käfigkontrolle: 2; 10- μ T-Gruppe: 2; 1-mT-Gruppe: 1 und 10-mT-Gruppe: 3 Tiere) oder der Allgemeinzustand einzelner Tiere verschlechterte sich so stark, dass die Entscheidung getroffen werden musste, diese Tiere moribund zu töten. Insgesamt waren zwischen 21 % (Scheinexposition und 10-mT-Gruppe) und 34 % (Käfigkontrolle) der Tiere einer Gruppe hiervon betroffen (s. **Abb. 27**). Diese Zahlen entsprechen den Daten von Kontrollgruppen in Kanzerogenitätsstudien mit einer Studiendauer von 18 Monaten in CD1-Mäusen und sind als nicht biologisch auffällig anzusehen. Kriterien für die vorzeitige Tötung eines Tieres als moribund waren ein sich deutlich verschlechternder Allgemeinzustand, oftmals kombiniert mit angestrenzter Flankenatmung/Vergrößerung des Bauchraumes durch Aszites/Kreislaufdepression (Tier kalt bei Berührung) und verminderte Durchblutung von Schleimhäuten und Schwanz/Schonhaltung und gesträubtes Fell/Lethargie

und Gewichtsverlust/Gleichgewichtsverlust. Diese Symptome traten in unterschiedlicher Kombination auf. In der Summe der beobachteten Symptomatiken waren keine expositionsbedingten oder dosis-abhängigen Effekte zu beobachten.

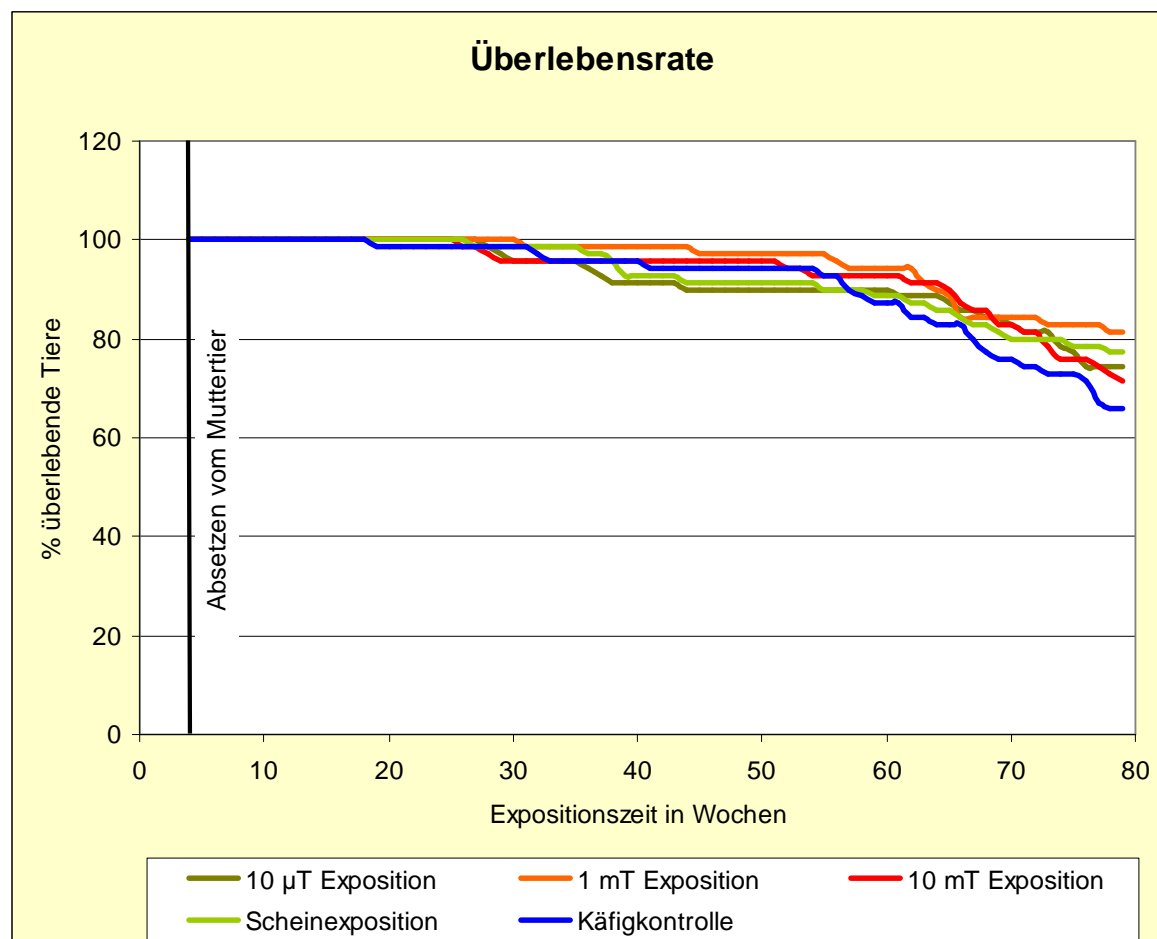


Abb. 27: Darstellung der Überlebensrate im Verlauf von 18 Monaten Exposition

10.2.3.2.1.2 Körpergewicht

10.2.3.2.1.2.1 Jungtiere bis zum Absetzen der Würfe vom Muttertier

Die Ergebnisse der Körpergewichtsmessungen auf Jungtierbasis und Wurfbasis sind in den **Tabellen 60-63** und **Annex 46-49** aufgeführt. Die Jungtiergewichte der Untersuchungsgruppen entwickelten sich ohne relevante Unterschiede. Zwischen Tag 10 und 17 zeigte sich, ermittelt auf Basis der individuellen Jungtiergewichte, ein statistisch signifikant leicht erhöhtes Jungtiergewicht in der Hochdosisgruppe (10 mT). Dies beruhte auf einer, zufallsbedingt, erhöhten Anzahl kleiner Würfe in dieser Gruppe mit einem hierdurch erhöhten Einzeltiergewicht (s. **Abb. 28**). Auf Basis der Gesamtwurfgewichte zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied (s. **Abb. 29**). Ein analoges Bild zeigte sich bei Berechnung der Körpergewichtszunahmen. Zwischen Tag 14 und 17 war hierbei die Körpergewichtszunahme auf Basis der individuellen Jungtierdaten in der Hochdosisgruppe (10 mT) statistisch signifikant leicht erhöht und in der Käfigkontrolle leicht erniedrigt. Bei Betrachtung auf Basis der Gesamtwurfkörpergewichtszunahmen zeigte sich kein

statistisch signifikanter Unterschied für die Hochdosisgruppe. Die Käfigkontrolle zeigte auch hier noch eine erniedrigte Körpergewichtszunahme der Würfe. Die Ergebnisse der Körpergewichtsmessungen auf Jungtierbasis und Wurfbasis werden als nicht biologisch relevant angesehen.

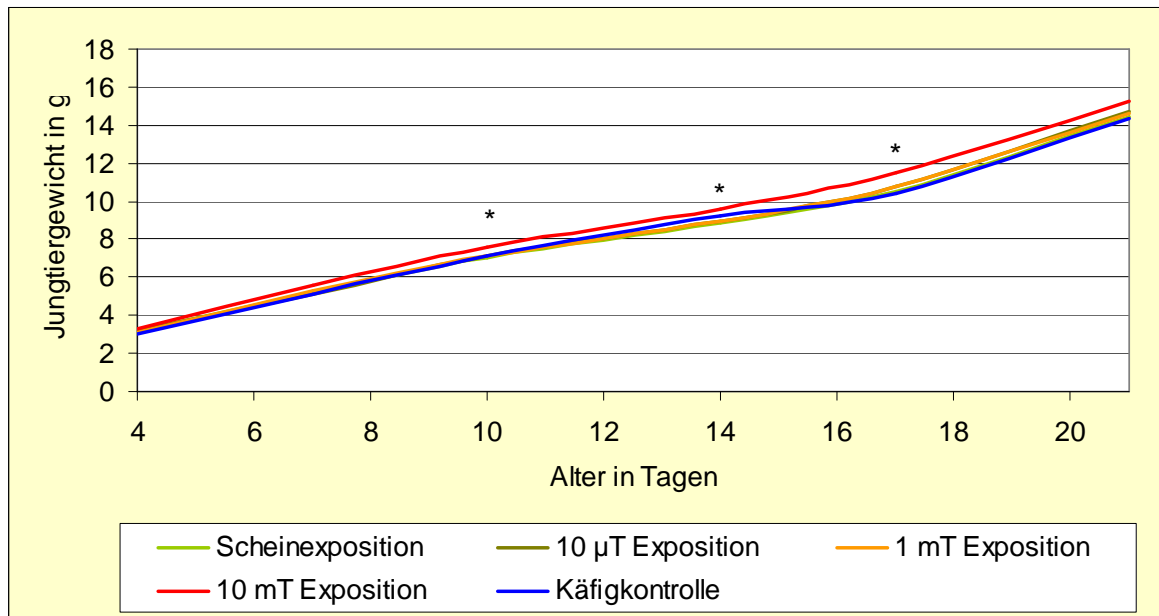


Abb. 28: Entwicklung der Jungtiergewichte während der Laktation auf Einzeltierbasis, * $p < 0,05$ vs. Scheinexposition

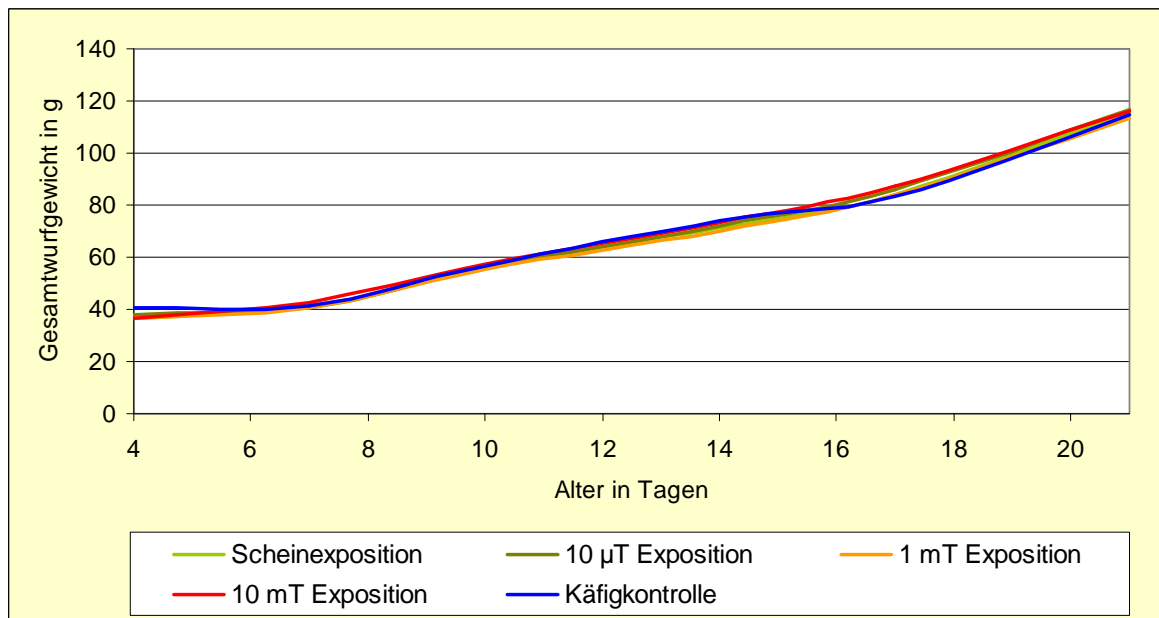


Abb. 29: Entwicklung der Jungtiergewichte während der Laktation auf Wurfbasis

10.2.3.2.1.2.2 Juvenile und adulte Tiere

Die Ergebnisse der Körpergewichtsmessungen sind den **Tabellen 64** und **65**, sowie **Annex 50-51** zu entnehmen. Die Körpergewichtsentwicklung nach dem Absetzen vom Muttertier und über den Alterungsprozess der Tiere war unauffällig und nicht statistisch signifikant unterschiedlich zwischen den Dosisgruppen und der Scheinexposition. Die Tiere der Käfigkontrolle holten das vormals leicht reduzierte Körpergewicht auf und zeigten sich bis zum Alter von circa 90 Tagen statistisch signifikant schwerer (s. **Abb. 30**). Bei Betrachtung der Körpergewichtsveränderungen zeigten sich keine Effekte auf die Gesamtgewichtszunahme im Studienverlauf. Vereinzelt transiente signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden als nicht toxikologisch relevant angesehen, da nur einzelne Zeitpunkte betroffen waren, keine Dosis-Abhängigkeit zu beobachten war und die individuelle Schwankungsbreite der Daten hoch war.

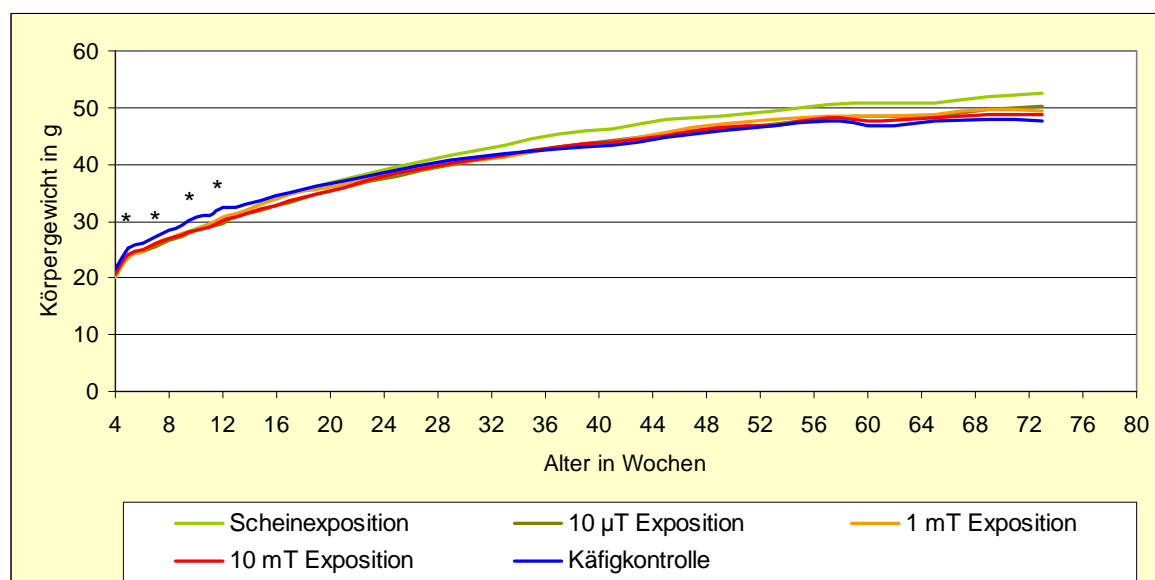


Abb. 30: Entwicklung der Jungtiergewichte nach dem Absetzen vom Muttertier bis zu einem Alter von 1 Monaten, * $p < 0,05$ vs. Scheinexposition

10.2.3.2.1.3 Reflexontogenese, körperliche und sexuelle Reife

10.2.3.2.1.3.1 Ausbildung von Reflexen

Der Stellreflex, die Fähigkeit, den Körper selbständig aus der Rückenlage in die Bauchlage zu bewegen, wurden an allen Jungtieren vom 1. bis 3. Tag nach der Geburt getestet. In **Tabelle 66** ist aufgeführt, wie viele Jungtiere am jeweiligen Tag getestet wurden, wie viele Tiere den Test bestanden und der kumulativ berechnete Anteil der Tiere, welche den Test bestanden. Weder im zeitlichen Verlauf, noch im Gesamtanteil der Tiere, welche den Test bestanden gab es statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Scheinexposition und den Dosisgruppen. Lediglich die Käfigkontrolle zeigte eine transiente Verzögerung der Anzahl der positiv getesteten Tiere an Tag 2. Bei statistischer Berechnung der Daten auf Wurfbasis war auch dieser Unterschied nicht mehr signifikant (s. **Abb. 31**). Die Daten der Einzeltiertestungen sind **Annex 52** zu entnehmen.

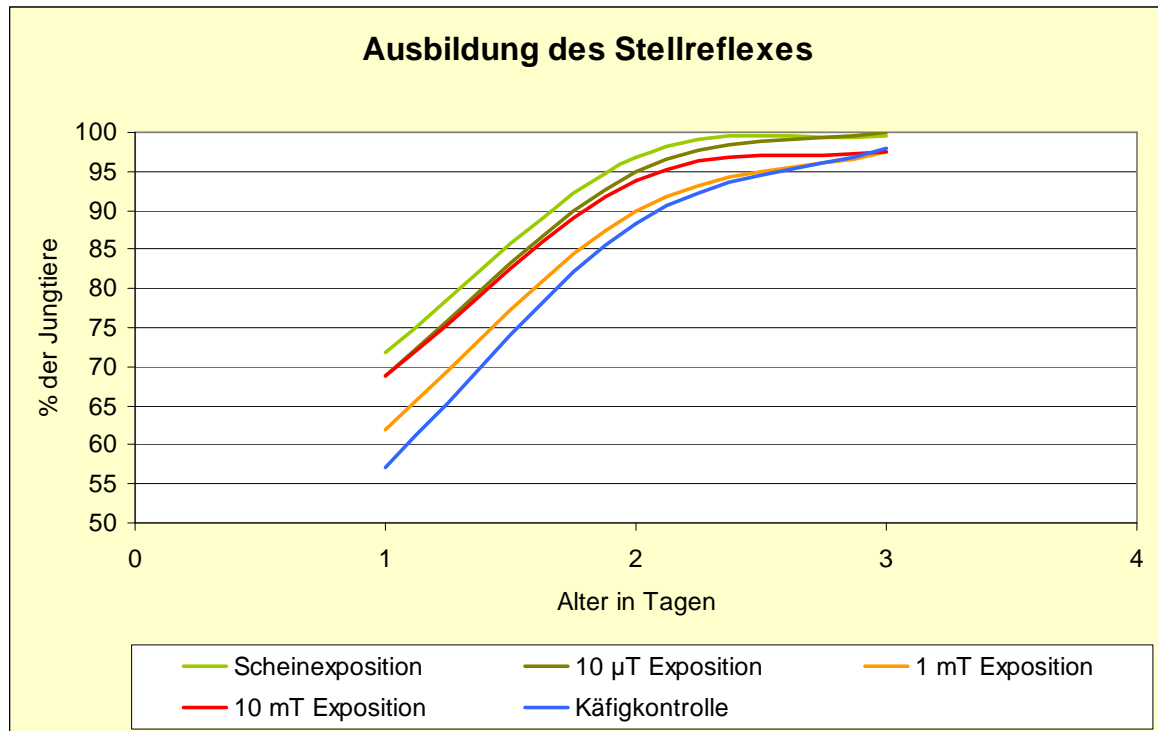


Abb. 31: Darstellung der Ergebnisse der Testungen des Stellreflexes

Die negative Geotaxis, das selbständige Umdrehen auf einer schiefen Ebene wurde an allen Jungtieren nach der Wurfstandardisierung von Tag 10 bis 12 getestet. In **Tabelle 67** ist aufgeführt, wie viele Jungtiere am jeweiligen Tag getestet wurden, wie viele Tiere den Test bestanden und der kumulativ berechnete Anteil der Tiere, welche den Test bestanden. Auch hier zeigten sich keinerlei Unterschiede im zeitlichen Verlauf oder im Gesamtanteil der positiv getesteten Tiere (s. **Abb. 32**). Die Daten der Einzeltiertestungen sind **Annex 53** zu entnehmen.

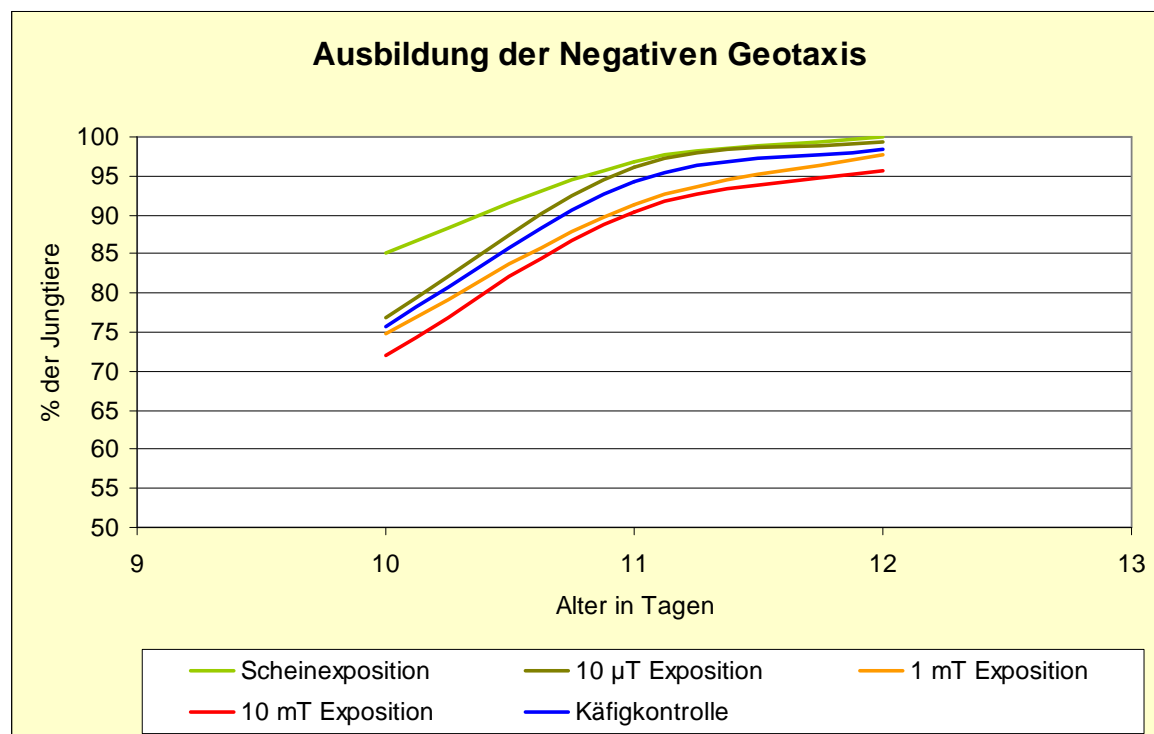


Abb. 32: Darstellung der Ergebnisse der Testungen der negativen Geotaxis

10.2.3.2.1.3.2 Functional Observational Battery (FOB)

Um Tag 20, 30 und 60 wurden jeweils 20 weibliche Jungtiere in der Testbatterie untersucht. An allen Untersuchungsterminen wurden die gleichen Tiere untersucht. Es zeigten sich keine Unterschiede in den Untersuchungsgruppen hinsichtlich der getesteten physiologischen Parameter, der Reflextestungen oder pathophysiologischer Merkmale. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist **Tabelle 68** zu entnehmen.

10.2.3.2.1.3.3 Erreichen der sexuellen Reife

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind **Tabelle 69** und **Annex 54 - 55** zu entnehmen. 94 % (Scheinexposition) bis 100 % (Käfigkontrolle) der Jungtiere der Gruppen erreichten die Vaginalöffnung im Untersuchungszeitrahmen von Tag 22-30. Die Tiere der mittleren Dosisgruppe (1 mT) wiesen hierbei ein statistisch signifikant höheres durchschnittliches Alter auf (26,1 Tage vs. 24,9 Tage in der Scheinexposition). Da es keine Dosisabhängigkeit gab und die Tiere der Hochdosisgruppe (10 mT) die Vaginalöffnung zum exakt gleichen Zeitpunkt wie die Tiere der Scheinexposition erreichten, wird dieser Effekt als nicht biologisch relevant angesehen. Allerdings war das durchschnittliche Gewicht bei Erreichen des Parameters in allen Dosisgruppen und in der Käfigkontrolle statistisch signifikant höher als in der Scheinexposition. Die toxikologische Relevanz dieses Ergebnisses ist unklar (s. **Abb. 33**).

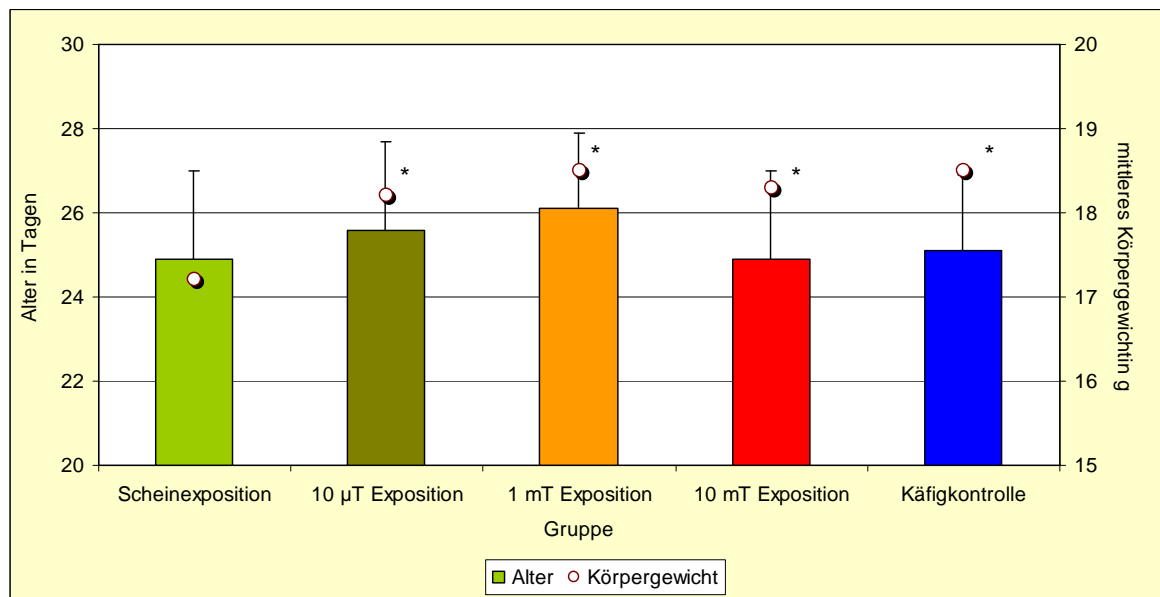
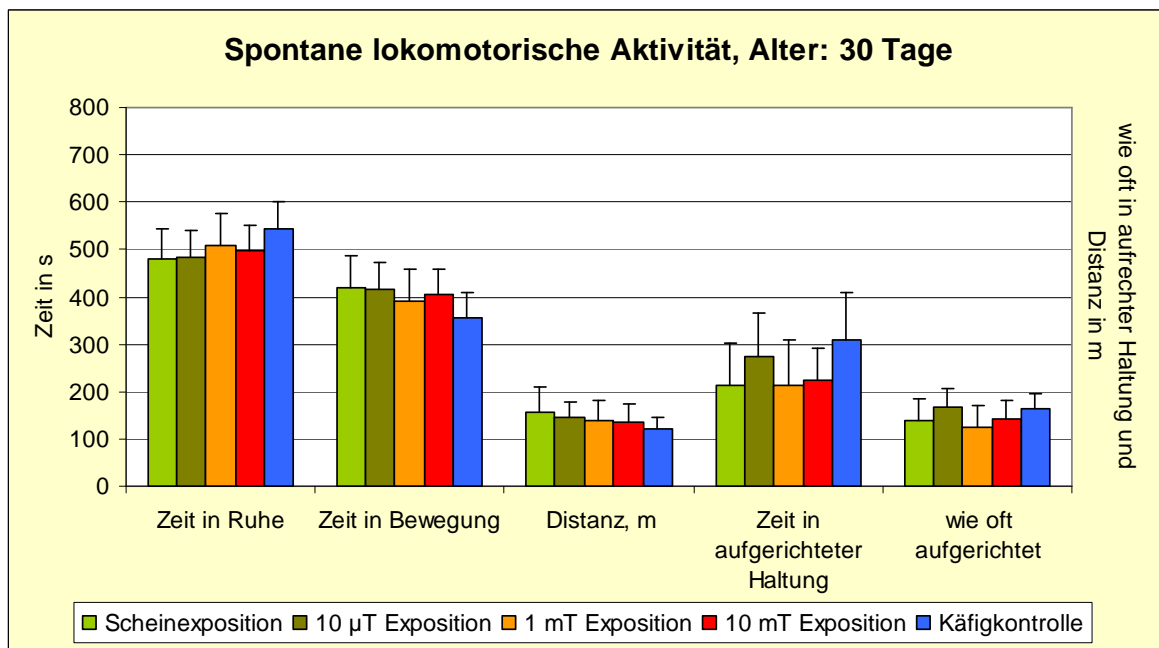
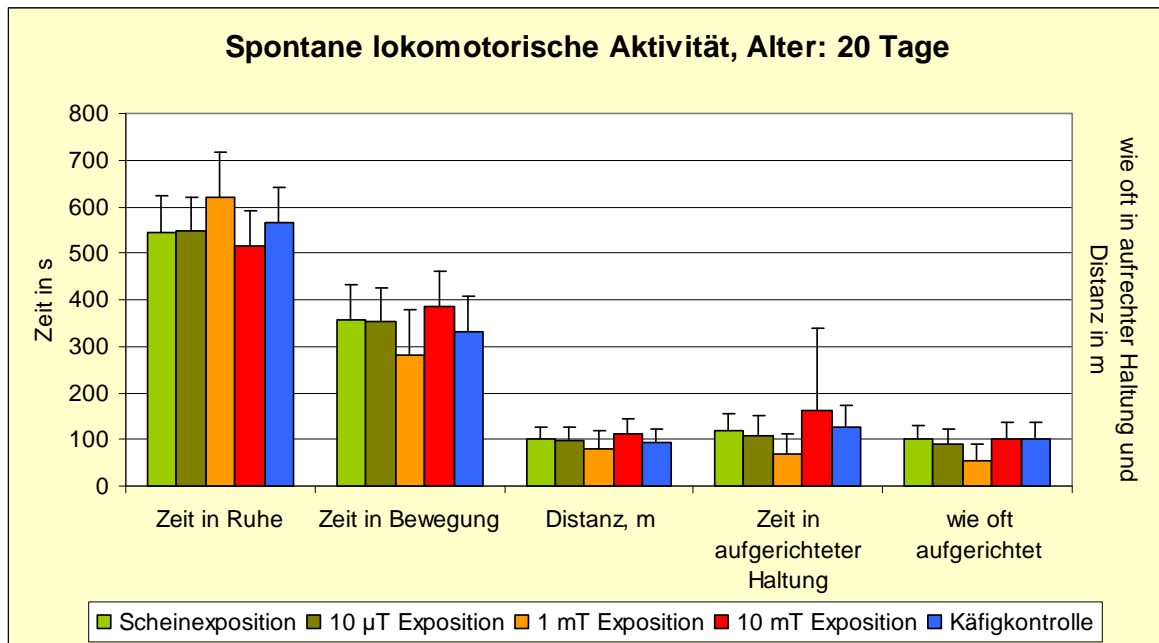


Abb. 33: Darstellung der Ergebnisse zur Testung des Erreichens der sexuellen Reife, * $p < 0,05$ vs. Scheinexposition

10.2.3.2.1.4 Reifung des Zentralnervensystems

10.2.3.2.1.4.1 Lokomotorische Aktivität

Die Zusammenfassung der Daten ist **Tabelle 70** zu entnehmen. Zu keinem der 3 Zeitpunkte (Tag 20, 30, 60) wurden Unterschiede in der quantitativen Auswertung der gemessenen Parameter (Zeitspanne in Bewegung, in Ruhe, die zurückgelegte Distanz und die Anzahl und Dauer von aufrechter Haltung) zwischen den Gruppen gemessen (s. **Abb. 34**).



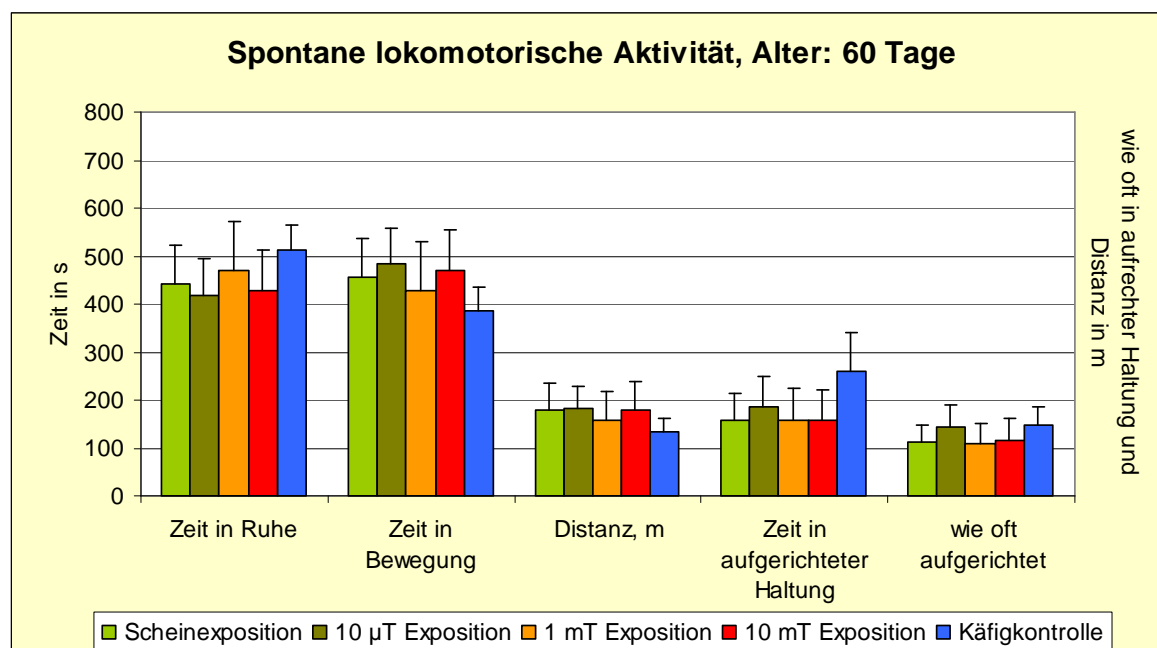


Abb. 34: Darstellung der Ergebnisse zur Testung der spontanen lokomotorischen Aktivität an 3 Zeitpunkten

10.2.3.2.1.4.2 Signalverarbeitung und Lernfähigkeit

Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist **Tabelle 71** zu entnehmen. Um Tag 20 und Tag 60 wurden jeweils 20 weibliche Jungtiere auf ihre Reaktion auf akustische Signale hin untersucht. Wie bei jeder Art solcher Untersuchungen war die individuelle Reaktion der Tiere unterschiedlich stark ausgeprägt. Im Vergleich der Mittelwerte von jeweils 20 Tieren pro Untersuchungsgruppe zeigen sich keine Unterschiede in der Stärke der naiven Reaktion, in der Ausprägung der Habituation durch Gewöhnung und Lerneffekt oder in der Abschwächung der Schreckreaktion durch ein vorgeschaltetes Vorwarn-Signal im Sinne koordinierten zerebralen Signalverarbeitung (s. **Abb. 35**).

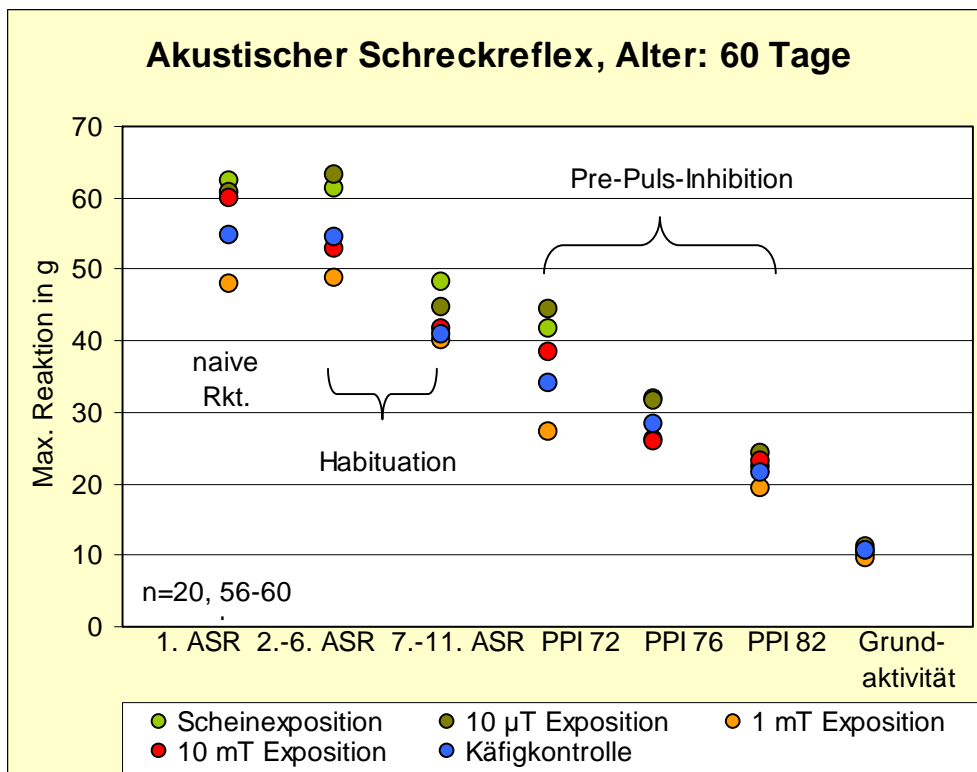
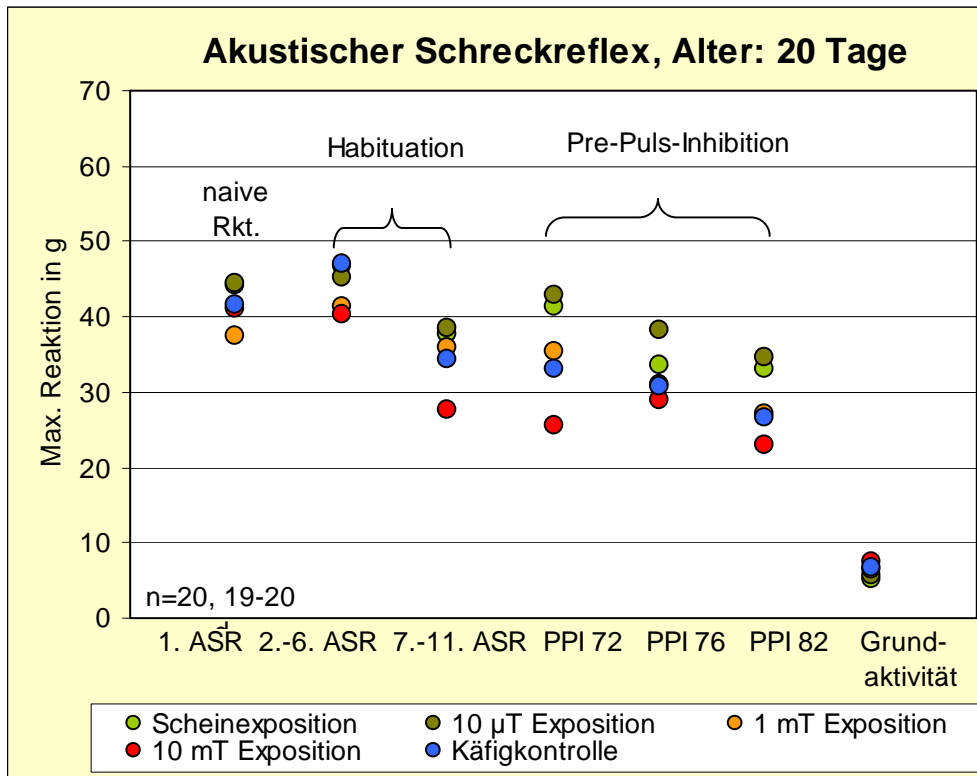


Abb. 35: Darstellung der Ergebnisse zur Testung des akustischen Schreckreflexes an 2 Zeitpunkten

10.2.3.2.2 Post-mortem Untersuchungen

Alle zwischenzeitlich tot aufgefundenen oder moribund getöteten Tiere sowie alle bis zum Zeitpunkt von 18 Monaten Exposition überlebenden Tiere wurden vollständig makroskopisch bei der Sektion befundet und fixiert. Es erfolgte eine histopathologische Untersuchung von Thymus, Milz, mesenterialen Lymphknoten (LK), LK der Leistenbeuge, Lungen-assoziierten LK, Femur und Sternum mit Knochenmark, Leber, Gehirn, Lunge, Nieren sowie allen beobachteten Makroveränderungen. Zusätzlich wurden bei jeweils 20 Tieren pro Gruppe zum Zeitpunkt nach 18 Monaten Exposition bei der Sektion Blutproben entnommen sowie ein Teil der Milz und hämatologisch und immunologisch untersucht.

10.2.3.2.2.1 Untersuchungen des blutbildenden Systems

Die Zusammenfassung der hämatologischen Daten ist den **Tabellen 72-74** zu entnehmen, die Einzeltierdaten finden sich in **Annex 56-58**. Die Erläuterung der Abkürzungen ist ebenfalls dem Annex zu entnehmen.

Auf Grund des fortgeschrittenen Alters der Mäuse zeigten die Werte der weißen Blutzellen (WBC) eine höhere Variabilität im Vergleich zu jüngeren Tieren, wie sie in Standardtoxizitätsuntersuchungen eingesetzt werden. Zusätzlich wurden reaktive Lymphozyten, charakterisiert durch ein hohes nukleo-zytoplasmatisches Verhältnis häufiger als normal beobachtet. Trotz der erhöhten Variabilität der Daten zeigten sich in der Auswertung des Differentialblutbildes einige signifikante Unterschiede zur Scheinexpositionsgruppe, bei denen von expositionsbedingten Effekten ausgegangen werden kann.

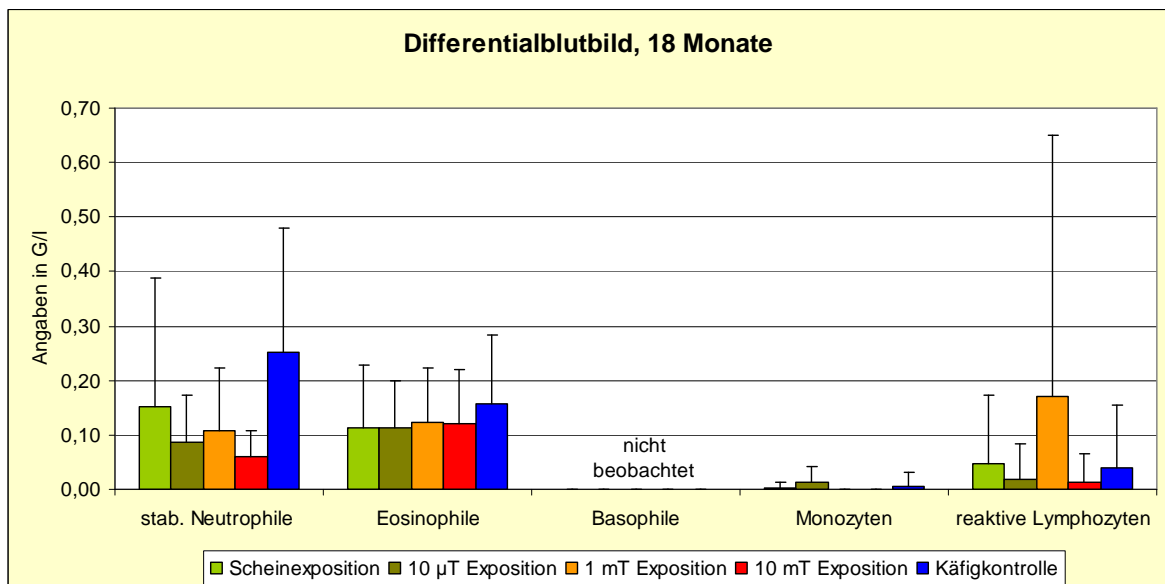
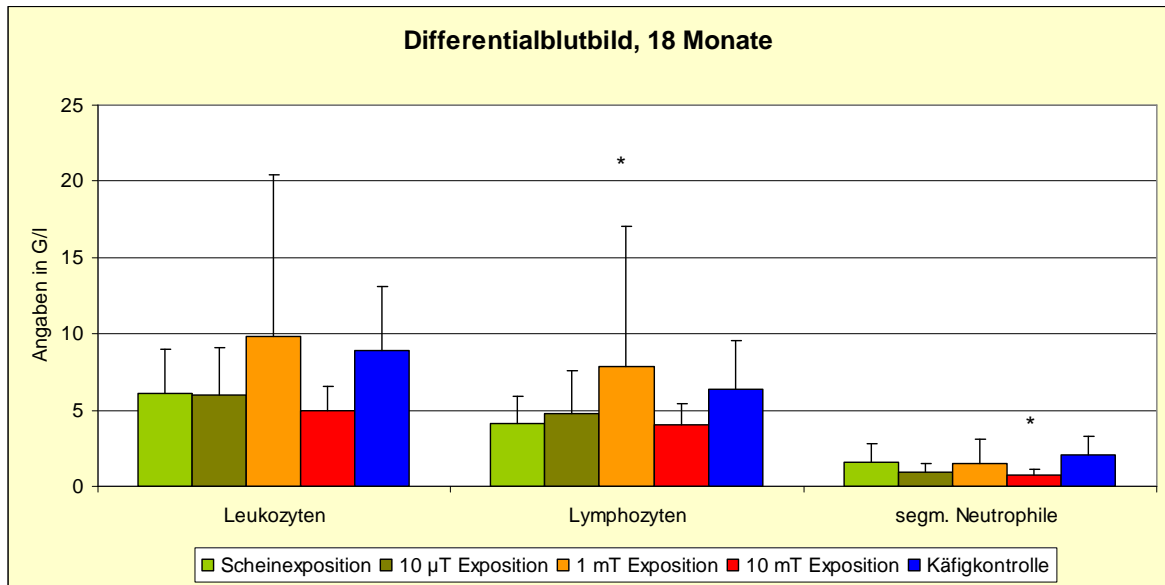
10.2.3.2.2.1.1 Differentialblutbild und Retikulozytenauswertung

Es wurden folgende statistisch signifikante Unterschiede zur Scheinexpositionsgruppe gemessen:

Die relative Anzahl von Retikulozyten (RETI) war in der mittleren Dosisgruppe (1 mT) erhöht, nicht aber die absolute Anzahl an Retikulozyten (RETC).

Die relative Anzahl von Lymphozyten (LYM) war in allen 3 Dosisgruppen statistisch signifikant erhöht, zusätzlich auch die absolute Anzahl von Lymphozyten in der mittleren Dosisgruppe. Gleichzeitig war eine Abnahme der relativen Anzahl an segmentkernigen neutrophilen Granulozyten (SEGM) in allen 3 Dosisgruppen zu beobachten, mit einer zusätzlichen statistisch signifikanten Abnahme der absoluten Werte in der Hochdosisgruppe. Für beide Befunde deutet sich ein dosis-abhängiger Effekt an und ein Behandlungseffekt durch die Magnetfeldexposition ist wahrscheinlich.

Es zeigten sich keine Unterschiede in der absoluten oder relativen Anzahl der weißen Blutzellen (WBC), von stabkernigen neutrophilen (BAND), eosinophilen (EOS) oder basophilen (BASO) Granulozyten, sowie in der Anzahl von Monozyten (MONO) oder reaktiven Lymphozytenformen (LREA) (s. **Abb. 36**).



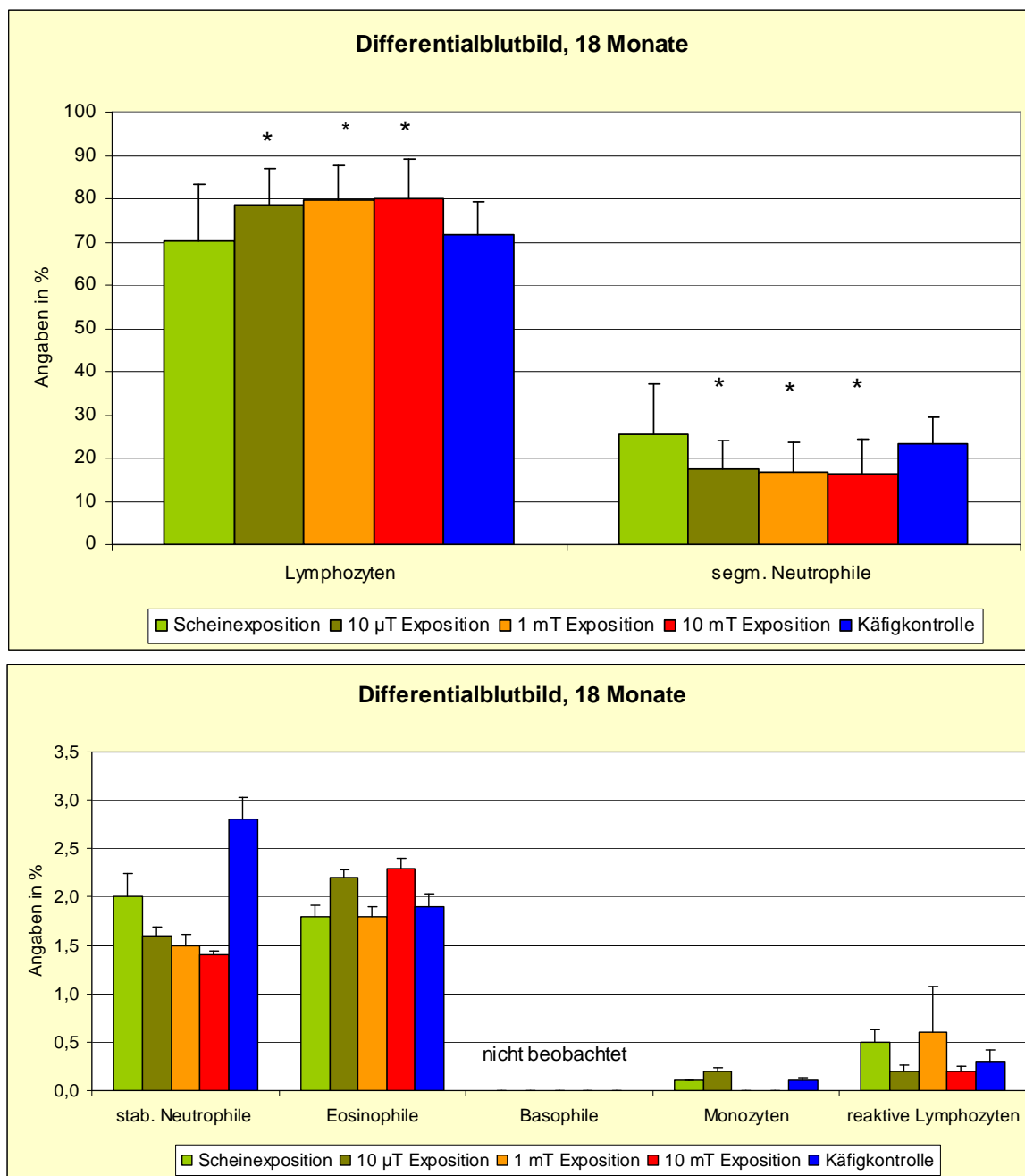


Abb. 36: Darstellung der Ergebnisse des Differentialblutbildes im Alter von 18 Monaten, Angaben als absolute Werte (G/l) bzw. als relative Werte (%), * $p < 0,05$ vs. Scheinexposition

10.2.3.2.2.1.2 Bestimmungen im kleinen Blutbild

Es zeigten sich keine Unterschiede in den untersuchten Parametern

10.2.3.2.2.2 Untersuchungen des Immunsystems

10.2.3.2.2.2.1 Durchflußzytometrische Messung des Immunstatus in Blut und Milz

Die Mittelwerte der Rohdaten abzüglich der Isotyp-Kontrollen aus dem Blut sind in **Tabelle 75** dargestellt und die Mittelwerte der Rohdaten abzüglich der Isotyp-Kontrollen aus der Milz sind in **Tabelle 76** dargestellt. Die Einzeltierdaten sind **Annex 59-60** zu entnehmen.

Niederfrequente elektromagnetische Felder mit verschiedenen Feldintensitäten hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die prozentuale Zusammensetzung der gemessenen Lymphozyten-Subpopulationen aus dem peripheren Blut (s. **Abb. 37**).

Niederfrequente elektromagnetische Felder mit verschiedenen Feldintensitäten hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die prozentuale Zusammensetzung der gemessenen Lymphozyten-Subpopulationen aus der Milz (s. **Abb. 38**).

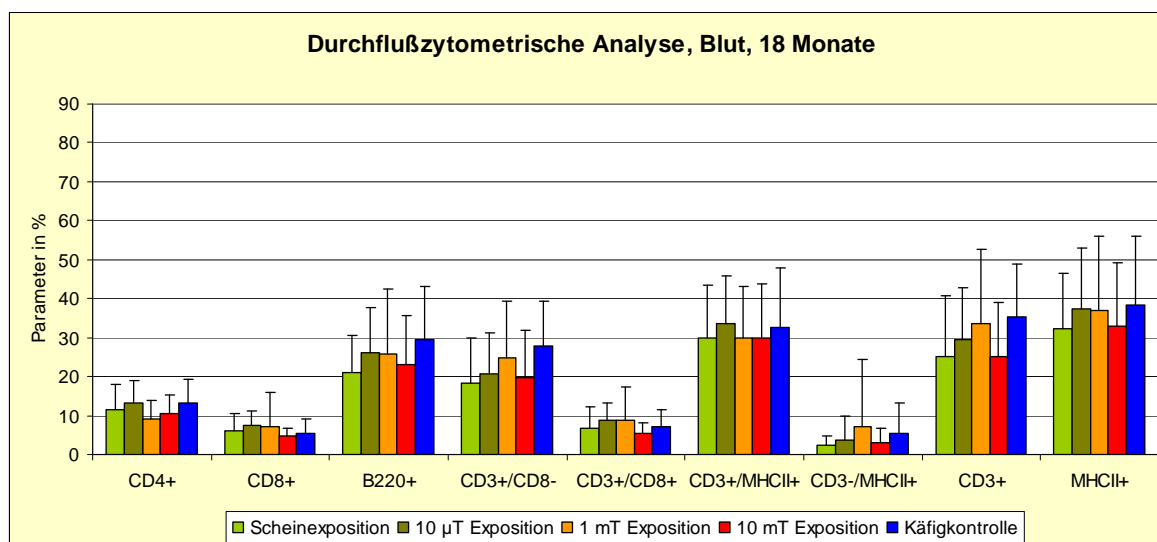


Abb. 37: Darstellung der Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchungen des peripheren Blutes im Alter von 18 Monaten

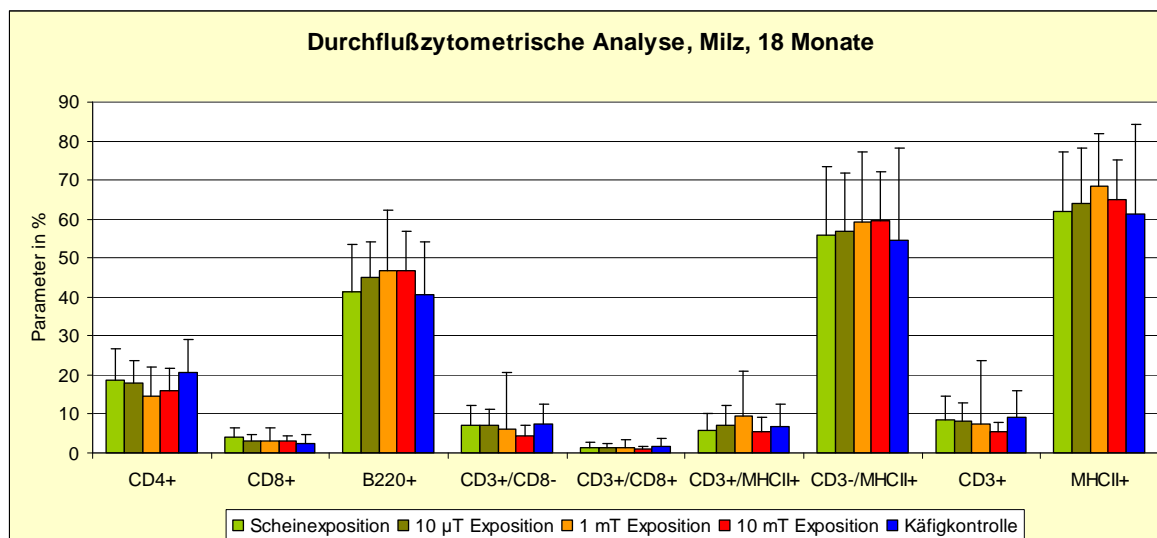


Abb. 38: Darstellung der Ergebnisse der durchflußzytometrischen Untersuchungen von Milzzellen im Alter von 18 Monaten

10.2.3.2.2.2 Messung der Proliferation von Milzzellen

Die Mittelwerte der Rohdaten sind in **Tabelle 77** dargestellt. Zudem ist in **Tabelle 78** das Wachstum als Proliferationsindex (PI = Proliferation stimulierter Zellen/Proliferation unstimulierter Zellen) angegeben. Die Einzeltierdaten sind **Annex 61** zu entnehmen.

Niederfrequente elektromagnetische Felder mit verschiedenen Feldintensitäten hatten keinen Einfluss auf ConA-, PWM- und LPS-induziertes Proliferationsverhalten von Milz-Lymphozyten aus 18 Monate alten Mäusen nach Exposition.

10.2.3.2.2.3 Sektionsbefunde

Alle während der Studiendauer tot aufgefundenen oder moribund getöteten, sowie alle bis zum Studienende überlebenden Tiere wurden einer vollständigen makroskopischen Befundung bei der Sektion unterzogen. Es wurden zusätzlich bei allen bis zum Versuchsende überlebenden Tieren das terminale Körpergewicht, sowie die Organgewichte von Milz, Nieren, Nebennieren, Leber und Hirn ermittelt und die relativen Organgewichte, bezogen auf das terminale Körpergewicht, berechnet. Die Zusammenfassung der Ergebnisse ist den **Tabellen 79-82** und die Einzeltierdaten dem **Annex 62-65** zu entnehmen.

Bei Versuchsende zeigten sich keine Unterschiede des terminalen Körpergewichtes

Es zeigten sich keine Unterschiede des absoluten Organgewichtes für die Milz, die Nieren, die Nebennieren und die Leber. Lediglich das absolute Organgewicht des Hirns war in der mittleren Dosisgruppe (1 mT) marginal aber statistisch signifikant erniedrigt. Dieser Befund wird als nicht toxikologisch relevant eingestuft, da er sich bei Betrachtung des relativen Organgewichtes nicht mehr zeigte und nur auf diese Dosisgruppe beschränkt war. In der Käfigkontrolle zeigten sich statistisch signifikante Zunahmen des relativen Organgewichtes der Nieren und der Leber. Auch dieser Befund wird als nicht toxikologisch relevant eingestuft (s. **Abb. 39**).

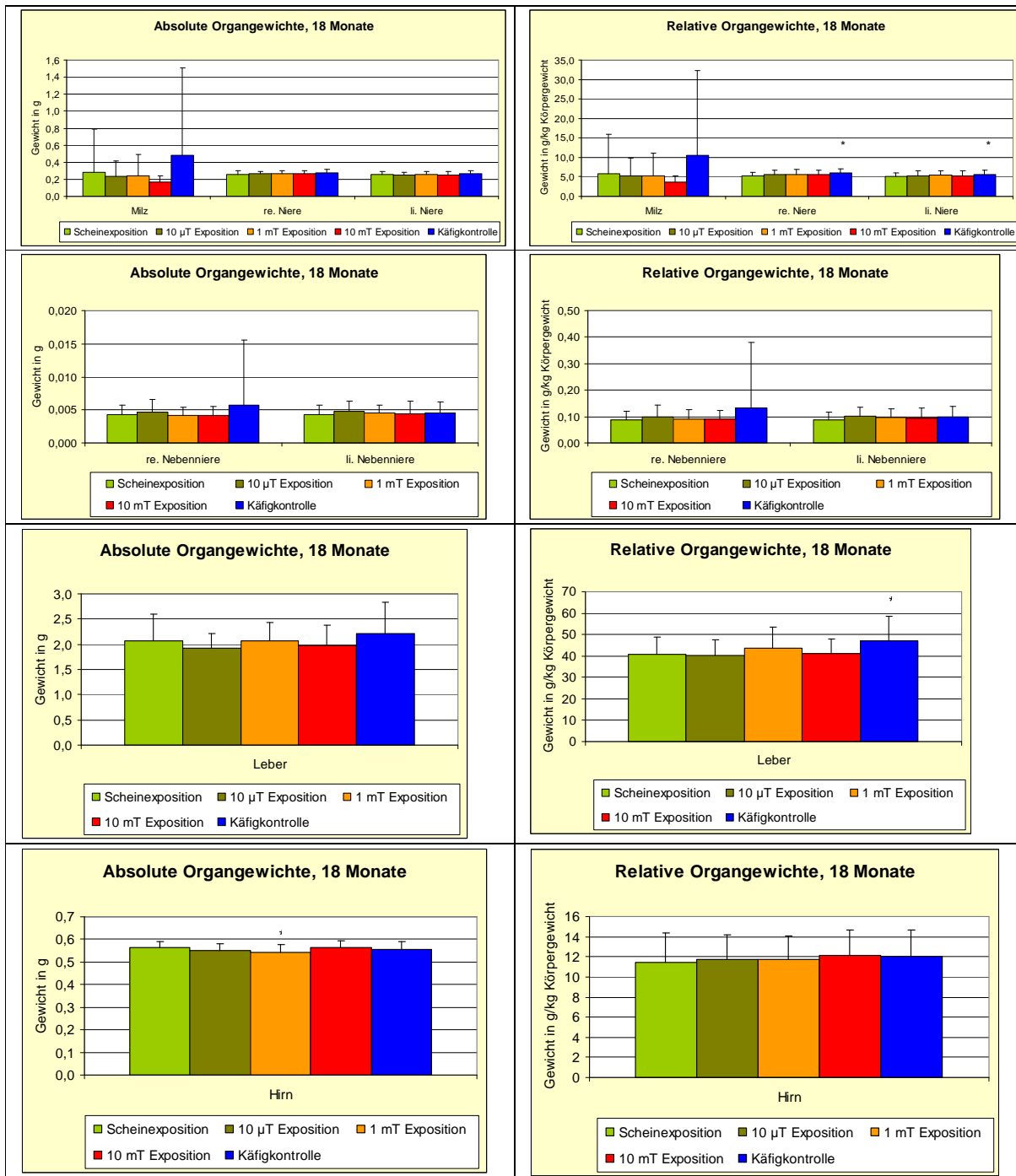


Abb: 39: Zusammenfassende Darstellung der absoluten und relativen Organgewichte, * p<0,05 vs. Scheinexposition

Bei der Sektion zeigte sich, bedingt durch das hohe Alter der Tiere, eine Vielzahl von Befunden. Die Mehrheit stellt Einzelbefunde ohne sichtbaren Bezug auf die Exposition durch Magnetfelder dar. Relativ häufig wurden in allen Untersuchungsgruppen Verfärbungen der Nieren, oftmals einhergehend mit einer rauen Organoberfläche, beobachtet. Lunge und Leber wiesen vereinzelt veränderte Bezirke im Sinne einer Knoten- oder Zystenbildung auf. Da sich die Tiere am Studienende bereits in der seneszenten Phase befanden, waren Veränderungen der Sexualhor-

mon-abhängigen Organe, besonders der Ovarien und der Uteri, häufig zu beobachten. Dies betraf vor allem zystische Erweiterungen der *Bursa ovarica* sowie zystische Erweiterungen/knotige Verdickungen der Uteri in allen Untersuchungsgruppen. Relativ häufig kam es, wiederum in allen Untersuchungsgruppen, zu Vergrößerungen der Lymphknoten. Hiervon waren besonders die Lungen-assoziierten Lymphknoten und die abdominalen Lymphknoten betroffen. Insgesamt zeigten zwischen 21/70 Tieren in der Hochdosisgruppe (10 mT) und 31/70 Tieren in der Käfigkontrolle (Scheinexposition = 23/70 Tieren) eine Vergrößerung der Milz und zwischen 4/70 in der Hochdosisgruppe und 12/70 Tieren in der Scheinexposition eine Vergrößerung des Thymus. Erst die histopathologischen Untersuchungen können die Genese dieser Veränderungen beurteilen.

10.2.3.2.2.4 Histopathologie

Die Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung sind in den **Tabellen 83-86**, die Einzel-tierbefunde im **Annex 66** dargestellt.

Expositionsbedingte Effekte konnten weder bei den Neoplasien (Tumoren) noch bei den nicht-neoplastischen Veränderungen beobachtet werden.

Histopathologische Untersuchungen wurden bei allen Tieren (70 weibliche Mäuse je Gruppe) der Käfigkontrolle (Gruppe 5), der Scheinexposition (Gruppe 4), der unteren (10 μ T, Gruppe 3), mittleren (1 mT, Gruppe 1) und hohen (10 mT, Gruppe 2) Expositionsdosis durchgeführt. Die folgenden Protokollorgane wurden in allen 5 Gruppen untersucht:

- Femur
- Gehirn (incl. Kleinhirn)
- Hämatopoetisches System
- Kniegelenk
- Knochenmark
- Leber
- Leistenlymphknoten
- Lunge
- Lungen-assoziierte Lymphknoten (LALN)
- Mesenteriale Lymphknoten
- Milz
- Nieren
- Sternum
- Thymus

Weitere Organe wurden nur dann histologisch untersucht, wenn ein makroskopischer Befund vorlag.

Die für die histopathologische Untersuchung benötigten Organe und Gewebe wurden in 4%iger Formaldehydlösung fixiert. Im Anschluss an eine ausreichende Fixation wurden Organ- und Gewebeproben zugeschnitten und in Paraplast eingebettet. Die Färbung der 3 μ m dicken Schnittpräparate erfolgte mit Hämatoxylin-Eosin. Von nicht optimal angeschnittenen Organen/Geweben wurden gegebenenfalls mehrere Nachschnitte zur Auswertung angefertigt.

Die Befundung der Schnittpräparate erfolgte ‚geblindet‘, d.h. in Unkenntnis der Gruppenzugehörigkeit.

Die Speicherung und Auswertung der histopathologischen Befunde sowie die Erstellung der Tabellen erfolgte mit Hilfe des Provantis Pathologie-Programms (Version: 8.3).

Die Befundung der histopathologischen Veränderungen erfolgte unter Berücksichtigung des Verteilungsmusters, des Schweregrades und der morphologischen Charakteristika.

Die Graduierung der nicht-neoplastischen Befunde wurde wie folgt durchgeführt:

- sehr geringgradig (very slight) = bis 10% Abweichung vom Normalzustand
- geringgradig (slight) = zwischen 10% und 25% Abweichung vom Normalzustand,
- mittelgradig (moderate) = zwischen 25% und 50% Abweichung vom Normalzustand,
- hochgradig (severe) = zwischen 50% und 90% Abweichung vom Normalzustand,
- sehr hochgradig (very severe) = mehr als 90% Abweichung vom Normalzustand.

10.2.3.2.2.4.1 Neoplasien

Neoplasien – Gesamtinzidenz

Die Zahl tumortragender Tiere war mit 54/70 am höchsten in Gruppe 5 (Käfigkontrolle), gefolgt von 53/70 in Gruppe 3 (10 μ T), 42/70 in Gruppe 4 (Scheinexposition), 40/70 in Gruppe 2 (10 mT) und 38/70 in Gruppe 1 (1 mT). Ein positiver Dosis-Wirkungseffekt der Exposition konnte somit nicht beobachtet werden. Die Anzahl maligner/benigner Tumoren betrug 45/18 in Gruppe 5 (Käfigkontrolle), 43/16 in Gruppe 3 (10 μ T), 34/11 in Gruppe 1 (1 mT), 33/12 in Gruppe 4 (Scheinexposition) und 32/11 in Gruppe 2 (10mT). Die Anzahl Tiere mit multiplen/singulären Tumoren war 12/42 in Gruppe 5, 8/45 in Gruppe 3, 7/35 in Gruppe 4, 8/32 in Gruppe 2 und 10/28 in Gruppe 1. Auch bei diesen Parametern zeigten sich keine Expositionseffekte. Nicht-systemische metastasierende Tumoren wurden nur bei 2/70 Tieren der 10 mT-Expositionsgruppe (Gruppe 2) beobachtet. Hierbei handelte es sich um ein Adenokarzinom der Milchdrüse und ein nicht weiter spezifizierbares Karzinom der Bauchhöhle, jeweils mit Ausbildung von Lungenmetastasen.

Neoplasien – Protokollorgane

a. Hämatopoetisches System

Häufigste Tumorlokalisation war das hämatopoetische System mit systemisch verteilten malignen pleomorphen oder lymphoblastischen Lymphomen, sowie in Einzelfällen granulozytären Leukämien und einem histiozytären Sarkom. Die mit 39/70 (pleomorph/lymphoblastisch: 36/3) höchste Lymphominzidenz wurde in Gruppe 5, der Käfigkontrolle, diagnostiziert. Es folgten Gruppe 3 (niedrige Expositionsdosis, pleomorph/lymphoblastisch: 37/0) mit 37/70 Lymphomen und die Gruppen 4 (Scheinexposition, pleomorph/lymphoblastisch: 27/4) und 1 (mittlere Expositionsdosis, pleomorph/lymphoblastisch: 26/5), jeweils mit 31/70 Lymphomträgern. Die niedrigste Lymphomrate wurde in Gruppe 2, der hohen Expositionsdosis beobachtet: 27/70 (pleomorph/lymphoblastisch: 24/3). Statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Scheinexpositionsgruppe und den übrigen Gruppen traten nicht auf. Bei weiteren 2 Tieren der Käfigkontrolle und je einem Tier der Gruppen 1-3 wurde darüberhinaus eine granulozytäre Leukämie beobachtet.

tet, bei einem weiteren Tier der Gruppe 3 ein histiozytäres Sarkom. Lymphominfiltrate wurden am häufigsten in Thymus (40/69, Gruppe 5) und Milz (40/70, Gruppe 5) diagnostiziert, gefolgt von den Lymphknoten (bis 39/62 je untersuchtem Lymphknoten, Gruppe 5), Lunge (32/69, Gruppe 5), Nieren (32/70, Gruppe 5), Leber (25/70, Gruppe 5), Knochenmark (18/70, Gruppe 5) und Gehirn (11/70, Gruppe 5).

b. Lunge

Zweithäufigste Tumorlokalisation war die Lunge. Die Inzidenz bronchiolo-alveolärer Karzinome/Adenome lag bei 3/1 in Gruppe 5 (Käfigkontrolle), 1/3 in Gruppe 4 (Scheinexposition), 3/5 in Gruppe 3 (10 μ T), 1/4 in Gruppe 1 (1 mT) und 5/3 in Gruppe 2 (10 mT). Obwohl die Karzinomrate mit 5/70 in der hohen Dosisgruppe am höchsten war, gab es keinen positiven Dosis-Wirkungseffekt bei den Lungentumoren.

c. Thymus

Benigne Thymome wurden in allen Gruppen beobachtet. Die Häufigkeit betrug 5/69 in Gruppe 5 (Käfigkontrolle), 5/70 in Gruppe 4 (Scheinexposition), 3/68 in Gruppe 3 (10 μ T), 3/64 in Gruppe 1 (1 mT) und 6/68 in Gruppe 2 (10 mT).

d. Leber

Ein hepatozelluläres Adenom wurde ausschließlich bei 3/70 Tieren der Gruppe 5 (Käfigkontrolle) beobachtet, während ein einzelnes Weibchen der Gruppe 2 (10 mT) ein hepatozelluläres Karzinom zeigte. Weiterhin wiesen Einzeltiere der Gruppen 1 (1 mT) und 3 (10 μ T) ein Hämangiom auf. Bei 2 scheinexponierten Mäusen, einem Tier der Gruppe 3 (10 μ T) und 2 Weibchen der Gruppe 1 (1 mT) konnte außerdem ein Hämangiosarkom der Leber diagnostiziert werden.

e. Übrige Protokollorgane

Einzelne Tiere verschiedener Gruppen zeigten Neoplasien in weiteren Protokollorganen: ein Hämangiom des Knochenmarks (Gruppe 3, 10 μ T) und des mesenterialen Lymphknotens (Gruppe 2, 10 mT) und ein Tubuluszell-Karzinom der Niere (Gruppe 5, Käfigkontrolle).

Neoplasien - Nicht-Protokollorgane

In Nicht-Protokollorganen wurden zufällig oder als Korrelate zu makroskopischen Befunden weitere Tumoren detektiert. An erster Stelle ist hier der Uterus zu nennen. Hier wurden Hämangiome (Gruppe 3: 2; Gruppe 1: 1), Hämangiosarkome (Gruppen 1, 4 und 5: jeweils 1), ein Leiomyom (Gruppe 1), endometriale Stromapolyphen (Gruppen 4 und 5: jeweils 3; Gruppe 3: 2; Gruppe 2: 1) und glanduläre Polyphen (Gruppe 5: 6; Gruppen 2, 3 und 4: jeweils 1) befundet.

Adenokarzinome der Milchdrüse wurden bei 3 Tieren der Gruppe 2 (10 mT) und bei 2 Mäusen aus Gruppe 5 (Käfigkontrolle) beobachtet. Ein Karzinom aus Gruppe 2 (10 mT) zeigte – wie schon erwähnt – multiple Metastasen in der Lunge.

Weitere Tumoren traten sporadisch in verschiedenen Gruppen auf, darunter das ebenfalls bereits erwähnte metastasierende Karzinom der Bauchhöhle (Gruppe 2), Osteome unterschiedlicher Lokalisation (Gruppe 5: 2; Gruppen 1 und 3: jeweils 1), ein Zystadenom des Drüsenmagens (Gruppe 5), Adenome der Harderschen Drüsen (Gruppen 1 und 3: jeweils 1), ein nicht weiter spezifizierbares Karzinom (Gruppe 5) und ein Plattenepithel-Papillom der Haut (Gruppe 4),

sowie ein Rhabdomyosarkom (Gruppe 1) und ein malignes Schwannom (Gruppe 3) mit subkutaner Lokalisation.

10.2.3.2.2.4.2 Nicht-neoplastische Veränderungen

Nicht-neoplastische Veränderungen - Protokollorgane

Expositionsbedingte pathologische Veränderungen konnten weder in den Protokollorganen noch in anderen Organen nachgewiesen werden. Die häufigsten Läsionen (Inzidenz $\geq 10\%$) in den Protokollorganen sind im Folgenden aufgeführt:

a. Joint

Zwischen 5/70 und 12/70 Tiere je Gruppe zeigten überwiegend gering- bis mittelgradige degenerative Kniegelenksveränderungen (degenerative joint disease) in Form von Gelenkknorpeldegenerationen, Hyperostosen, subchondralen Zysten, Kapselfibrosen und entzündlichen Infiltraten.

b. Nieren

Eine meist beidseitige, gering- bis hochgradige chronisch-progressive Nephropathie (CPN) konnte bei 9/69 bis 22/70 Mäusen je Gruppe nachgewiesen werden. Diese Nephropathie war v. a. charakterisiert durch Tubulusatrophie, interstitielle Fibrose und interstitielle Entzündungszellinfiltrate und häufig assoziiert mit einer sehr gering- bis hochgradigen hyalinen Glomerulopathie. Letztere zeigte charakteristische Ablagerungen von amyloidähnlichem hyalinen Material im Bereich der glomerulären und tubulären Basalmembranen. Die Häufigkeit der hyalinen Glomerulopathie lag bei 8/69 bis 17/70 betroffenen Mäusen je Gruppe.

Bei den Tieren, die keine CPN hatten, konnten häufig (multi)fokale, überwiegend geringgradige Tubulusatrophien (Inzidenz: 6/69-10/70/Gruppe), basophile Tubuli (Inzidenz: 5/70-12/70/Gruppe), tubuläre Zysten (Inzidenz: 2/70-7/70/Gruppe), dilatierte Tubuli (Inzidenz: 15/70-23/70/Gruppe), tubuläre Hypertrophien (Inzidenz: 5/70-9/70/Gruppe) und interstitielle mononukleäre Zellinfiltrate (Inzidenz: 14/69-22/70/Gruppe) beobachtet werden.

c. Leber

In der Leber konnten bei 4/69 bis 13/70 Mäusen je Gruppe (multi)fokale, überwiegend sehr gering- bis geringgradige gemischtzellige Entzündungszellinfiltrate und bei 25/70 bis 37/69 Tieren je Gruppe mononukleäre Zellinfiltrate beobachtet werden. Die zellulären Infiltrate waren bei 5/70 bis 13/70 Tieren je Gruppe mit sehr gering- bis hochgradigen (multi)fokalen Leberzellnekrosen assoziiert. Potentiell präneoplastische klarzellige oder basophile Zellfoci (focus of cellular alteration) wurden bei einem Tier der Käfigkontrolle und bei 4/69 Tieren der Gruppe 2 diagnostiziert. Obwohl die Differenz zwischen Gruppe 4 (Scheinexposition, Inzidenz: 0/70) und Gruppe 2 statistisch signifikant ist, wird das Auftreten der Leberzellfoci als sporadischer Befund bewertet.

d. Lunge

(Multi)fokale sehr gering- bis hochgradige bronchiolo-alveoläre Hyperplasien, überwiegend vom bronchiolären Typ (= alveoläre Bronchiolisation) waren bei 3/70 bis 7/70 Mäusen je Gruppe nachweisbar, wobei hochgradige und damit potentiell präneoplastische Hyperplasien bei je einem Tier der Gruppen 2 und 3 (10 mT bzw. 10 μ T), sowie bei 2/70 Mäusen der Gruppe 5 (Käfigkontrolle) auftraten. Bei zahlreichen Mäusen konnten (multi)fokale, überwiegend sehr gering-

bis geringgradige mononukleäre Zellinfiltrate beobachtet werden, teils in peribronchiolärer (Inzidenz: 10/70-21/70/Gruppe), teils in perivaskulärer (Inzidenz: 13/70-22/69/Gruppe) oder in interstitieller (intraseptaler) Lokalisation (Inzidenz: 4/70-11/70/Gruppe).

e. Lymphknoten

Vorwiegend geringgradige lymphoidzellige Hyperplasien der Lymphknoten waren ein häufiger Befund in allen Gruppen. In den lungenassoziierten Lymphknoten zeigten 2/58 bis 12/60 Mäuse je Gruppe eine lymphoide Hyperplasie, in den mesenterialen Lymphknoten waren es 5/69 bis 21/68 und im Leistenlymphknoten 1/51 bis 9/61 Tiere, die diese Veränderung aufwiesen.

f. Milz

(Multi)fokale, vorwiegend gering- bis mittelgradige lymphoide Hyperplasien wurden auch bei 14/70 bis 20/69 Mäusen in der Milz beobachtet. Bei je einem Tier der Gruppen 1 und 3 sowie bei 2/70 Mäusen der Gruppe 5 war die lymphoide Hyperplasie hochgradig ausgebildet und musste differentialdiagnostisch von einem malignen Lymphom abgegrenzt werden.

Ein weiterer häufiger Befund der Milz war eine gering- bis hochgradig verstärkte extramedulläre Hämatopoese, die bei 12/69 bis 18/70 Tieren je Gruppe zu beobachten war.

g. Sternum

Bei 6/70 bis 14/70 Mäusen je Gruppe konnten altersabhängige, vorwiegend geringgradige (multi)fokale Degenerationen im Bereich der intersternibralen Knorpel diagnostiziert werden.

h. Thymus

Auch im Thymus wurden bei vielen Tieren (Inzidenz: 16/69-27/70) (multi)fokale gering- bis hochgradige lymphoide Hyperplasien beobachtet. Bei 1/69 bis 6/68 Tieren je Gruppe war die Hyperplasie hochgradig und musste gegen ein malignes Lymphom abgegrenzt werden.

Nicht-neoplastische Veränderungen - Nicht-Protokollorgane

Bei den Nicht-Protokollorganen wurden nur in den Ovarien und im Uterus nicht-neoplastische Veränderungen mit einer Inzidenz $\geq 10\%$ detektiert. Diese Läsionen korrespondierten in der Regel mit entsprechenden makroskopischen Befunden.

Ein- oder beidseitig auftretende Ovarialzysten fanden sich bei 11 bis 26 untersuchten Tieren je Gruppe. In Kombination mit den Ovarialzysten oder allein auftretend wurden bei 9 bis 12 Mäusen je Gruppe ein- oder beidseitige Zysten der Bursa ovarica beobachtet. Weitere 5 bis 9 Mäuse je Gruppe zeigten ein- oder beidseitig auftretende, gering- bis mittelgradige zystische Dilatationen der Bursa ovarica.

Im Uterus wurden bei 8 bis 26 Mäusen je Gruppe zyklusabhängige, z.T. zystische Erweiterungen des Lumens befundet, in der Regel in Kombination mit teils zystischen Hyperplasien des Endometriums, die bei 8 bis 23 Mäusen je Gruppe festgestellt wurden.

10.2.3.2.2.4.3 Sonstige Befunde

Eine Vielzahl weiterer pathologischer Befunde mit einer Inzidenz $\leq 10\%$ wurde bei Mäusen aller Gruppen in zahlreichen Protokoll- wie Nicht-Protokollorganen beobachtet. Diese Veränderungen

waren allesamt expositionsunabhängig, sporadisch und nicht untypisch für Mäuse dieses Stammes und Alters.

Autolytische Veränderungen bei spontan verendeten Mäusen, die die histopathologische Diagnostik erschwerten, wurden bei 1/70 bis 4/70 Tieren je Gruppe vorgefunden.

Schlussfolgerung Histopathologie

Die histopathologische Auswertung der Studie ergab, dass weder bei den Tumoren noch bei den nicht-neoplastischen Organveränderungen irgendwelche Expositionseffekte beobachtet werden konnten. Die höchste Anzahl an Mäusen mit Tumoren (Tumorträger) wurde in der Käfigkontrolle gesehen, während die mittlere, gefolgt von der hohen Expositionsdosis, die niedrigste Zahl an Tumorträgern aufwies. Die Anzahl maligner und benigner Tumoren war ebenfalls am höchsten in der Käfigkontrolle und am niedrigsten in der hohen Expositionsdosis. Auch gab es organübergreifend keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Tumorraten zwischen der Scheinexposition und den verschiedenen Expositionsgruppen.

11 Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie wurde der mögliche Effekt einer lebenslangen Exposition gegenüber niederfrequenten magnetischen Feldern auf die Entwicklung von Jungtieren und die Reifung des blutbildenden Systems, des Immunsystems und des zentralen Nervensystems in vivo in einem Mäusemodell untersucht. Die Prüfung wurde an freibeweglichen CD-1-Mäusen durchgeführt, die während einer möglichst langen Zeit (20 Stunden täglich) befeldet wurden, beginnend mit Tag 10 der Trächtigkeit.

Die Feldintensitäten (10 μ T, 1 mT und 10 mT) wurden so gewählt, dass im Körper der Tiere Stromdichten erzielt werden, die denen entsprechen, die beim Menschen unter Exposition mit magnetischen Flussdichten von 1, 100 und 1000 μ T auftreten. Außerdem wurde eine Gruppe von Tieren scheinexponiert und eine separate Käfigkontrolle mitgeführt.

Bei der Studie handelte es sich um eine Non-GLP-Studie. Trotzdem erfolgten die Exposition, die tierexperimentelle Durchführung und die Auswertung der Prüfung in Anlehnung an die GLP-Grundsätze des Chemikaliengesetzes §19a (Anlage 1) vom 20. Juli 2008 sowie nach den Regelungen des Tierschutzgesetzes vom 18. Mai 2008. Weiterhin wurde die Prüfung in Anlehnung an die OECD-Guideline 415 "One-Generation Reproduction Toxicity Study", die OECD-Guideline 407 "Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents", die OECD-Guideline 408 "Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents" und die OECD-Guideline 451 "Carcinogenicity Studies" durchgeführt.

In einem **Vorversuch** wurde der Einfluss einer 16tägigen Hochdosis-Exposition auf 16 weibliche Tiere und sowie 8 weitere weibliche Tiere in der Käfigkontrolle untersucht. Es zeigten sich hierbei keine negativen Effekte auf die Gesundheit der Tiere.

Eine Zusammenfassung ist **Tabelle 7** zu entnehmen.

Tab. 7: Zusammenfassung der Ergebnisse des Vorversuches

Parameter	Hochdosis-Exposition vs. Käfigkontrolle
Klinische Befunde	↔
Körpergewicht(sentwicklung)	↔
Körpertemperatur	↔
Wasserverbrauch	leicht reduziert, ohne biologische Auswirkung

Erläuterungen der Symbole: ↔ = kein Effekt

In einer **ersten Teilstudie** wurden zeitlich angepaarte CD-1 Muttertiere ab Tag 10 der Trächtigkeit exponiert. Die Entwicklung der Jungtiere wurde bis Tag 90 nach der Geburt verfolgt. An Tag 28 und 90 wurden jeweils 20 weibliche Nachkommen getötet, makroskopisch untersucht und an Hand von Blut- und Milzproben wurde der hämatologische und immunologische Status der Tiere untersucht. Es zeigten sich in dieser Teilstudie keine adversen Einflüsse auf die körperliche Entwicklung der Tiere. Allerdings zeigten sich in der immunologischen Untersuchung an Tag 90 reduzierte Anzahlen von zytotoxischen T-Zellen/Suppressorzellen sowohl im peripheren Blut als auch in der Milz der Tiere in der mittleren und hohen Dosisgruppe.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus Teilstudie A ist **Tabelle 8** zu entnehmen.

Tab. 8: Zusammenfassung der Ergebnisse der Teilstudie A

Generation / Entwicklungsphase	Parameter	Expositionsbedingte Effekte
F0: Muttertiere	Mortalität/Klinische Befunde	↔
	Körpergewicht(sentwicklung)	↔
	Reproduktionserfolg	↔
	Befunde bei der Sektion	↔
F1: Jungtiere < 22d	Mortalität/Klinische Befunde	↔
	Körpergewicht(sentwicklung)	↔
F1: Jungtiere > 21d	Mortalität/Klinische Befunde	↔
	Körpergewicht(sentwicklung)	↔
	Hämatologie	↔
	Immunologie Milzzellproliferation	↔
	Immunphänotypisierung	<u>Tag 28:</u> Blut: erhöhte Streuung der B- und T-Lymphozytenwerte Milz: ↔ <u>Tag 90:</u> Blut + Milz: ↓ zytotoxische T-Zellen/Suppressorzellen
	Befunde bei der Sektion	↔

Erläuterungen der Symbole: ↔ = kein Effekt, ↓ Abnahme

In einer **zweiten Teilstudie** wurden analog wiederum zeitlich angepaarte CD-1 Muttertiere ab Tag 10 der Trächtigkeit exponiert. Die Entwicklung der Jungtiere wurde über einen Expositionszeitraum von 18 Monaten verfolgt. In dieser Teilstudie wurde ein besonderes Augenmerk auf Reifungsprozesse des zentralen Nervensystems gelegt und die Jungtiere auf ihre Reflexontogenese, die sexuelle Reifung und eine Vielzahl unterschiedlicher Verhaltensaspekte hin untersucht. Nach 18 Monaten Expositionsdauer wurden die Tiere wiederum bei der Sektion makroskopisch befundet und es erfolgte eine anschließende histopathologische Untersuchung. Zusätzlich wurde wiederum an Hand von Blut- und Milzproben der hämatologische und immunologische Status der Tiere untersucht, analog zu den Untersuchungen nach 28 und 90 Tagen in der ersten Teilstudie. Die Etablierung einer gesonderten ersten Teilstudie beruhte auf der Tatsache, dass Manipulationen an den Tieren, wie z.B. Blutentnahmen, starken Einfluß auf parallel durchgeführte physiologische und Verhaltensteste haben. Darüber hinaus konnte eine Rückwirkung von Blutentnahmen auf die Entwicklung des hämatopoietischen Systems nicht ausgeschlossen werden. Somit wurden alle Testungen zur Reifung und Funktionalität des Zentralnervensystems in der zweiten Teilstudie und alle Interimsparameter für das blutbildende und Immunsystem in der ersten Teilstudie erhoben.

In der zweiten Teilstudie zeigten sich wiederum keine adversen, expositionsbedingten Effekte auf die Muttertiere, den Reproduktionserfolg, die Jungtierentwicklung und die weitere Entwicklung der F1-Generation bis in die Seneszenz. Alle durchgeführten Verhaltenstestungen zeigten

keine Effekte. Bei den hämatologischen Untersuchungen nach 18monatiger Exposition zeigten sich statistisch signifikant erhöhte Lymphozytenwerte im peripheren Blut aller 3 Magnetfeld-exponierten Gruppen bei gleichzeitiger statistisch signifikanter Abnahme der Anzahl segment-kerniger Granulozyten. Es traten hingegen keine Auffälligkeiten im Immunstatus der Tiere auf. Die histopathologische Untersuchung aller Tiere ergab keine expositionsabhängigen Effekte, insbesondere weder für neoplastische noch für nicht-neoplastische Veränderungen.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse aus Teilstudie B ist **Tabelle 9** zu entnehmen.

Tab. 9: Zusammenfassung der Ergebnisse der Teilstudie B

Generation / Entwicklungsphase	Parameter	Expositionsbedingte Effekte
F0: Muttertiere	Mortalität/Klinische Befunde	↔
	Körpergewicht(sentwicklung)	↔
	Reproduktionserfolg	↔
	Befunde bei der Sektion	↔
F1: Jungtiere < 22d	Mortalität/Klinische Befunde	↔
	Körpergewicht(sentwicklung)	↔
	Reflexontogenese	↔
F1: Jungtiere > 21d	Mortalität/Klinische Befunde	↔
	Körpergewicht(sentwicklung)	↔
	Verhalten	↔
	Functional Obs. Battery	↔
	Lokomotorische Aktivität	↔
	Akustischer Schreckreflex	↔
	Sexuelle Reifung	Vaginalöffnung nicht zeitverzögert aber bei höherem Körpergewicht
	Hämatologie (18 Monate)	↑ Lymphozyten ↓ segment-kernige neutrophile Granulozyten
	Immunologie	↔
	Milzzellproliferation	↔
	Immunphänotypisierung	↔
	Befunde bei der Sektion	↔
	Histopathologie	↔

Erläuterungen der Symbole: ↔ = kein Effekt, ↓ Abnahme, ↑ Zunahme

In Zusammenfassung zeigten sich in den durchgeführten Studien keine Effekte auf die prä- und postnatale Entwicklung der Tiere, auf die Mortalität, auf die ZNS-Reifung und das Verhalten sowie auf die Inzidenz von Tumoren, inkl. Tumoren des blutbildenden Systems.

Veränderungen im Blutbild waren zu allen Zeitpunkten marginal. Nach 18 Monaten war in allen Dosisgruppen in geringgradiger Anstieg der relativen Lymphozytenzahlen zu beobachten, während die relative Anzahl der segmentkernigen neutrophilen Granulozyten geringgradig verringert war. Aufgrund der hohen Variabilität waren diese Unterschiede bei Betrachtung der absoluten Zahlen nicht vorhanden.

Eine Verminderung der Granulozytenzahl kann auf inflammatorische Prozesse hinweisen, oder auch durch eine verminderte Produktion im Knochenmark bedingt sein. Die toxikologische Relevanz der vorliegenden Ergebnisse ist aber aufgrund der geringen Ausprägung mit Vorsicht zu beurteilen.

Allerdings wurde in immunologischen Untersuchungen an Tag 90 in der mittleren (1 mT) und hohen (10 mT) Dosisgruppe eine reduzierte Anzahl von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) gemessen, sowohl im peripheren Blut als auch in der Milz der Tiere. Dieser Effekt war nicht sehr ausgeprägt aber signifikant. Nach 18 Monaten wurde keine Reduzierung der CTL gefunden. CTL sind wichtige Effektorzellen des Immunsystems. Sie zerstören Zellen, die nicht körpereigene Antigene auf ihrer Oberfläche über MHC Klasse I Moleküle präsentieren und schützen dabei gegen virale Infektionen und Tumore. Ob die beobachtete Reduktion der CTL funktionelle Auswirkungen hat, kann anhand der Resultate aus den bisher durchgeführten Studien nicht geschlussfolgert werden. Deshalb ist es notwendig, eventuelle funktionelle Veränderung von Immunzellen durch niederfrequente magnetische Felder (z.B. von CTL, aber auch Makrophagen) durch entsprechende Versuche, z.B. durch Messung der CTL Aktivität (⁵¹Cr release assay) und Phagozytose-Fähigkeit, zu erfassen.

12 Summary and Conclusion

In the presented study, possible effects of a lifelong exposure to low-frequency magnetic fields on the development of juvenile animals and the maturation of the hematopoietic and immune system as well as on the central nervous system were assessed in a mouse model *in vivo*. The testing was performed in free moving CD-1 mice, exposed for 20 hrs per day, starting at gestation day 10.

The field strength (10 μ T, 1mT, 10mT) was chosen in a way that the current densities in the animal bodies resembled those induced in humans exposed to magnetic flux densities of 1, 100 and 1000 μ T. Two additional groups of animals were either sham exposed or cage controls.

This was a non GLP study. However, the principles of Good Laboratory Practice were taken into consideration as far as possible (German Chemicals Law § 19a, Appendix 1, July 02, 2008) and the study will be conducted in the spirit of Good Laboratory Practice. The study followed the regulations of the German animal protection law (Tierschutzgesetz of May 18, 2006). The study was performed based on OECD-Guideline 415 "One-Generation Reproduction Toxicity Study", OECD-Guideline 407 "Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents", OECD-Guideline 408 "Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity Study in Rodents" and OECD-Guideline 451 "Carcinogenicity Studies".

In a **preliminary study** the influence of a 16 day exposure to the high dose (10 mT) was assessed in 16 exposed female animals versus 8 female animals in a cage control. No negative health effects were seen.

A summary of the results is shown in **table 10**.

Tab. 10: Summary of the results of the preliminary testing

Parameter	10 mT Exposure vs. Cage Control
Clinical Observations	↔
Body Weight (Gain)	↔
Body Temperature	↔
Water Consumption	slightly reduced, w/o biological consequences

Explanation of the symbols: ↔ = no effect

In a **first** sub-study, time-mated CD-1 mice were exposed starting gestation day 10 and the development of the offspring was followed up to postnatal day 90. At the time points day 28 and 90, respectively, 20 female offspring per group were sacrificed, underwent gross pathology and the haematological and immunological status were assessed using blood and spleen samples. No adverse influences on the physical development of the juvenile animals were observed. However, at day 90 a reduced number of cytotoxic T-cells/suppressor cells was seen in peripheral blood and spleen in the middle and high dose groups.

A summary of the results from sub-study A is shown in **table 11a**.

Tab. 11a: Summary of the results of the sub-study A

Generation / Developmental Stage	Parameter	Exposure Related Effects
F0: dams	Mortality / Clinical Observations	↔
	Body Weight (Gain)	↔
	Reproductive Success	↔
	Necropsy Data	↔
F1: offspring < 22d	Mortality / Clinical Observations	↔
	Body Weight (Gain)	↔
F1: offspring > 21d	Mortality / Clinical Observations	↔
	Body Weight (Gain)	↔
	Haematology	↔
	Immunology Spleen Cell Proliferation	↔
	Immunophenotyping	Day 28: Blood: Increased Variety of Numbers of B- and T-Cells Spleen: ↔ Day 90: Blood + Spleen: ↓ cytotoxic T-Cells/Suppressor Cells
	Necropsy Data	↔

Explanation of the symbols: ↔ = no effect, ↓ decrease,

In a **second** sub-study, again time-mated CD-1 mice were exposed starting gestational day 10. The development of the offspring was followed over 18 months of exposure. In this sub-study, a special emphasis was placed on maturational processes of the central nervous system and the juvenile animals were tested for reflex ontogenesis, sexual maturation and a multitude of behavioural aspects. After 18 months of exposure the animals were sacrificed, gross pathology including selected organ weights, was performed during necropsy followed by histopathology. Additionally, as in sub-study A, the haematological and immunological status of 20 animals per group was assessed using peripheral blood and spleen samples. The use of 2 sub-studies was based on the fact, that manipulations on the animals, e.g. during blood sampling, has a strong influence on physiological and behavioural testing performed in parallel. Furthermore, a feedback mechanism of blood sampling on the maturation of the haematopoietic system can not be excluded. Therefore, all testing on the maturation and functionality of the central nervous system were performed in the second sub-study and all interim parameters of the haematopoietic and immune system were assessed in the first sub-study.

As in the first sub-study, no adverse exposure-related effects on the dams, the reproductive success, juvenile development and the development of the F1 generation up to senescence were seen in the second sub-study. All performed behavioural tests showed no effects. In the haematological assessment after 18 months of exposure, increased lymphocyte counts and decreased counts of banded neutrophils were seen in peripheral blood from all 3 exposure groups. No

against viral infections and also against certain cancers. Whether the observed reduction of CTL has a functional effect can not be concluded from the studies. Therefore, it could be necessary to assess the effect of low-frequency magnetic fields on functional aspects of immune cells such as CTL and macrophages by e.g. measuring CTL activity (^{51}Cr release assay) and phagocytosis etc.

13 Literatur

Bahr, A, T Bolz, C Hennes (2007): Numerical dosimetry ELF: Accuracy of the method, variability of models and parameters and the implication for quantifying guidelines. Health Physics 92(6): 521-530

Bornkessel, C, W Meier, S G Pan, U Kullnick (1998): Conception and Construction of an Exposure Setup for the Investigation of the Influence of Pulsed Electromagnetic RF Fields on Defined Physiological Parameters of Rats. Final Report of a Project carried out for the Forschungsgemeinschaft Funk (FGF). IMST, Kamp-Lintfort,.

Charles River Laboratories (2005): Spontaneous Neoplastic Lesions in the Crl:CD-1(ICR) Mouse in Control Groups from 18 Month to 2 year Studies,
http://www.criver.com/flex_content_area/documents/rm_rm_r_lesions_crlcd_1_icr_mouse.pdf

Charles River Laboratories (2007): Reproduction and Behavioural Evaluations in Crl:CD-1(ICR) Mice,
http://www.criver.com/flex_content_area/documents/rm_rm_r_reproductive_behavioral_evaluations_CD1_mice.pdf

Elmore, S (2006): Enhanced Histopathology of the Bone Marrow. Toxicol.Pathol. 34: 666-686

Empire. User and Reference Manual. IMST, 2008.

Fam, WZ, EL Mikhail (1993): A System for the Exposure of Small Laboratory Animals to a 25-mT, 60 Hz Alternating or Travelling Magnetic Field. IEEE Transactions on Biomedical Engineering 40(7): 708-711

Fam, WZ, EL Mikhail (1996): Lymphoma induced in mice chronically exposed to very strong low-frequency electromagnetic field. Cancer Letters 105: 257-269

Holsapple, MP, LJ West, KS Landreth (2003): Species comparison of anatomical and functional immune system development. Birth Defects Research (Part B)68: 321-334

Kittel B, C Ruehl-Fehlert, G Morawietz, J Klapwijk, MR Elwell, B Lenz, MG O'Sullivan, DR Roth, PF Wadsworth (2004): Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 2. A joint publication of the RITA and NACAD groups. Exp Toxicol Pathol. 55:413-31

Landreth, KS (2002): Critical windows in the development of the rodent immune system. Human and Experimental Toxicology 21: 493-498

Morawietz G., C Ruehl-Fehlert, B Kittel, A Bube, K Keane, S Halm, A Heuser, J Hellmann (2004): Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice--Part 3. A joint publication of the RITA and NACAD groups. Exp Toxicol Pathol. 55:433-49

Moser, VC, KL McDaniell, PM Phillips (1991): Rat strain and stock comparisons using a functional observational battery: baseline values and effects of amitraz. *Toxicol Appl Pharmacol.* 108(2):267-83.

Reagan WJ, A Irizarry-Rovira, F Poitout-Belissent, A Provencher Bolliger, S Ramaiah, G Travalos, J McCartney, D Walker, D Bounous, G Walter (2011). Best practices for evaluation of bone marrow in non-clinical toxicity studies. *Toxicol. Pathol.* 39: 435-448

Ruehl-Fehlert C., B Kittel, G Morawietz, P Deslex, C Keenan, CR Mahrt, T Nolte, M Robinson, BP Stuart, U Deschl (2003): Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice-- Part 1. A joint publication of the RITA and NACAD groups. *Exp Toxicol Pathol.* 55:91-106

Travlos GS (2006). Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol.Pathol.* 34: 548-565

Xi, W, MA Stuchly, OP Gandhi (1994): Induced Electric Currents in Models of Man and Rodents from 60 Hz Magnetic Fields. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, 41(11): 1018-1023

14 Anhang

14.1 Abschlußbericht der IMST GmbH



Abschlussbericht

„Aufbau einer Expositionseinrichtung“ im Rahmen des Forschungsvorhabens StSch30006

im Auftrag des

Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin
Reproduktionstoxikologie
Nikolai-Fuchs-Str. 1
30625 Hannover

IMST GmbH
Carl-Friedrich-Gauß-Str. 2
47475 Kamp-Lintfort

Dr.-Ing. Achim Bahr
Dr.-Ing. Thomas Bolz

10. April 2012

Inhaltsverzeichnis

1	EXPOSITIONSEINRICHTUNG	3
1.1	<i>AUFBAU</i>	3
1.2	<i>VERSUCHSDESIGN.....</i>	4
1.3	<i>SPULENAUFBAU.....</i>	4
2	AUSWERTUNG DER EXPOSITIONSDATEN.....	6
2.1	<i>VORSTUDIE</i>	6
2.2	<i>TEILSTUDIE A</i>	7
2.3	<i>TEILSTUDIE B.....</i>	8
3	LITERATUR	10
4	ANHANG.....	11
4.1	<i>ERGEBNISSE DER EXPOSITIONSPARAMETER FÜR DIE TEILSTUDIE A</i>	11
4.2	<i>ERGEBNISSE DER EXPOSITIONSPARAMETER FÜR DIE TEILSTUDIE B</i>	12

1 Expositionseinrichtung

1.1 Aufbau

Im Rahmen des Forschungsvorhabens StSch30006 „Einfluss niederfrequenter Felder auf das sich entwickelnde blutbildende System, das Immunsystem und das ZNS in vivo“ des Bundesamts für Strahlenschutz wurde zur Durchführung der biologischen Untersuchungen von der IMST GmbH eine „in vivo“- Expositionseinrichtung zur Befeldung von Mäusen bei der Frequenz 50 Hz im Fraunhofer Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin (ITEM) in Hannover aufgebaut. Eine schematische Darstellung der Expositionseinrichtung ist in Bild 1 wiedergegeben.

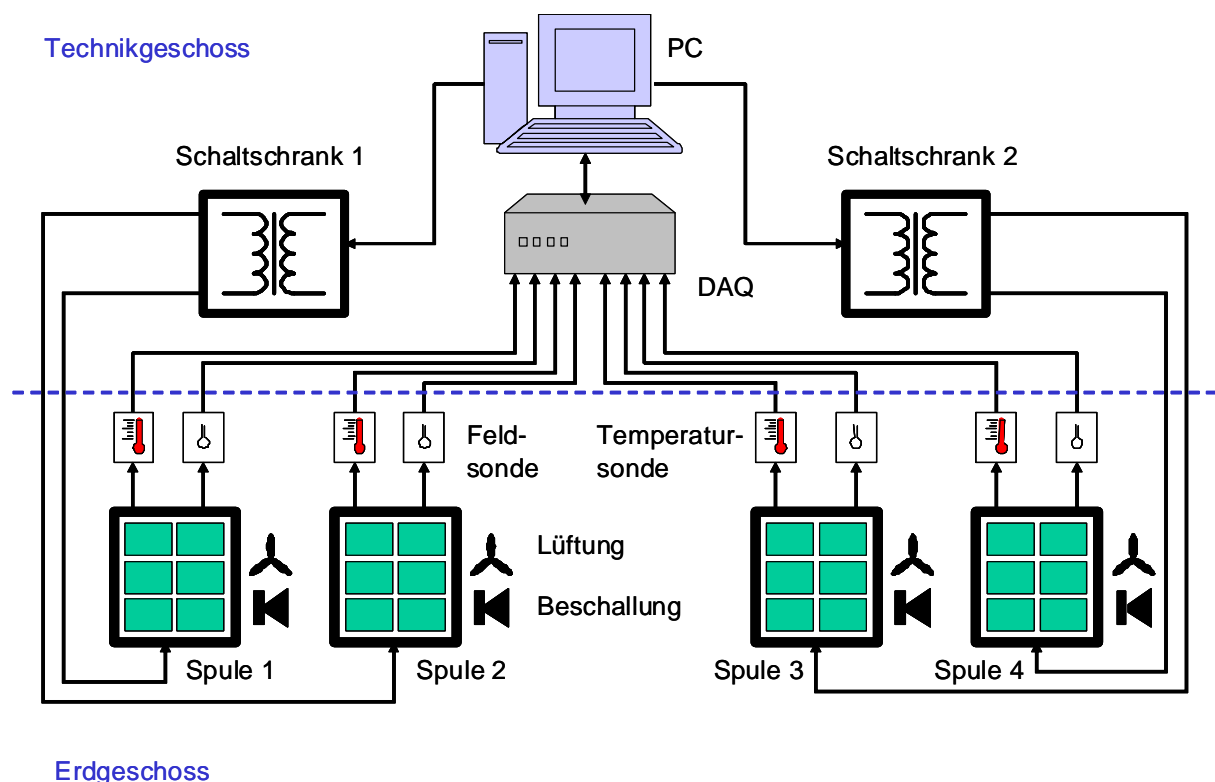


Bild 1: Schematische Darstellung der Expositionseinrichtung.

Die Expositionseinrichtung setzt sich zusammen aus einem PC zur Automatisierung und Expositionsüberwachung, 2 Schaltschränken (bestehend aus Stelltrafos zur Einstellung der erforderlichen Stromstärken und Kondensatoren zur Kompensation der Blindwiderstände der Spulen sowie Schaltern zur Abschaltung der Expositionseinrichtung), vier 50 Hz-Spulensystemen zur Exposition der Versuchstiere, einem Datenakquisitionssystem (DAQ) und Sonden zur Expositionsüberwachung, einer Einrichtung zur Kühlung der Spulensysteme und Lautsprechern zur Beschallung. Mit diesen 4 Spulensystemen, die sich im Erdgeschoss des Gebäudes befinden, lassen sich drei verschiedene Expositionsfeldstärken zzgl. scheinexponierter Kontrolle realisieren. Jeweils zwei Spulensysteme sind in einem Versuchsraum untergebracht. Der Steuer-PC, die Schaltschränke und das Datenakquisitionssystem sind im darüber liegenden Technikgeschoss installiert.

Elektrische Felder werden in allen vier Einrichtungen geschirmt. Eventuell auftretende Vibrationen der Käfige werden durch eine externe Aufhängung der Käfigsysteme vermieden. Zur Gewährleistung gleicher Umgebungstemperaturen werden die Spulensysteme gekühlt. Hierzu wird die Umluft für die Spulen der Klimaanlage des Gebäudes entnommen. Zur Vermeidung unterschiedlicher Geräuschpegel findet eine Beschallung aller Spulensysteme statt.

Umgebungsparameter wie Licht, Vibration, Geräuschpegel und Luftfeuchtigkeit wurden nach Installation der Spulensysteme geprüft.

Bedingt durch den identischen Aufbau der Spulensysteme und der Sicherstellung gleicher Umgebungsbedingungen (Licht, Temperatur, Vibration, Geräuschpegel und Luftfeuchtigkeit) bei Kontrollen und exponierten Tieren ist eine verblindete Versuchsdurchführung gewährleistet.

Die Anlage wird per Software automatisch gesteuert und überwacht. Hierzu werden die Temperatur- und die Feldstärkewerte im Rhythmus von 5 Minuten im Expositionsvolumen der Spulen erfasst, ausgewertet und aufgezeichnet. Im Falle eines gravierenden Fehlers wird die Anlage automatisch abgeschaltet. Die Überprüfung der Expositionsdaten erfolgte täglich durch die IMST GmbH.

1.2 Versuchsdesign

Mit der Expositionseinrichtung sollen 4 Gruppen von Tieren in jeweils 18 Käfigen und 4 Mäusen pro Käfig gleichzeitig befördert werden. Die Exposition der Tiere erfolgt geblendet mit den in Tabelle 1 aufgeführten drei Feldintensitäten der magnetischen Flussdichte. Außerdem wird eine Gruppe von Tieren scheinexponiert.

B _n -Feldintensitäten [μ T]			
0,0	9,6	961,0	9608,0

Tabelle 1: Magnetische Flussdichten zur Beförderung der Versuchstiere.

Die Feldintensitäten sind auf Basis von [Xi et al. 1994] so gewählt, dass im Körper der Tiere Stromdichten erzielt werden, die denen entsprechen, die beim Menschen unter Exposition mit magnetischen Flussdichten von 1, 100 und 1000 μ T auftreten.

1.3 Spulenaufbau

Das Bild 2 zeigt an Hand der Konstruktionszeichnung den inneren Aufbau eines Spulenkörpers, der aus Holz besteht und außen mit einer Kunststoffbeschichtung versehen ist. Auf den Innenkorpus ist eine 0,5 mm dicke Kupferplatte aufgebracht, die zur Schirmung gegenüber elektrischen Feldern verwendet wird. Zur Vermeidung von Wirbelströmen ist die Kupferschirmung an einer Stelle mit einem Schlitz versehen. Danach folgt eine Isolierung, die zur thermischen Isolation des Expositionsvolumens vom Spulendraht dient. Dieser wird auf dem eigentlichen Spulenkörper mit den Abmessungen 920 mm x 900 mm x 900 mm gewickelt. Die Kühlung des Spulendrahts

erfolgt durch Luftkühlung. Die Luft wird mit Hilfe der äußeren Spulenabdeckung um den Spulendraht geführt, gleichzeitig dient die äußere Spulenabdeckung als Berührungsschutz.

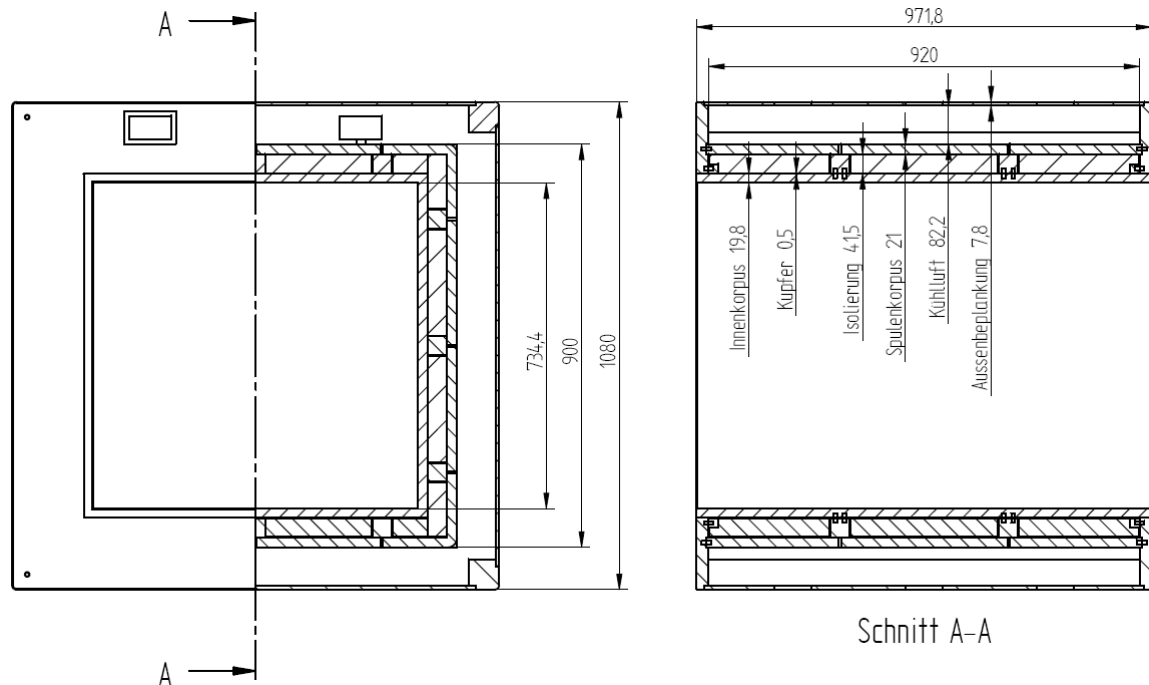


Bild 2: Konstruktionszeichnung eines Spulenkörpers.

Das Bild 3 zeigt ein realisiertes Spulensystem mit Tierkäfigen, Halterung für die Käfige und Schläuchen für die Luftzirkulation. Sämtliche relevanten Teile sind nichtmetallisch ausgeführt.



Bild 3: Realisierung eines Spulensystems mit Tierkäfigen, Halterung für die Käfige und Schläuchen für die Luftzirkulation.

2 Auswertung der Expositionsdaten

Während der durchgeführten Studien war die Expositionseinrichtung täglich 24 Stunden lang im Betrieb. Zur Untersuchung und Pflege der Tiere wurden die Felder in den Spulen für den Zeitraum von 8 Uhr bis 12 Uhr abgeschaltet. Die Datenakquisition erfolgte auch in diesen Pausen. In Bild 4 ist als Beispiel für einen typischen Expositionstag der zeitliche Verlauf der magnetischen Flussdichte der 10 mT-Spule dargestellt. Nach Einschalten der Expositionseinrichtung um 12 Uhr vergehen ca. 60 Minuten, bis sich ein stationäres Verhalten einstellt.

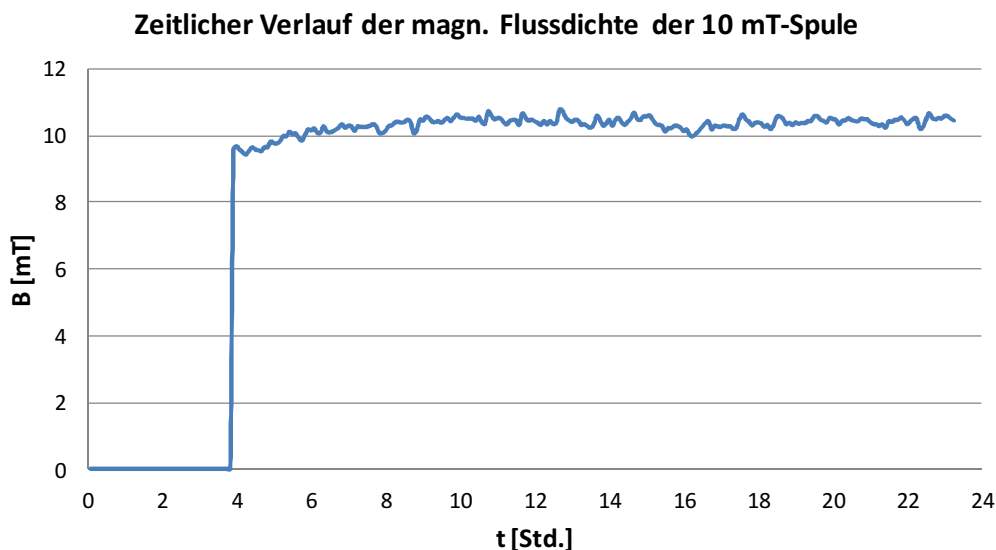


Bild 4: Zeitlicher Verlauf der magnetischen Flussdichte der 10 mT-Spule für einen typischen Expositionstag.

Die Auswertung der Expositionsdaten erfolgte für eine Vorstudie im Zeitraum vom 13.01.2010 bis zum 29.01.2010 und für zwei Teilstudien, die in den Zeiträumen vom 08.02.2010 bis zum 28.05.2010 und vom 11.06.2010 bis zum 20.12.2011 durchgeführt wurden. Hierzu wurden für jeden einzelnen Expositionstag der zeitliche Mittelwert und die Standardabweichung für die Temperatur und die magnetische Flussdichte im Expositionsvolumen der Spulen berechnet.

Für die monatliche Darstellung der Ergebnisse wurde der zugehörige Mittelwert aus den zeitlichen Mittelwerten der Tagesexpositionen ermittelt. Dies entspricht dem monatlichen Mittelwert. Als Standardabweichung für den jeweiligen Monat wurde die größte Standardabweichung aus den zugehörigen Tagesexpositionen zugrunde gelegt. Dieser Wert stellt damit einen worst-case für die monatliche Standardabweichung dar. Die Datenauswertung erfolgte unmittelbar nach dem Einschalten der Felder um 12 Uhr.

2.1 Vorstudie

Im Rahmen der Vorstudie wurden nur die 10 mT-Spule und die Spule für die Scheinexposition (0 T) verwendet. In der Tabelle 2 sind die ermittelten Ergebnisse für den Mittelwert und die maximale Standardabweichung der Temperatur und der magnetischen Flussdichte im Expositionsvolumen der Spulen für den Monat Januar 2010 zusammengefasst. In Bezug auf die Zielfeldstärke nach Tabelle 1 weist die

10 mT-Spule ein um 8,6% erhöhtes magnetisches Feld im Expositionsvolumen auf. Der geringe Wert für die maximale Standardabweichung der magnetischen Flussdichte im Expositionsvolumen der Spulen weist auf eine hervorragende Feldkonstanz während der Expositionstage hin.

Spule	T_{avg} [°C]	$STD_{max}(T)$ [°C]	B_{avg}	$STD_{max}(B)$
0 T	26,29	0,41	721,49 nT	15,77 nT
10 mT	24,79	0,69	10,43 mT	0,2 mT

Tabelle 2: Monatlicher Mittelwert und maximale Standardabweichung (STD) der Temperatur und der magnetischen Flussdichte im Expositionsvolumen der Spulen für die Vorstudie.

2.2 Teilstudie A

Die ermittelten Ergebnisse der monatlichen Mittelwerte und der maximalen Standardabweichungen für die Temperatur und die magnetische Flussdichte in den Expositionsvolumen der Spulen A bis D für die Teilstudie A sind in den Tabellen 4 bis 7 des Anhangs zusammengefasst. In Bild 5 ist der Verlauf der monatlichen Temperaturmittelwerte im Expositionsvolumen der Spulen grafisch dargestellt. Der Temperaturunterschied in den Spulen ist kleiner als 1°C.

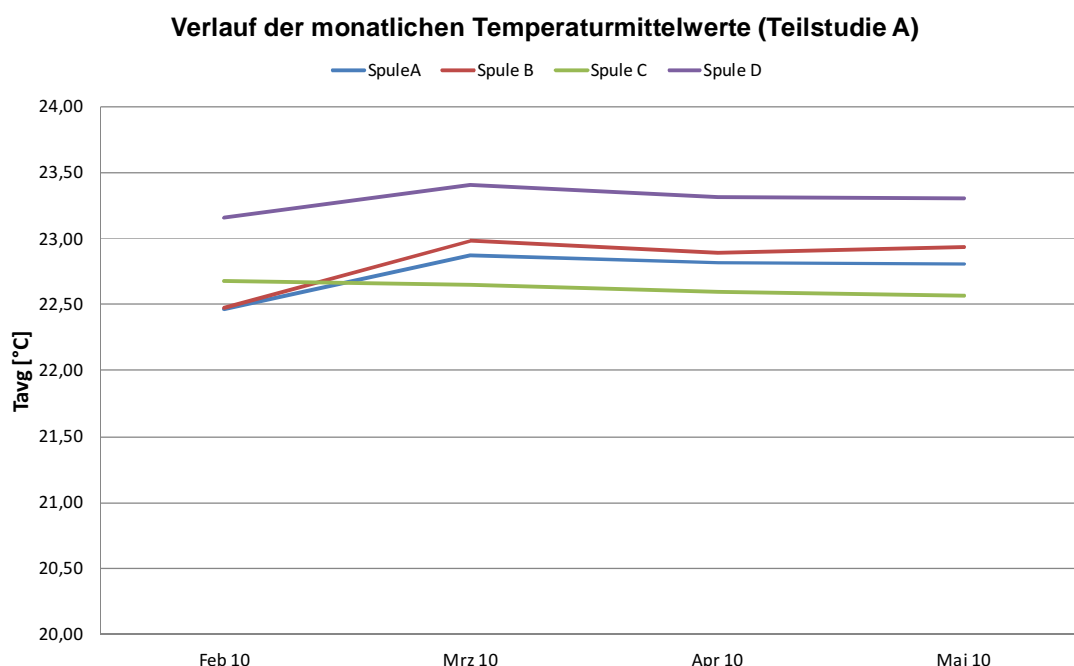


Bild 5: Verlauf der monatlichen Temperaturmittelwerte im Expositionsvolumen der Spulen für die Teilstudie A.

Das Bild 6 zeigt den Verlauf der monatlichen und auf die zugehörige Zielfeldstärke B_n der Tabelle 1 normierten magnetischen Flussdichtemittelwerte im Expositionsvolumen der aktiven Spulen. Die Felder in den Spulen weisen eine exzellente zeitliche Konstanz während der Teilstudie A auf.

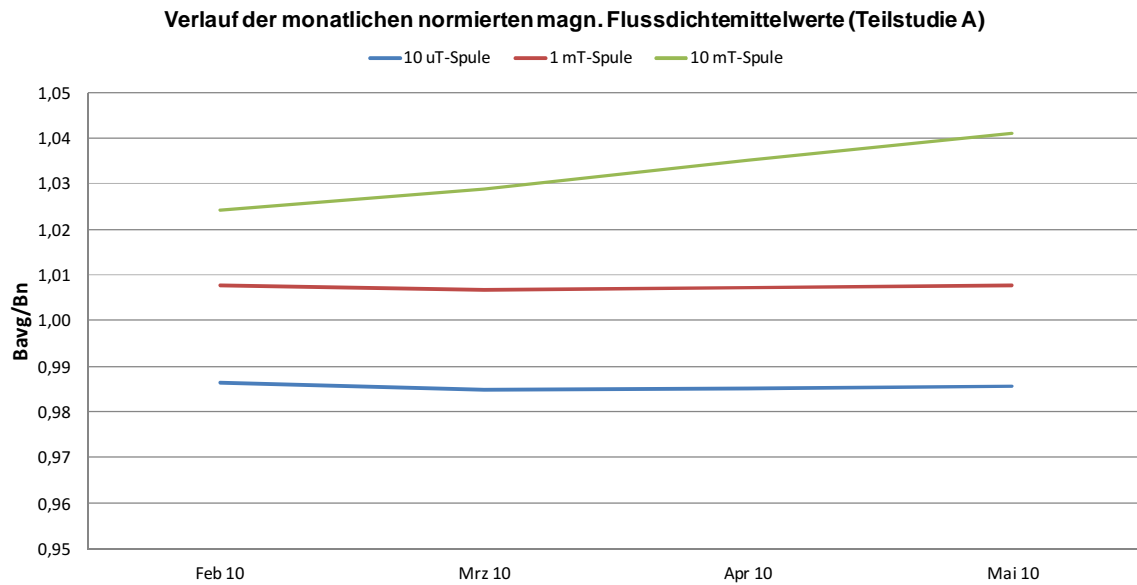


Bild 6: Verlauf der monatlichen und auf die Zielfeldstärke B_n normierten magnetischen Flussdichtemittelwerte im Expositionsvolumen der aktiven Spulen für die Teilstudie A.

Der Verlauf der monatlichen Mittelwerte der magnetischen Flussdichte im Expositionsvolumen der Spule für die Scheinexposition ist in Bild 7 gezeigt.

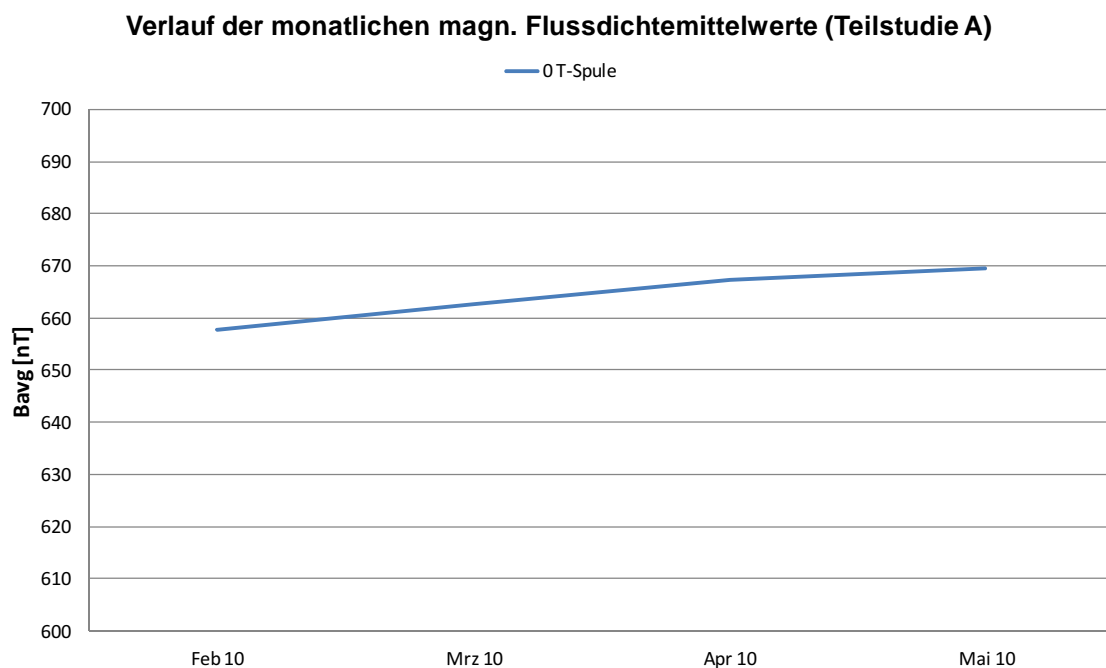


Bild 7: Verlauf der monatlichen magnetischen Flussdichtemittelwerte im Expositionsvolumen der Spule für die Scheinexposition (Teilstudie A).

Während der Teilstudie A gab es keine Ausfälle der Expositionseinrichtung.

2.3 Teilstudie B

Die ermittelten Ergebnisse der monatlichen Mittelwerte und der maximalen Standardabweichungen für die Temperatur und die magnetische Flussdichte in den

Expositionsvolumen der Spulen A bis D für die Teilstudie B sind in den Tabellen 8 bis 11 des Anhangs aufgelistet.

In Bild 8 ist der Verlauf der monatlichen Temperaturmittelwerte im Expositionsvolumen der Spulen grafisch dargestellt.

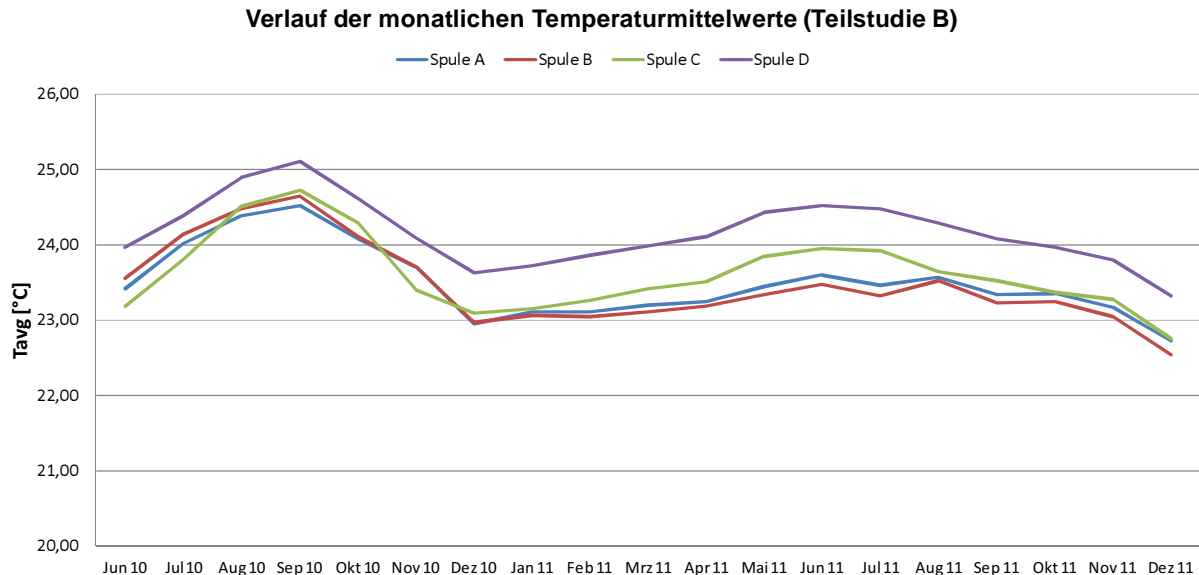


Bild 8: Verlauf der monatlichen Temperaturmittelwerte im Expositionsvolumen der Spulen für die Teilstudie B.

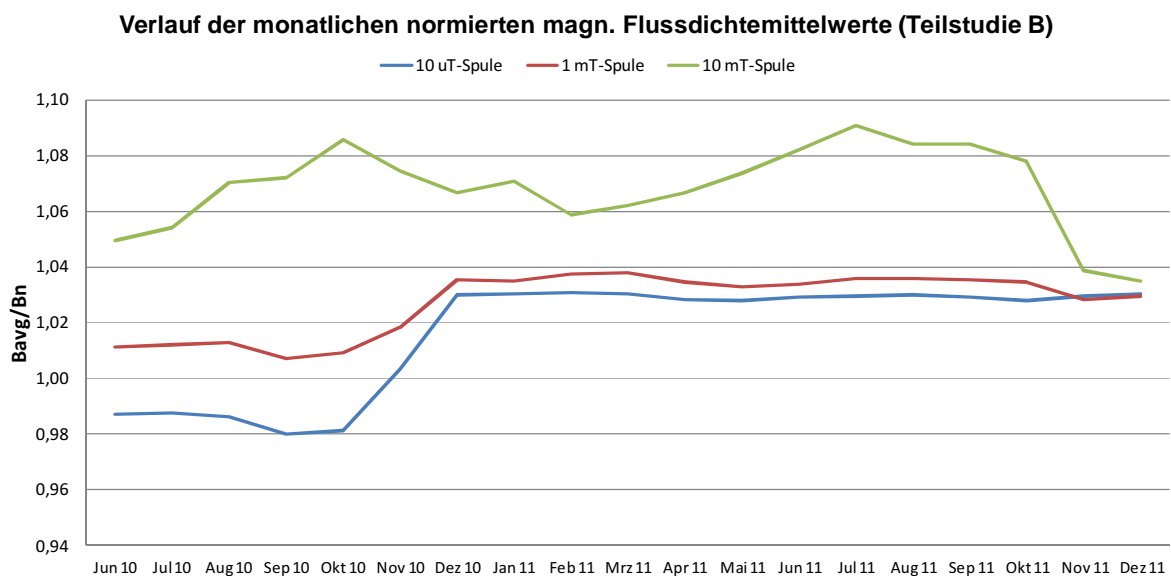


Bild 9: Verlauf der monatlichen und auf die Zielfeldstärke B_n normierten magnetischen Flussdichtemittelwerte im Expositionsvolumen der aktiven Spulen für die Teilstudie B.

Das Bild 9 zeigt den Verlauf der monatlichen und auf die zugehörige Zielfeldstärke B_n der Tabelle 1 normierten magnetischen Flussdichtemittelwerte im Expositionsvolumen der aktiven Spulen. Auch in dieser Teilstudie weisen die magnetischen Felder in den Spulen eine gute zeitliche Konstanz auf.

Der Verlauf der monatlichen Mittelwerte der magnetischen Flussdichte im Expositionsvolumen der Spule für die Scheinexposition ist in Bild 10 dargestellt.

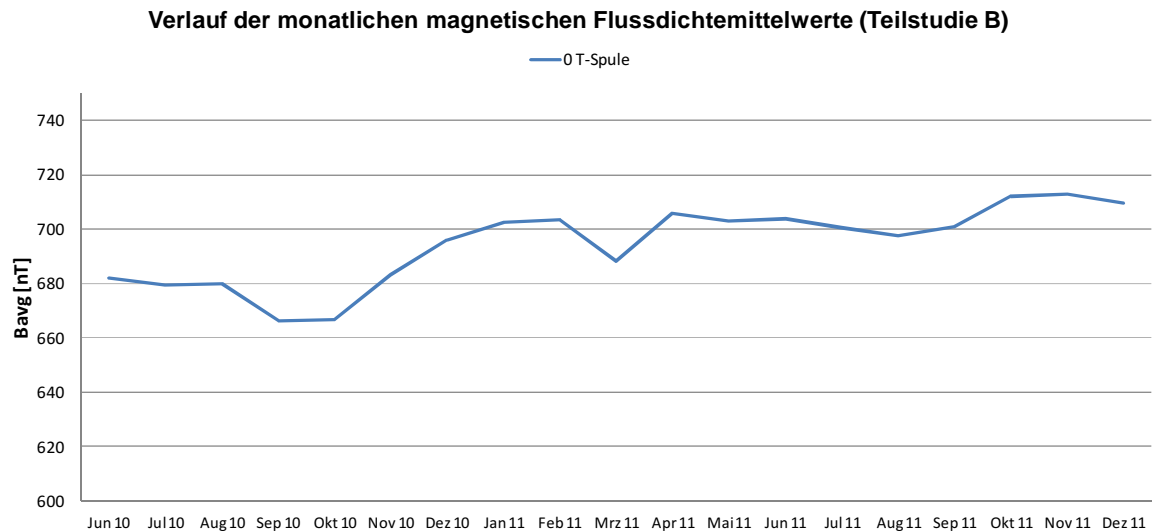


Bild 10: Verlauf der monatlichen magnetischen Flussdichtemittelwerte im Expositionsvolumen der Spule für die Scheinexposition (Teilstudie B).

Während der Teilstudie B wurden nur wenige Ausfälle registriert, wobei in 3 Fällen ein technischer Defekt vorlag. In der Tabelle 3 sind das Datum und die Dauer des Ausfalls der Spulen zusammengefasst.

Datum des Ausfalls	Dauer des Ausfalls [Std.]	Spule
21.07.2010	24	10 mT
10.09.2010	24	0 T, 10 μ T
19.10.2010	21	0 T, 10 μ T, 1 mT, 10 mT
11.10.2011	24	0 T, 10 μ T
06.11.2011	24	10 mT

Tabelle 3: Datum und Dauer des Ausfalls der Spulen während der Teilstudie B.

3 Literatur

- [Xi et al. 1994] Xi, W.; Stuchly, M. A. ; Gandhi, O. P. : Induced electric currents in models of man and rodents from 60 Hz magnetic fields. In: IEEE Trans. Biomed. Eng., S. 1018-1023, 1994.

4 Anhang

Für den Zeitraum vom 08.02.2010 bis zum 28.05.2010 und 11.06.2010 bis zum 20.12.2011 sind in den Tabellen 4 bis 7 und in den Tabellen 8 bis 11 die über den jeweiligen Monat gemittelte Temperatur und maximale Standardabweichung für die Temperatur und die magnetische Flussdichte im Expositionsbereich der Spulen zusammengefasst.

4.1 Ergebnisse der Expositionsparameter für die Teilstudie A

Monat/Jahr	T_{avg} [°C]	$\text{STD}_{\text{max}}(T)$ [°C]	B_{avg} [nT]	$\text{STD}_{\text{max}}(B)$ [nT]
Feb. 2010	22,47	0,55	657,63	9,82
Mrz. 2010	22,88	0,49	662,75	10,17
Apr. 2010	22,82	0,54	667,37	11,26
Mai. 2010	22,81	0,71	669,58	16,49

Tabelle 4: Monatliche Mittelwerte und maximale Standardabweichungen (STD) der Temperatur und der magnetischen Flussdichte der Spule A für die Teilstudie A.

Monat/Jahr	T_{avg} [°C]	$\text{STD}_{\text{max}}(T)$ [°C]	B_{avg} [µT]	$\text{STD}_{\text{max}}(B)$ [µT]
Feb. 2010	22,47	0,44	9,47	0,07
Mrz. 2010	22,99	0,38	9,46	0,06
Apr. 2010	22,89	0,44	9,46	0,08
Mai. 2010	22,93	0,52	9,46	0,06

Tabelle 5: Monatliche Mittelwerte und maximale Standardabweichungen (STD) der Temperatur und der magnetischen Flussdichte der Spule B für die Teilstudie A.

Monat/Jahr	T_{avg} [°C]	$\text{STD}_{\text{max}}(T)$ [°C]	B_{avg} [mT]	$\text{STD}_{\text{max}}(B)$ [mT]
Feb. 2010	22,68	0,73	0,97	0,01
Mrz. 2010	22,65	0,68	0,97	0,01
Apr. 2010	22,59	0,68	0,97	0,01
Mai. 2010	22,57	0,88	0,97	0,01

Tabelle 6: Monatliche Mittelwerte und maximale Standardabweichungen (STD) der Temperatur und der magnetischen Flussdichte der Spule C für die Teilstudie A.

Monat/Jahr	T_{avg} [°C]	$STD_{max}(T)$ [°C]	B_{avg} [mT]	$STD_{max}(B)$ [mT]
Feb. 2010	23,16	0,90	9,83	0,18
Mrz. 2010	23,41	0,82	9,88	0,19
Apr. 2010	23,31	0,74	9,94	0,18
Mai. 2010	23,31	0,97	9,99	0,18

Tabelle 7: Monatliche Mittelwerte und maximale Standardabweichungen (STD) der Temperatur und der magnetischen Flussdichte der Spule D für die Teilstudie A.

4.2 Ergebnisse der Expositionsparameter für die Teilstudie B

Monat/Jahr	T_{avg} [°C]	$STD_{max}(T)$ [°C]	B_{avg} [nT]	$STD_{max}(B)$ [nT]
Jun. 2010	23,42	0,80	681,79	13,12
Jul. 2010	24,01	0,79	679,60	22,96
Aug. 2010	24,38	1,06	679,86	7,05
Sep. 2010	24,52	1,87	666,36	10,39
Okt. 2010	24,07	1,48	666,74	10,63
Nov. 2010	23,70	1,24	683,30	11,76
Dez. 2010	22,96	0,33	695,77	10,48
Jan. 2011	23,10	0,16	702,67	10,80
Feb. 2011	23,10	0,30	703,43	11,48
Mrz. 2011	23,20	0,24	688,09	10,46
Apr. 2011	23,24	0,79	705,74	10,18
Mai 2011	23,45	0,36	703,02	12,13
Jun. 2011	23,60	0,39	703,55	10,37
Jul. 2011	23,46	0,40	700,49	8,27
Aug. 2011	23,56	0,32	697,61	8,79
Sep. 2011	23,34	0,37	701,02	10,00
Okt. 2011	23,34	0,34	711,94	11,84
Nov. 2011	23,17	0,18	712,98	11,11
Dez. 2011	22,71	0,17	709,45	11,27

Tabelle 8: Monatliche Mittelwerte und maximale Standardabweichungen (STD) der Temperatur und der magnetischen Flussdichte der Spule A für die Teilstudie B.

Monat/Jahr	T_{avg} [°C]	$STD_{max}(T)$ [°C]	B_{avg} [μT]	$STD_{max}(B)$ [μT]
Jun. 2010	23,55	0,66	9,47	0,06
Jul. 2010	24,13	0,63	9,48	0,10
Aug. 2010	24,47	0,80	9,47	0,06
Sep. 2010	24,64	0,76	9,41	0,07
Okt. 2010	24,10	1,19	9,42	0,07
Nov. 2010	23,70	1,12	9,63	0,08
Dez. 2010	22,96	0,28	9,89	0,06
Jan. 2011	23,05	0,16	9,89	0,07
Feb. 2011	23,04	0,29	9,90	0,06
Mrz. 2011	23,10	0,25	9,89	0,06
Apr. 2011	23,18	0,86	9,87	0,07
Mai 2011	23,34	0,22	9,87	0,06
Jun. 2011	23,47	0,24	9,88	0,06
Jul. 2011	23,32	0,31	9,88	0,06
Aug. 2011	23,52	0,20	9,89	0,08
Sep. 2011	23,23	0,44	9,88	0,06
Okt. 2011	23,24	0,17	9,87	0,07
Nov. 2011	23,04	0,15	9,88	0,06
Dez. 2011	22,54	0,15	9,89	0,07

Tabelle 9: Monatliche Mittelwerte und maximale Standardabweichungen (STD) der Temperatur und der magnetischen Flussdichte der Spule B für die Teilstudie B.

Monat/Jahr	T_{avg} [°C]	$STD_{max}(T)$ [°C]	B_{avg} [mT]	$STD_{max}(B)$ [mT]
Jun. 2010	23,18	1,23	0,97	0,01
Jul. 2010	23,80	0,88	0,97	0,02
Aug. 2010	24,51	1,94	0,97	0,01
Sep. 2010	24,72	1,78	0,97	0,01
Okt. 2010	24,28	2,80	0,97	0,01
Nov. 2010	23,39	1,25	0,98	0,01
Dez. 2010	23,09	0,23	0,99	0,01
Jan. 2011	23,15	0,21	0,99	0,01
Feb. 2011	23,26	0,32	1,00	0,01
Mrz. 2011	23,41	0,33	1,00	0,01
Apr. 2011	23,50	0,87	0,99	0,01
Mai 2011	23,84	0,45	0,99	0,01
Jun. 2011	23,95	0,48	0,99	0,01
Jul. 2011	23,92	0,33	0,99	0,01
Aug. 2011	23,64	0,36	0,99	0,01
Sep. 2011	23,52	0,48	0,99	0,01
Okt. 2011	23,37	0,31	0,99	0,01
Nov. 2011	23,28	0,33	0,99	0,01
Dez. 2011	22,75	0,18	0,99	0,01

Tabelle 10: Monatliche Mittelwerte und maximale Standardabweichungen (STD) der Temperatur und der magnetischen Flussdichte der Spule C für die Teilstudie B.

Monat/Jahr	T_{avg} [°C]	$STD_{max}(T)$ [°C]	B_{avg} [mT]	$STD_{max}(B)$ [mT]
Jun. 2010	23,97	1,19	10,08	0,18
Jul. 2010	24,38	1,18	10,12	0,23
Aug. 2010	24,90	1,66	10,27	0,20
Sep. 2010	25,10	1,58	10,29	0,21
Okt. 2010	24,61	2,63	10,42	0,22
Nov. 2010	24,09	1,70	10,31	0,38
Dez. 2010	23,63	0,57	10,24	0,21
Jan. 2011	23,72	0,42	10,28	0,23
Feb. 2011	23,85	0,51	10,17	0,21
Mrz. 2011	23,97	0,42	10,19	0,20
Apr. 2011	24,10	0,90	10,24	0,19
Mai 2011	24,43	0,56	10,31	0,20
Jun. 2011	24,52	0,63	10,39	0,23
Jul. 2011	24,47	0,55	10,47	0,25
Aug. 2011	24,29	0,51	10,41	0,22
Sep. 2011	24,07	0,66	10,41	0,25
Okt. 2011	23,97	0,50	10,35	0,28
Nov. 2011	23,79	0,47	9,97	0,30
Dez. 2011	23,32	0,50	9,93	0,24

Tabelle 11: Monatliche Mittelwerte und maximale Standardabweichungen (STD) der Temperatur und der magnetischen Flussdichte der Spule D für die Teilstudie B.

IMST GmbH

Carl-Friedrich-Gauß-Straße 2
D-47475 Kamp-Lintfort

Tel. 02842 / 981 - 370
Fax 02842 / 981 - 299
email: bahr@imst.de

| Verantwortung für Mensch und Umwelt |

Kontakt:

Bundesamt für Strahlenschutz

Postfach 10 01 49

38201 Salzgitter

Telefon: + 49 30 18333 - 0

Telefax: + 49 30 18333 - 1885

Internet: www.bfs.de

E-Mail: ePost@bfs.de

Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.



Bundesamt für Strahlenschutz