

Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

**Altersabhängige Wirkungen hochfrequenter elektro-
magnetischer Felder des Mobilfunks auf Entwicklungs-
und Differenzierungsprozesse des Zentralnervensystems
in juvenilen Labornagern - Vorhaben FM 8848**

**Auftragnehmer:
Jacobs University Bremen gGmbH
School of Engineering and Science**

**M. Klose
A. Lerchl**

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-87/13

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:
urn:nbn:de:0221-2013112711143

Salzgitter, November 2013

Abschlussbericht für das Forschungsvorhaben

Altersabhängige Wirkungen hochfrequenter elektromagnetischer Felder des Mobilfunks auf Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse des Zentralnervensystems in juvenilen Labornagern

Forschungsnehmer:

Jacobs University Bremen gGmbH
School of Engineering and Science
Prof. Dr. A. Lerchl
Campus Ring 1, 28759 Bremen

Verfasser

Dr. Melanie Klose und Prof. Dr. Alexander Lerchl
Jacobs University Bremen gGmbH

Mai 2013

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

Zusammenfassung

Weibliche Wistar-Ratten wurden beginnend mit dem Alter von 14 Tagen bis zum Alter von 19 Monaten im Kopfbereich für 2 Stunden täglich, 5 Tage die Woche, elektromagnetischen Feldern des Mobilfunks ausgesetzt (900 MHz GSM). Die SAR-Werte betrugen 0 (Schein-Exposition), 0,7, 2,5 und 10 W/kg, als über das Rattenhirn gemittelten Teilkörper-SAR-Wert. Die Versuchsdurchführung erfolgte verblindet. Da sich die Exposition der Ratten hauptsächlich auf den Kopf beschränken sollte, war eine Fixierung der Tiere in speziell angefertigten und dem Wachstum der Ratten entsprechenden Restrainern nötig. Während des 19monatigen Versuchszeitraums wurde 3 Mal ein Set von Verhaltens- und Lerntests (RotaRod, Morris-Water-Maze, 8-Arm-Labyrinth, Open Field) mit juvenilen, adulten und präsenilen Ratten durchgeführt, dabei konnten zwischen den Gruppen der (schein-)exponierten Ratten und den Ratten der Käfig-Kontrolle keine konsistenten Unterschiede festgestellt werden. Lediglich die präsenilen Ratten der Käfigkontrolle zeigten in 2 der 4 Tests eine verminderte Aktivität im Vergleich zu den anderen Gruppen. Die RotaRod Ergebnisse wiesen bei den adulten und den präsenilen Ratten etwas längere Verweilzeiten bei den scheinexponierten gegenüber den exponierten Tieren auf, diese Unterschiede waren allerdings nicht konsistent. Ein regelmäßiges Monitoring der Körpergewichte zeigte im ersten Jahr keine und danach nur leicht verschiedene Gewichte der (schein-) exponierten Ratten gegenüber den Käfig-Kontrollen, so dass Stress als Störfaktor kaum eine Rolle gespielt haben dürfte. Eine histopathologische Auswertung erbrachte keine Hinweise, dass eine Langzeit-Exposition zu erhöhten Tumorraten des Zentralnervensystems (ZNS), oder einer veränderten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke führt.

Summary

Female Wistar-rats, from an age of 14 days to 19 months, were exposed in the head region for 2 hours per day, 5 days per week, to a GSM-modulated 900 MHz electromagnetic field. The SAR values were 0 (Sham), 0.7, 2.5 and 10 W/kg. To ensure

a primary exposure of the head region, rats were fixated in restraining tubes of different sizes according to their increasing body weight. During the experiment, a set of 4 behavioral and learning tests (RotaRod, Morris-water maze, 8-arm maze, open field) were performed three times in juvenile, adult, and pre-senile rats. Between the groups of the (sham-)exposed rats and the cage control, no profound differences could be identified in these tests. Only pre-senile rats of the cage control showed a lower activity in two of these tests compared to the other groups. The RotaRod data revealed somewhat longer holding times for the sham exposed vs. the exposed rats, but this was not consistent. The body weights of the (sham-) exposed rats were not different during the first year, and thereafter only marginally different from those of the the cage controls, so that the effect of stress as confounder was probably negligible. A histopathological analysis revealed no higher tumor incidence in the central nervous system (CNS) due to exposure, or a difference in the blood-brain-barrier permeability, respectively.

1. Zielsetzung

In einem Langzeitversuch sollten am Tiermodell Ratte die Effekte der Exposition zu elektromagnetischen Feldern des GSM-Standards (900 MHz) bei wiederholter lokaler Kopfexposition untersucht werden. Die Exposition erfolgte vom 14. Lebenstag bis zu einem Alter von 19 Monaten für 2 Stunden pro Tag an 5 Tagen pro Woche. Die über das Gehirn gemittelten spezifischen Absorptionsraten (SAR) sollten 0 (Schein-Exposition), 0.4, 2 und 10 W/kg bei GSM-gepulster Exposition betragen. Die biologischen Endpunkte waren Entwicklungsparameter, der allgemeine Gesundheitszustand und mögliche Effekte auf das Zentralnervensystem (ZNS), welche durch Verhaltens- und Kognitionstests sowie durch histopathologische Auswertung nach Ende der Exposition erfasst wurden. Zu dem durchgeführten Set an etablierten Verhaltens- und Kognitionstests gehörten das Open Field, Water Maze, RotaRod und das 8-Arm-Maze. Diese 4 Verhaltensversuche wurden in 3 verschiedenen Lebensaltern (juvenil, adult, präsenil) der Ratten wiederholt, um mögliche Unterschiede in der Entwicklung des ZNS bei exponierten und nicht exponierten Ratten feststellen zu können. Die Untersuchungsergebnisse sollten Erkenntnisse im Kontext der Frage liefern, ob Kinder und Jugendliche im Vergleich zum Erwachsenen höhere Empfindlichkeiten gegenüber hochfrequenten elektromagnetischen Feldern des Mobilfunks, z.B. aufgrund höherer Energieaufnahme, altersabhängiger Unterschiede im Entwicklungsstatus des ZNS, oder längeren Lebenszeitexposition, aufweisen.

2. Methodik

2.1 Restraining

Für die zu untersuchende Fragestellung sollte gezielt der Kopfbereich und somit das Gehirn exponiert werden, andere Körperbereiche dagegen möglichst wenig, was eine Fixierung der Ratten notwendig machte. Zu diesem Zweck wurden Restrainer aus transparentem Makrolon® mit Fixierstopfen entwickelt, die sich im vorderen Bereich konisch verschmälerten und den Kopf in der gewünschten Position fixierten (Abb. 1a).

Eine Öffnung am vorderen Ende ermöglichte eine problemlose Ventilation und olfaktorische Wahrnehmung der Umwelt. Den Tieren wurde vor der ersten Exposition mehrere Tage lang die Möglichkeit gegeben, sich an das Restraining zu gewöhnen, indem die Restrainer zu den Ratten in die Käfige gelegt und die Ratten wiederholt für kurze Zeit in die Restrainer gesetzt wurden. Bereits nach kurzer Zeit war eine Gewöhnung der Tiere an diese Prozedur zu erkennen und sie verhielten sich ruhig und schliefen z.T. sogar in den Restrainern (Abb.1a), was zusätzlich durch die Exposition während der inaktiven Phase gefördert wurde. Da die Exposition vom 14. Lebenstag bis ins hohe Alter der Ratten erfolgte, mussten die Restrainer der körperlichen Entwicklung entsprechend angepasst werden, um sicherzustellen, dass die Tiere sich möglichst wenig bewegen konnten, ohne sie jedoch zu stark zu belasten. Anhand von Daten des Züchters zur Körperlänge, -höhe, -größe und Gewicht des verwendeten Rattenstamms und ergänzende eigene Messungen, wurden Restrainer in fünf verschiedenen Größen hergestellt (Abb.1b).

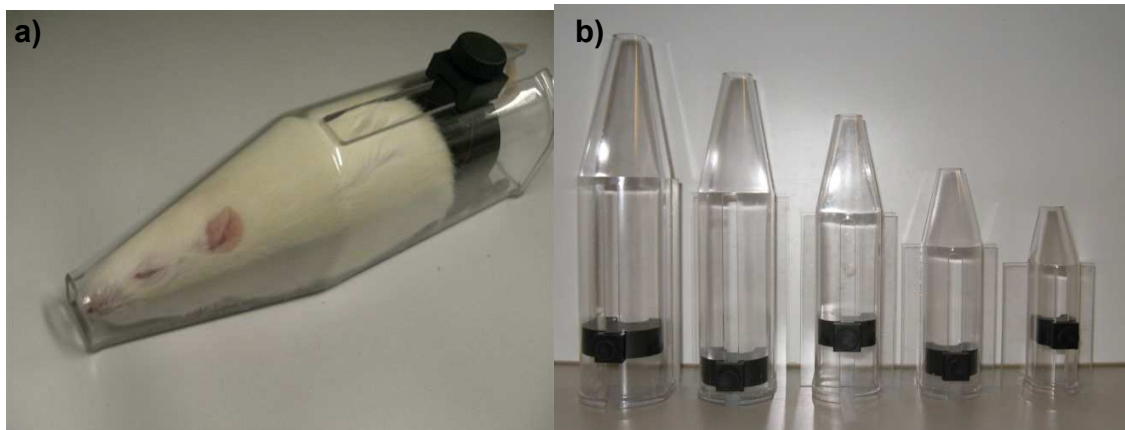


Abb. 1: Fixierte Ratte im Restrainer (a) und während des Versuchsverlaufs eingesetzte Restrainer in 5 verschiedenen Größen, entsprechend der körperlichen Entwicklung der Ratten (b).

2.2 Expositionsanlagen

Vom Kooperationspartner in Wuppertal wurden acht identische Expositionsanlagen mit Plätzen für jeweils sechs Ratten gefertigt, so dass insgesamt 48 Ratten zeitgleich einem GSM-gepulsten Signal von 900 MHz bzw. einer Scheinexposition ausgesetzt werden konnten. Je zwei Anlagen gehörten zur selben Gruppe mit identischem SAR-Wert, 0 (Schein-Exposition), 0,7, 2,5 und 10 W/kg, als über das Rattenhirn gemittelten Teilkörper-SAR-Wert.

Eine aus Aluminium gefertigte Flachhohlleitung wurde aufrecht stehend betrieben, wobei das eingespeiste Hochfrequenz (HF)-Signal (900 MHz) über eine Kegel-Antenne im Inneren der Wellenleitung (Abb. 2a, b) in die nach unten laufende Grundwelle der Struktur umgesetzt wird. Am Ende des Wellenleiters wurde ein Adapter angebracht, der passgenau auf die jeweiligen Restrainer abgestimmt war und während des Versuchs entsprechend der Restrainergröße ausgewechselt wurde (Abb. 2c, d). Zur Erhöhung der elektrischen Feldstärke in Querschnittsmitte wurde parallel zur Längsachse der Hohlleitung ein zentral angeordneter Doppelsteg heraus geformt (Abb. 2b), der sich auch innerhalb des Adapters fortsetzte. So konnte ein Teil des Leistungsverlustes, der durch Reflexion vom Adapterende und vom Tierkörper unvermeidlich entstand, kompensiert werden. Die Hohlleiterwelle transformierte sich am unteren Adapterende durch eine Blende mit einer zentralen Öffnung in das Immissionsfeld, von welchem ein über die Speiseleitung der Hohlleitung definierter Teil in den Kopf der fixierten Ratte eindrang.

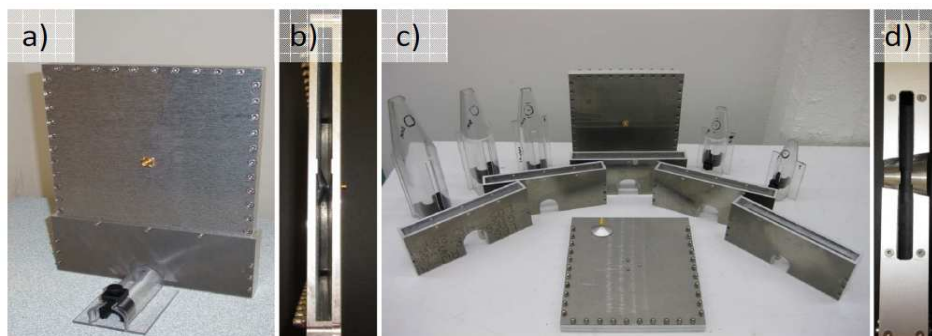


Abb. 2: Einzelbestandteile der Expositionsanlagen: a) Wellenleiter als Expositionseinheit mit Adapter und Restrainer, b) untere Öffnung des Wellenleiters, c) Restrainer in 5 verschiedenen Größen mit entsprechenden Adaptern, d) unteres Ende des Adapters mit passgenauer Aussparung für den Restrainer (Spathmann et al. 2012).

Die gesamte Expositionsanlage wurde aus 48 Einzelleitungen aufgebaut, von denen jeweils 6 Leitungen in Form eines Sechsecks angeordnet (Abb. 3a) und auf einem Unterbau aus PVC angebracht wurden. Um 5° nach hinten geneigte Rampen dienten als Halterung für die Restrainer (Abb. 3b), und die Neigung sorgte dafür, dass von den Ratten während der Exposition abgegebener Urin abfließen konnte und sich nicht unter den Tieren staute. Jede Sechsergruppe mit dazugehörigen Rampen wurde auf einen Tisch mit einer zentralen Öffnung montiert, durch die Luft in den durch die 6 Hohlleitungen gebildeten Kamin nach oben strömen konnte und somit eine ausreichende Luftzufuhr für die Tiere gewährleistet war.

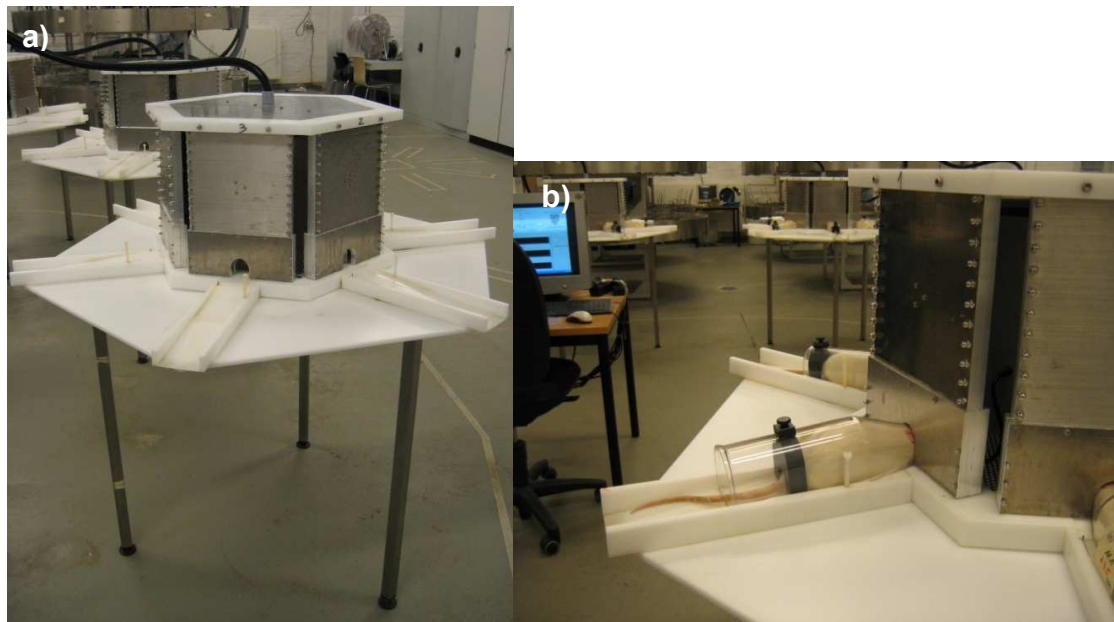


Abb. 3: Expositionsanlage mit 6 Steckplätzen (a) und im Restrainer fixierte Ratte während der Exposition (b).

2.3 Dosimetrie

Die elektromagnetischen Felder innerhalb der Flachhohlleitung wurden auf der Basis eines detaillierten Computermodells berechnet. Das elektrische Feld der ungestörten Eigenwelle der Struktur, dargestellt in einem Linien- und Farbkontur-Plot (Abb. 4a), erfährt Störungen durch die reale Anregung über den HF-Stecker, den Einspeisekegel, den Kurzschluss am oberen Leitungsende und durch das offene untere Leitungsende

(Abb. 4b). Desweiteren mussten die Auswirkungen des am unteren Ende der Hohlleitung angebrachten Adapters und die partielle Abdichtung des unteren Leitungsendes durch Metallblenden, auf die Verteilung der elektrischen Feldstärke berücksichtigt werden. Im letzten Schritt wurden der Restraint mit fixierter Ratte dem Simulationsmodell hinzugefügt und die Feld- und SAR-Verteilung berechnet, hier für die Längsschnittebene des Voxel-Modells einer 56 Tage alten Ratte dargestellt (Abb. 6b). Die Verteilungen belegen, dass die Ratte durch das von oben auf den Kopf einfallende Immissionsfeld vornehmlich in einem relativ begrenzten Bereich des Kopfes exponiert wird (Abb. 5b). Die elektrische Feldverteilung in einer vertikalen Ansicht durch den Rattenkopf zeigt im Vergleich zum Leerfeld eine größere Stehwelligkeit, bedingt durch eine stärkere Reflexion an dem Restraint und der Ratte, sowie mit Luft gefüllten Zwischenräumen (Abb. 5a). In longitudinalen Schnitten durch den Kopf einer Ratte wurde, bei einer Auflösung von 0,74 mm, die räumliche SAR-Verteilung untersucht (Abb. 6a). Es zeigte sich, dass die höchsten SAR-Werte in der oberen, vom Gehirn eingenommenen Kopfhälfte vorlagen, während nur vereinzelte, rasch in alle Richtungen abklingende Maxima an den Seiten des Kopfes auftraten.

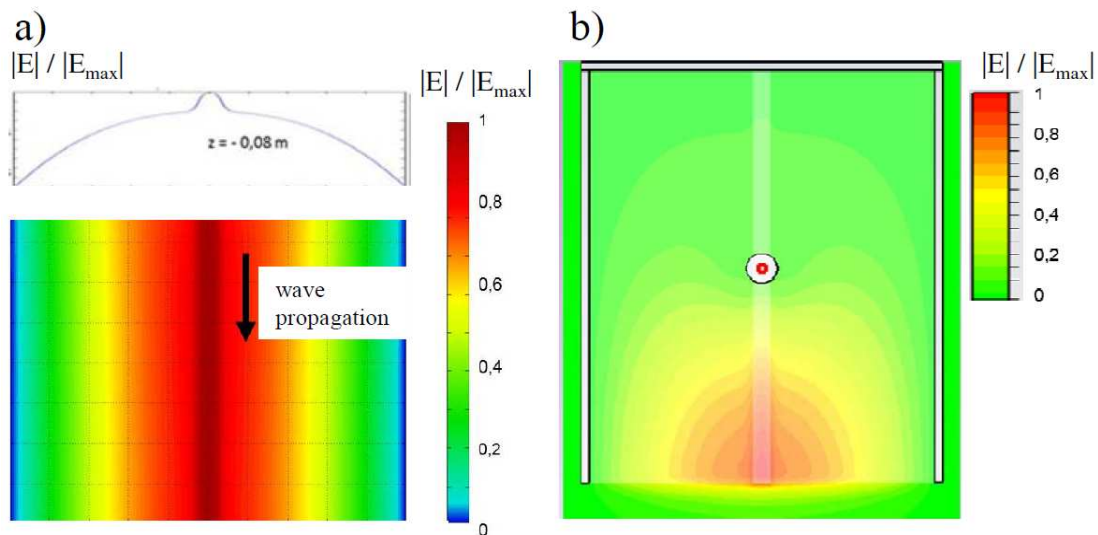


Abb. 4: Numerische Ergebnisse der elektrischen Feldverteilung in einer vertikalen Ebene der ungestörten Hohlleitung (a) und für die Eigenform der Struktur mit Felderhebungen, bedingt durch die am offenen Leitungsende reflektierte Welle (b), bei einer realistischen Anordnung der kegelförmigen Antenne (Spathmann et al. 2012).

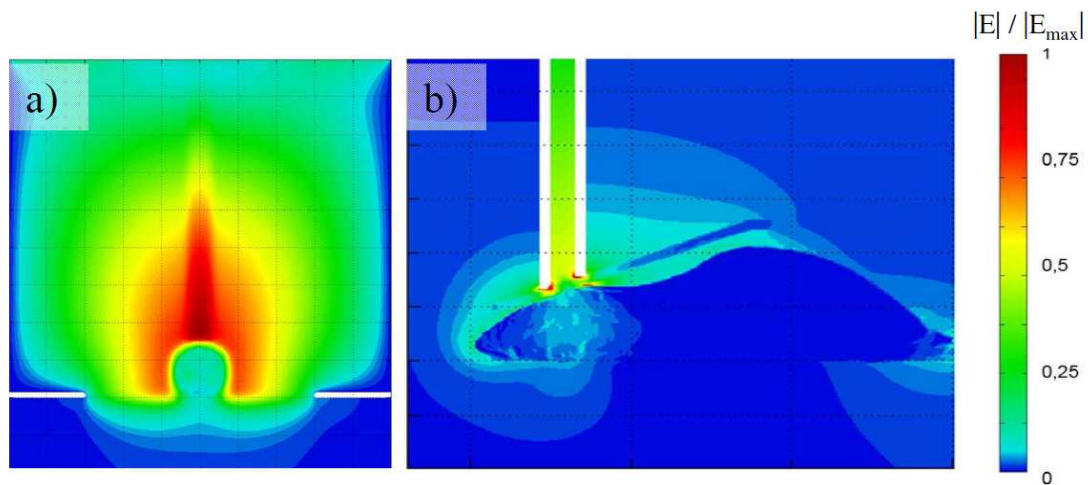


Abb. 5: Numerische Ergebnisse für die elektrische Feldverteilung während der Exposition einer im Restraint fixierten 56 Tage alten Ratte (Modell), in vertikaler Ebene (a) und in einem longitudinalen Schnitt durch den gesamten Rattenkörper (b) (Spathmann et al. 2012).

Das Versuchsdesign sah vor, juvenile Ratten von ca. 30 g Körpermasse bis zu adulten Ratten mit Körpergewichten von 300 g und mehr zu exponieren. Zur Erzielung einer hohen statistischen Aussagekraft war eine möglichst homogene Exposition erforderlich, d.h. Ratten ähnlicher Größe mussten möglichst identisch im Kopfbereich exponiert werden. Für eine verlässliche numerische Dosimetrie waren hochauflösende 3D-Computermodelle von Wistar-Ratten in verschiedenen Wachstumsphasen mit einer räumlichen Auflösung von 0.5 – 1.0 mm erforderlich. Die beiden bereits vorhandenen Voxelmodelle für Wistar-Ratten (Alter: 14 Tage, Gewicht ca. 21 g und 140 Tage, 256g) wurden durch zwei 3D-Modelle von Ratten mit einem Alter von 28 bzw. 49 Tagen und einem Körpergewicht von ca. 73g bzw. 126 g ergänzt, die anhand von hoch auflösenden MRI-Aufnahmen angefertigt wurden. Die MRI-Aufnahmen wurden hinsichtlich der anatomischen Struktur ausgewertet, mit dielektrischen Gewebedaten korreliert und anschließend in digitale Körpermodelle umgewandelt. Von diesen 4 Voxelmodellen wurden weitere Modelle durch Interpolation abgeleitet, um auch andere Gewichte bei der Dosimetrie berücksichtigen zu können. Dafür wurden auch aus der Literatur bekannte Gewichtsentwicklungen von Gehirn (Morgan et al. 2006) und Ganzkörper bei Ratten herangezogen. Da die Körpergewichte während des Experiments regelmäßig erfasst wurden, konnte bei großen Abweichungen von den Modellgewichten eine Korrektur der Dosimetrie vorgenommen werden. Bei den

Gehirngewichten zeigte sich, dass die aus den MRI-Aufnahmen entwickelten Modellgewichte den Literaturangaben sehr nahe kamen (Abb. 6c). Natürlich führten sowohl die Abweichungen der realen Gewichte von den Modellgewichten, als auch die noch minimal möglichen Bewegungen der Ratten in den Restrainern zu Unsicherheiten und Schwankungen der tatsächlichen Exposition des Gehirns. Die Standardabweichungen der SAR-Werte im Gehirn lagen unter der Annahme von Bewegungen der Ratten aus der Standardposition um 1 mm in beliebige Richtungen, rechnerisch abhängig von der altersbedingten Größe, innerhalb eines Intervalls von $\pm 17\%$ bis $\pm 36\%$ der Ziel-SAR-Werte.

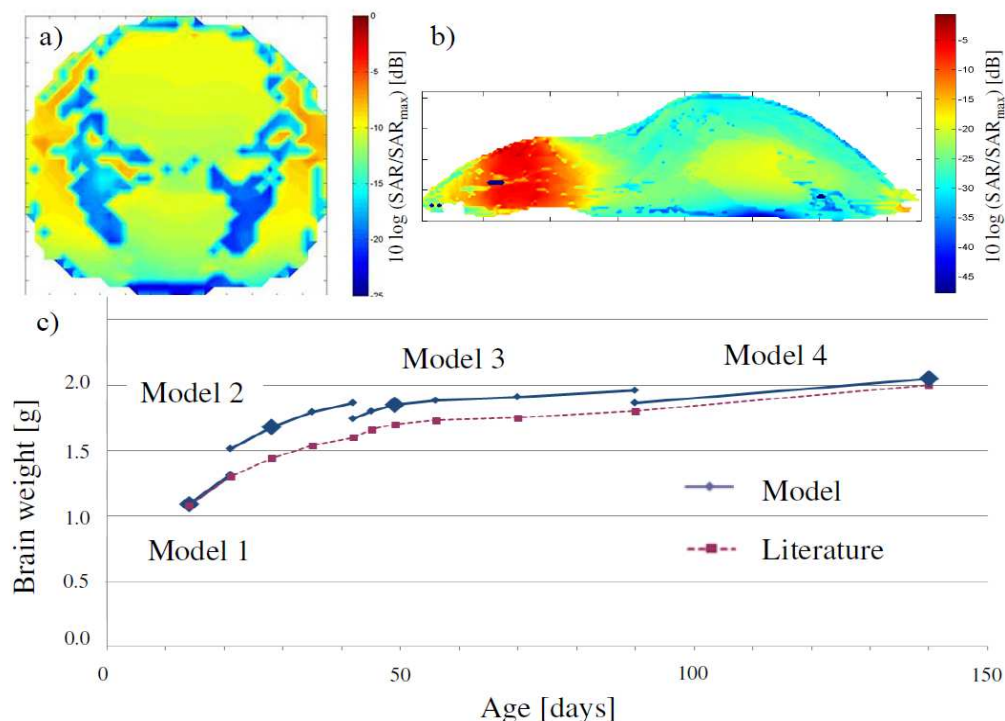


Abb. 6: Numerische Ergebnisse für die SAR-Verteilung im Querschnitt durch den Kopf einer 56 Tage alten Ratte (a) und in einem longitudinalen Schnitt durch den gesamten Rattenkörper (b). Gehirngewichte von 11 Voxel-Modellen verglichen mit Literaturangaben (c) (Spathmann et al. 2012).

Die mittleren Gehirn-SAR-Werte für die mit 10 W/kg am höchsten exponierte Gruppe wurden möglichst exakt über die Generatorleistung eingestellt, die durch das Speisenetzwerk heruntergeteilt wurde. Für die anderen Expositionsgruppen ergaben sich dann die Speiseleistungen der Hohlleitungen und damit die mittleren Gehirn-SAR-Werte der Ratten über die unterschiedlichen Leistungsteilungsfaktoren des

Speisenetzwerks an den entsprechenden Ausgängen. Aufgrund früherer schlechter Erfahrungen verzichtete der Kooperationspartner auf den Einsatz einstellbarer Dämpfungsglieder, was neben der Verwendung von Standardbauteilen dazu führte, dass die zur Erzeugung der beiden niedrigen SAR-Nominalwerte (0,4 und 2 W/kg) rechnerisch erforderlichen Teilungsfaktoren nicht exakt realisiert werden konnten. Daher weichen diese SAR-Werte mit 0,7 und 2,5 W/kg etwas von den aus den Personenschutzrichtlinien bekannten Nominalwerten ab, was aber nach Ansicht des Auftragnehmers in Anbetracht der biologisch bedingten Variation und der noch ungeklärten Problematik der Übertragbarkeit von SAR-Grenzwerten zwischen Mensch und Tier absolut vertretbar ist.

2.4 Signalquelle und Speisenetzwerk

Für die Modulation des 900 MHz-Trägers sollte das bewährte generische GSM-Testsignal verwendet werden, das bereits bei früheren BfS-Projekten zum Einsatz kam (El Quardi et al. 2008, 2011; Schüller et al. 2000).

Zur Anhebung des HF-Signalpegels auf die zur Exposition aller Ratten mit den gewünschten SAR-Werten erforderliche Gesamt-Leistung musste dem Generator ein Verstärker nachgeschaltet werden. Die Hauptverteilung des Speisenetzwerks, bestehend aus mehreren Leistungsteilern, Zirkulatoren und Abschlusswiderständen, verzweigte das vom Verstärker abgegebene Signal im Verhältnis der unterschiedlichen SAR-Werte der 3 zu exponierenden Gruppen auf 6 voneinander entkoppelte Ausgänge. Je einer dieser Ausgänge führte zu einer Expositionsanlage mit 6 Steckplätzen, und zwischen diesen Steckplätzen wurde die erforderliche Umverteilung des Speisenetzwerks mit je einem 1:6-Koppler und 6 Zirkulatoren mit Abschlüssen und Kabelverbindungen gewährleistet und somit die Verteilung der Expositionssignale auf die einzelnen Hohlleitungen. Die Verkabelung wurde mit identischen Schutzschläuchen versehen, so dass die Verkabelung von außen für das Personal nicht unterscheidbar war und die Exposition verblindet ablaufen konnte. Durch installierte Sonden mit nachgeschaltetem Diodendetektor in den Expositionsanlagen wurde die Feldstärke

während der gesamten Dauer der Exposition fortlaufend registriert, auf einem PC dokumentiert und vom Kooperationspartner in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Die während des Versuchs gespeicherten Daten wurden zusätzlich als Sicherungskopie verwahrt.

2.5 Versuchstiere

Als Tiermodell wurden Ratten des Stamms RccHanWist (Wistar-Ratten) gewählt aufgrund ihrer geringen Mortalität, gutem Lernverhalten, geringen Aggressivität und gut charakterisierten Entwicklungsparametern. 45 schwangere Wistar-Ratten wurden vom Züchter am 12. Tag ($\pm$ einen Tag) ihrer Schwangerschaft erhalten und in Haltungskäfigen vereinzelt. Die trächtigen Tiere und ihre Nachkommen wurden während der gesamten Versuchsdauer in einem leicht verschobenen Licht-Dunkelwechsel gehalten, die Beleuchtung erfolgte von 10 Uhr vormittags bis 22 Uhr abends. Die Nachkommen wurden innerhalb von 4 Tagen geboren und der Zeitpunkt der Augen – und Ohröffnung, sowie des „Righting Reflexes“ als wichtige Entwicklungsparameter notiert. Zur genauen Unterscheidung wurde den juvenilen Weibchen an ihrem 13. Lebenstag, vor Expositionsbeginn, ein programmierbarer Transponder (BioMedic Data Systems, Inc., Delaware, USA, IPTT-300) subkutan mit individuellen Daten (Käfignummer, Rattennummer, Expositionszeit, Anlage und Steckplatz) eingesetzt. Dieser Transpondertyp konnte zusätzlich die Temperatur messen und war gleichzeitig in seiner Funktion unbeeinträchtigt von dem elektromagnetischen Feld. In den Tagen vor Expositionsbeginn wurden die Ratten an die Prozedur des Restrainings gewöhnt. Die erste Exposition erfolgte am Tag 14 für 5 Minuten ($n = 24$ pro Expositionsstärke), in den darauffolgenden Tagen wurde die Dauer der Exposition schrittweise über 7 Tage auf 120 Minuten erhöht. Im Alter von 22 Tagen wurden die 120 weiblichen Nachkommen (24 Tiere pro Gruppe einschließlich Käfigkontrolle) von ihren Muttertieren getrennt und jeweils zu viert in einem Käfig gehalten. Die Muttertiere und Nachkommen, die nicht im Versuch verblieben, wurden schmerzfrei getötet. Nach Ende der 19monatigen Exposition wurden die 120

Rattenweibchen ebenfalls schmerzfrei getötet, eine umfassende Autopsie durchgeführt und die Gehirne und Hypophysen nach Standard-Verfahren (Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Peroxidase-Antiperoxidase-Färbung) histologisch aufbereitet und analysiert.

In einem Nebenprojekt wurden 3 Gruppen männlicher Nachkommen im Alter von 14, 16 und 18 Tagen einer 2tägigen Kurzzeitbestrahlung (15 bzw. 30 min) ausgesetzt, anschließend schmerzfrei getötet, die Gehirne entnommen und mögliche Effekte der Exposition auf die Blut-Hirn-Schranke untersucht. Hierzu wurde körpereigenes Albumin als Marker verwendet und mittels immunohistochemischer Färbung (PAP-Methode) analysiert (Moos and Hoyer 1996, Fritze et al. 1997).

2.6 Auswertungen

Alle Ergebnisse der Verhaltensversuche wurden während der Versuchsdurchführung schriftlich protokolliert und später elektronisch gespeichert und analysiert. Im Fall des Open-Field-Tests erfolgte eine Aufnahme jeder einzelnen Ratte mit einer Kamera, die aufgezeichnete Videodatei wurde später mit verlangsamer Geschwindigkeit abgespielt und ausgewertet. Außerdem wurde das Körpergewicht über die gesamte Versuchsdauer protokolliert. Die Studie wurde verblindet durchgeführt, d.h. die Versuchsdurchführung und Datenaufbereitung erfolgte ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit der Ratten. Erst nachdem die verblindeten Ergebnisse dem Kooperationspartner in Wuppertal übermittelt wurden, übersandte dieser den Expositionscode. Die Daten wurden mittels Shapiro-WilksTest auf Normalverteilung geprüft. Normalverteilte Daten wurden mit multifaktorieller Varianzanalyse (MANOVA) und post-hoc Test (Bonferroni) statistisch analysiert. Bei nicht normalverteilten Datensätzen wurde entsprechend der Friedman-Test durchgeführt und Unterschiede anhand eines Wilcoxon signed-rank Test mit Bonferroni-Korrektur auf Signifikanz geprüft.

3. Durchführung

Von den insgesamt 8 Expositionsanlagen mit je 6 Plätzen wurden jeweils 2 Anlagen mit derselben eingespeisten Leitung und somit mit demselben SAR-Wert betrieben, d.h. in je 2 Anlagen wurden die Ratten ($n = 12$) einem SAR-Wert von 0,7, 2,5, oder 10 W/kg ausgesetzt bzw. schein-exponiert. Die erste Hälfte jeder Gruppe wurde von 10 bis 12 Uhr exponiert und kurz vor Ende der 2stündigen Exposition wurde die zweite Hälfte der Gruppen in die Restrainer verbracht und unmittelbar im Anschluss von 12 bis 14 Uhr exponiert. Somit betrug die endgültige Gruppengröße 24 Ratten pro SAR-Wert. Die Wahl des Zeitpunkts der ersten Exposition im Alter von 14 Tagen erfolgte im Hinblick auf die Gehirnentwicklung. Dazu wurden die Verläufe der Gehirngewichte bei Menschen und Ratten verglichen (Dekaban and Sadowsky 1978, Morgan et al. 2006, Angaben des Züchters). Das endgültige Gehirngewicht wird beim Menschen nach etwa 10 Jahren und bei der Ratte nach etwa 90 Tagen (13 Wochen) erreicht. In einem Alter von ca. $\frac{1}{2}$ Jahr werden beim Menschen und nach etwa 12 Tagen bei der Ratte 50% des endgültigen Gehirngewichts erreicht, somit ist die Gehirnentwicklung bei der Ratte im Alter von 14 Tagen, dem Expositionsbeginn, noch nicht abgeschlossen und entspricht in etwa, ausgehend vom Gewicht, dem Entwicklungsstadium eines Kleinkindes von ca. 3 Jahren. Interspezifische Vergleiche zwischen Ratten und Menschen im Hinblick auf Proliferations- und Migrationsprozesse, sowie der Ablauf des Reifungsprozesses sich entwickelnder Regionen des ZNS, zeigen einen relativ parallelen Verlauf. Die Zeitskala jedoch ist zwischen Ratten und Menschen völlig unterschiedlich, so entsprechen bei Ratten Tage des Reifungsprozesses Wochen bis Monate bei Menschen. Nach 12-15 Tagen postnatal entspricht die Entwicklung des Rattengehirns dem des Menschen nach 32,0-35,9 Wochen (Rice and Barone 2000).

Das Körpergewicht der Ratten wurde bis zum Alter von 6 Monaten wöchentlich, anschließend alle 2 Wochen dokumentiert. Nach Expositionsbeginn wurden mit den Ratten im Alter von 1-2 Monaten (juvenil), 10-11 Monaten (adult) und 16-17 Monaten (präsenil) ein Set von 4 etablierten Verhaltens- und Kognitionstests durchgeführt. Die hierfür ausgewählten Tests (Open Field, Morris-Water Maze, RotaRod-Treadmill, 8-Arm-Maze) sind bereits in vielen Studien erfolgreich eingesetzt worden und gut etabliert.

Aus Gründen der Praktikabilität wurden 2-6 Experimentatoren eingesetzt und die Tiere zwischen den Experimentatoren regelmäßig ausgetauscht.

3.1 RotaRod-Treadmill-Test

Mit diesem Test lassen sich auf einfache Weise motorische Koordination und Motivation untersuchen. Hierzu werden bis zu 4 Ratten gleichzeitig auf eine erhöhte, langsam rotierende Walze gesetzt, deren Rotationsgeschwindigkeit stetig ansteigt (Abb. 7). Können sich die Tiere nicht mehr auf der Walze halten oder rutschen ab, fallen sie wenige Zentimeter tief auf eine Plastikplatte und stoppen durch ihr Gewicht die Messung, deren Zeitpunkt und Endgeschwindigkeit werden automatisch erfasst. Dieser Test wurde dreimal pro Tier und Tag an 3 aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt und der jeweilige Tagesmittelwert berechnet. Durchgeführt wurde der Versuch während der Aktivitätsphase der nachtaktiven Ratten, unter schwacher roter Beleuchtung (s. a. Hass et al.1994). Bei den juvenilen Ratten wurde mit einer Rotationsgeschwindigkeit der Walze von 10 rpm gestartet und die Geschwindigkeit automatisch über 3 Minuten auf 60 rpm angehoben. Nach dem zweiten Versuchstag zeigte sich, dass eine Endgeschwindigkeit von 60 rpm für die meisten Ratten keine Herausforderung mehr war, so dass die Rotationsgeschwindigkeit von 20 – 80 rpm über 3 Minuten angepasst wurde. Diese Einstellung wurde bei der Wiederholung mit den adulten und präsenilen Ratten beibehalten.



Abb. 7: RotaRod- Apparatur mit 4 Ratten auf der rotierenden Walze.

3.2 8-Arm-Maze-Test

Ein häufig angewandter Test für Gedächtnisleistung und räumliches Orientierungsvermögen ist der 8-Arm-Maze-Test. Die Vorrichtung besteht aus einer zentralen Plattform, von der 8 identische Arme abgehen (Abb. 8), die im Uhrzeigersinn von 1 bis 8 nummeriert sind. Der Test wird während der Dunkelphase unter schwacher roter Beleuchtung durchgeführt, da Ratten dann in ihrer Aktivitätsphase sind. Die Durchführung des Versuchs erfolgte wie bei Dubreuil et al. (2003) beschrieben. Zur Gewöhnung der Ratten an die Vorrichtung und den Versuchsablauf wurden sie in den ersten 2 Tagen zuerst gemeinsam, d.h. alle 4 Ratten eines Käfigs, für 3 Minuten in das Labyrinth gesetzt und die Belohnungen, in Form von kleinen Milchpulverpellets, im gesamten 8-Arm-Maze verstreut, um die Ratten zum Erforschen des Labyrinths zu ermuntern. Am darauffolgenden Tag wurden die Belohnungen nur noch in die Enden der Arme verteilt und die 4 Ratten für 3 Minuten ins 8-Arm-Maze gelassen. Während des letzten Trainingstages waren die Belohnungen lediglich in den auch später geköderten Armen 2, 4, 6 und 8 verteilt und die Ratten jeweils zu zweit für 3 Minuten im Labyrinth.

Auf die Trainingsphase folgten die eigentlichen Versuchstage, in denen die Ratten einzeln 4mal pro Tag an 8 aufeinanderfolgenden Tagen in das Labyrinth gesetzt wurden. Nach einer Pause von 7 Tagen wurde der Versuch ein letztes Mal an einem einzigen Tag wiederholt, um das Langzeitgedächtnis zu untersuchen. Zu Beginn jedes Einzelversuchs wurde die Ratte in den ungeköderten Arm 1 verbracht. Durch eine über dem Labyrinth angebrachte Kamera konnte der jeweilige Experimentator die Ratte beobachten und die besuchten Labyrintharme notieren. Ein Arm galt als besucht, wenn die Ratte die Mitte eines Arms überquert hatte. Der Einzelversuch wurde beendet, wenn entweder alle Belohnungen gefunden, oder 10 Arme erkundet wurden, oder die Ratten 3 Minuten in der Vorrichtung verbracht hatten. Nach jedem Einzelversuch wurde die Ratte wieder in den Käfig zurückgesetzt und die Vorrichtung mit 70% Ethanol ausgewischt, bevor die nächste Ratte hineingesetzt wurde, um eine olfaktorische Orientierung zu verhindern. In der Auswertung wurde die Zeit, die im Durchschnitt für einen Einzelversuch pro Tag benötigt wurde, ermittelt, sowie der prozentuale Anteil erfolgreicher Einzelversuche. Desweiteren wurden der ‚Reference Memory Error (RME)‘ und der ‚Working Memory Error (WME)‘ erfasst. Als RME galt, wenn eine Ratte einen Labyrintharm betrat, der niemals mit einer Belohnung versehen war und bei einem WME besucht die Ratte zum wiederholten Mal einen beköderten Arm. Aus dem RME, dem WME und zusätzlichen Fehlern, wie das Nicht-Einhalten des Zeitlimits und dem Nicht-Besuch eines geköderten Arms, wurde die Anzahl insgesamt gemachter Fehler bestimmt.



Abb. 8: 8-Arm-Maze-Vorrichtung aufgenommen während des laufenden Versuchs unter schwacher roter Beleuchtung.

3.3 Open-Field-Test

Der Open-Field-Test dient dazu, das Explorationsverhalten, die Motivation und die Ängstlichkeit der Ratten zu untersuchen (Hass et al. 1994). Die für den Test verwendete Vorrichtung hatte eine Kantenlänge von 1 m und die Seitenwände eine Höhe von 50 cm (Abb. 9). Die Grundfläche wurde durch aufgezeichnete Linien in 9 gleichgroße Quadrate unterteilt, ein Mittelquadrat und 8 Randquadrate. Die Ratten wurden zu Beginn des Versuchs einzeln, mit der Nase zur Außenwand, in ein mittleres Randquadrat gesetzt und für 3 Minuten auf der Fläche belassen. Bevor die nächste Ratte in das Open-Field gesetzt wurde, wurde die Vorrichtung mit 70% Ethanol ausgewischt, um eine olfaktorische Orientierung zu verhindern. Mittels einer über dem Open-Field angebrachten Kamera und eines PCs wurden die Bewegung und der Aufenthaltsort der Ratte registriert und zu einem späteren Zeitpunkt, durch verlangsamtes Abspielen, ausgewertet. Der Versuch wurde zweimal innerhalb einer Woche unter schwachem Rotlicht durchgeführt. Dies hat den Vorteil, dass die aus der Literatur bekannten supprimierenden Effekte von Licht auf die Aktivität vermieden werden (siehe z.B. Morin und Studholme 2009, Morin et al. 2010). Die Auswertung erfolgte, indem erfasst wurde, wie häufig eine Ratte das Mittelquadrat oder die Randquadrate besucht hatte, sowie wie häufig sie sich aufrichtete, putzte, oder Faeces absetzte.



Abb. 9: Verwendete Versuchsanordnung für den Open-Field-Test.

3.4 Morris-Water-Maze-Test

Das Kurz- und Langzeitgedächtnis der Ratten wurde ebenfalls mit Hilfe des Morris-Water-Maze-Tests geprüft (Morris 1984). Die Versuchsanordnung besteht aus einem Becken (Durchmesser 180 cm, Abb. 10) an deren Wänden 3 farblich und geometrisch unterschiedliche Markierungen, sogenannte „Landmarks“, angebracht sind, an denen sich die Ratte orientieren soll. Das auf etwa 28°C angewärmte Wasser wurde mit Milchpulver getrübt, um die Plattform (20x20 cm), die sich etwa 1 cm unterhalb der Wasseroberfläche und stets vor derselben Markierung (Abb. 10, Pfeil) befand, zu verbergen. Die Ratten wurden stets mit der Nase zur schwarzen Markierung (Abb. 10 oben im Bild) ins Becken gesetzt und begannen sofort mit den Schwimmbewegungen, da sie aufgrund der Wassertiefe den Boden nicht berühren konnten. Dies bedeutete Stress für die Tiere und eine hohe Motivation, aus der Situation durch das Finden der für die Tiere verborgenen Plattform möglichst schnell zu entkommen. Waren die Ratten nicht in der Lage, die Plattform innerhalb von 60 Sekunden zu finden, wurden sie dorthin geleitet, und nach Erreichen der Plattform hatte jede Ratte 15 Sekunden Zeit, sich dort zu erholen und sich die Lage der Plattform einzuprägen. Anschließend wurde sie aus dem Wasser gehoben und am Startpunkt wieder ins Wasser gesetzt. Jede Ratte durchlief 3 Einzelversuche pro Tag, an 6 aufeinanderfolgenden Tagen und einem Wiederholungsversuch nach einer Woche. Im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen wurde der Morris-Water-Maze-Test während der Beleuchtungsphase durchgeführt, um den Ratten einerseits eine Orientierung anhand der „Landmarks“ zu ermöglichen. Andererseits bedeutete eine Versuchsdurchführung während der eigentlichen Ruhephase der Ratten einen zusätzlichen, aber erwünschten Stressor. Die Auswertung erfolgte durch die benötigte Zeit bis zum Auffinden der Plattform und den prozentualen Anteil fehlgeschlagener Versuche.

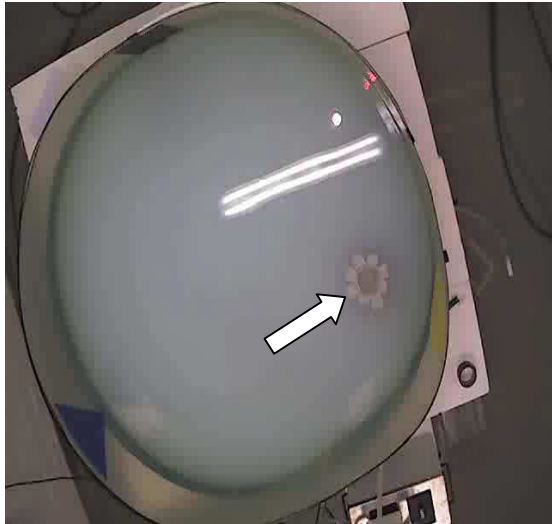


Abb. 10: Versuchsaufbau des Morris-Water-Maze-Test mit verborgener Plattform (Pfeil).

3.5 Histopathologische Auswertung

Nach Ablauf von 19 Monaten wurde der Versuch beendet, die Ratten schmerzfrei getötet und auf makroskopisch sichtbare pathologische Veränderungen untersucht. Auffällige Organe, bzw. Proben derselben wurden entnommen und fixiert. Die Gehirne und Hypophysen, sofern letztere makroskopisch unauffällig waren, wurden entnommen und nach Standardverfahren in Bouin's Lösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Von den Gehirnen wurden Frontalschnitte mit einer Dicke von 6 μm in einem Abstand von 1 mm über die gesamte Länge des Gehirns angefertigt (im Mittel 15 Schnitte pro Ratte). Die Schnitte wurden mittels Hämatoxylin-Eosin-Standardmethode angefärbt und mikroskopisch ausgewertet. Ein weiterer Satz Gehirnschnitte, ebenfalls als Frontalschnitte mit einer Dicke von 6 μm aus drei verschiedenen Bereichen des Gehirns (Frontaler Cortex, Cerebraler Cortex Höhe Hypothalamus, Cerebellum) angefertigt, wurde mittels Peroxidase-Antiperoxidase (PAP) Methode gefärbt. Die Reaktion wurde mit Diaminobenzidin-Lösung entwickelt, um die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu überprüfen und die Ergebnisse wurden mit den mitgeführten negativ Kontrollen und mit Literaturangaben für positiv Kontrollen verglichen (Fritze et al. 1997). Von den makroskopisch unauffälligen Hypophysen wurden komplette Serienschnitte hergestellt, die mittels HE-Färbung analysiert wurden. Makroskopisch auffällige Hypophysen

wurden nicht näher untersucht, da es bekanntermaßen bei älteren Ratten zu gehäuftem Auftreten von Hypophysentumoren kommt, die in 99% der Fälle Adenome sind (siehe z.B. Bomhard 1992, Nakazawa et al. 2001, Walsh and Poteracki 1994). Zur genauen Diagnose von auffälligen Befunden nach den internationalen Klassifikationssystemen wurde der Pathologe Prof. Dr. med. Bergmann vom Institut für Neuropathologie Bremen hinzugezogen.

3.6 Nebenprojekt

Die männlichen Ratten wurden ebenfalls wie die weiblichen Ratten in den Tagen vor der ersten Exposition an die Restrainter gewöhnt (s.o.) und mit den gleichen SAR-Werten, 0 (Schein-Exposition), 0,7, 2,5 und 10 W/kg, als über das Rattenhirn gemittelten Teilkörper-SAR-Wert, exponiert. Die Exposition erfolgte an 2 aufeinanderfolgenden Tagen, entspricht also einer Kurzzeitexposition und erfolgte während der Beleuchtungsphase, der inaktiven Phase der Ratten. Bei den Rattenmännchen wurde auf das Einsetzen eines subkutanen Transponders verzichtet und stattdessen mit einer farbigen Schwanzmarkierung für die Dauer des Versuchs gearbeitet. Die männlichen Ratten wurden in 3 Gruppen unterteilt mit jeweils 48 Tieren pro Gruppe, was 12 Ratten pro SAR-Wert entspricht. Die erste Gruppe wurde an ihrem 14. Lebenstag erstmalig für 15 Minuten und an ihrem 15. Lebenstag für 30 Minuten exponiert. Die Exposition der zweiten Gruppe erfolgte an den Lebenstagen 16 und 17 für 15 bzw. 30 Minuten und die dritte Gruppe wurde am 18. und 19. Lebenstag für 15 bzw. 30 Minuten exponiert. Zusätzlich wurde eine Käfig-Kontrolle (n=48) mitgeführt. Unmittelbar nach der letzten Exposition wurden die Tiere schmerzfrei getötet, die Gehirne entnommen und histologisch aufgearbeitet wie bereits für die Rattenweibchen beschrieben (s.o.). Mittels der PAP-Methode konnte das körpereigene Albumin angefärbt und mikroskopisch ausgewertet werden, um die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke zu untersuchen.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die Zeitpunkte der Augenöffnung und die Zeit, die die Tiere benötigten, um sich von der Rücken- in die normale Lage zu drehen („Righting Reflex“) waren als frühe Entwicklungsparameter zwischen den Gruppen nicht verschieden, ebenso unterschieden sich im ersten Jahr die Körpergewichte der Gruppen nicht signifikant. Ab einem Lebensalter von ca. 13 Monaten waren die Ratten der Käfigkontrolle signifikant schwerer als Tiere aus den mit 2,5 W/kg und 10 W/kg exponierten Gruppen (Abb.11). In den letzten drei Monaten des Versuch waren die Körpergewichte der Kontrolltiere höher als die aller (schein-)exponierten Ratten. Da dieser Gewichtsunterschied erst ab einem Alter von ca. 13 Monaten auftrat und nicht während der kritischen Zeit des stärksten Wachstums, scheint das Verbringen in die Restraint für die Ratten nicht mit starkem Stress verbunden gewesen zu sein, wenn man das Körpergewicht als Indikator für Stress heranzieht. Zwischen scheinexponierten und exponierten Ratten ergaben sich keine signifikanten Gewichtsunterschiede, somit scheint die wiederholte Exposition mit elektromagnetischer Strahlung und unterschiedlichen SAR-Werten sich nicht auf das Körpergewicht auszuwirken.

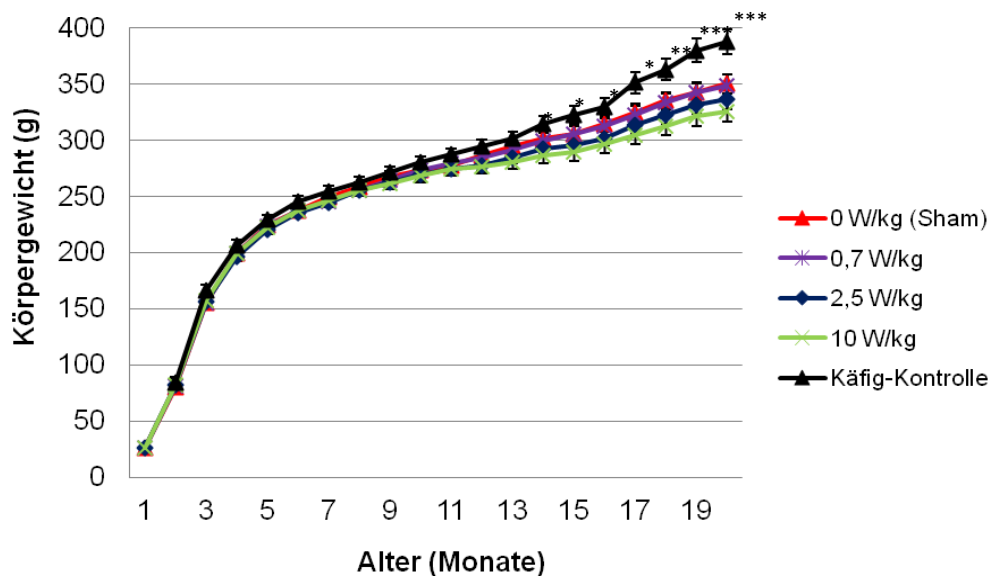


Abb. 11: Entwicklung der Körpergewichte der Ratten in g (Mittelwerte $\pm$ SEM). Signifikante Unterschiede zwischen den Käfigkontrollen gegenüber den (schein-)exponierten Ratten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Während des Versuchs wurden bei den exponierten bzw. scheinexponierten Ratten die Körperkerntemperaturen durch die implantierten Transponder (IPPT-300, Plexx, Niederlande), sowie die Hautoberflächentemperaturen mit Hilfe einer Infrarotkamera (Ti 20, Fluke, Österreich) gemessen. Weder bei den Körperkerntemperaturen, noch bei den Hautoberflächentemperaturen zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den exponierten bzw. scheinexponierten Gruppen (Abb. 12). Thermische Effekte können somit weitestgehend ausgeschlossen werden.

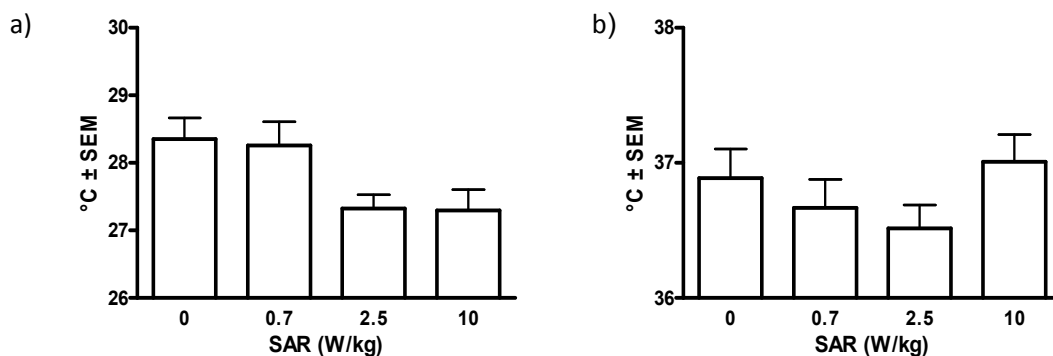


Abb. 12: Hautoberflächentemperaturen (a) und Körperkerntemperaturen (b) exponierten bzw. scheinexponierten Ratten (Mittelwerte ± SEM).

4.1 RotaRod-Treadmill-Test

Unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit zeigte sich bei allen Ratten mit zunehmendem Alter eine verringerte Aktivität und Verweildauer auf dem RotaRod (Abb. 13). Bei den juvenilen Ratten beendeten die Tiere der Käfigkontrolle den Versuch am 3. Testtag signifikant früher als die Ratten der (schein-)exponierten Gruppen, während es zu keinerlei Unterschieden in der Verweildauer zwischen scheinexponierten Ratten und exponierten Ratten kam. Präsenile Ratten der Käfigkontrolle zeigten eine deutlich verringerte Verweildauer auf der Walze als scheinexponierte und exponierte Ratten, im Vergleich zu den scheinexponierten Ratten blieben sie im Schnitt nur halb so lange auf dem RotaRod. Mögliche Ursachen für das schlechtere Abschneiden der Tiere in diesem Test können das signifikant höhere Körpergewicht und geringere Handling der Ratten der Kontrollgruppe sein. Adulte und präsenile Ratten der scheinexponierten Gruppe zeigten an allen Versuchstagen die längste Verweildauer auf dem RotaRod und unterschieden sich damit auch z.T. signifikant von den Ratten der exponierten Gruppen.

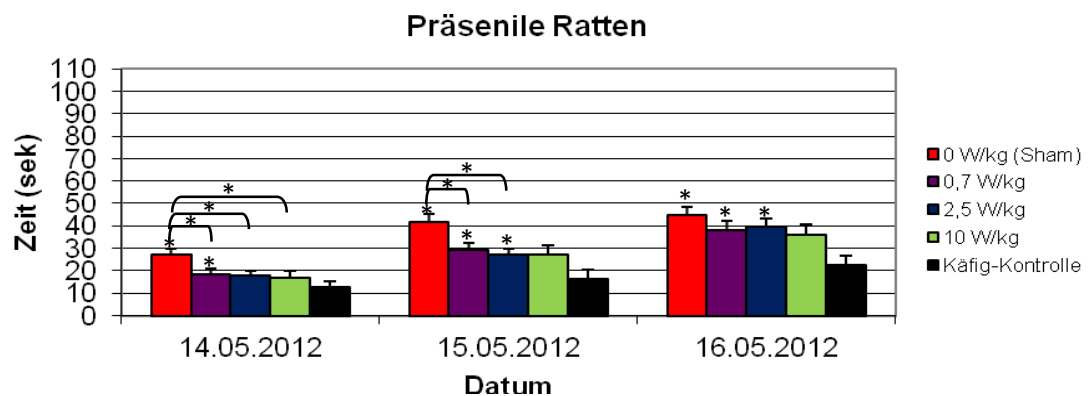
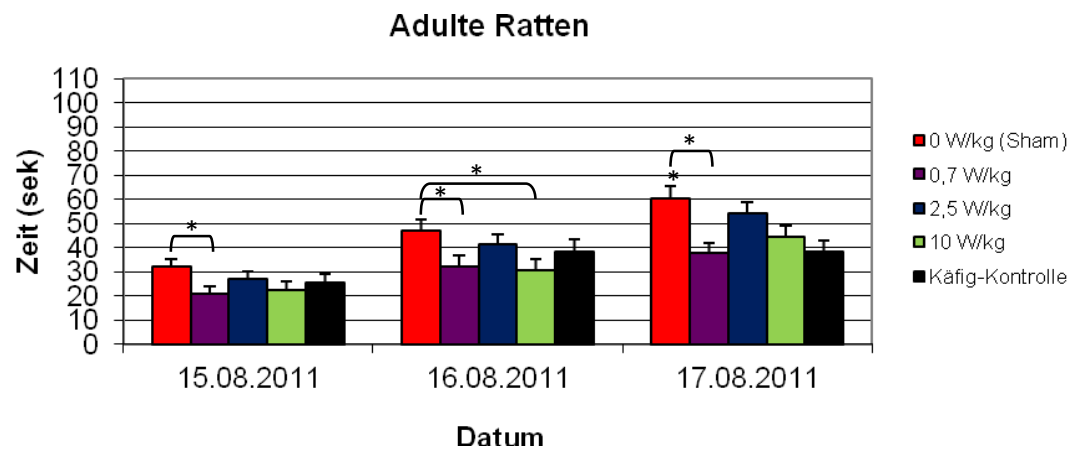
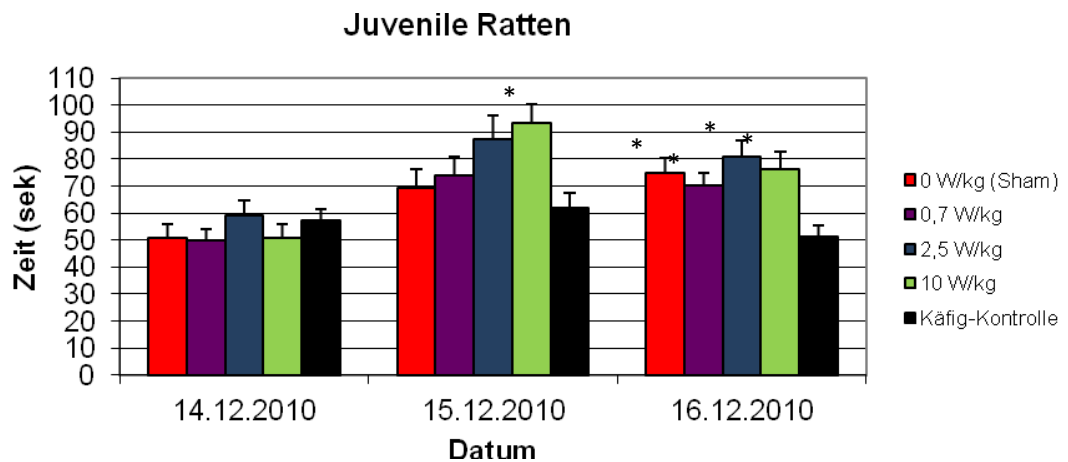


Abb. 13: Verweildauer von juvenilen, adulten und präsenilen Ratten auf dem RotaRod (Mittelwert $\pm$ SEM). * signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) exponierter Ratten im Vergleich zu scheinexponierten Ratten und zur Käfig-Kontrolle nach Bonferroni-Korrektur.

Die scheinexponierte Gruppe und die Käfigkontrolle, beides Gruppen die keinen elektromagnetischen Feldern ausgesetzt waren, zeigen somit mit zunehmendem Alter gegenläufige Leistungen auf dem RotaRod. Die präsenilen Ratten der exponierten Gruppen liegen mit ihrer Verweildauern auf dem RotaRod zwischen denen der nicht exponierten Gruppen (sham und Käfigkontrolle) was zu der Annahme führt, dass eine Exposition mit elektromagnetischer Strahlung keinen Einfluss auf das motorische Koordinationsvermögen hat und eher durch die Motivation und das Alter der Tiere beeinflusst wird.

4.2 8-Arm-Maze-Test

Die juvenilen Ratten aller Gruppen benötigen zu Beginn des ersten Versuchsdurchgangs etwa 110 sek zum Auffinden aller Belohnungen in den 4 geköderten Armen (Abb. 14). Diese Zeit reduziert sich im Laufe des Versuchs auf ca. 70 sek und wird auch noch nach einer einwöchigen Pause erreicht, was auf einen positiven Lerneffekt hindeutet. Dass alle Ratten im Versuch über ein gutes Langzeitgedächtnis verfügen, zeigt sich daran, dass adulte und präsenile Ratten aller Gruppen, auch nach mehrmonatigen Pausen, in der Lage waren, den 8-Arm-Maze-Test in ähnlicher Geschwindigkeit und ähnlich erfolgreich wie zu Ende der 1. Testphase zu absolvieren (Abb.14, 15). In gleicher Weise wie sich die benötigte Zeit und der erfolgreiche Abschluß des Tests verbesserten, verringerte sich auch die Anzahl der begangenen Fehler der Ratten aller Gruppen (Abb. 16). Bei der Aufschlüsselung der begangenen Fehler zeigte sich, dass vor allem Reference Memory Errors (RME) von den Ratten begangen wurden, d.h. es wurden häufig Arme des Labyrinths besucht, die nie geködert wurden (Abb.17). Viel seltener besuchten die Ratten einen geköderten Arm irrtümlicherweise erneut (Working Memory Error, WME). Die Ratten der exponierten Gruppen unterschieden sich in keiner der 3 Testphasen in den untersuchten Parametern von den Ratten der scheinexponierten Gruppe, sowie der Käfigkontrolle und eine Beeinflussung des Langzeitgedächtnisses und der räumlichen Orientierung durch wiederholte Kopf-Exposition mit elektromagnetischen Feldern ist somit unwahrscheinlich.

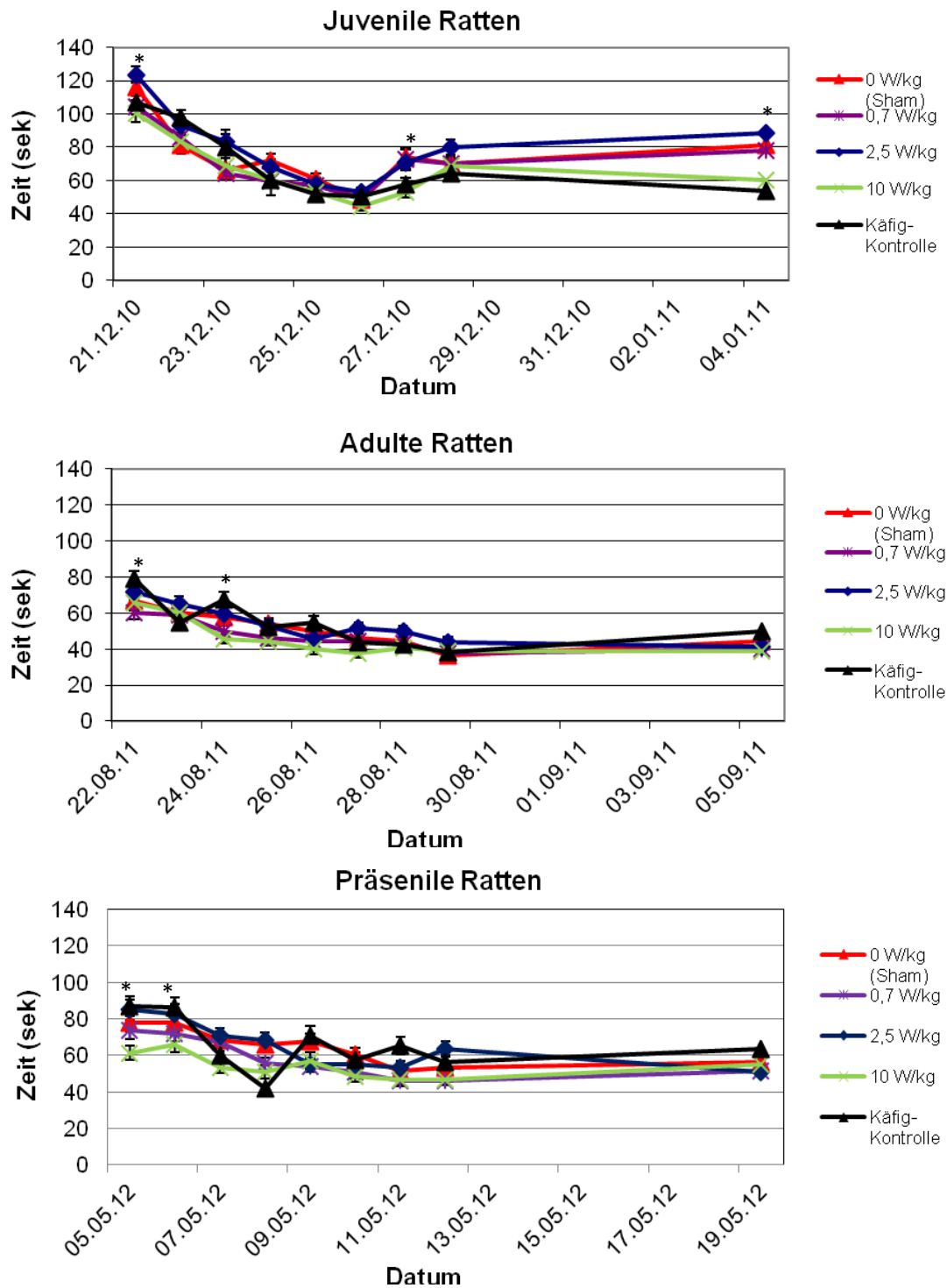


Abb. 14: Durchschnittlich benötigte Zeit für einen Einzelversuch im 8-Arm-Maze von juvenilen, adulten und präsenilen Ratten (Mittelwerte $\pm$ SEM). * signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) (schein-) exponierter Ratten im Vergleich zur Käfigkontrolle nach Bonferroni-Korrektur.

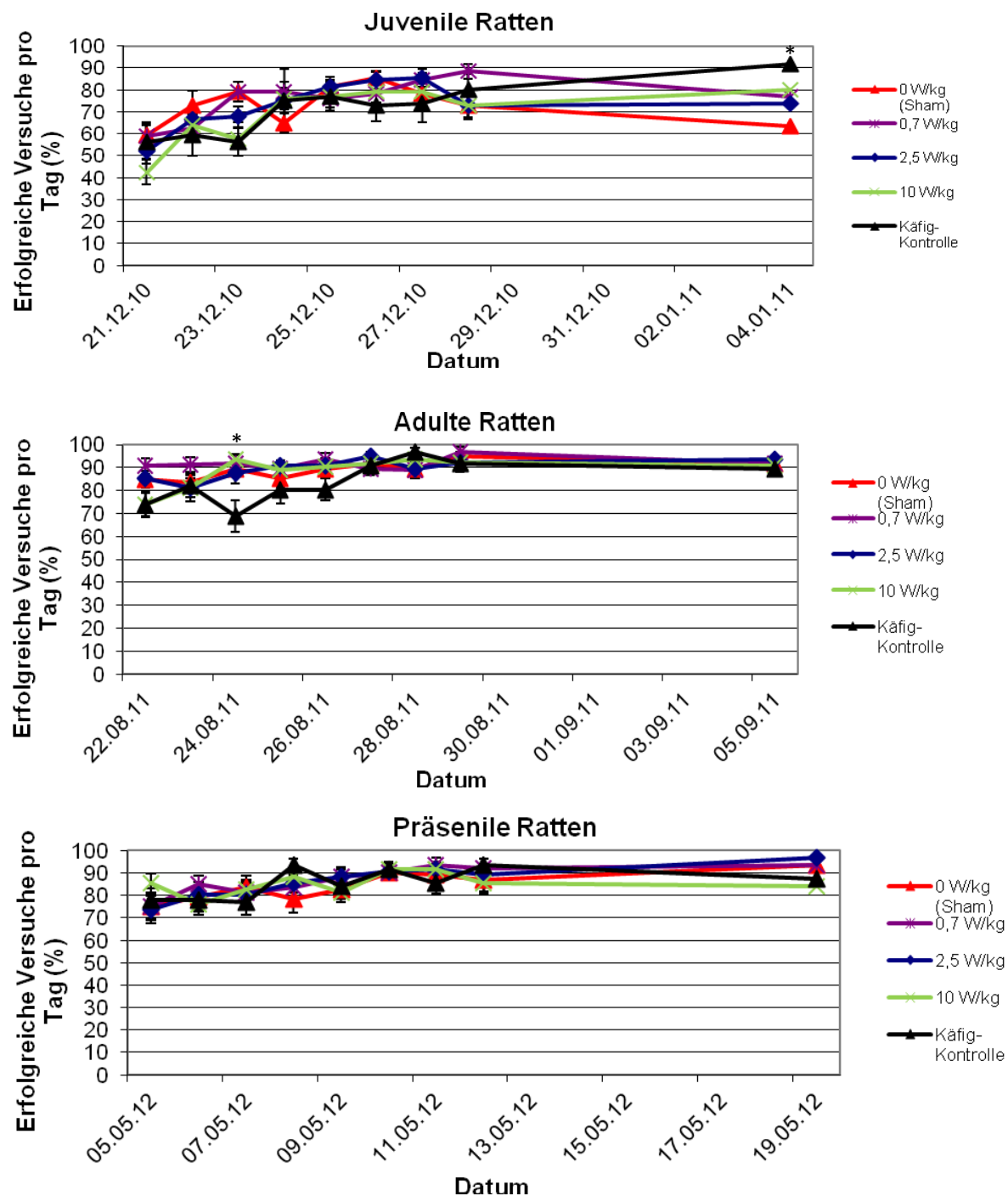


Abb. 15: Prozentualer Anteil erfolgreicher Versuche pro Tag (Mittelwerte $\pm$ SEM). * signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) (schein-)exponierter Ratten im Vergleich zur Käfigkontrolle nach Bonferroni-Korrektur.

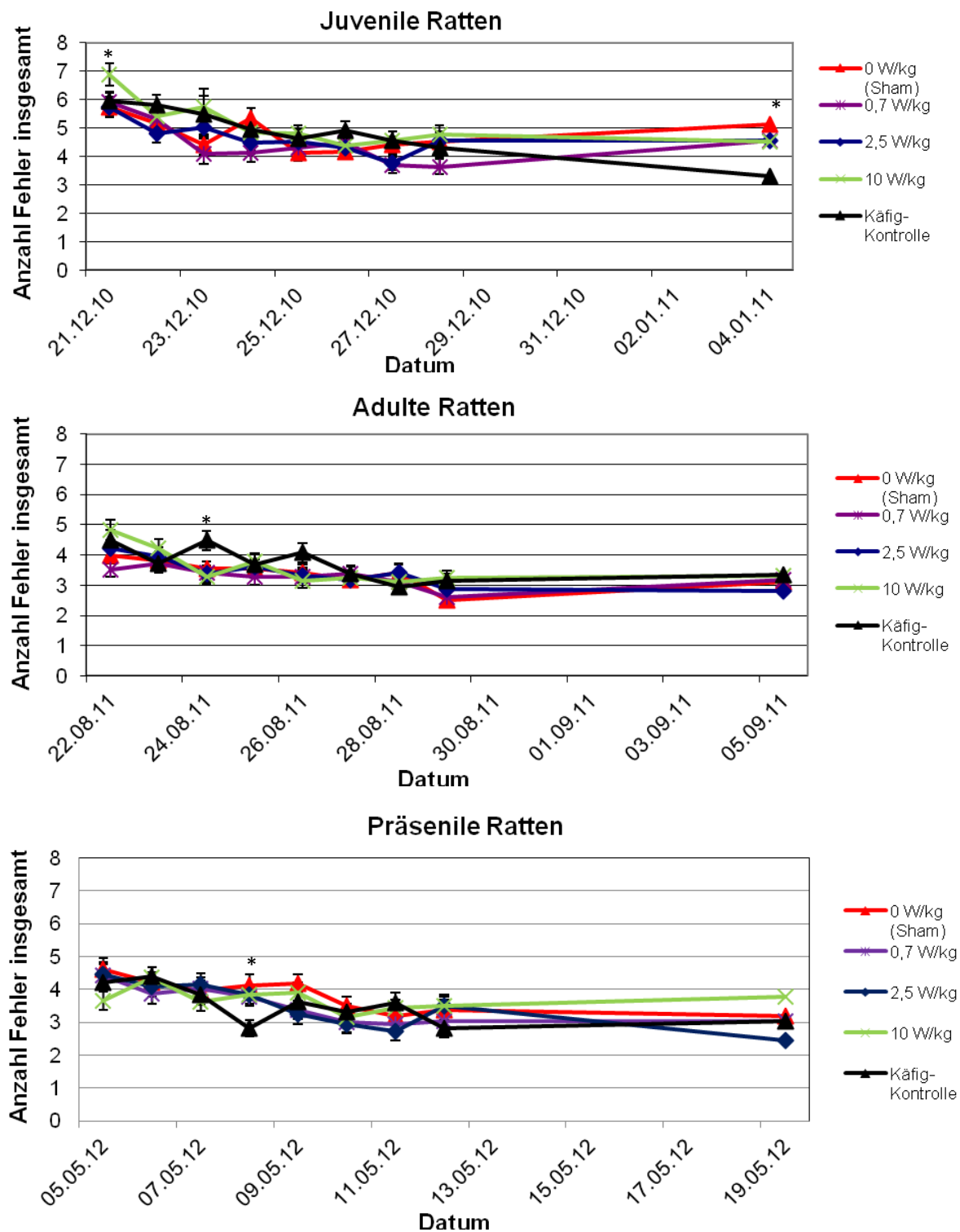


Abb. 16: Insgesamt von juvenilen, adulten und präsenilen Ratten begangene Fehler pro Versuchstag (Mittelwerte $\pm$ SEM). * signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) (schein-)exponierter Ratten im Vergleich zur Käfigkontrolle nach Bonferroni-Korrektur.

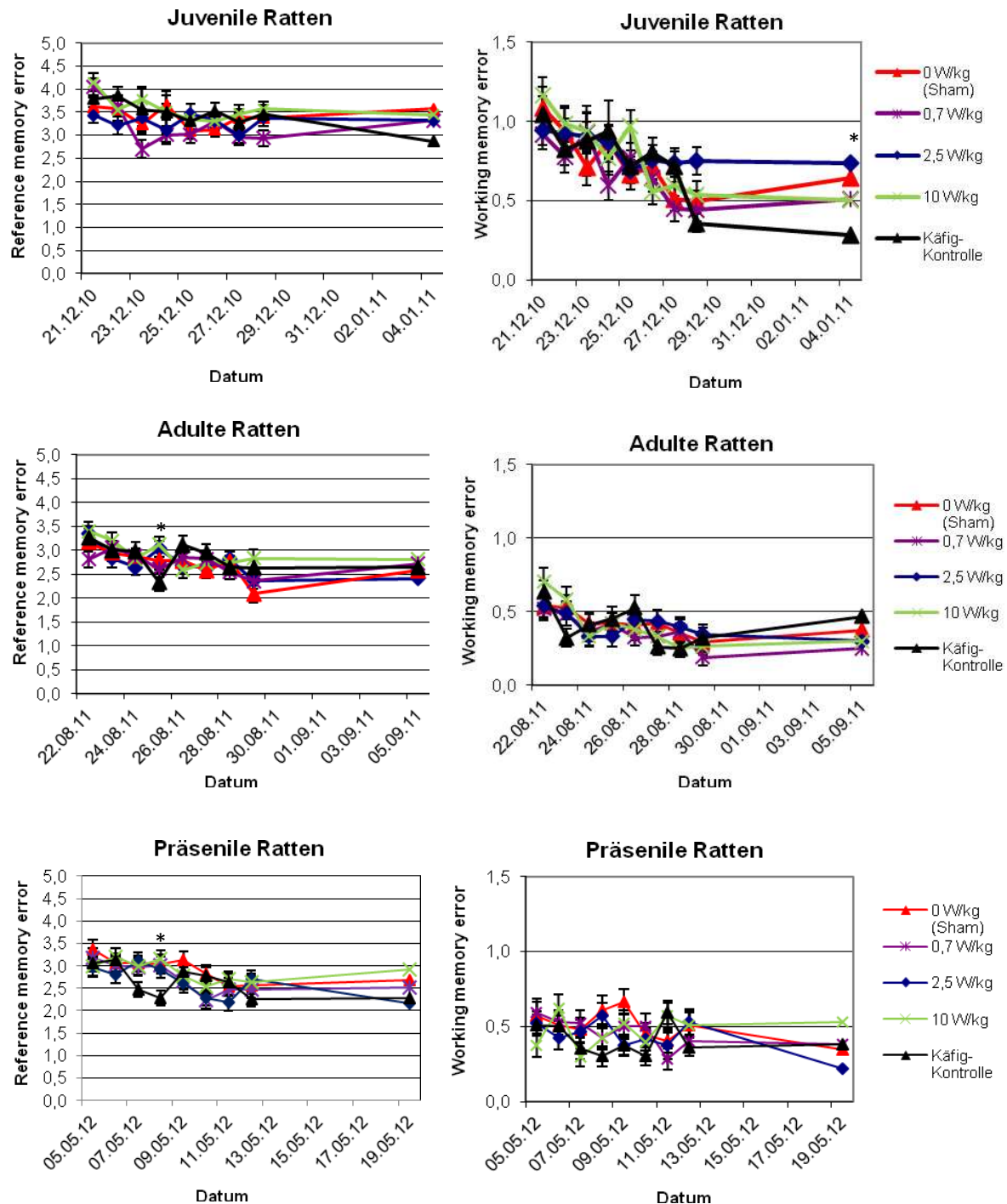


Abb. 17: Von juvenilen, adulten und präsenilen Ratten begangene Fehler unterschieden in RME (linke Seite) und WME (rechte Seite) (Mittelwerte $\pm$ SEM). * signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) (schein-) exponierter Ratten im Vergleich zur Käfigkontrolle nach Bonferroni-Korrektur.

4.3 Open-Field-Test

Wie bei dem RotaRod-Treadmill-Test zeigt sich auch beim Open-Field-Test ein deutlicher altersabhängiger Effekt in der Aktivität der Ratten. Präsenile Ratten aller Gruppen zeigten ein verringertes Explorationsverhalten im Vergleich zu juvenilen und adulten Ratten, es wurden deutlich weniger Randquadrate besucht, das Mittelquadrat wurde nur noch etwa halb so oft betreten und auch die Häufigkeit mit der sich die Ratten aufrichteten verringerte sich (Abb. 18, 19). Zwischen juvenilen und adulten Ratten der Käfigkontrolle und (schein-)exponierten Gruppen gab es lediglich im Putzverhalten Unterschiede, bei den präsenilen Ratten hingegen zeigten die Käfig-Kontrolltiere eine geringere Aktivität und selteneres Aufrichten als die Tiere aus der scheinexponierten Gruppe (sham) und die Tiere aus den mit 0,7 W/kg und 10 W/kg exponierten Gruppen. Häufiges Putzen und Faecesabsatz sind Zeichen für Unsicherheit und Nervosität und traten bei juvenilen Ratten, die diesen Test zum ersten Mal durchliefen, erwartungsgemäß häufiger auf als bei adulten oder präsenilen Tieren. Juvenile Ratten der Kontrollgruppe setzten signifikant häufiger Faeces ab, als die Ratten der (schein-)exponierten Gruppen (Tab.1). Scheinexponierte Ratten und exponierte Ratten unterschieden sich in den untersuchten Parametern nicht signifikant voneinander und somit eine Beeinflussung des Explorationsverhaltens, der Motivation und Ängstlichkeit der Tiere durch Exposition mit elektromagnetischer Strahlung unwahrscheinlich.

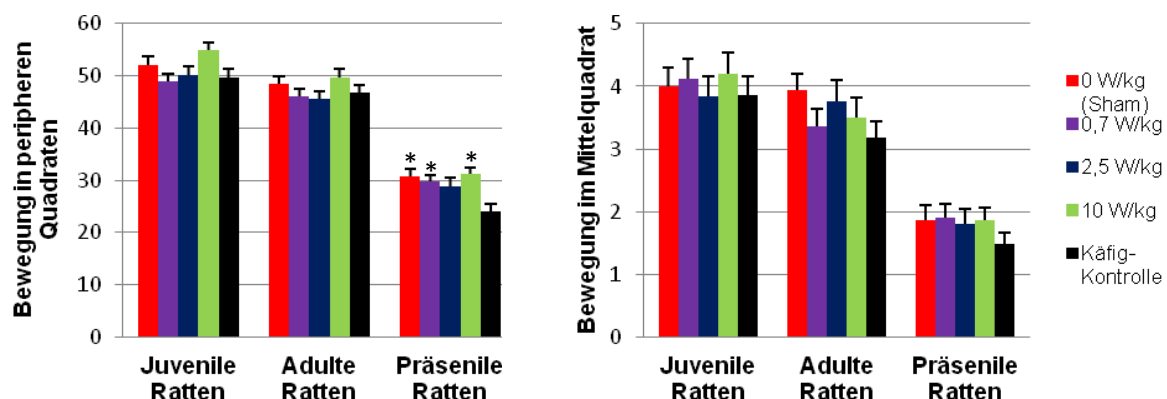


Abb. 18: Häufigkeit des Durchquerens von peripheren Quadraten (a) und des Mittelquadrats (b) bei juvenilen, adulten und präsenilen Ratten während des Open-Field-Tests (Mittelwerte $\pm$ SEM). * signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) (schein-)exponierter Ratten im Vergleich zur Käfigkontrolle nach Bonferroni-Korrektur.

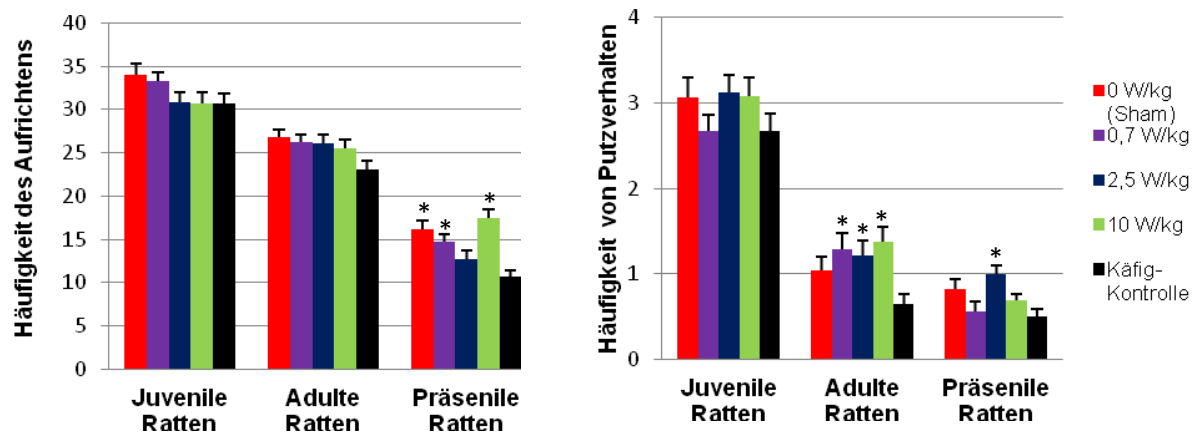


Abb. 19: Häufigkeit des Aufrichtens (a) und Auftretens von Putzverhalten (b) bei juvenilen, adulten und präsenilen Ratten während des Open-Field-Tests (Mittelwerte $\pm$ SEM). * signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) (schein-)exponierter Ratten im Vergleich zur Käfigkontrolle nach Bonferroni-Korrektur.

Tab. 1: Während des Open-Field-Test von juvenilen, adulten und präsenilen Ratten abgesetzte Faeces (Mittelwerte $\pm$ SEM). * signifikanter Unterschied ($p < 0.05$) (schein-)exponierter Ratten im Vergleich zur Käfigkontrolle nach Bonferroni-Korrektur.

	0 W/kg (Sham) MW $\pm$ SEM	0,7 W/kg MW $\pm$ SEM	2,5 W/kg MW $\pm$ SEM	10 W/kg MW $\pm$ SEM	Käfig- kontrolle MW $\pm$ SEM
Juvenile Ratten	1,35 ($\pm$ 0,21) *	1,00 ($\pm$ 0,20) *	1,33 ($\pm$ 0,22) *	1,06 ($\pm$ 0,21) *	2,44 ($\pm$ 0,31)
Adulte Ratten	0,06 ($\pm$ 0,05)	0,00 *	0,02 ($\pm$ 0,02)	0,00 *	0,21 ($\pm$ 0,09)
Präsenile Ratten	0,54 ($\pm$ 0,16)	0,33 ($\pm$ 0,11)	0,38 ($\pm$ 0,11)	0,38 ($\pm$ 0,11)	0,75 ($\pm$ 0,15)

4.4 Morris-Water-Maze-Test

Dass alle Ratten aus dem Versuch über ein gutes Kurz- und Langzeitgedächtnis verfügten, wird aus den Ergebnissen des Morris-Water-Maze-Tests deutlich. Benötigten die juvenilen Ratten aller Gruppen am ersten Testtag noch ca. 45 sec zum Auffinden der Plattform, verringerte sich diese Zeit im Laufe des Versuchs und selbst nach einwöchiger Pause auf ca. 15 sec (Abb. 20). Auch nach mehrmonatigen Pausen waren die adulten und präsenilen Ratten in der Lage, die Plattform in nur 15 sec beim ersten

Durchgang zu finden. Im gleichen Maße, wie die Schnelligkeit beim Auffinden der Plattform anstieg, so verringerte sich der Anteil fehlgeschlagener Versuche und ging, insbesondere bei präsenilen Ratten, gegen Null (Tab. 2). Exponierte Ratten unterschieden sich im Morris-Water-Maze-Test in keiner der drei Testphasen von den scheinexponierten Ratten und den Tieren der Käfigkontrolle. In diesem Test und dem 8-Arm-Maze kam es zu keinen Unterschieden zwischen den exponierten Ratten und den scheinexponierten Ratten und der Käfigkontrolle in den drei Testphasen, was möglicherweise auf die hohe Motivation, durch eine potentiell lebensbedrohliche Situation bzw. eine Belohnung in Form von Zuckerpellets, zurückzuführen ist. In den anderen beiden Verhaltenstest, dem RotaRod und dem Open Field, fehlte eine solche Motivation und hier kam es vor allem bei den präsenilen Ratten zu Unterschieden zwischen exponierten Gruppen und der scheinexponierten Gruppe, sowie der Käfigkontrollgruppe. Sowohl im RotaRod-Test, als auch im Open-Field-Test fielen die präsenilen Ratten der Käfigkontrolle durch verringertes Explorationsverhalten und Aktivität auf. Zeitgleich wiesen die präsenilen Ratten der Käfigkontrolle ein signifikant höheres Körpergewicht auf, als alle anderen Gruppen. Das bessere Abschneiden der scheinexponierten und exponierten Ratten im RotaRod-Test und Open-Field-Test, sowie das leichtere Körpergewicht lassen vermuten, dass das tägliche „Handling“ der Tiere sich positiv auf deren Aktivität ausgewirkt hat. Die erhöhte Aktivität, die z.B. auch nach dem Entlassen der Ratten aus den Restrainern in der eigentlichen Ruhephase der Tiere zu beobachten war, mag letztlich auch zu einem verringertem Körpergewicht im Vergleich zu den Ratten der Käfigkontrolle geführt haben.

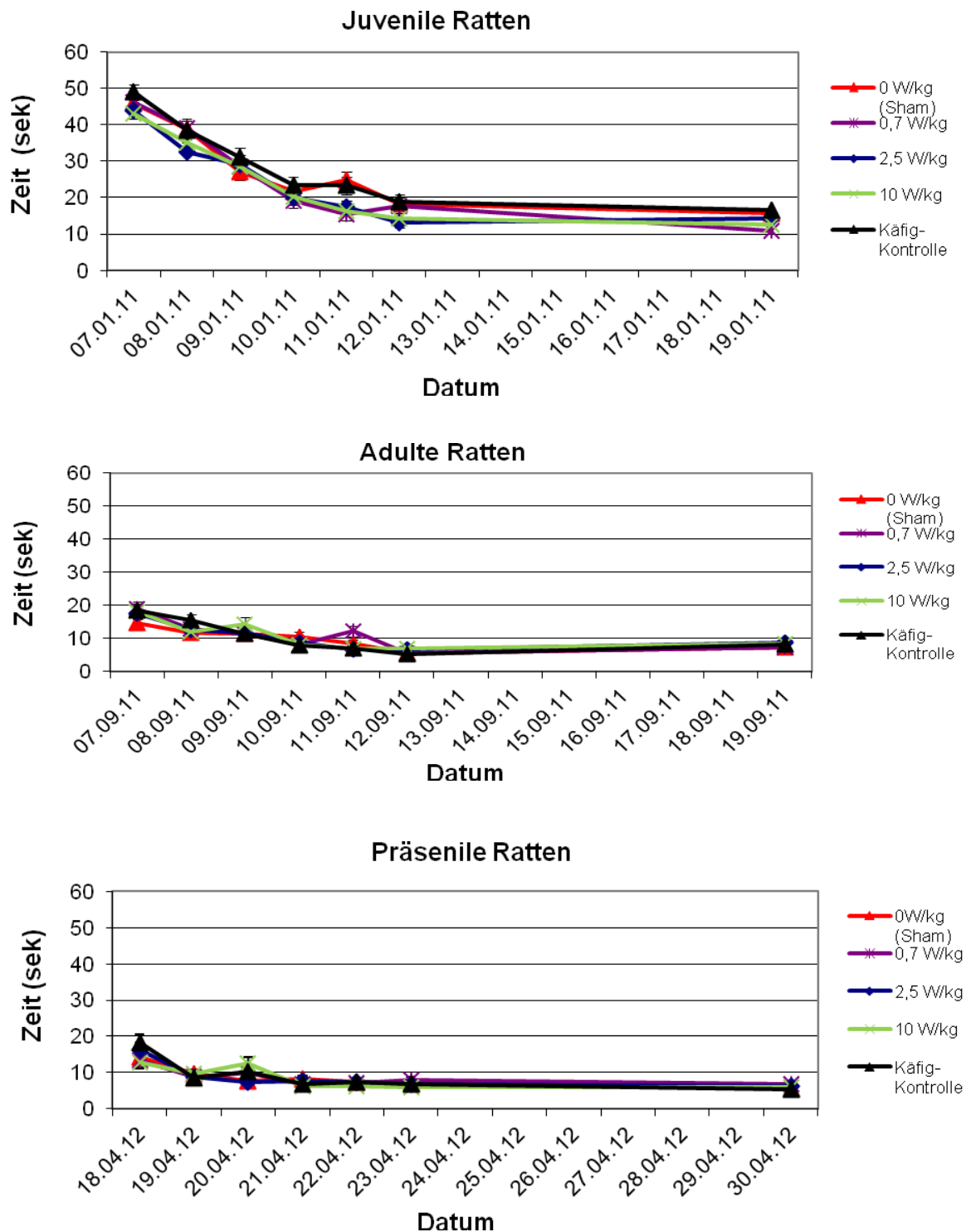


Abb. 20: Benötigte Zeit von juvenilen, adulten und präsenilen Ratten bis zum Erreichen der verborgenen Plattform (Mittelwerte $\pm$ SEM).

Tab. 2: Prozentualer Anteil fehlgeschlagener Versuche bei juvenilen (j), adulten (a) und präsenilen (p) Ratten der (schein-)exponierten Gruppen sowie der Kontrollgruppe, an allen Versuchstagen (Wiederholungsmal erfolgte nach einer Pause von 7 Tagen).

Versuchstag	0 W/kg (Sham)			0,7 W/kg			2,5 W/kg			10 W/kg			Käfig- kontrolle		
	j (%)	a (%)	p (%)	j (%)	a (%)	p (%)	j (%)	a (%)	p (%)	j (%)	a (%)	p (%)	j (%)	a (%)	p (%)
1	54,2	1,4	2,9	59,7	12,5	2,9	47,2	6,9	6,9	44,4	11,1	2,8	62,5	9,7	6,9
2	40,3	2,8	1,5	43,1	4,2	0,0	26,4	5,6	0,0	34,7	4,2	1,4	45,8	5,6	0,0
3	18,1	2,8	0,0	25,0	8,3	0,0	22,2	1,4	0,0	15,3	9,7	4,2	27,8	1,4	2,8
4	12,5	2,8	0,0	6,9	0,0	0,0	6,9	2,8	0,0	6,9	2,8	0,0	11,1	1,4	0,0
5	18,1	2,8	0,0	4,2	2,8	0,0	5,6	0,0	0,0	6,9	1,4	0,0	11,1	1,4	0,0
6	6,9	0,0	0,0	8,3	0,0	0,0	2,8	0,0	1,4	2,8	0,0	0,0	9,7	0,0	0,0
Wiederholung	4,2	0,0	0,0	1,4	1,4	0,0	4,2	2,8	0,0	1,4	2,8	0,0	4,2	1,4	0,0

4.6 Histopathologische Untersuchungen

Die Überlebensrate weiblicher RccHanWIST- Ratten liegt nach Angaben des Züchters im Alter von 18 Monaten bei etwa 90%. Mit einer Überlebensrate von 98,3% im Alter von 19 Monaten liegen die Ratten in diesem Versuch noch über den Angaben des Züchters. Dies weist darauf hin, dass das tägliche Restrainen und (Schein-)Exponieren nicht zu einer erhöhten Sterblichkeit der Ratten geführt hat. Von den 120 Ratten mussten 2 Tiere (1,7 %) vor Versuchsende eingeschläfert werden. In einem Fall aufgrund eines metastasierenden und schnell an Umfang zunehmenden Mammarkarzinoms. Im anderen Fall fiel die Ratte durch Gewichtsverlust und atypisches Verhalten auf, eine Autopsie erbrachte einen malignes Adenom der Hypophyse im Endstadium (Abb. 21b). Solche Adenome der Hypophyse sind bei diesem Rattenstamm nicht selten und treten bei etwa 60 % der weiblichen Tiere in einem Alter von 24 Monaten auf (Züchterangaben, Mittelwert aus 27 Studien, SD 11 %). Es konnte also erwartet werden, dass bei 19 Monate alten Ratten etwa 50% der Tiere ein Adenom aufwiesen, tatsächlich lagen die gefundenen Tumorraten noch darunter. Insgesamt wiesen 38 der 120 Ratten, also ca. 32 %, einen solchen Tumor auf (Tab. 3), neuroanatomisch klassifiziert, basierend auf der Tumorgröße und den Grad der lokalen Invasion (nach Hardy 1969).

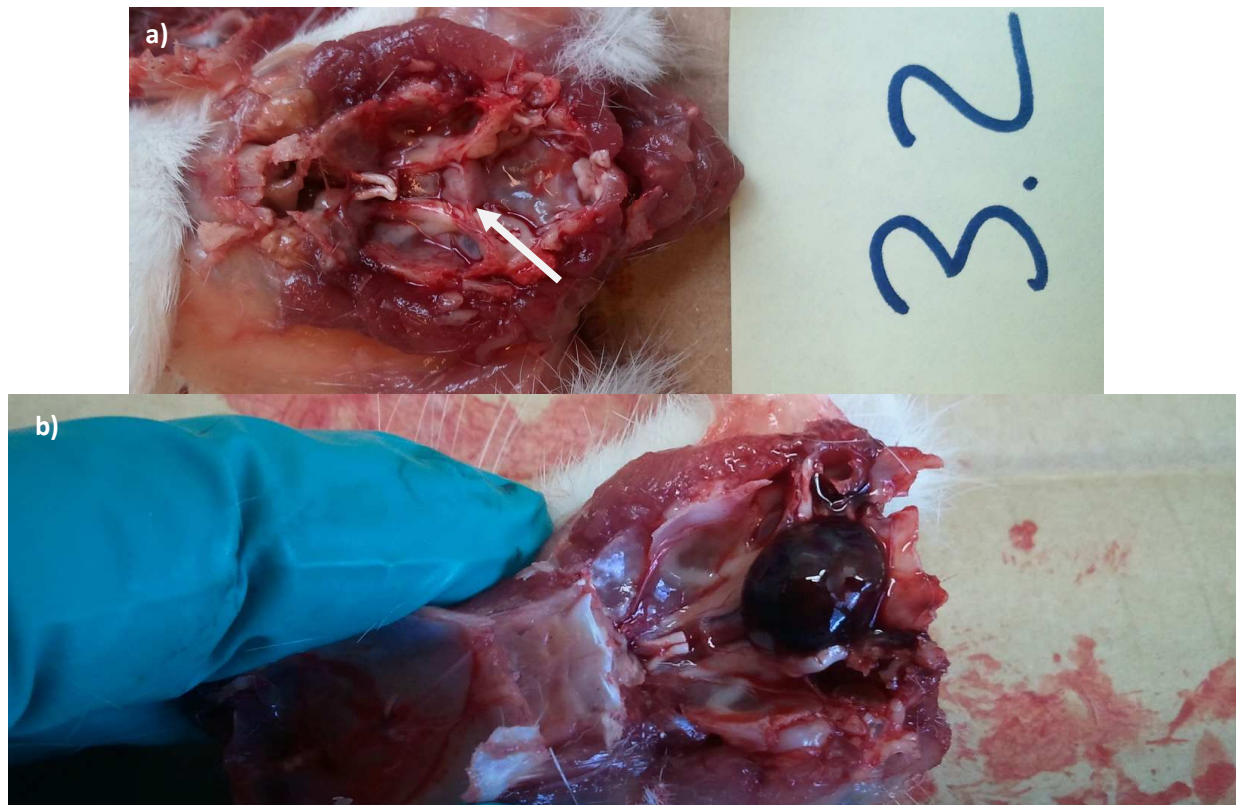


Abb. 21: Beispiele einer makroskopisch unauffälligen Hypophyse (a, Pfeil) und eines Tumors der Hypophyse im Endstadium (b).

Die Stadien I und II sind nicht invasiv und weiterhin umschlossen von der Sella Turcica, eine Vertiefung am Boden der mittleren Schädelgrube und unterscheiden sich anhand ihrer Größe (beim Menschen: I < 10 mm, II > 10 mm). Stadien III und IV sind lokal invasiv und dehnen sich z.T. weit über die Sella Turcica hinaus aus (siehe Abb. 21b). Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, ist das Anfangsstadium eines Hypophysentumors (Stadium I) in allen Gruppen am häufigsten vertreten, und nur selten war ein Adenom im Endstadium zu beobachten. Es traten keine Unterschiede in der Adenomhäufigkeit zwischen den Gruppen auf. Neoplasien des ZNS sind bei dem verwendeten Rattenstamm selten und liegen bei 2 Jahre alten Ratten unter 1% (Züchterangaben). In diesem Versuch wurde nur bei einer Ratte, aus der mit 2,5 W/kg exponierten Gruppe, bei der histologischen Untersuchung ein Gehirntumor festgestellt (0,84 %). Der hinzugezogene Pathologe diagnostizierte periventrikuläres Tumorgewebe.

Tab. 3: Hypophysenadenome der (schein-)exponierten Ratten und Ratten der Käfigkontrolle, neuroanatomisch unterteilt in Stadien I-IV.

Gruppe	I	II	III	IV	Insgesamt
0 W/kg (sham)	4	2	1	1	8 (33 %)
0,7 W/kg	5	1	1		7 (29 %)
2,5 W/kg	5	1	1		7 (29 %)
10 W/kg	4	2		1	7 (29 %)
Käfig-Kontrolle	8			1	9 (38 %)
Gesamt	26	6	3	3	38 (32 %)

Bei der immunhistologischen Untersuchung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) war weder bei den Ratten aus den (schein-)exponierten Gruppen, noch bei den Tieren aus der Käfigkontrolle eine erhöhte Permeabilität der BHS für körpereigenes Albumin festzustellen. Es konnte keine Extravasation festgestellt werden, der Albuminnachweis blieb beschränkt auf die Blutgefäße. Eine Langzeit-Exposition mit elektromagnetischen Feldern des Mobilfunks unterschiedlicher Intensitäten scheint somit keinen Einfluss auf die Permeabilität der BHS zu haben, selbst wenn sie bereits wie in diesem Versuch vor Abschluss der Gehirnentwicklung beginnt.

4.7 Nebenprojekt

Die männlichen Wistar-Ratten wurden einmalig vor Expositionsbeginn an ihrem 14. Lebenstag gewogen (Abb. 22). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Körpergewichten der verschiedenen Gruppen und den Tieren der Käfig-Kontrolle. Während ihrer Kurzzeit-Exposition an zwei aufeinanderfolgenden wurden die Ratten in den Gruppen 1 (14./15. Lebenstag), 2 (16./17. Lebenstag) und 3 (18./19. Lebenstag) SAR-Werten von 0 (Sham), 0,7, 2,5 und 10 W/kg ausgesetzt. Nach der immunhistologischen Auswertung der Gehirnschnitte zeigte sich bei keiner einzigen Ratte, unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit, oder der Expositionsstärke, eine erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) für Albumin (Tab. 4, Abb. 23). Körpereigenes Albumin wurde wie erwartet in den Blutgefäßen beobachtet (Abb. 23b), eine Extravasation in umliegendes Gehirngewebe konnte jedoch nicht festgestellt

werden. Somit ist es unwahrscheinlich, dass eine Kurzzeitexposition, selbst in den frühen Tagen der Entwicklung und unabhängig vom SAR-Wert zu einer Veränderung in der BHS-Permeabilität führt.

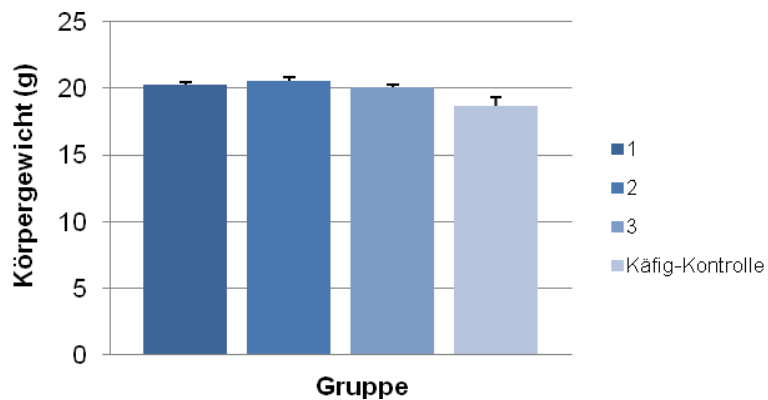


Abb. 22: Körpergewichte männlicher Wistar-Ratten der Gruppe 1 (Tag 14/15), 2 (Tag 15/17) und 3 (Tag 18/19) sowie der Käfig-Kontrolle am 14. Lebenstag (Mittelwerte $\pm$ SEM).

Tab. 4: Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (BHS) von (schein-)exponierten Ratten und der Käfig-Kontrolle. (+) BHS permeabel für Albumin, (-) keine Veränderung der Permeabilität der BHS.

	0 W/kg (Sham)	0,7 W/kg	2,5 W/kg	10 W/kg
Gruppe 1 (Tag 14/15)	-	-	-	-
Gruppe 2 (Tag 16/17)	-	-	-	-
Gruppe 3 (Tag 18/19)	-	-	-	-
Käfig-Kontrolle	-	-	-	-

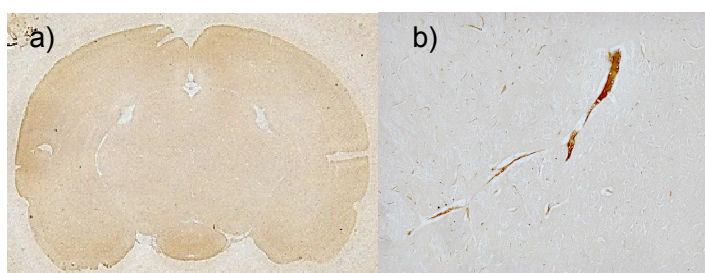


Abb. 23: Querschnitt durch das Gehirn einer jungen männlichen Ratte mit intakter BHS (a). Albuminnachweis innerhalb eines klar abgegrenzten Blutgefäßes (x 10) ohne erkennbare Extravasation (b).

5. Bewertung der Ergebnisse

In dieser, an weiblichen Wistar-Ratten durchgeführten Langzeitstudie, sollte die Auswirkung von elektromagnetischen Feldern auf die Entwicklung des ZNS untersucht werden. Dazu wurden die Ratten ab dem 14. Lebenstag (schein-)exponiert und zu drei verschiedenen Lebensaltern vier Verhaltenstests unterzogen. In allen Gruppen waren altersbedingte Effekte, wie verringerte Aktivität und vermindertes Explorationsverhalten, zu beobachten. Lediglich in einem der vier Verhaltenstest, dem RotaRod, kam es zu signifikanten Unterschieden zwischen den exponierten und scheinexponierten Ratten, sowie den Käfigkontrolltieren. Präsenile Ratten der scheinexponierten Gruppe zeigten die längste und die Käfigkontrolltiere die kürzeste Verweildauer auf dem RotaRod, die Leistungen der exponierten Gruppen waren im mittleren Bereich angesiedelt. Somit führen die Ergebnisse zu der Annahme, dass eine Exposition mit elektromagnetischer Strahlung keinen Einfluss auf das motorische Koordinationsvermögen hat und diese eher durch die Motivation und das Alter der Tiere beeinflusst wird.

Anhand des durchgeführten Sets an Verhaltens- und Kognitionstest lässt sich keine Beeinflussung der motorischen Fähigkeiten, sowie des Kurz- oder Langzeitgedächtnisses exponierter Ratten durch die Exposition mit elektromagnetischen Feldern feststellen. Des Weiteren wurde weder eine erhöhte Sterblichkeitsrate, noch ein erhöhtes Vorkommen von Neoplasien des ZNS, oder malignen Adenomen der Hypophyse, bei exponierten Ratten festgestellt. Die Untersuchung der BHS ergab ebenfalls keine Beeinflussung der Permeabilität für körpereigenes Albumin bei wiederholt Kopf-exponierten Ratten. Auch die, in einem Nebenprojekt an juvenilen, männlichen Wistar-Ratten durchgeführte Kurzzeitbestrahlung an zwei aufeinanderfolgenden Tagen bestätigt, dass die Permeabilität der BHS nicht durch die Exposition mit elektromagnetischen Feldern beeinflusst wird. Somit ist es unwahrscheinlich, dass eine Exposition des sich entwickelnden ZNS mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern zu einer Beeinträchtigung des allgemeinen Gesundheitszustands und Veränderungen des ZNS führt.

6. Literatur

- Bomhard, E., Frequency of spontaneous tumors in Wistar rats in 30-months studies, *Exp. Toxicol. Pathol.*, 44(7): 381-92, 1992.
- Dekaban, A.S., Sadowsky, D., Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights and body weights, *Ann. Neurology*, 4:345-356, 1978.
- Dubreuil, D., Jay, T., Edeline, J. M., Head-only exposure to GSM 900-MHz electromagnetic fields does not alter rat's memory in spatial and non-spatial tasks, *Behav. Brain Res.*, 145(1-2): 51-61, 2003.
- El Ouardi, A., Streckert, J., Lerchl, A., Schwarzpaul, K., Hansen, V., Exposure of hamsters to GSM900 signals carried by a quasi-TEM wave propagating in a rectangular waveguide. *FREQUENZ*, 62: 252-256, 2008.
- El Ouardi, A., Streckert, J., Bitz, A., Münkner, S., Engel, J., Hansen, V., New fin-line devices for radiofrequency exposure of small biological samples in vitro allowing whole-cell patch clamp recordings, *Bioelectromagnetics*, 32: 102-112, 2011.
- Fritze, K., Wiessner, C., Kuster, N., Sommer, C., Gass, P., Hermann, D. M., Kiessling, M., Hossmann, K. A., Effect of global system for mobile communication microwave exposure on the genomic response of the rat brain, *Neuroscience*, 81(3): 627-39, 1997.
- Hass, U., Lund, S. P., Elsner, J., Effects of prenatal exposure to N-methylpyrrolidone on postnatal development and behavior in rats, *Neurotoxicol. Teratol.*, 16(3): 241-9, 1994.
- Moos, T., Høyer P. E., Detection of plasma proteins in CNS neurons: conspicuous influence of tissue-processing parameters and the utilization of serum for blocking nonspecific reactions, *J. Histochem. Cytochem.*, 44(6): 591-603, 1996.
- Morgan, D., Price, H., Fernando, R., Chanda, S., O'Connor, R., Barone, S., Herr, D., Beliles, R., Gestational Mercury Vapor Exposure and Diet Contribute to Mercury Accumulation in Neonatal Rats, *Environ. Health Perspect.* 114: 735-739, 2006.
- Morin, L. P., Lituma, P. J., Studholme, K. M., Two components of nocturnal locomotor suppression by light, *J. Biol. Rhythms*, 25(3): 197-207, 2010.
- Morin, L. P., Studholme, K. M., Millisecond light pulses make mice stop running, then display prolonged sleep-like behavior in the absence of light, *J. Biol. Rhythms*, 24(6): 497-508, 2009.
- Morris, R., Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat, *J. Neurosci. Methods*, 11(1): 47-60, 1984.
- Nakazawa, M., Tawaratani, T., Uchimoto, H., Kawaminami, A., Ueda, M., Ueda, A., Shinoda, Y., Iwakura, K., Kura, K., Sumi, N., Spontaneous neoplastic lesions in aged Sprague-Dawley rats, *Exp. Anim.*, 50(2): 99-103, 2001.

- Rice, D., Barone, S., Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: Evidence from humans and animal models, *Environ. Health Perspect.*, 108(Suppl 3): 511-533, 2000.
- Spathmann, O., Hansen, V., Streckert, J., Yi Zhou, Clemens, M., Grote, K., Klose, M., Lerchl, A., "Head Only"-exposure of continuously growing rats to 900 MHz GSM signals, *International Symposium on Electromagnetic Compatibility (EMC EUROPE)*, 2012.
- Schüller, M., Streckert, J., Bitz, A., Menzel, K., Eicher, B., Proposal for generic GSM test signal, *Proc. 22nd BEMS Annual Meeting, Munich, Germany*, 122-123, 2000.
- Walsh, K. M., Poteracki, J., Spontaneous neoplasms in control Wistar rats, *Fundam. Appl. Toxicol.*, 22(1): 65-72, 1994.

| 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