

Aus dem Department für Veterinärwissenschaften
Lehrstuhl für Physiologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. M. Stangassinger

**Zum Einfluss elektromagnetischer Befeldung mit Mobilfunkstrahlen
auf die Zahl der CA1-Neuronen im Hippocampus der Ratte**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Tina Susanne Deutinger geb. Gärtner

aus Wattwil (CH)

München 2009

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
Der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Stangassinger
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Dr. Schmahl

Tag der Promotion: 17. Juli 2009

Für Opa Rudi

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATUR.....	4
2.1	Zum Hippocampus der Ratte	4
2.2	CA-Neuronen-Region.....	7
2.3	CA1-Neuronen	10
2.4	Elektromagnetische Felder	12
2.5	Allgemeine biologische Effekte elektromagnetischer Felder	21
2.6	Bisherige Erkenntnisse zum Einfluss elektromagnetischer Felder auf Nervenzellen	26
2.7	Zielsetzung.....	32
3	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1	Tiere und Unterbringung	33
3.2	Versuchsaufbau und –ablauf.....	35
3.3	Herstellung der Gehirnpräparate.....	37
3.4	Ablauf der morphologischen Auswertung.....	40
3.5	Methoden zur Bestimmung der CA1-Neuronenzahl.....	44
3.6	Statistische Methoden.....	49
4	ERGEBNISSE.....	50
4.1	Umfang des Untersuchungsgutes	50
4.2	Volumenbestimmung der CA1-Region.....	51
4.3	Dichtebestimmung der CA1-Region.....	56
4.4	Gesamtzahl der CA1-Neuronen	58
5	DISKUSSION.....	60
5.1	Diskussion der Methoden.....	60

5.2	Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Ermittlung der Zahl von CA1-Neuronen	66
5.3	Funktionelle Zusammenhänge mit anderen Teilen dieser Studie.....	68
5.4	Auswirkungen von EMF auf die Zahl von Neuronen	71
5.5	Auswirkungen von EMF auf Funktion und Morphologie von Zellen im Gehirn.....	76
6	ZUSAMMENFASSUNG	80
7	SUMMARY	82
8	LITERATURVERZEICHNIS	84
9	TABELLENVERZEICHNIS	97
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	98
11	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	101
12	DANKSAGUNG	103

1 Einleitung

Seit Einführung des ersten digitalen Mobilfunknetzes 1992 in Deutschland ist die Zahl der Mobilfunk-Vertragsverhältnisse (ein Nutzer kann dabei mehrere Vertragsverhältnisse unterhalten) auf über 107 Millionen (Bundesnetzagentur, 1. Quartal 2009) gestiegen. Einen ähnlich rasanten Anstieg macht auch die Anzahl der bisher veröffentlichten Forschungsergebnisse über mögliche Auswirkungen auf die Gesundheit durch die zunehmende Belastung mit der Hochfrequenzstrahlung.

Die anfangs auf nationalen Ebenen durchgeführten Studien beschäftigen sich mit den Wirkungen von elektromagnetischen Feldern auf Gewebe und Organismen und kommen dabei zu keinen einheitlichen Aussagen (D'Andrea et al., 2003; Gollnick und Dubois, 2007; Hermann und Hossmann, 1997; Hossmann und Hermann, 2003; Silny, 2003). Nur die thermischen Effekte der hochfrequenten elektromagnetischen Strahlung sind unumstritten und können Schäden verursachen (ICNIRP, 1998).

Seit Mai 1996 werden die Arbeiten in einem internationalen Programm von der WHO koordiniert. Dadurch sollen überflüssige Duplizierungen vermieden und wichtige Forschungsvorhaben gefördert werden. Das „Internationale EMF-Projekt“ soll mögliche Wirkungen elektromagnetischer Felder im Frequenzbereich von 0 bis 300 GHz auf Gesundheit und Umwelt untersuchen. Dabei beteiligen sich internationale Organisationen, wissenschaftliche Forschungsinstitute und nationale Behörden aus über 50 Mitgliedsstaaten an dem Projekt, um Informationen und Ergebnisse auf einer globalen Plattform präsentieren zu können. In Deutschland wird das Internationale EMF-Projekt der WHO durch das Deutschen Mobilfunk-Forschungsprogramm (DMF) unterstützt.

Ziele der WHO sind unter anderem Antworten auf mögliche gesundheitliche Effekte von EMF-Expositionen zu liefern, wissenschaftliche Literatur zu bewerten und einen Statusreport über die jeweiligen Gesundheitseffekte abzugeben, Wissenslücken aufzudecken und Forschungsbedarf aufzuzeigen um das Gesundheitsrisiko besser einschätzen zu können, Forschungsprogramme zu koordinieren und zu unterstützen (z.B. finanziell) sowie Informationen für das Management von Programmen zum Schutz vor elektromagnetischen Feldern bereitzustellen.

EINLEITUNG

Die WHO definiert regelmäßig in einer Agenda (WHO Research Agenda for Radio Frequency Fields) den wichtigsten Forschungsbedarf in den einzelnen Bereichen. Bei der Hochfrequenzstrahlung lassen sich Schwerpunkte für die Teilbereiche Epidemiologie, Laborstudien an Menschen und Tieren, in vitro-Studien, biologische Wirkmechanismen, Dosimetrie und sozialwissenschaftliche Forschungsaufgaben unterscheiden.

Studien, deren Ergebnisse einen großen Einfluss auf die Bewertung des Gesundheitsrisikos durch elektromagnetische Exposition im Radiofrequenzbereich haben, werden mit hoher Priorität eingestuft.

So besteht beispielsweise Forschungsbedarf hoher Priorität hinsichtlich der Wirkung von EMF auf immature Tiere bezüglich Entwicklung und Reifung des zentralen Nervensystems.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss chronischer elektromagnetischer Strahlung auf die Zahl der CA1-Neuronen im Hippocampus von Ratten untersucht. Dabei sollten potentielle Effekte der Langzeitexposition sichtbar gemacht werden. Dieses Forschungsvorhaben wurde im Rahmen des Deutschen Mobilfunk-Forschungsprogramms umgesetzt.

Dabei handelte es sich um eine Langzeituntersuchung in vivo unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation (GSM, UMTS und Kontrolle). Bei den Versuchen wurden Ratten über drei Generationen kontinuierlich bestrahlt und unter anderem die Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke, die Immun- und Stressreaktion sowie die Lern- und Gedächtnisleistung überprüft.

Die Tiere wurden in extra hierfür angefertigten Expositionskammern GSM- (Global System for Mobile Telecommunication, 900 MHz) und UMTS-Frequenzen (Universal Mobile Telecommunication System, 1966 MHz) bzw. einer Scheinexposition ausgesetzt. Die Strahlungsintensität war dabei so eingestellt, dass die maximal zulässige Arbeitsplatzkonzentration (BISchV, berufliche Exposition von Personen durch feststehende Strahlungsquellen) mit einem SAR-Wert von 0,4 W/kg in den Tierkörpern erreicht wurde.

EINLEITUNG

Für die Bestimmung der CA1-Neuronenzahl wurden weibliche Tiere der F₁-Generation verwendet, die sieben Monaten kontinuierlich (24 Stunden am Tag) unter Fernfeldbedingungen bestrahlt wurden. Nach Ablauf der Versuchszeit wurden die Ratten euthanasiert und die Gehirne in Kunststoff eingebettet. Durch die Hippocampusregionen wurden koronare Schnittserien angefertigt und bearbeitet. Im Anschluss wurde die Anzahl der CA1-Neuronen mit Hilfe einer modifizierten Disektormethode bestimmt.

Da Neuronen und Synapsen direkt an der Vernetzung und der Übertragung von Informationen im Nervensystem beteiligt sind, ist ihre Anzahl ein wichtiger Parameter bei der Beurteilung der funktionellen Kapazität des Nervensystems. Ermittlungen oder Schätzungen der absoluten Neuronenzahlen dieser Regionen sind wichtig um zu entscheiden ob deren Veränderungen mit Entwicklung, Altern, Stress, Trauma, Pathologie, giftigen Substanzen oder elektromagnetischer Strahlung zusammenhängen.

2 Literatur

2.1 Zum Hippocampus der Ratte

2.1.1 Aufbau

Der Hippocampus der Ratte gehört zum medialen Teil des Großhirns und ist eine bilaterale Struktur, die zwei „Cs“ ähnelt, welche im oberen Bereich aneinander lehnen, während sie unten auseinander divergieren.

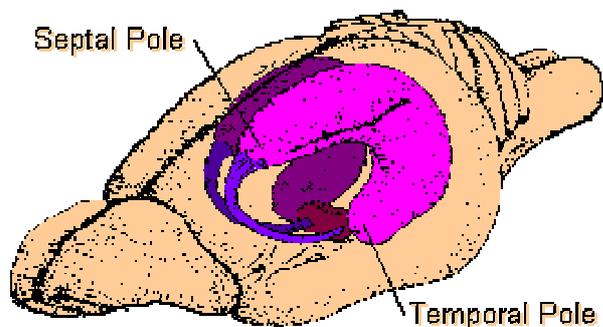


Abbildung 1: Schematische Darstellung der C-förmigen Hippocampusstruktur im Rattenhirn (modifiziert nach Amaral und Witter, 1995)

Der obere Anteil wird als dorsaler Hippocampus bezeichnet mit dem septalen Pol als Spitze, ventral endet der Hippocampus im temporalen Pol. Die hippocampale Formation liegt zwischen dem entorhinalen Kortex, dem Tractus opticus und dem lateralen Ventrikel.

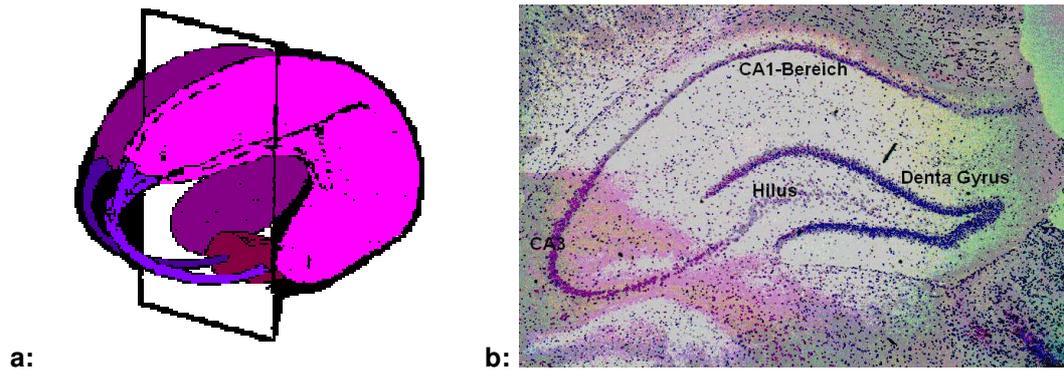


Abbildung 2a: Schematische Illustration des Hippocampus mit der Darstellung eines koronaren Schnittes (modifiziert nach Amaral und Witter, 1995) und b: mikroskopische Aufnahmen eines koronaren Schnittbildes durch den rostralen Teil des Hippocampus

Im koronaren Schnittbild wird die innere Struktur sichtbar, die Nervenzellschichten ähneln zwei ineinander greifenden Bögen, dem Gyrus dentatus und dem Ammonshorn. Letzteres setzt sich nach Lorente de Nó (1934) aus den Regionen CA1 bis CA4 zusammen. Wobei die CA4-Region in den Gyrus dentatus hineinreicht und keine eindeutige Schichtung aufweist. Die Regionen CA1 bis CA3 bestehen aus mehreren Schichten und enthalten als Grundbestandteil die Pyramidenzellen, die hier CA1 bis CA3-Neuronen genannt werden (Amaral und Witter, 1995).

2.1.2 Funktion

Der Hippocampus ist eine der evolutionär ältesten Gehirnstrukturen und wichtige Schaltstation des limbischen Systems. Er ist vor allem für das Langzeitgedächtnis verantwortlich, dazu gehören Lernen (Gedächtnisbildung), Erinnern und räumliche Orientierung (Gedächtnis abrufen). Im Hippocampus werden die Informationen aus dem Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis überführt und dann in der Großhirnrinde gespeichert. Wird der Hippocampus verletzt oder zerstört kann keine neue Information mehr aufgenommen werden, die Patienten leiden an einer anterograden Amnesie. Dabei ist die Merkfähigkeit für neue Bewusstseinsinhalte stark reduziert. Neue Dinge können nur noch für wenige Minuten im Gedächtnis behalten werden, bevor sie wieder vergessen werden.

2.1.3 Informationskette

Informationen gelangen hauptsächlich über kortikale Afferenzen in den Gyrus dentatus und werden von dort über Moosfasern zu den CA3-Neuronen transportiert, von wo sie über Schaffer-Kollateralen zu den CA1-Neuronen gelangen. Die CA1-Pyramidenzellen projizieren weiter ins Subiculum.

Es ergibt sich eine Kette aus hintereinander geschalteten Neuronen. Durch diese Anordnung der Nervenzellen wird deutlich, warum sich ein Schaden in der Region so verheerend auf die Gedächtnisleistung auswirkt.

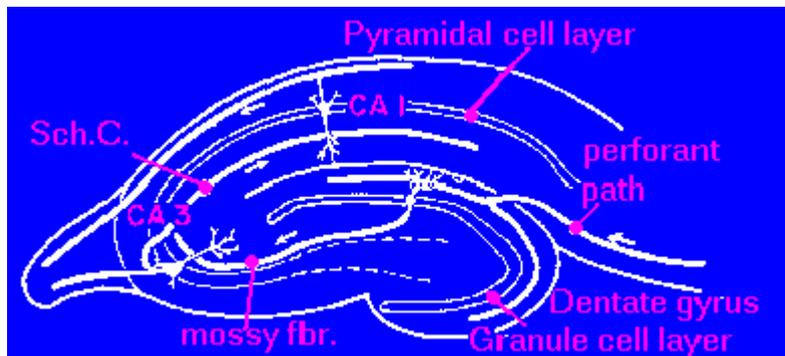


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Informationskette im Hippocampus (<http://www.pageoneuroplasticity.info/>)

2.2 CA-Neuronen-Region

CA steht für Cornu Ammonis, das Ammonshorn. Die CA Region ist aus mehreren Schichten aufgebaut, von tief zu oberflächlich folgen Stratum oriens, pyramidale, lucidum, radiatum und Str. lacunosum-moleculare aufeinander.

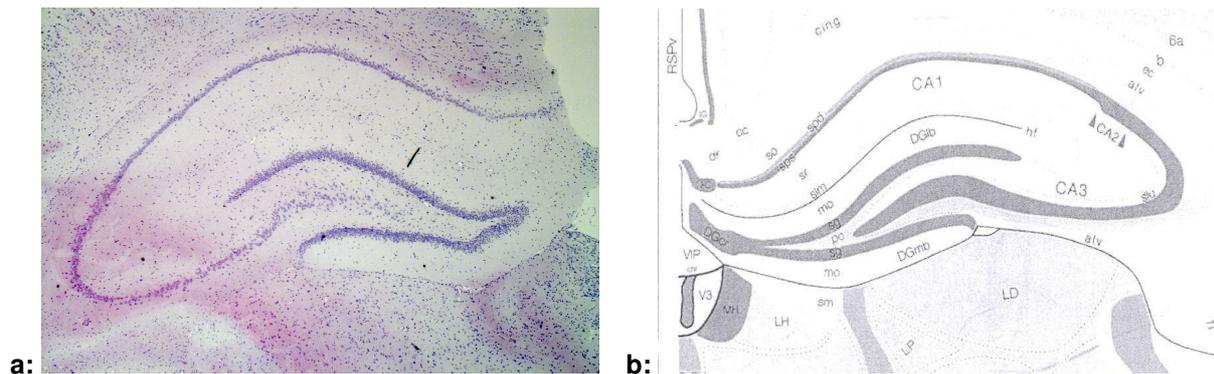


Abbildung 4a: mikroskopische Aufnahme und b: schematische Darstellung eines koronaren Schnittbildes durch den Hippocampus (Swanson, 1992)

Die tiefste Schicht ist das Str. oriens, sie ist eine schmale, relativ zellfreie Schicht. Im Anschluss folgt das Str. pyramidale, welches mit den Pyramidenzellen den Hauptbestandteil des Ammonshorns bildet. Die Pyramidenzellen sind besonders große Nervenzellen. Sie haben ihren Namen nach der Gestalt ihres Zellkörpers, der dreizipfelig einer Pyramide ähnelt. Der basale Dentritenbaum der Pyramidenzellen reicht bis in das Stratum oriens und die apicalen dentritischen Verzweigungen erreichen die Hippocampus-Fissur (Amaral und Witter, 1995). Im CA1-Bereich lässt sich die Pyramidenzellschicht zusätzlich in einen tiefen und einen oberflächlichen Abschnitt (CA1 spd bzw. CA1 sps, Str. pyramidale deep bzw. superficial, Swanson 1992) einteilen. Während die Nervenzellen im tiefen Bereich lockerer verteilt sind, liegen sie im oberflächlichen Abschnitt in einigen Reihen dicht gedrängt beieinander.

Das Str. lucidum ist eine schmale zellfreie Zone oberhalb der Pyramidenzellschicht, es enthält die Axone der Moosfasern aus dem Gyrus dentatus und kommt nur im CA3-Bereich vor.

Das Str. radiatum ist die suprapyramidale Region in der die CA3-CA3-Verbindungen und die CA3-CA1-Schaffer-kollaterale-Verbindungen verlaufen.

In der oberflächlichsten Schicht, dem Str. lacunosum-moleculare gelangen unter anderem Afferenzen vom entorhinalen Kortex in den Hippocampus (entorhino-hippocampaler Fasertrakt, so genannter Tractus perforans oder Hauptleitungsbahn zum Hippocampus).

Neben den verschiedenen Schichten lassen sich im Ammonshorn auch unterschiedliche CA-Neuronenregionen abgrenzen. Auf den Hilus folgen CA3-, CA2- und CA1-Bereich sowie im Anschluss das Subiculum (Amaral und Witter, 1995).

Die CA4-Neuronenregion wird auch Hilus genannt. Ihre Neuronen sind so genannte Mooszellen (*mossy cells*), da sie keine Pyramidenzell-Morphologie besitzen. Sie erhalten Informationen über Moosfasern von den Körnerzellen des Gyrus dentatus sowie von einigen CA3-Pyramidenzellen. Die Mooszellen projizieren zurück in den Gyrus dentatus.

Auf den Hilus folgen die größeren, dicht beieinander liegenden CA3-Neuronen. Sie erhalten Informationen hauptsächlich über Moosfasern aus dem Gyrus dentatus sowie aus dem entorhinalen Kortex (Tractus perforans) und geben Signale über Schaffer-Kollaterale an CA2- und CA1-Neuronen weiter. Einige Axone ziehen auch zurück zum Hilus (CA4-Region) sowie zu anderen CA3-Neuronen (negative Rückkopplung). Einzelne Axone reichen bis ins laterale Septum und geben dort Informationen weiter.

Die CA2-Neuronenregion ist ein kleiner Bereich (mit einer Länge bis zu 250 μm) zwischen CA3 und CA1. Sie enthält größere Pyramidenzellen, die nicht sehr dicht beieinander liegen. Diese erhalten Informationen über den Tractus perforans aus der entorhinalen Kortexschicht II (nicht aber über Moosfasern aus dem Gyrus dentatus) und geben ihre Signale an CA1-Neuronen und über Kollaterale auch an den Gyrus dentatus weiter (Amaral und Witter, 1989). CA2-Pyramidenzellen lassen sich immunhistochemisch von den anderen CA-Neuronen (Amaral und Witter, 1995) unterscheiden und sind relativ unempfindlich für Schäden durch epileptische Anfälle oder Ischämie (Kirino, 1982).

Es folgen die CA1-Neuronenregion (siehe Kapitel 2.3) und das Subiculum.

Der subiculaire Komplex ist eine Anhäufung von relativ kleinen kortikalen Feldern, die sich durch ihre Zytoarchitektur unterscheiden. Sie liegen zwischen der CA1-Region und dem entorhinalen Kortex ventral sowie der CA1-Region und dem retrosplenialen Kortex dorsal. Zum subicularen Komplex gehören das Prosubiculum, das Subiculum, das Presubiculum sowie das Post- und das Parasubiculum (Amaral und Witter, 1995). Das Subiculum selbst ist das Ende der hippocampalen Informationskette. Die Signale kommen vor allem von den CA1-Neuronen, einige auch von der entorhinalen Kortexschicht III und werden (wie bei CA1) überwiegend an die entorhinale Kortexschicht V weitergegeben (auch an Nucleus accumbens, vorderen Thalamus, laterales Septum und Presubiculum; Amaral und Witter, 1995).

2.3 CA1-Neuronen

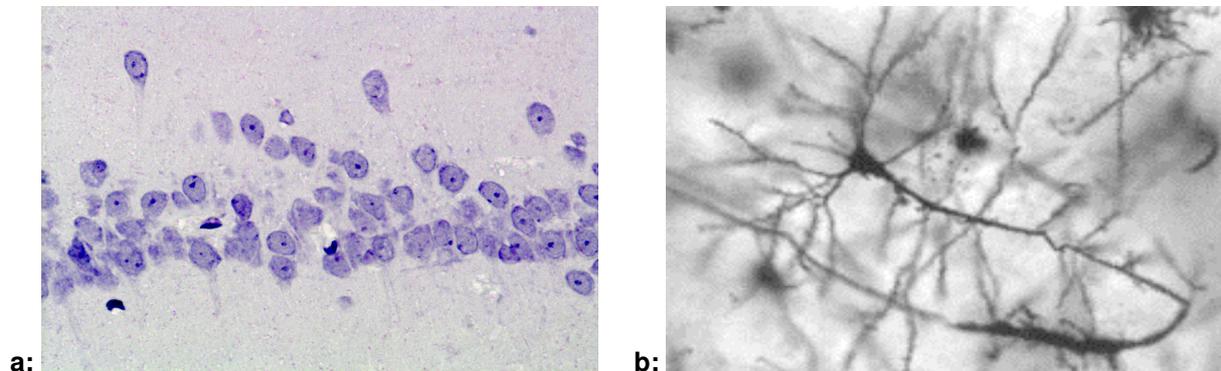


Abbildung 5: mikroskopische Aufnahmen von Pyramidenzellen in 40facher Vergrößerung a: Kernfärbung und b: Silbernitratfärbung nach Golgi (http://public.tfh-berlin.de/~miszalok/Lectures/L14_Cortex/Cortex_d.htm, Zugriff 31.03.08)

CA1-Neuronen sind kleine, dicht beieinander in vier bis fünf Reihen liegende Pyramidenzellen. Die Neuronen haben mit ihren dendritischen Verzweigungen eine durchschnittliche Länge von 13 mm (Amaral und Witter, 1995). Sie erhalten hauptsächlich Informationen über Schaffer-Kollateralen von CA3-Neuronen aber auch aus anderen Regionen, z.B. über den Tractus perforans des entorhinalen Kortex, von CA2- und contralateralen CA1-Neuronen (Van Groen und Wyss, 1990b) sowie aus der Amygdala (Krettek und Price, 1977). Die CA1-Neuronenregion ist die erste Region, von welcher viele Informationen nach außen an kortikale und subkortikale Regionen (retrosplenialer und perirhinaler Kortex, lateraler septaler Nucleus, Teile von Amygdala und Hypothalamus) und das Subiculum weiter gegeben werden (Amaral und Witter, 1995).

Die Neuronen der CA1-Region gehören zu den empfindlichsten Zellen des Gehirns. Sie reagieren besonders sensibel auf verschiedene Stressoren, wie globale oder fokale Ischämie (Kirino, 1982 und 2000; Wang et al., 2004; Zeng et al., 2000), hohe Kortikosteroidspiegel (Kerr et al., 1991; Pavlides et al., 1996), Hypoglykämie (Auer et al., 1984; Sadgrove et al., 2007) und Superoxidradikale (Wilde et al., 1997).

Veränderungen sind schon nach kurzer Zeit erkennbar. Oft degenerieren die Nervenzellen und sterben dann nach wenigen Tagen ab (Kövesdi, 2007), so dass eine verminderte Neuronenzelldichte und verringerte gesamte CA1-Neuronenzahl gemessen werden kann.

Aufgrund ihrer Empfindlichkeit ist die Untersuchung der CA1-Neuronen auch besonders geeignet potentielle Strahleneffekte nachzuweisen, weil schon eine geringe akute Schädigung der Neuronen über die lange Bestrahlungszeit zu einer eindeutigen Verringerung der verbleibenden Neuronen führen kann.

2.4 Elektromagnetische Felder

Elektrische und magnetische Felder kommen seit jeher in der Umgebung des Menschen vor. Dabei können wir heute zwischen natürlichen (Erdmagnetfeld, Blitze) und vom Menschen erzeugten (Energieversorgung, Kommunikationstechnologie) Feldern unterscheiden.

2.4.1 Elektrisches Feld

Ein elektrisches Feld wird zwischen zwei Polen mit gegensätzlicher elektrischer Ladung ausgebildet. Die elektrische Feldstärke wird in Volt pro Meter (V/m) angegeben. Das elektrische Feld kann durch seine Umgebung beeinflusst werden und umgekehrt. Wirkt beispielsweise ein sich zeitlich änderndes elektrisches Feld auf einen Körper, so entstehen durch die periodische Umverteilung elektrischer Ladung im Organismus Wechselströme. Die Stromdichte hat die Einheit A/m^2 und ist der elektrische Strom pro Fläche. Die natürlichen Körperstromdichten liegen im Mittel im Bereich von 1 bis $10\text{ mA}/m^2$.

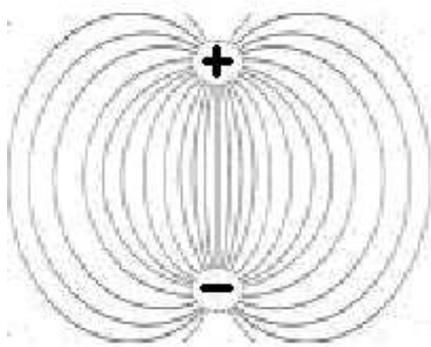


Abbildung 6: elektrisches Feld zwischen zwei Polen mit gegensätzlicher elektrischer Ladung

2.4.2 Magnetisches Feld

Das magnetische Feld ist ein gerichtetes Kraftfeld um einen stromdurchflossenen Leiter, dessen Feldstärke in Ampere pro Meter (A/m) angegeben wird. Mit zunehmendem Abstand von der Quelle nimmt die magnetische Feldstärke ab. Im Gegensatz zum elektrischen Feld kann das Magnetfeld die meisten Materialien fast ungehindert durchdringen und lässt sich deshalb nur mit größerem Aufwand abschirmen.

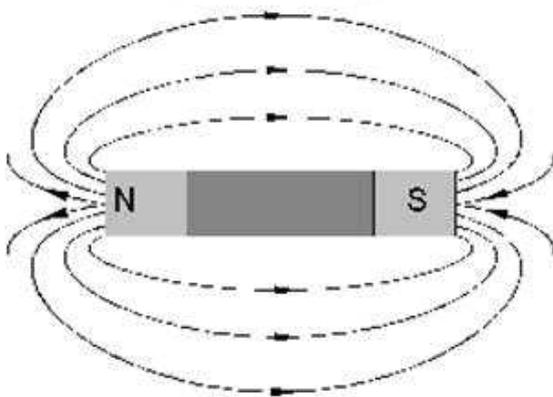


Abbildung 7: Magnetfeld eines Stabmagneten (Institut für Medizinische Physik und Biostatistik, Vet. Univ. Wien unter www-med-physik.vu-wien.ac.at/.../image002.jpg)

2.4.3 Elektromagnetisches Feld

Elektrische und magnetische Felder haben einen direkten Zusammenhang. So erzeugen bewegte elektrische Ladungen magnetische Felder und magnetische Wechselfelder induzieren wiederum elektrische Felder, die erneut elektrische Ladungen bewegen. Die gegenseitige Verbindung ist umso enger, je höher die Frequenz ist.

Ein elektromagnetisches Feld besteht also aus elektrischen und magnetischen Feldkomponenten, die bei hohen Frequenzen (> 30 KHz) unlösbar miteinander verbunden sind. Hochfrequenzfelder können Wärme erzeugen und elektrische Ströme induzieren. Moleküle mit Dipolcharakter (v.a. Wassermoleküle) richten sich

im Hochfrequenzfeld periodisch aus. Durch die Orientierungspolarisation (Schwingungs- und Rotationsbewegungen) kommt es zu Reibungsverlusten, die zur Wärmebildung führen.

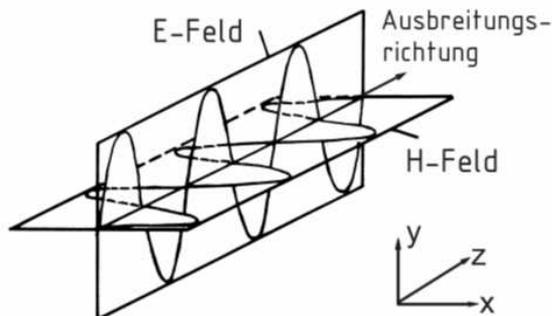


Abbildung 8: elektromagnetisches Feld bei vertikaler Polarisation (nach Moltrecht, 2007)

2.4.4 Frequenz und Wellenlänge

EMF lassen sich durch ihre Frequenz, ihre Wellenlänge sowie ihre Stärke beschreiben.

Die Frequenz ist die Zahl der Schwingungen pro Sekunde. Sie wird in Hertz (Hz) angegeben. Man unterscheidet niederfrequente (< 30 kHz) und hochfrequente (30 kHz - 300 GHz) elektromagnetische Felder. Die niederfrequenten Felder haben Wellenlängen im Kilometer-Bereich. Immissionsquellen sind beispielsweise der Bahnstrom oder die 50-Hz-Stromversorgung im Haushalt. Zu den hochfrequenten elektromagnetischen Feldern gehören die Radiofrequenzen (Lang-, Mittel- und Kurzwelle), die Mikrowellen mit dem Mobilfunkfrequenzbereich (von 900 bis etwa 2100 MHz) und der Radar. Je höher die Frequenz, desto energiereicher ist die Strahlung. Auf die hochfrequenten Felder folgen noch die optische Strahlung (Infrarot Strahlung und sichtbares Licht) und die ionisierende Strahlung (UV-, Röntgen- und Gammastrahlung). Letztere enthält eine so große elementare Energie, dass sie die Bindungen zwischen Atomen und Molekülen auflösen kann, freie Ladungsträger verschiebt und Atome polarisiert. Die ionisierende Strahlung beginnt bei Frequenzen über 1,2 PHz (Peta = 10^{15} Hertz), das entspricht einer Wellenlänge von 250 nm.

Die Wellenlänge ist umgekehrt proportional zur Frequenz, d.h. bei niedrigen Frequenzen ist die Wellenlänge der Strahlung groß, während hohe Frequenzen mit geringeren Wellenlängen einhergehen. Je höher die Frequenz, desto geringer ist die Eindringtiefe (im MHz-Bereich bis zu 30 cm, beim Mobilfunk nur wenige cm, über 10 GHz nur an der Hautoberfläche, etwa 0,2 mm). Die Energieabsorption ist am höchsten, wenn halbe Wellenlänge und Körperabmessung etwa gleich groß sind. Bis zu einem Frequenzbereich von 30 MHz ist die Wellenlänge größer als der menschliche Körper. Hier ist die Eindringtiefe der Strahlung groß und das Absorptionsverhalten des Körpers klein, d.h. man benötigt viel Energie um den Körper zu erwärmen.

Im Frequenzbereich von 30 MHz bis 300 MHz sind Wellenlänge und Körperabmessung eines Menschen ähnlich groß. Die maximale Energieabsorption für einen Erwachsenen erfolgt im Bereich von 70 – 100 MHz (Resonanzfrequenz), hier besitzt der Körper etwa die halbe Wellenlänge und nimmt besonders viel Strahlungsenergie auf. Für Kleinkinder oder Versuchstiere (Ratten, Mäuse) ist die optimale Resonanzfrequenz höher, da ihre Körperabmessungen geringer sind. Das muss auch bei der Übertragung von Ergebnissen aus Tierversuchen auf den Menschen mit berücksichtigt werden.

Bei Frequenzen über 300 MHz wird die Wellenlänge wieder kleiner als der menschliche Körper und die Eindringtiefe nimmt ab. Hier kommt es zu Teilkörpererwärmungen an der Oberfläche.

LITERATUR

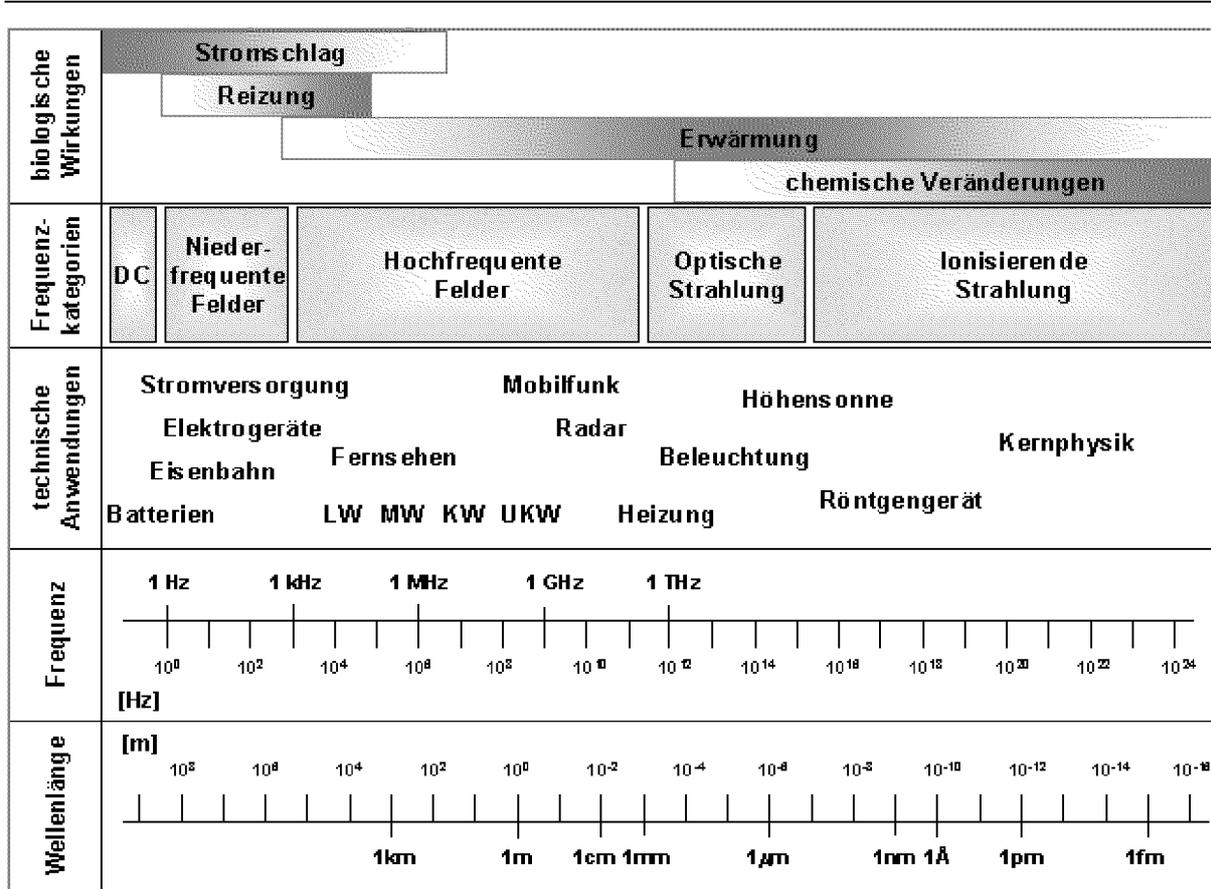


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Frequenzspektrums mit bekannten biologischen Wirkungen, Frequenzkategorien und Beispielen technischer Anwendungen (nach Müller, 2000)

2.4.5 Messgrößen

Die Leistungsflussdichte ist die im Strahlungsfeld pro Zeit und pro Fläche transportierte Energie. Sie ist das Maß für den Energiegehalt des Feldes im Fernbereich. Ihre Maßeinheit ist Watt pro Quadratmeter (W/m^2). Sie ist das Produkt aus der elektrischen Feldstärke E (V/m) und der magnetischen Feldstärke H (A/m), d.h. die Energie, die pro Zeiteinheit eine Fläche senkrecht zur Ausbreitungsrichtung des elektromagnetischen Feldes durchströmt. Bei Abstrahlung der Felder von einer Antenne wird die Leistungsflussdichte umso geringer, je größer der Abstand von der Antenne ist.

Der SAR-Wert (W/kg) ist die pro Zeiteinheit im Gewebe absorbierte Energie. Er dient als Maß zur Beurteilung der thermischen Wirkung von Hochfrequenzstrahlung. Wird die über den gesamten Körper absorbierte Energie gemittelt, ergibt sich die GK-SAR (Ganzkörper-Spezifische Absorptionsrate). Bei der TK-SAR (Teilkörper-SAR) wird nur eine lokale Teilexposition bestimmt (z.B. für die Augenlinse). Hierbei wird über eine kleine Masse (von 1 oder 10g) gemittelt. Die SAR-Werte werden jeweils nach 6-Minuten-Intervallen bestimmt, da der Körper in der Regel diese Zeit benötigt um die Wärme über Ableitmechanismen wie Blutzirkulation und Wärmeleitung in ein Gleichgewicht zu bringen.

2.4.6 Grenzwerte

Grenzwerte werden zum Schutz der Bevölkerung vor biologischen Effekten durch elektrische und magnetische Felder (welche die Kompensationsfähigkeit des Körpers überschreiten könnten) festgelegt.

Dabei werden die Grenzwertempfehlungen zum Schutz vor elektromagnetischen Feldern sowohl von internationalen als auch von nationalen Gremien veröffentlicht. Die Internationale Kommission zum Schutz vor nichtionisierenden Strahlen (International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection, ICNIRP) gibt weltweit Empfehlungen für Grenzwerte im Frequenzbereich von 0 bis 300 GHz

heraus (ICNIRP, 1998). Dabei werden der niederfrequente (0 Hz – 100 kHz) und der hochfrequente (100 kHz – 300 GHz) Bereich getrennt bewertet. Die Empfehlungen der ICNIRP beruhen ausschließlich auf wissenschaftlich etablierten Forschungsergebnissen. Die Kommission arbeitet dabei unter anderem mit der Weltgesundheitsorganisation (WHO) und der Internationalen Agentur für Krebsforschung (IARC, International Agency for Research on Cancer) zusammen. Sie analysiert kontinuierlich die aktuellen Forschungsergebnisse und bewertet ihre gesundheitliche Relevanz in Bezug auf den Strahlenschutz.

Im Jahr 1999 hat der Rat der Europäischen Union ebenfalls Empfehlungen zur Expositionsbegrenzung durch elektromagnetische Felder herausgegeben (European Communities 1999/519/EC). Dadurch sollen Rahmenbedingungen für die Mitgliedsstaaten geschaffen werden, so dass die Bevölkerung in allen EU-Ländern vor nachweislich gesundheitsschädlichen Auswirkungen der Exposition mit elektromagnetischen Feldern geschützt ist.

In Deutschland werden die Grenzwertempfehlungen von der Verordnung über elektromagnetische Felder (26. BfSchV, Durchführungsverordnung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes) in nationales Recht umgesetzt. Dabei soll die Bevölkerung vor nachgewiesenen, gesundheitlich relevanten, biologischen Wirkungen elektrischer, magnetischer und elektromagnetischer Felder geschützt werden. Die Strahlenschutzkommission (SSK) überprüft regelmäßig die Gültigkeit der Grenzwerte. Nach derzeitigem Wissensstand ist der Bevölkerungsschutz bei Einhaltung der Grenzwerte auch bei Dauereinwirkung garantiert.

Bei den Grenzwerten muss zwischen Basisgrenzwerten und Referenzwerten (abgeleiteten Grenzwerten) unterschieden werden. Zu den Basisgrenzwerten gehören die physikalischen Größen Stromdichte (mA/m^2) und spezifische Absorptionsrate (W/kg), die beide auf gesicherten Schwellenwerten beruhen, sich aber messtechnisch nicht ohne weiteres überprüfen lassen. In der Umgebung von exponierten Personen lassen sich die Feldstärken (elektrische Feldstärke in V/m und magnetische Flussdichte in A/m) und die Leistungsflussdichte (W/m^2) in Luft bestimmen. Diese abgeleiteten Grenzwerte lassen sich problemlos außerhalb des Körpers messen und werden deshalb als Referenzwerte herangezogen. Sie lassen sich aus den Basisgrenzwerten unter Nutzung von Mess- und/oder

Berechnungsverfahren ableiten. Bei Einhaltung der abgeleiteten Grenzwerte werden gleichzeitig die entsprechenden Basisgrenzwerte nicht überschritten (ICNIRP, 1998).

Für die berufliche Exposition gelten höhere Grenzwerte als für die Exposition der Bevölkerung, da bei der beruflichen Exposition ausschließlich Erwachsene nur für die Dauer der Arbeitszeit betroffen sind. Die allgemeine Bevölkerung besteht dagegen aus allen Menschen, die unabhängig von Alter und Gesundheitszustand rund um die Uhr der Bestrahlung durch elektromagnetische Felder ausgesetzt sein können.

Tabelle 1: Grenzwerte für Ganzkörper- und Teilkörper-SAR bei beruflich exponierten Personen und der Bevölkerung

Befeldung	Betroffene Personengruppe	Ganzkörper-SAR	Teilkörper-SAR (Kopf/Rumpf)	Teilkörper-SAR (Gliedmaßen)
hochfrequentes elektromagnetisches Feld (100 kHz – 10 GHz)	beruflich exponierte Personen	0,4 W/kg	10 W/kg	20 W/kg
	Bevölkerung	0,08 W/kg	2 W/kg	4 W/kg

2.4.7 Mobilfunkstandards

GSM

Das Global System of Mobile Communications sendet im Hochfrequenzbereich mit Frequenzen von 900 (D-Netz) und 1800 MHz (E-Netz) und einer Datenübertragungsgeschwindigkeit von 9,6 kBit/s. Die Sprachinformation wird dabei in Abschnitte geteilt, die anschließend digitalisiert und zu Paketen komprimiert werden. Diese Informationspakete werden dann im Frequenz- oder Zeitmultiplexverfahren transportiert.

Beim Frequenzmultiplexverfahren senden Mobilfunkgeräte und Basisstationen auf unterschiedlichen Frequenzen, während beim Zeitmultiplexverfahren eine Sekunde in 217 Informationsperioden unterteilt wird, von denen jede noch mal in acht Timeslots zerlegt wird. Der erste Timeslot wird dabei vom Mobilfunkbetreiber zur Kontrolle und Regulation herangezogen, während die anderen sieben der Informationsübertragung dienen. Die Datenübertragung vom Mobiltelefon zur Basisstation erfolgt also in einem gepulsten Feld nur alle 4,7 ms (Modulation: 217 Hz -> niederfrequent gepulste Hochfrequenzfelder). Die Basisstation sendet dagegen kontinuierlich mit 30 bis 50 W. Die Verbindung von Basisstationen und Mobilfunkvermittlungszentrale besteht über herkömmliche Datenleitungen oder über Richtfunk (Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz, Mobilfunk 2007 und Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Elektromog in der Umwelt 2005).

UMTS

Universal Mobile Telecommunications System bezeichnet das Mobilfunksystem der neuesten Generation. UMTS sendet kontinuierlich im Frequenzbereich zwischen 1900 und 2170 MHz. Die Daten der einzelnen Mobilfunkteilnehmer werden codiert und können zeitgleich übermittelt werden. Es lassen sich größere Datenmengen schneller mobil versenden und empfangen. Die Übertragungsrates der Daten beträgt bis zu 384 kBit/s. UMTS Basisstationen haben eine durchschnittliche Sendeleistung von 10 – 30 W.

2.5 Allgemeine biologische Effekte elektromagnetischer Felder

Die Effekte von elektromagnetischen Feldern auf Organismen sind einerseits abhängig von Frequenz, Modulation und Intensität der Exposition, andererseits spielen Körperform und –größe sowie die Eigenschaft des biologischen Gewebes eine große Rolle bei der Energieabsorption.

Die biologischen Wirkungen können den Körper dabei direkt, also unmittelbar beeinflussen oder indirekt durch leitfähige Substanzen als Spannungen oder induzierte Ströme auf den Körper übertragen werden.

Ferner können Effekte akut, also sofort auftreten oder erst nach einiger Zeit sichtbar werden (Langzeitwirkung).

2.5.1 Auswirkungen niederfrequenter elektromagnetischer Felder

Ein elektrisches Feld entsteht sobald eine elektrische Spannung vorhanden ist, auch wenn kein Strom fließt. Das Feld erzeugt im Körper Stromdichten (= elektrischer Strom, der durch eine Körperfläche fließt in mA/m^2), die ab einem bestimmten Schwellenwert Reizerscheinungen an Muskel- und Nervenzellen auslösen können (Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft, Elektrosmog in der Umwelt 2005). Die natürlichen Körperstromdichten liegen im Bereich von 1 bis 10 mA/m^2 . Übersteigt die Stromdichte die frequenzabhängige Reizschwelle wird eine Erregung nach dem „Alles oder Nichts“ Prinzip eingeleitet. Bei örtlichen Körperstromdichten von mehr als 100 mA/m^2 kommt es zur akuten Gesundheitsgefahr durch Erregung der Nerven-, Muskel- beziehungsweise Herzfunktion (Kammerflimmern).

Je nach Größe der elektrischen Feldstärke können Oberflächeneffekte, wie beispielsweise die Bewegung von Haaren auf der Haut wahrgenommen werden. Daneben kommt es im Körperinneren zu elektrischen Ausgleichsströmen, deren Stromdichten (wenige mA/m^2) aber meist zu niedrig sind um Nerven- oder Muskelzellen zu erregen. Die magnetische Komponente des niederfrequenten

elektromagnetischen Feldes kann tief in den Körper eindringen und dort elektrische Wirbelströme induzieren, die ab einem bestimmten Schwellenwert Reize auslösen können. Das reicht von der harmlosen optischen Wahrnehmung (sog. Flicker-Effekte am Rand des Sehfeldes) bis hin zu Herzrhythmusstörungen (Bundesamt für Strahlenschutz, 2008).

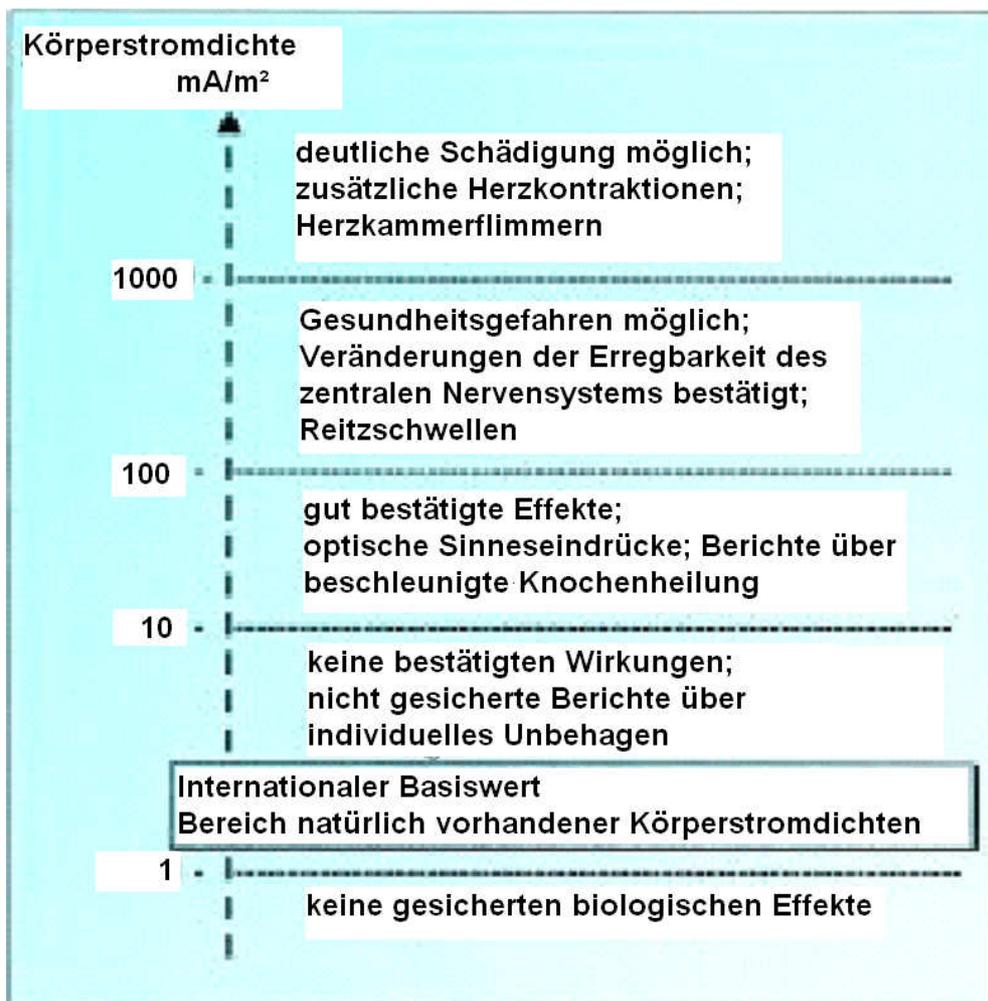


Abbildung 10: Auflistung der möglichen Wirkungen steigender Körperstromdichten im Organismus (Bundesamt für Strahlenschutz, <http://www.bfs.de/de/elektro/nff/wirkungen.html>)

2.5.2 Auswirkungen hochfrequenter elektromagnetischer Felder

Hochfrequente elektromagnetische Felder erzeugen im Körper Wärme. Dies geschieht, indem sich Moleküle mit Dipolcharakter im Hochfrequenzfeld periodisch ausrichten. Die größte Bedeutung haben dabei die Wassermoleküle, durch deren Schwingungs- und Rotationsbewegungen entstehen Reibungsverluste und damit Wärme.

Die Körpererwärmung ist abhängig von der absorbierten Energie. Diese steht im Zusammenhang mit der Leitfähigkeit und dem Wassergehalt eines Körpers sowie der Frequenz und der Wellenlänge der elektromagnetischen Strahlung. Für eine maximale Energieabsorption müssen Körperabmessung und halbe Wellenlänge etwa gleich groß sein. Bei einem erwachsenen Menschen ist das im Frequenzbereich zwischen 70 bis 100 MHz der Fall, man spricht hier auch von Resonanzfrequenz (ICNIRP, 1998). Im Mobilfunkfrequenzbereich (900 MHz bis 2,1 GHz) ist die Wellenlänge kleiner als der menschliche Körper und die Eindringtiefe nimmt ab. Hier kommt es zu Teilkörpererwärmungen an der Oberfläche (Bundesamt für Strahlenschutz, 2008).

Bei einer Ganzkörperbestrahlung ruhender Menschen mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern über 30 Minuten, kommt es bei SAR-Werten zwischen 1 und 4 W/kg zu einer Temperaturerhöhung von weniger als 1 °C (ICNIRP, 1998). Die aktuellen Grenzwerte von 0,4 W/kg (beruflich exponierte Personen) bzw. 0,08 W/kg (allgemeine Bevölkerung) sind also nochmals um den Sicherheitsfaktor 10 bzw. 50 niedriger.

Ob nicht-thermische Wirkungen im Mobilfunkfrequenzbereich eine gesundheitliche Relevanz haben ist umstritten.

2.5.3 Langzeitwirkungen elektromagnetischer Felder

Um Langzeitwirkungen aufzuzeigen werden neben epidemiologischen Studien (an Menschen) auch in vitro- und in vivo-Experimente (an Zellkulturen bzw. Tieren) herangezogen. Dabei liegt der Forschungsschwerpunkt vor allem auf der Frage ob es durch EMF unterhalb der Grenzwerte zu einem erhöhten Krebsrisiko oder einem größeren Risiko angeborener Anomalien kommt. Daneben wird die Beeinträchtigung von Implantaten (z.B. Herzschrittmacher) untersucht und auch Beschwerden im Zusammenhang mit dem Begriff der Elektrosensibilität (Kopfschmerzen, Müdigkeit, Konzentrationsschwäche, Übererregung,...) erforscht.

Obwohl viele epidemiologische Studien laut ICNIRP (1998) nicht ohne Mängel sind (z.B. ungenaue Expositionsabschätzung) deuten sie aber darauf hin, dass sich typische Expositionspegel nicht schädlich auf das Krebsrisiko oder die Fortpflanzung exponierter Personen auswirken. Diese Schlussfolgerung wird auch durch viele Laborstudien mit Zellen und Tieren gestützt, bei denen weder karzinogene (Energie der EMF ist nicht ausreichend um DNS direkt zu schädigen und dadurch Tumorinitiation auszulösen) noch teratogene Effekte durch hochfrequente elektromagnetische Felder nachgewiesen wurden (INCIRP, 1998).

Viele medizintechnische Geräte, wie Herzschrittmacher, Defibrillatoren, Insulinpumpen, Hörprothesen oder Nerven- und Muskelstimulatoren sind mit elektronischen Schaltkreisen versehen, die grundsätzlich durch elektromagnetische Felder beeinflusst werden können. In seltenen Fällen kann es dabei auch zu schwerwiegenden Störungen der vitalen Funktionen kommen, wenn beispielsweise Herzschrittmacher oder implantierte Insulinpumpen behindert werden. Die Störung der elektrischen Systeme kann auch noch längere Zeit nach der Exposition anhalten. Personen mit medizintechnischen Implantaten sollten sich der Beeinflussung stets bewusst sein und das Mobiltelefon nur mit Bedacht einsetzen (z.B. Abstand von der Handyantenne zum Schrittmacher mindestens 20 cm, Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit, 2009).

Die verschiedenen Befindlichkeitsstörungen wie Konzentrationsschwäche, Müdigkeit, Kopfschmerzen, Schlafstörungen, Übererregung, Sehstörungen, usw. werden unter dem Begriff der Elektrosensibilität (engl. electromagnetic hypersensitivity) zusammengefasst (WHO Fact Sheet 296, 2005). Die unterschiedlichen Symptome sind real und können in ihrem Schweregrad stark variieren (Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz, Mobilfunk 2007). Sie zeigen oft einen Zusammenhang mit dem Ausmaß der Angst vor negativen Auswirkungen durch EMF, selten aber mit den tatsächlich gemessenen Feldstärken der Hochfrequenzstrahlung (Otto und Mühlendahl, 2003). Es gibt weder eindeutige Diagnosekriterien noch eine wissenschaftliche Grundlage, welche diese Symptome und EMF miteinander verbindet.

2.6 Bisherige Erkenntnisse zum Einfluss elektromagnetischer Felder auf Nervenzellen

Es gibt bislang nur sehr wenig veröffentlichte Studien über einen Zusammenhang zwischen hochfrequenter elektromagnetischer Strahlung und Auswirkungen auf die Anzahl von Nervenzellen. Im Gegensatz dazu gibt es eine ganze Reihe von Untersuchungen, die sich mit der Wirkung von EMF auf das EEG, die Kognition, verschiedene Schlafparameter, die Integrität der Blut-Hirn-Schranke und anderen Effekten befassen.

2.6.1 Auswirkungen auf die Neuronenzahl

Bisher wurde keine in vivo Studie veröffentlicht, die sich direkt mit den Auswirkungen von hochfrequenten elektromagnetischen Feldern auf die Anzahl der CA1-Neuronen im Hippocampus beschäftigt. Dafür gibt es einige Arbeiten, die sich mit einer Veränderung der Apoptoserate von Nervenzellen in vitro und in vivo befassen. Durch eine Änderung der Apoptoserate kann indirekt auch auf eine veränderte Gesamtzahl an Neuronen geschlossen werden. Einzelne Arbeiten beschäftigten sich mit Nervenzellschäden bzw. einer Reduktion der Neuronen im Gyrus dentatus.

Die Arbeitsgruppe um die Französin Vanessa Joubert kam bei ihren Studien zu unterschiedlichen Ergebnissen. In den ersten Versuchen (Joubert et al., 2007) wurde untersucht, ob sich hochfrequente elektromagnetische Bestrahlung auf die neuronale Apoptose in vitro auswirkt. Dabei wurden kortikale Neuronen von Rattenembryonen kultiviert und 24 Stunden einem gepulsten 900 MHz Feld bei einem SAR-Wert von 0,25 W/kg ausgesetzt. Direkt im Anschluss und 24 Stunden nach der Exposition wurde die Apoptoserate auf drei verschiedenen Arten ermittelt. In keinem der Fälle kam es zu einer statistisch relevanten Veränderung der Apoptoserate zwischen den bestrahlten Neuronen und Kontrollzellen. Bei ähnlichen Versuchen etwas später (Joubert et al., 2008) wurden höhere SAR-Werte (2 W/kg) und eine kontinuierliche Welle (900 MHz) eingesetzt, dabei wurden Effekte auf die Apoptose beobachtet. Im Vergleich zu den scheinexponierten Neuronen kam es zu einer Erhöhung der Apoptoserate sowohl direkt als auch 24 Stunden nach der Exposition.

Eine koreanische Arbeitsgruppe (Kim et al., 2008) untersuchte in vivo die Wirkung von EMF im Mobilfunk Frequenzbereich auf Neuronen (Hippocampus und Kleinhirn) von Mäusen. Die Tiere wurden bis zu 12 Monate mit 849 oder 1763 MHz, bei einem SAR-Wert von 7,8 W/kg bestrahlt und anschließend ihre Gehirne untersucht. Es kam weder zu vermehrter Apoptose noch zu Zellproliferationen, bei der Verteilung von Neuronen und Gliazellen gab es keine Unterschiede zwischen exponierten und Kontrolltieren.

Salford et al. veröffentlichten 2003 eine Studie zu Nervenzellschäden nach einer elektromagnetischen Befeldung im Mobilfunkfrequenzbereich. Dabei wurden Ratten zwei Stunden bei SAR-Werten von 2, 20 oder 200 mW/kg exponiert und 50 Tage im Anschluss histologisch untersucht. Es wurden Veränderungen in Form so genannter „dark neurons“ gefunden, die auf Schäden im Bereich des Hippocampus hinweisen.

Bei Odaci et al. (2008) wurde die Wirkung pränataler elektromagnetischer Exposition auf die Zahl der Körnerzellen im Gyrus dentatus untersucht. Dazu wurden Ratten während der gesamten Trächtigkeit täglich eine Stunde einen 900 MHz CW Feld ausgesetzt. Die Jungtiere wurden im Alter von vier Wochen euthanasiert und anschließend die Gehirne histologisch und stereologisch untersucht. Dabei wurden morphologische Zellveränderungen (dunkel gefärbte Neuronen) und eine geringere Anzahl an Körnerzellen im Gyrus dentatus beobachtet.

2.6.2 Veränderungen von Hirnströmen (EEG)

Es gibt eine ganze Reihe von Untersuchungen zu Veränderungen der Hirnstromaktivitäten (EEG = Elektroenzephalogramm) durch EMF, allerdings mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen. So publizierte die Arbeitsgruppe um Krause in mehreren Studien Veränderungen in bestimmten EEG-Frequenzbändern (Krause et al., 2000a und b, 2004 und 2006), die aber in einer letzten Studie nicht mehr alle zu replizieren waren (Krause et al., 2007). Auch andere Arbeitsgruppen kamen bei Reproduktionsstudien zu keinen einheitlichen Resultaten (Croft et al., 2002 und 2008; Hamblin et al., 2004 und 2006). Alles in allem wurden bei Versuchen zum Ruhe-EEG seltener messbare Veränderungen festgestellt, während bei der

komplexen Informationsbearbeitung meist eine Beeinflussung der Hirnaktivität beobachtet werden konnte.

Insgesamt ist festzustellen, dass die gesundheitliche Relevanz ungewiss ist und sich keine Rückschlüsse auf eine Beeinflussung des Wohlbefindens ziehen lassen.

2.6.3 Veränderungen von kognitiven Leistungen

Hier gibt es viele verschiedene Studien, die sowohl an Menschen als auch an Versuchstieren durchgeführt wurden. In verschiedenen Studien der Forschungsgruppen um Christian Haarala, Mika Koivisto und Alan Preece (Haarala et al., 2003, 2004, 2005 und 2007; Koivisto et al., 2000a und b; Preece et al., 2005) wurden standardisierte Laborversuche mit freiwilligen Probanden (Kinder und Erwachsene) durchgeführt, bei denen die Veränderungen kognitiver Funktionen getestet wurden (verschiedene Reaktionszeit-Aufgaben, Antwortgenauigkeit, Vigilanz-Aufgaben, Kurzzeitgedächtnis, bei 902 MHz, PW und einer Frequenz von 217 Hz). Es ergaben sich nur bei einem Teil der Versuche signifikante Unterschiede (meist verkürzte Reaktionszeiten), die sich nicht immer replizieren ließen.

Bei Lai (Lai et al., 1994) wurden Ratten mit gepulsten 2,45 GHz-Mikrowellen bestrahlt und anschließend ihr Verhalten und die Lernfähigkeit in einem 12-armigen Labyrinth untersucht. Dabei zeigte sich, dass es bei den länger bestrahlten Tieren (45 min. tägl., nicht bei 20 min. tägl.) häufiger zu Fehlern kam, was auf Defizite im „Arbeitsgedächtnis“ hinweist. Bornhausen (Bornhausen und Scheingraber, 2000) untersuchte die Wirkung von 900 MHz GSM-Mobilfunkfeldern auf das Verhalten von Ratten, die während der ersten 20 Tage ihrer Embryonalentwicklung bestrahlt wurden. Hierbei ließen sich keine signifikanten Unterschiede erkennen.

Die vom Bundesamt für Strahlenschutz in Auftrag gegebene Studie, Langzeituntersuchung in vivo unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation, beinhaltete auch Untersuchungen zur Kognition bei Ratten. Hierbei wurden drei Generationen von Ratten in doppel-blind Experimenten mittels operanter Verhaltenstests mit ansteigender Lernanforderung in Skinner-Boxen untersucht. Aus den Testergebnissen der chronisch (schein-) exponierten Tiere ließ sich keine

Beeinträchtigung der Gedächtnisleistung der Ratten auf Grund der elektromagnetischen Befeldung ableiten (Forschungsverbund EMVU, 2007).

2.6.4 Veränderungen von Schlafparametern

Bei den Beobachtungen im Schlaflabor kam es zu sehr uneinheitlichen Ergebnissen. Mann und Röschke (1996) entdeckten, dass sich unter GSM-Exposition die Einschlafzeit verkürzt und die REM-Phase verändert. Diese schlaffördernden Wirkungen konnten in späteren Studien der gleichen Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden (Wagner et al. 1998 und 2000). Eine Schweizer Forschergruppe um Peter Achermann dokumentierte in mehreren Untersuchungen eine Beeinflussung der spektralen EEG-Leistung sowie eine Verkürzung der Wachphasen (Borbely et al., 1999; Huber et al., 2002 und 2003; Regel et al., 2007a), während eine Kieler Arbeitsgruppe (Fritzer et al., 2007) keine Veränderung der erfassten Schlafparameter beobachtete. Bei Lebedeva et al. (2001) kam es zu einer Verkürzung der REM-Schlafphase und zu einer Zunahme des alpha-Wellen-Anteils, was eher für eine schlafhemmende Wirkung sprach. In einer Umfrage mit standardisierten Fragebögen zur Schlafqualität wurde kein Einfluss durch EMF festgestellt (Herr et al., 2005; Hutter et al., 2006).

Insgesamt ergibt sich kein einheitliches Bild, so dass bisher nicht gesagt werden kann, wie und ob sich hochfrequente Elektromagnetische Felder letztendlich auf den Schlaf auswirken.

2.6.5 Veränderungen der Öffnung der Blut-Hirn-Schranke

Obwohl die Integrität der Blut-Hirn-Schranke schon seit einigen Jahren im Zusammenhang mit möglichen Effekten der hochfrequenten Strahlung untersucht wurde, gab es sowohl bei in vitro- als auch bei in vivo-Untersuchungen sehr unterschiedliche Ergebnisse. Ein Grossteil der Arbeitsgruppen kam zu dem Schluss, dass sich die Integrität der BHS durch EMF nicht verändert (Finnie et al., 2001, 2002 und 2006; Franke et al., 2005; Masuda et al., 2007; Ward et al., 1982). Bei einigen Veröffentlichung (z.B. Lin und Lin 1982; Merritt et al., 1978) wurden Veränderungen der Integrität der BHS nach Bestrahlungen im thermischen Bereich gemessen (Erwärmung des Gehirngewebes auf über 42°C) und eine dritte Gruppe von Forschern kam zu dem Ergebnis, dass sich die BHS auch im nicht-thermischen Bereich aufgrund der Bestrahlung öffnet (Persson et al., 1992; Salford et al., 1994 und 2003; Schirmacher et al., 2000). Bei letzteren lassen sich in den Arbeiten häufig methodische Mängel nachweisen, so dass die beschriebenen Effekte oft fraglich sind.

Die Untersuchungen zur Integrität der BHS im Rahmen der Langzeituntersuchung in vivo unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation deuteten darauf hin, dass sich die chronische Bestrahlung der Ratten nicht auf die Integrität der BHS auswirkt. Dabei wurde zusätzlich zur quantitativen Messung mittels unidirektionalen Influxkonstante K_{in} von ^{14}C -Saccharose auch eine Challenge-Methode zur Labilisierung der BHS verwendet, wodurch die Nachweisempfindlichkeit der Methode erhöht wurde (Forschungsverbund EMVU, 2007; Hettenbach, 2007).

2.6.6 Veränderte Neuronenaktivität

In einigen älteren in vitro Studien wurde nachgewiesen, dass es bei hohen Expositionsdosen (SAR 6.8 bis 100 W/kg) zu veränderten Aktivitätsmustern bei isolierten Nervenzellen kam. Bei Meeresschnecken-Neuronen kam es zu einer verringerten spontanen elektrischen Aktivität (Seaman und Wachtel, 1978; Wachtel et al., 1975), während der N. ischiadicus bei Fröschen mit einer erniedrigten Amplitude des Aktionspotentials und einer verlängerten Refraktärzeit reagierte (McRee und Wachtel, 1980). In einer neueren Studie von Tattersall (Tattersall et al., 2001) ließ sich bei einer 700 MHz CW Bestrahlung unter temperaturkonstanten Bedingungen eine signifikante Änderung der elektrischen Aktivität (erzeugt und spontan) von CA1-Neuronen in Rattenhirnschnitten nachweisen. In der Arbeitsgruppe um Pakhomov (Pakhomov et al., 2003) wurden Ratten-Hippocampusschnitte einem pulsmodulierten (0,5 bis 10 Hz) 9,3 GHz Feld ausgesetzt, dabei kam es zu einer Temperaturerhöhung von bis zu 6°C. Die Forscher kamen zu dem Schluss, dass sich keine Indizien für spezifische biologische Veränderungen durch EMF ergaben, bzw. dass die beobachteten Effekte (Abnahmen der population spikes) reversibel waren und sich durch die Temperaturerhöhung erklären ließen.

2.7 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es nach Auswirkungen hochfrequenter elektromagnetischer Felder auf die CA1-Neuronen im Hippocampus der Ratte zu suchen. Es soll überprüft werden ob athermische Effekte durch die chronische Exposition im Mobilfunkfrequenzbereich die Anzahl der CA1-Pyramidenzellen verändert.

Zu diesem Zweck werden die Versuchstiere in Hochfrequenzkammern mit GSM- und UMTS-Standards von Mobilfunkbasisstationen bestrahlt bzw. die Kontrolltiere einer Scheinexposition ausgesetzt.

Dabei sollen durch die Exposition Ganzkörper SAR-Werte von 0,4 W/kg erreicht werden, was dem Grenzwert für beruflich strahlenexponierte Menschen entspricht.

Da bei dieser Arbeit nur geringe Unterschiede zwischen den Versuchstiergruppen zu erwarten sind, werden zur Auswertung möglichst wenig fehleranfällige histologische (modifizierte Disektormethode) und Computer gestützte Techniken (Amira) eingesetzt. Um möglichst präzise Ergebnisse zu erhalten, wird nicht nur die numerische Dichte, sondern die absolute CA1-Neuronenzahl bestimmt.

3 Material und Methoden

3.1 Tiere und Unterbringung

Im Rahmen dieser Arbeit werden 30 Versuchstiere aus dem Projekt „in vivo-Experimente unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation“ verwendet (Tierversuchsantrag gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes von der Regierung von Oberbayern genehmigt). Es handelt sich um weibliche albinotische Wistarratten (Stamm: Rj:HAN). Die Tiere werden als F1-Generation in den Versuchskammern geboren und kontinuierlich sieben Monate (schein-) bestrahlt, bevor sie für die weiteren Untersuchungen euthanasiert werden.

Die Jungtiere bleiben bis zum Absetzen am 21. Tag bei der Mutter und werden dann in Dreiergruppen aufgeteilt. Die Unterbringung der Ratten erfolgt in Polycarbonat Makrolon-Käfigen Typ III H (42,5 x 26,6 x 24,0 cm, Firma Tecniplast, Hohenpeißenberg), wobei Deckel und Wasserflaschen ebenfalls aus Kunststoff sind. An der Käfigstirnseite befinden sich mehrere Lüftungslöcher um das Innenklima zu verbessern.

In den Versuchskammern beträgt die Temperatur 20°C ($\pm 3^\circ\text{C}$), es herrscht eine relative Luftfeuchte von 60% ($\pm 15\%$) und die durchschnittliche Beleuchtungsstärke ergibt 65 Lux (± 15 Lux) bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden, wobei das Lichtregime um 7 Uhr beginnt und um 19 Uhr endet.

Die Ratten werden täglich visuell kontrolliert und einmal wöchentlich zusätzlich zur Gesundheitskontrolle gewogen. Fütterung und Käfigreinigung erfolgen alle zwei Tage.

Das Einstreu besteht aus Weichholzgranulat (Altromin[®] GmbH, Lage-Lippe). Als Beschäftigungsmaterial wird eine autoklavierte Pappröhre, einzelne Streifen ungebleichten Zellstoffes (WDT, Garbsen) sowie Espenholzblöcke zum Nagen (ABEDD[®] LAB & VET Service GmbH, Wien, Österreich) angeboten. Die Ratten bekommen pelletiertes Futter für Nagetiere (Haltung: Standard 1324, Zucht: Standard 1314, Altromin[®] GmbH, Lage-Lippe) und frisches Trinkwasser ad libitum.



Abbildung 11: Foto eines modifizierten Makrolon Käfigs (Typ III H) mit Kunststoffdeckel, Einstreu und Wasserflasche (Schneider, 2008)

3.2 Versuchsaufbau und –ablauf

Die Untersuchung der CA1-Neuronen nach chronischer Exposition wird im Rahmen der Langzeituntersuchung „in vivo-Experimente unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation“ durchgeführt. Bei den Experimenten werden die Ratten über drei Generationen kontinuierlich bestrahlt. Es wird unter anderem die Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke, die Immun- und Stressreaktion sowie die Lern- und Gedächtnisleistung überprüft.

Um den Einfluss elektromagnetischer Strahlung auf CA1-Neuronen im Hippocampus der Ratte zu untersuchen, erfolgt die Bestrahlung der F1-Generation der Ratten in Hochfrequenzexpositions-kammern (EMC- Technik & Consulting, Stuttgart) sieben Monate kontinuierlich (24h/d) unter Fernfeldbedingungen. Die Exposition beträgt für die erste Kammer 900 MHz (GSM-Standard, Global System for Mobile Communication), für die zweite Kammer 1966 MHz (UMTS-Standard, Universal Mobile Telecommunication System) und 0 MHz für die Kontrollgruppe in der dritten Kammer. Die Feldstärken sind so eingestellt, dass bei den Versuchstieren eine Ganzkörper-Spezifische Absorptionsrate (GK-SAR) von 0,4 W/kg erreicht wird. Dieser Wert entspricht der höchsten GK-SAR, die in Deutschland laut B1SchV für die berufliche Exposition von Personen durch feststehende Strahlenquellen zugelassen ist.

Am Ende des Versuchs werden die Ratten aus den Versuchskammern genommen und euthanasiert.

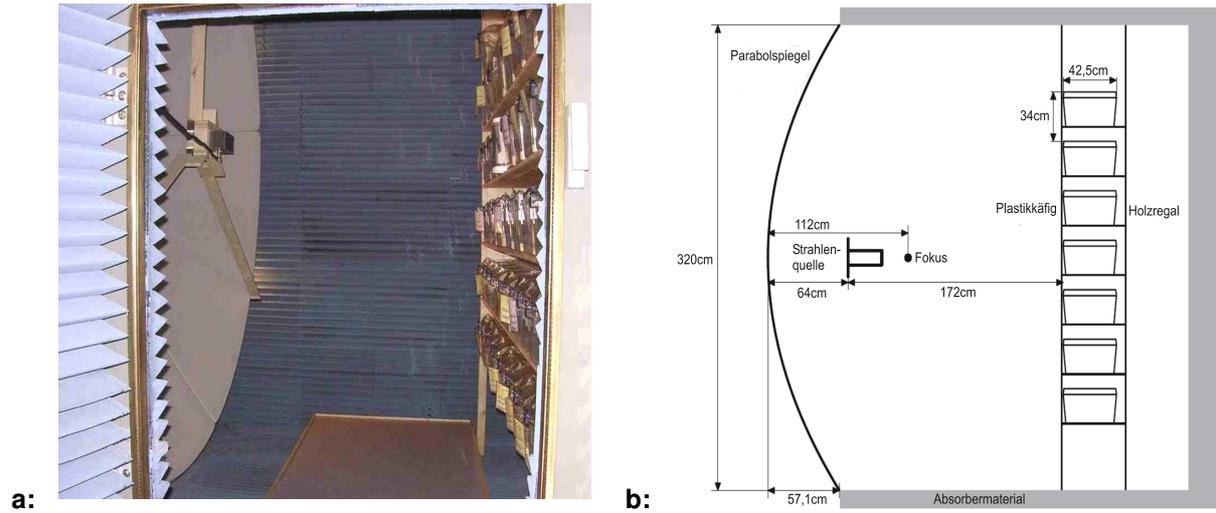


Abbildung 12a: Foto und **b:** Schematische Seitenansicht der Befeldungsanlage und des Aufbaus einer Expositions-kammer am Beispiel der GSM-Kammer (modifiziert nach Schelkshorn et al., 2007)

3.3 Herstellung der Gehirnpräparate

3.3.1 Gehirnpräparation und –einbettung

Die Ratte wird mit Ketamin/Xylazin tief anästhesiert und anschließend eine Perfusionsfixierung durchgeführt, indem über eine Kanüle in die linke Herzkammer PBS-Puffer infundiert wird bis kein Blut mehr in den Gefäßen ist, dann erfolgt über 6 Minuten die Infusion mit 4% PFA (Paraformaldehyd).

Das Tier wird dekapitiert und nach Entfernen der Schädelkalotte das Gehirn herausgenommen. Das Kleinhirn wird weg geschnitten und dann die beiden Hemisphären getrennt für mind. 24 Stunden bei Raumtemperatur in frischen 4% PFA fixiert.

Nach dem Auswaschen mit 0,1 M PP (Phosphatpuffer) werden die Hirnhälften in Einbettkörbchen gelegt und über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (70% Ethanol mind. 2-3 h, 95% Ethanol mind. 2 h, 100% Ethanol 1 bis 2 h).

Die Einbettung erfolgt mit Technovit 7100 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts) einem kaltpolymerisierenden Kunststoff speziell für dünnste Mikrotomschnitte, der das Gewebe homogen durchdringt und polymerisiert.

Für die Präinfiltration wird Technovit 7100 mit absolutem Alkohol im Verhältnis 1:1 gemischt und die Präparate für 2-3 h (auf der Schüttelplatte) eingelegt.

Bei der Infiltration löst man 1 g Härter I in 100 ml Technovit 7100 (= Basislösung) und lässt die Gewebeproben je nach Größe bis zu 24 h auf der Schüttelplatte infiltrieren.

Für die anschließende Polymerisation werden 1,5 ml Härter II mit 30 ml Basislösung gemischt, die Präparate werden in die Einbettform gestellt und diese mit Flüssigkeit aufgefüllt. Nach einiger Zeit wird noch mal etwas Polymerisationsmedium nachgefüllt, da der Kunststoff sich beim Aushärten meist zusammenzieht.

Die Polymerisationszeit beträgt bei Raumtemperatur etwa 4 Stunden.

Zuletzt wird der ausgehärtete Kunststoffblock mittels Technovit 3040 (einem schnell härtendem Kunststoff zur Befestigung der Probe auf dem Histobloc, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim/Ts) auf ein Trägerteil aufgeblockt. Dazu werden 1 Teelöffel

Flüssigkeit und 2 Teelöffel Technovit 3040-Pulver mit einem Glasstab verrührt. Einbettform und Histobloc werden aufeinander gelegt und die Mischung in die Vertiefung gegossen. Nach 15 bis 30 Minuten ist der Kunststoff ausgehärtet und die Einbettform kommt für einige Zeit ins Gefrierfach. Danach kann der Trägerteil vorsichtig mit der Zange herausgelöst werden.

Pro Gruppe (GSM, UMTS und Kontrolle) werden 20 Gehirne eingebettet, von denen anschließend jeweils 10 für die Auswertung weiter verarbeitet werden.

3.3.2 Schneiden

Die in Kunststoff eingebetteten linken Hirnhälften werden möglichst exakt im Mikrotom (Rotationsmikrotom HM 360, Microm) eingespannt. Die Winkeleinstellung des Messers beträgt dabei 8 °. Anschließend werden durch die Hippocampusregion von rostral nach kaudal koronare Schnittserien von 3 µm dicken Schnitten angefertigt. Im Abstand von 300µm wird jeweils eine Schnittreihe von acht aufeinander folgenden Schnitten entnommen. Für den gesamten Hippocampus entstehen dadurch zwischen 11 und 15 Schnittserien zu je acht Schnitten in Folge.

Die Schnitte werden auf Objektträgern (vorgewärmt und mit 0,4 ml warmen, destilliertem Wasser betropft) aufgefangen und bei 60°C 20 bis 40 Minuten auf der Heizplatte getrocknet, anschließend werden sie über Nacht bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.3.3 Färben

Die Schnitte werden nach dem Trocknen mit einer Kernfärbung (Hämatoxylin nach Mayer) gefärbt:

- Hämatoxylin nach Mayer	20 Minuten
- Kalialaun 0,1%ig	10 Sekunden
- Bläuen in fließendem Leitungswasser	10 Minuten
- Aqua dest. 2x	mehrmals kurz eintauchen
- 70 % Ethanol	5 Minuten
- 95 % Ethanol	5 Minuten
- 99 % Ethanol	5 Minuten
- Xylol I	10 Minuten
- Xylol II	20 Minuten

Das Hämatoxylin wird je nach Bedarf aufgefüllt, filtriert oder neu angesetzt. Das 0,1%ige Kalialaun wird jeweils nach zwei Färbeküvetten erneuert. Der Alkohol wird nach fünf Durchgängen gewechselt und die Schalen mit Xylol werden nach drei bis fünf Passagen frisch aufgefüllt.

3.3.4 Konservieren

Nach dem Färben werden die Präparate mit Eukitt[®] (Kindler GmbH, Freiburg) unter den Deckgläsern eingedeckt und zum Trocknen über Nacht gleichmäßig mit kleinen 30 g schweren Messingblöcken beschwert.

3.4 Ablauf der morphologischen Auswertung

3.4.1 Einlesen der Schnitte

Die konservierten Hippocampuspräparate werden unter dem Mikroskop (Axioskop von Zeiss, Jena) beurteilt, mit der Software LSM 510 (Zeiss, Jena) eingelesen und mit der AxioCam MRc 5 (Zeiss, Jena) aufgenommen. Dabei werden pro Schnittreihe jeweils Aufnahmen vom gesamten Hippocampus mit 2,5facher Vergrößerung gemacht. Die Übergänge vom CA2- zum CA1-Bereich und von CA1 zum Subiculum (bzw. das vergleichbare Ende der CA1-Region im rostralen Hippocampus) werden in der 10fachen Vergrößerung gekennzeichnet und aufgenommen. Außerdem wird in den acht aufeinander folgenden Schnitten einer Serie dieselbe Stelle im CA1-Bereich in 40facher Vergrößerung eingelesen und auch in den kleineren Vergrößerungen (x 2,5 und x10) die ausgewählte Stelle markiert.

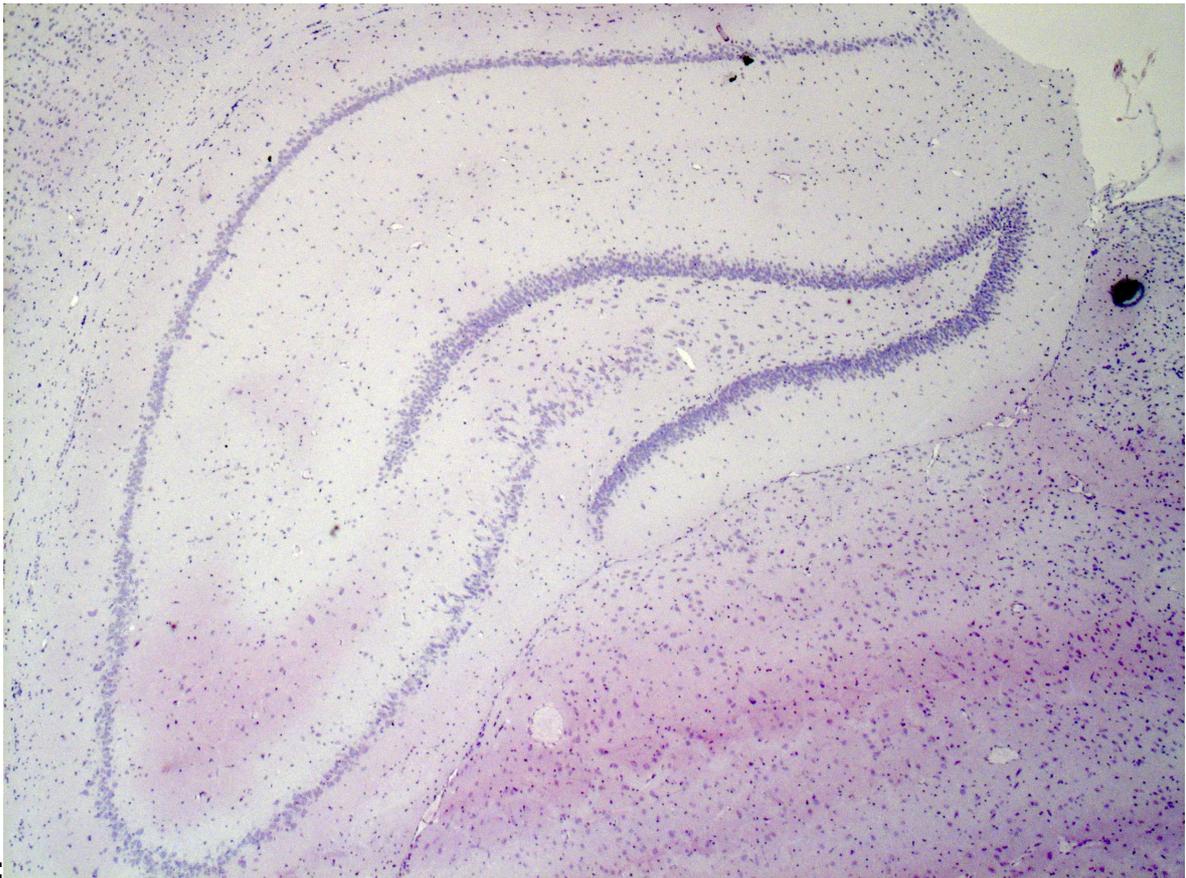
In den folgenden Schnittreihen werden jeweils andere Stellen für die 40fache Vergrößerung ausgewählt, so dass über den gesamten Hippocampus viele unterschiedliche Stellen im CA1-Bereich ausgezählt werden.

3.4.2 Volumenbestimmung

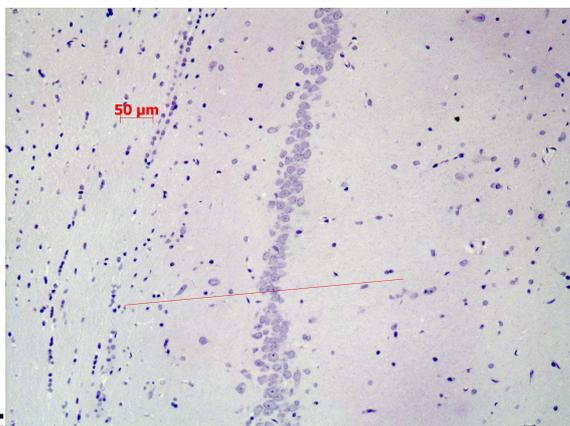
Um das Volumen der oberflächlichen Pyramidenzellschicht der CA1-Region des dorsalen Hippocampus möglichst genau zu schätzen, wird in jeder Schnittreihe die Fläche des Stratum pyramidale superficiale der CA1-Region ausgemessen. Dabei werden jeweils die Übergänge von der CA2- zur CA1-Region und von der CA1-Region zum Subiculum (im rostralen Hippocampus das entsprechende Ende der CA1-Region, siehe Abbildung13c) markiert. Die Grenze zwischen CA2- und CA1-Bereich wird als der Punkt definiert, ab dem die größeren, locker verteilten CA2-Nervenzellen mit mehr Zellsomata und größeren Kernen von den kleineren, dichter gepackten Pyramidenzellen der CA1-Region mit weniger Soma und kleineren Zellkernen abgelöst werden (siehe Abbildung 13b). Den Übergang zwischen CA1-Bereich und Subiculum erkennt man daran, dass die oberflächlichste Schicht der

MATERIAL UND METHODEN

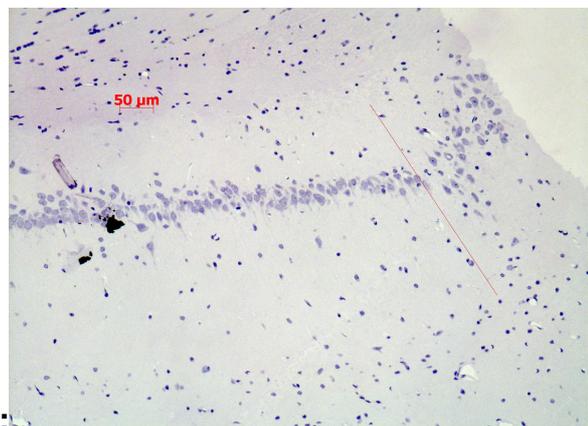
Pyramidenzellen diskontinuierlich wird (West et al., 1991). Die kompakt beieinander liegenden CA1-Neuronen werden von den locker verteilten Zellen der abrupt erweiterten Pyramidenzellschicht des Subiculum abgelöst. Außerdem enden Str. radiatum und Str. oriens mit der CA1-Region, dieser Bereich wird im Subiculum durch ein größeres Str. molekulare ausgeglichen (Amaral und Witter, 1995).



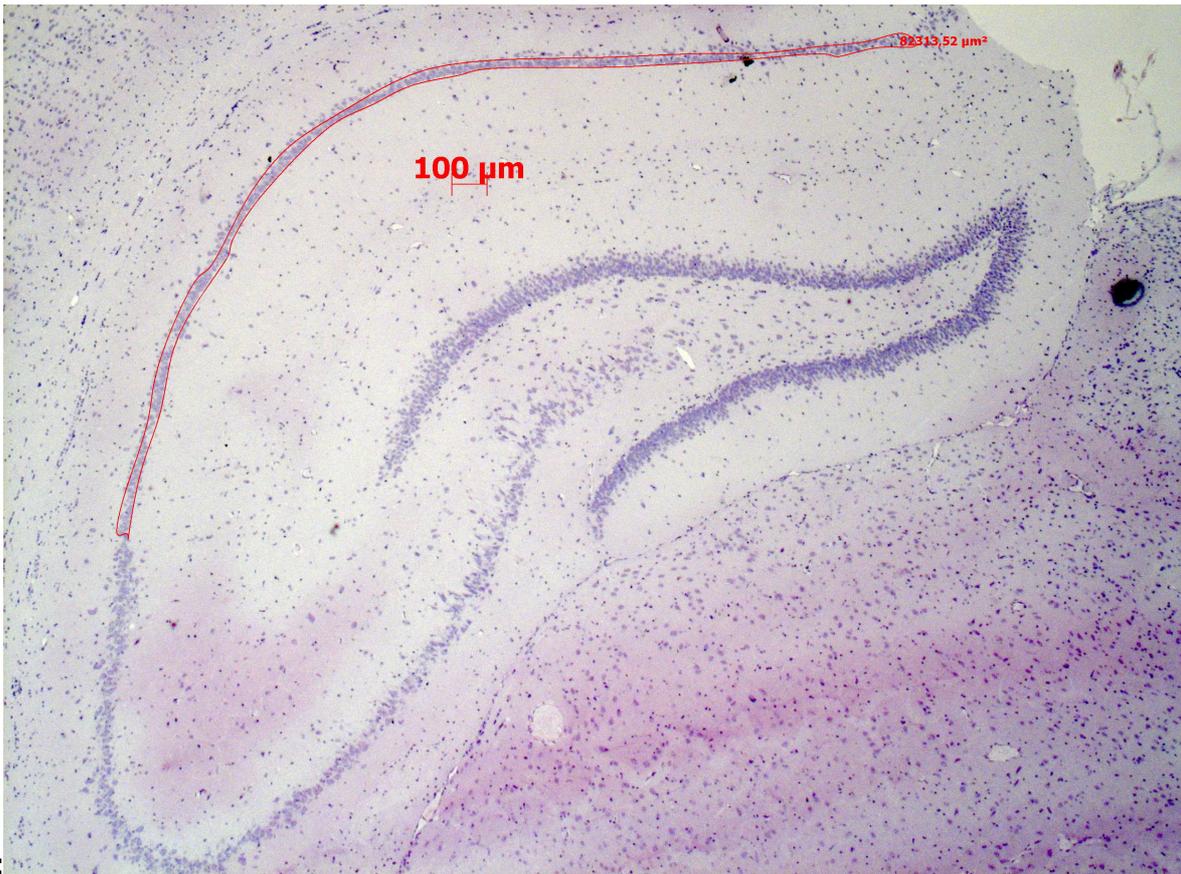
a:



b:



c:



d:

Abbildung 13: koronare Bilder aus dem rostralen Teil des Hippocampus (Block 273901 links) beispielhafte Vorgehensweise bei der Flächenbestimmung, a: Nativbild in 2,5facher Vergrößerung, b: Übergang zwischen CA1- und CA2-Bereich in 10facher Vergrößerung anzeigt und c: Ende der oberflächlichen CA1-Pyramidenzellschicht (CA1 sps) in 10facher Vergrößerung gekennzeichnet und d: CA1 sps in 2,5facher Vergrößerung umgrenzt

Das Stratum pyramidale superficiale des dorsalen CA1-Bereichs wird am Computer per Hand abgegrenzt und die eingefasste Fläche dann mit Hilfe der Software LSM 510 (Zeiss, Jena) errechnet. Um das Volumen zu erhalten, wird die Gesamtfläche mit 300 µm (das ist der Abstand zwischen den einzelnen Flächenmessungen) multipliziert.

3.4.3 Dichtebestimmung

Die Dichte ist die Verteilung der Masse in einem Raum. Sie wird vom Abstand der einzelnen Teilchen zueinander bestimmt. Die CA1-Neuronendichte ist also die Anzahl der Nervenzellen im gesamten CA1-Bereich.

Für die Dichtebestimmung wird in den acht aufeinander folgenden Schnitten einer Reihe die selbe Stelle mit 40facher Vergrößerung eingelesen und diese Bilderserie mit einem speziellen Computerprogramm (*align* und *Crop-editor*, Amira 4.0, Mercury Computer Systems) übereinander gelegt und zurechtgeschnitten um die neu hinzugekommenen CA1-Neuronen nach einer modifizierten Disektormethode auszuzählen. In den folgenden Schnittserien wird dann jeweils eine andere Stelle im CA1-Bereich ausgewählt und bearbeitet.

3.4.4 Gesamtzahl der CA1-Neuronen

Um die Anzahl der Pyramidenzellen im CA1-Bereich zu erhalten, wird die durchschnittliche Dichte mit dem Volumen multipliziert. Der so errechnete Schätzwert liegt nahe an der tatsächlichen Gesamtzahl der CA1-Neuronen pro unilateralem Hippocampus.

3.5 Methoden zur Bestimmung der CA1-Neuronenzahl

3.5.1 Amira®

Amira (ein Produkt von Mercury Computer Systems Inc.) ist ein wissenschaftliches System zur Verarbeitung, Visualisierung und Analyse von zwei- und dreidimensionalen Daten. Es lassen sich interaktiv Bilder segmentieren, polygonale Oberflächen rekonstruieren oder Volumen modellieren und berechnen.

In dieser Arbeit sollen die Präparate exakt übereinander ausgerichtet und zurechtgeschnitten werden.

Mit dem Befehl *align* lassen sich die einzelnen Schnittbilder möglichst genau übereinander stapeln (nicht immer ganz exakt, wenn das Material beim Bearbeiten unterschiedlich stark geschrumpft ist).

Anschließend wird der Bildstapel mit Hilfe des *Crop-editors* zurechtgeschnitten und die einzelnen Bilder können nebeneinander vergleichend betrachtet werden.

Mittels *Landmarks* werden dann die neu hinzugekommenen CA1-Neuronen nach dem Zählschema der Disektormethode in dem umgrenzten Raum markiert und ausgezählt.

3.5.2 Disektormethode

Der Disektor wird verwendet um Objekte im dreidimensionalen Raum zu zählen.

Man unterscheidet zwischen der physikalischen und der optischen Disektormethode.

Der Ausdruck Disektor kommt von den Begriffen *di* für zwei und *section* für Ausschnitt. Die zwei miteinander zu vergleichenden Strukturen/Schnittbilder müssen nah genug zusammen liegen, so dass es möglich ist aus ihnen zu entnehmen was dazwischen liegt. Dadurch kann man die Disektormethode auch zur Volumenbestimmung verwenden.

Physikalischer Disektor:

Mit Hilfe der physikalischen Disektormethode lassen sich Objekte zählen oder sortieren, indem zwei benachbarte Schnittbilder miteinander verglichen werden. Dabei werden die Objekte in einem „Zählrahmen“ (*counting frame*) nach einem festen Schema ausgezählt. Objekte, die sich im Inneren oder auf den Einschlusslinien (eine senkrechte und eine waagrechte, in Abbildung 14 grün dargestellt) befinden, werden mitgezählt, während Gebilde außerhalb oder auf den Ausschlusslinien (die zwei übrigen Linien, in Abbildung 14 rot dargestellt) nicht mitgezählt werden.

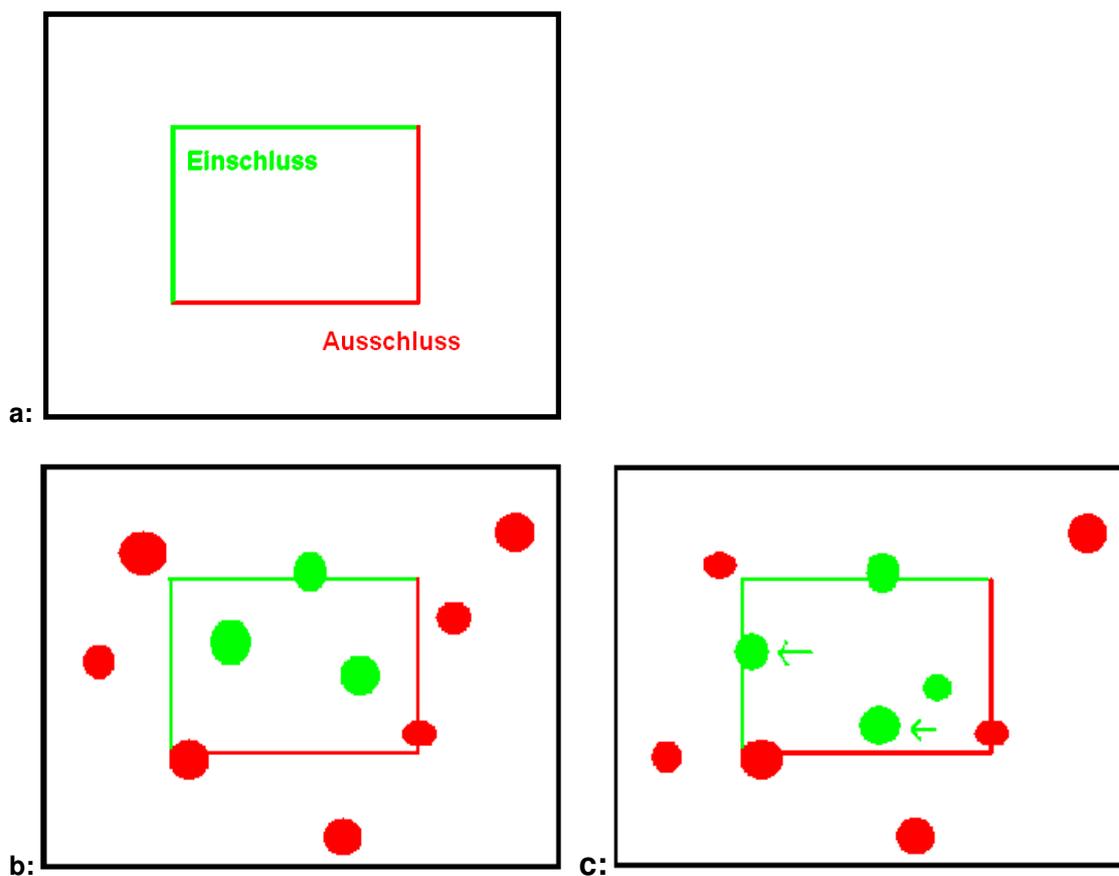


Abbildung 14a: schematische Darstellung eines Zählrahmens (*counting frame*) mit grünen Einschlusslinien und roten Ausschlusslinien, b: schematische Darstellung des Referenzschnittes mit grünen eingeschlossenen Objekten sowie roten ausgeschlossenen Objekten und c: schematische Darstellungen des nachfolgenden Schnittes (*lookup section*) mit neu hinzugekommenen (grüne Pfeile) und somit mitgezählten Objekten

Das erste Schnittbild, der so genannte Referenzschnitt (*reference section*, Abbildung 14b) dient als Vorlage. In ihm werden die Objekte selektiert, während im nachfolgenden Schnitt (*lookup section*, Abbildung 14c) neu hinzugekommene Strukturen gezählt und markiert werden.

Optischer Disektor:

Die optische Disektormethode ist ebenfalls zum Auszählen oder Sortieren von Objekten in Gewebeschnitten geeignet. Hierbei werden dickere Gewebeschnitte beurteilt, indem unterschiedlich tiefe Fokusebenen miteinander verglichen werden.

Anstatt nur zwei Schnitte einander gegenüber zu stellen, wird mit einem konfokalen Mikroskop die Fokustiefe variiert, wodurch mehrere Fokusebenen (optische Schnitte im Gegensatz zu tatsächlichen Schnitten) miteinander verglichen werden können.

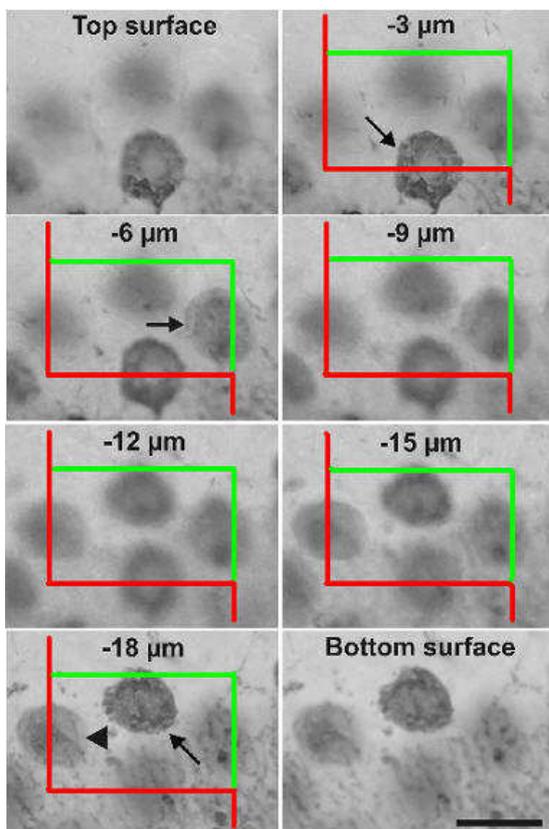


Abbildung 15: schematische Darstellung der einzelnen Fokusebenen mit Zählrahmen bei der optischen Disektormethode (nach MBF Bioscience - MicroBrightField, Inc., www.stereology.info/images/475.jpg)

Bei der optischen Disektormethode wird ein dreidimensionaler Raum beurteilt. D.h. anstatt der jeweils zwei Linien beim Zählrahmen der physikalischen Disektormethode hat man hier jetzt jeweils zwei Flächen, die mitgezählt oder ausgeschlossen werden. Die Aufsicht auf das Kopfende des Präparates dient als Referenzschnitt (wird nicht mitgezählt), während Objekte im letzten Bild (*lookup section*) dazu gerechnet werden.

Modifizierter Disektor:

Die modifizierte Disektormethode ist eine Kombination aus physikalischer und optischer Disektormethode. Nach der physikalischen Methode werden jeweils dieselben Stellen auf den Schnittbildern gesucht und miteinander verglichen. Die Ähnlichkeit zur optischen Disektormethode besteht darin, dass die aufeinander folgenden Einzelschnittbilder vorher (mit Hilfe von Amira) so übereinander gelagert werden, dass sie theoretisch den verschiedenen Fokustiefen eines einzigen breiten Gewebeschnittes (mit einer Tiefe von $8 \times 3 \mu\text{m} = 24\mu\text{m}$) entsprechen. Das heißt, die einzelnen Fokusebenen werden zu tatsächlichen Schnitten, somit kann jeweils eine ganze Schnittreihe aus acht aufeinander folgenden Schnitten verglichen werden.

Der erste Schnitt einer Reihe dient dabei immer als Referenzbild, dem das zweite Schnittbild gegenübergesetzt wird (Zählschema nach der physikalischen Disektormethode - obere und linke Kante des *counting frame* werden als Einschlusslinien festgelegt und mitgezählt, während die untere und die rechte Kante des Zählrahmens zu Ausschlusslinien werden). Die darauf folgenden Bilder werden dann jeweils mit dem vorherigen Schnitt verglichen, um die neu hinzu gekommenen Neuronen zu markieren und auszuzählen. D.h. für das dritte Schnittbild orientiert man sich am zweiten, für den vierten Schnitt am dritten, usw..

Bei der Bearbeitung wird durch Amira eine definierte Fläche vorgegeben, so dass der Zählrahmen eine Breite von $101,10 \mu\text{m}$, eine Höhe von $33,98 \mu\text{m}$ und eine Tiefe von $21 \mu\text{m}$ hat (der Referenzschnitt dient nur als Vorlage, er wird nicht mitgerechnet). Pro Schnittreihe wird die Neuronendichte also in einem Volumen von etwa $72153 \mu\text{m}^3$ bestimmt.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 2: beispielhafte Auswertung eines Gewebelockes (Block 304218 li), Flächenbestimmung für jede Reihe einzeln sowie Gesamtfläche (1023600 μm^2) und daraus errechnetes Volumen (CA1 sps = 0,307 mm^3), Anzahl der neu hinzugekommenen Zellen sowie die Dichte in dem ausgezählten Volumen (306 $\times 10^3/\text{mm}^3$), daraus errechnete Gesamtzahl der oberflächlichen CA1-Neuronen (93939) im dorsalen Hippocampus dieses Blockes

Block	Reihe	CA1-Region sps		Zellzahlen			Gesamtzahl	
		Fläche (μm^2)	Volumen	neue Zellen	Mittelwert	Dichte		
			(mm^3)	(pro 54570 μm^3)	(pro 54570 μm^3)	($10^3/\text{mm}^3$)		
304218 li	300er	25100		13				
	600er	26700		22				
	900er	44200		26				
	1200er	47100		20				
	1500er	73500		28				
	1800er	67200		25				
	2100er	75200		22				
	2400er	100400		27				
	2700er	91900		23				
	3000er	81000		22				
	3300er	86100		29				
	3600er	85600		24				
	3900er	127900	CA1 durchgehend	19				
	4200er	91700		9				
	4500er		keine CA1 mehr					
		1023600	Gesamtfläche	0,307		22,07	306	93939

3.6 Statistische Methoden

Die erarbeiteten Daten wurden als arithmetische Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung (SD) in Tabellen oder graphisch dargestellt. Als signifikant wurde jeweils $p \leq 0,05$ angesehen. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Computerprogramm GraphPad InStat™ (GraphPad Software, Version 1997).

Als Eingangstest wurde die Kruskal-Wallis Varianzanalyse (Nonparametric ANOVA) durchgeführt. Da dabei keine Unterschiede zwischen den Gruppen auftraten, kam der geplante Post-hoc Dunn's multiple comparisons Test nicht zur Anwendung.

4 Ergebnisse

4.1 Umfang des Untersuchungsgutes

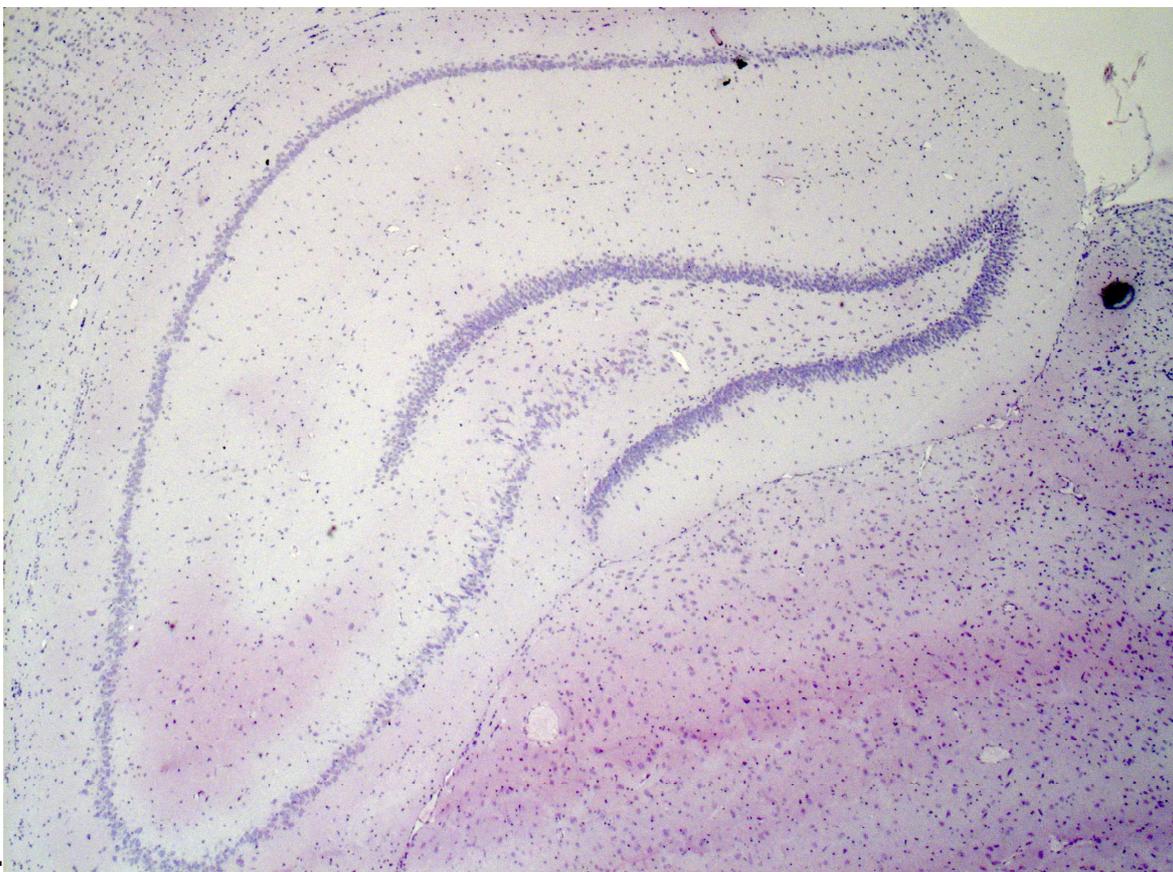
Um biologisch relevante Unterschiede statistisch nachweisen zu können, wurden für die Bestimmung der CA1-Neuronenzahl jeweils 10 Tiere pro Versuchskammer verwendet. Es wurde immer der linke Hippocampus ausgewertet.

Pro Hippocampusblock entstanden zwischen 11 und 15 Schnittserien mit jeweils acht aufeinander folgenden Einzelschnittbildern pro Serie. Bei 10 Tieren pro Gruppe und drei Versuchsgruppen (GSM, UMTS und Kontrolle) ergaben sich somit über 3000 Gewebeschnitte zum Auswerten.

Gelegentlich konnten einzelne Schnittreihen nicht bzw. nicht komplett ausgewertet werden, da die aufeinander folgenden Schnittbilder nicht ausreichend genau übereinander passten (Fehler durch Gewebeschrumpfung oder Stauchung beim Bearbeiten). In diesen Fällen wurden beispielsweise nur sechs statt acht aufeinander folgende Schnitte für die Auswertung verwendet. Vier der Hippocampusblöcke ließen sich nur sehr schwer bearbeiten. Der Kunststoff war bei diesen Blöcken so spröde, dass sich beim Schneiden Risse bildeten. Hier konnte mehrfach nur jeder zweite Schnitt vollständig aufgefangen werden. Wenn der entsprechende Teilbereich des Hippocampus auf den eingerissenen Schnitten nicht zerstört oder verzerrt war, konnten diese Schnittbilder trotzdem noch für die Auswertung verwendet werden. So das im Endeffekt nur ein unbedeutender Teil (etwa 2%) der gesamten Schnittreihen gar nicht ausgewertet werden konnte.

4.2 Volumenbestimmung der CA1-Region

In dieser Arbeit wird das Str. pyramidale superficiale der CA1-Region (CA1 sps) des dorsalen Hippocampus ausgemessen (siehe Abbildung 16). Da es aufgrund der verwendeten Hirneinbettung nachträglich nahezu unmöglich ist, die einzelnen Hemisphären exakt in der gleichen Orientierung ins Mikrotom einzuspannen, sind die Blöcke nicht alle gleich ausgerichtet. Dadurch entsteht eine geringgradige Verkippung der einzelnen Blöcke und die Hippocampusregionen stellen sich nicht ganz einheitlich da. Damit die Streuung so gering wie möglich gehalten wird und sich die Versuchstiergruppen bestmöglich miteinander vergleichen lassen, wird nur ein gut abgrenzbarer oberflächlicher Teilbereich der CA1-Pyramidenzellschicht bestimmt.

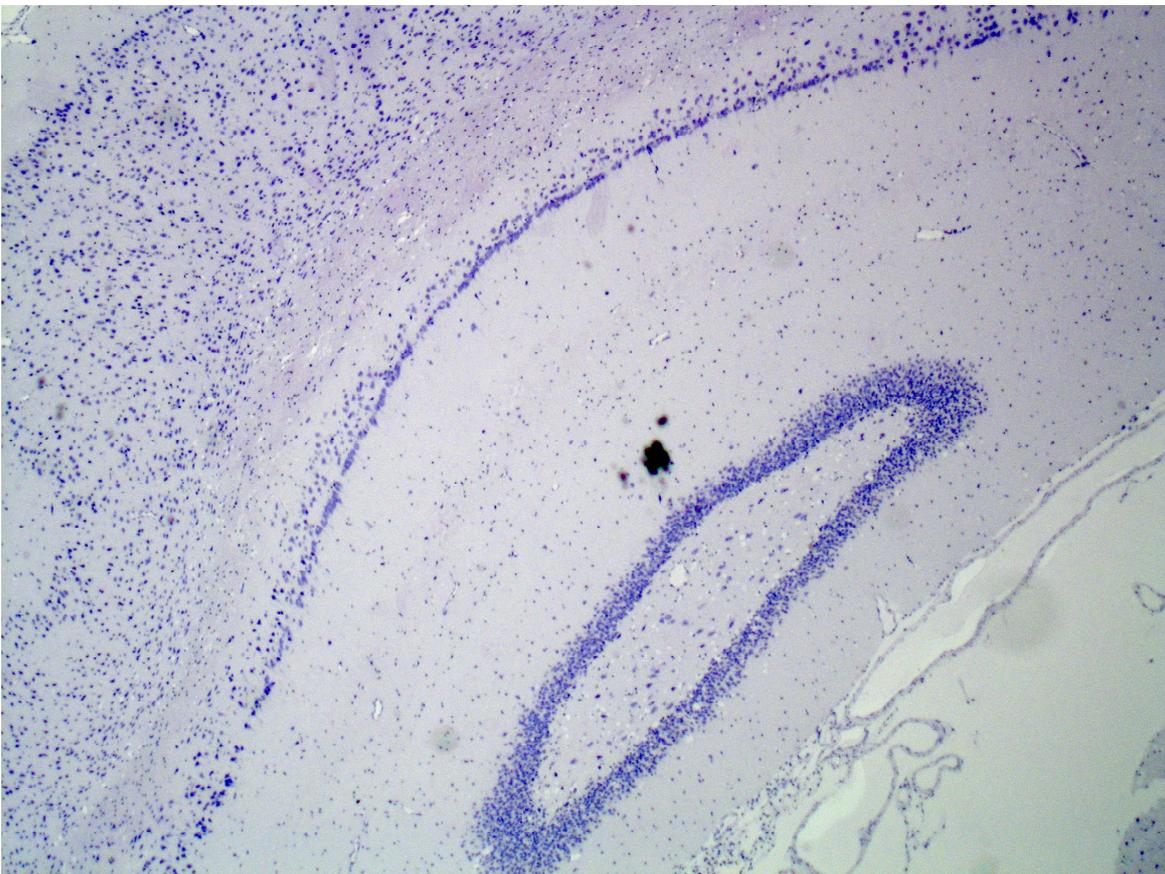


a:

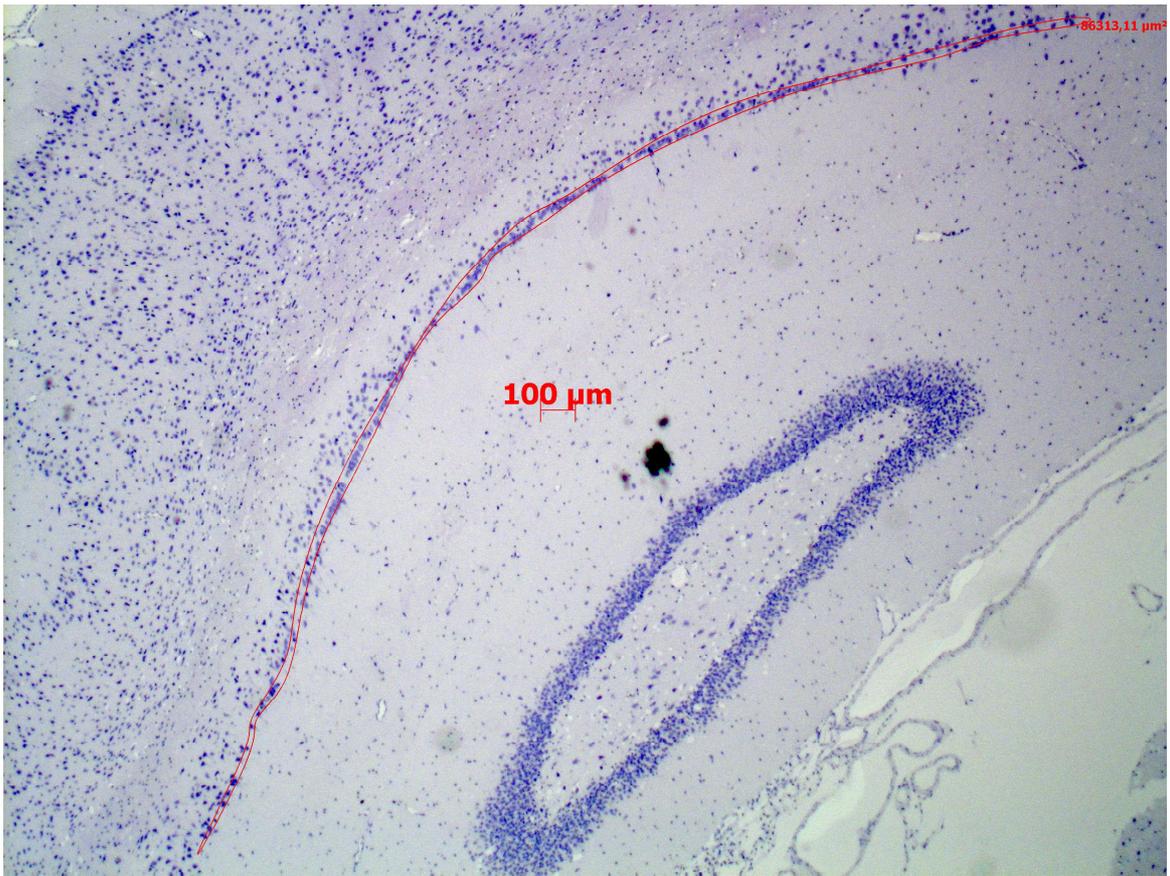
ERGEBNISSE



b:



c:



d:

Abbildung 16: koronare Schnittbilder in 2,5facher Vergrößerung, a: nativ und b: CA1 sps umgrenzt, aus dem rostralen Teil des Hippocampus (Block 273901 links, 900er Reihe), c: nativ und d: CA1 sps umgrenzt, aus dem kaudalen Teil des Hippocampus (Block 269275 links, 4500er Reihe)

ERGEBNISSE

Die Mittelwerte der Volumenbestimmung (siehe Abbildung 17) liegen in allen drei Gruppen mit $0,339 \text{ mm}^3$ (GSM), $0,353 \text{ mm}^3$ (UMTS) und $0,348 \text{ mm}^3$ (Kontrolle) sehr nahe beieinander.

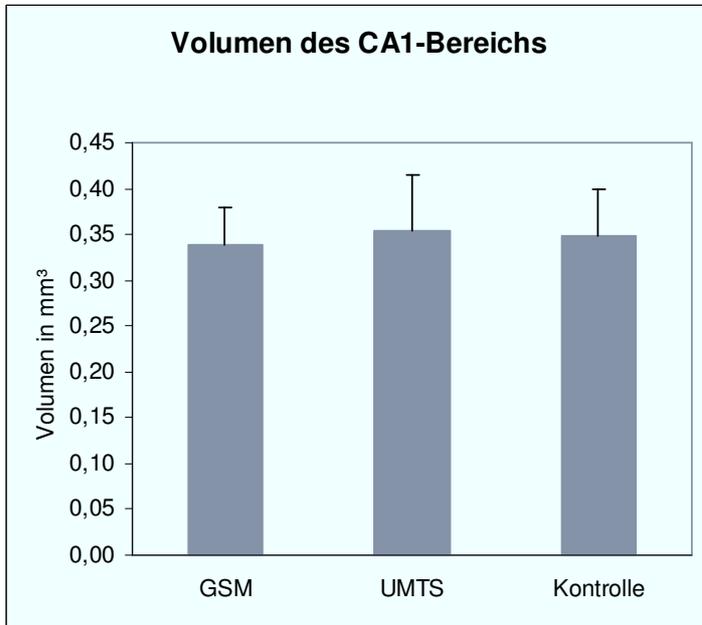


Abbildung 17: graphische Darstellung des Volumens (CA1 sps) der drei Versuchsgruppen (n=10, Mittelwert mit Standardabweichung)

ERGEBNISSE

Die einzelnen Ergebnisse (siehe Tabelle 3) reichen dabei von 0,257 bis 0,455 mm³. Die Standardabweichung beträgt für die GSM-Gruppe 0,041 mm³, 0,061 mm³ bei den UMTS befeldeten Ratten und 0,051 mm³ bei den scheinexponierten Kontrolltieren.

Tabelle 3: Volumen der oberflächlichen Pyramidenzellschicht im CA1-Bereich des dorsalen Hippocampus (in mm³), Angaben für alle zehn Hippocampusblöcke der einzelnen Versuchsgruppen

Hippocampusblöcke	Befeldungskriterien		
	GSM	UMTS	Kontrolle
1	0,283	0,257	0,275
2	0,270	0,336	0,304
3	0,366	0,272	0,370
4	0,339	0,418	0,365
5	0,307	0,376	0,384
6	0,366	0,417	0,338
7	0,361	0,418	0,455
8	0,400	0,348	0,312
9	0,361	0,389	0,315
10	0,340	0,303	0,366
Mittelwert	0,34	0,35	0,35
Standardabweichung	0,04	0,06	0,05

4.3 Dichtebestimmung der CA1-Region

Die Dichtebestimmung erfolgt nach einer modifizierten Disektormethode (siehe Kapitel 3.5.2).

Der Disektor ist eine stereologische Methode um dreidimensionale Objekte in einem Raum unbeeinflusst zu zählen. Es lassen sich eine physikalische und eine optische Disektormethode unterscheiden. Bei der physikalischen Methode werden jeweils zwei Einzelschnittbilder miteinander verglichen, während der optische Disektor mit nur einem dickeren Gewebeschnitt und mehreren Fokusebenen arbeitet. Die optische Disektormethode wäre für die hiesige Fragestellung ideal, ist aber wegen des fehlenden Laborequipments (spezielles Mikrotom zum Schneiden der dicken Gewebeschnitte, konfokales Mikroskop mit der Möglichkeit die z-Achse auszumessen) nicht anzuwenden.

Bei der Versuchsauswertung wird deshalb die physikalische Disektormethode erweitert und eine Kombination aus physikalischer und optischer Methode verwendet. Dabei werden, wie beim physikalischen Disektor jeweils aufeinander folgende Einzelschnittbilder miteinander verglichen und die neu hinzugekommenen Neuronen anhand eines bestimmten Zählschemas (siehe Kapitel 3.5.2) ausgezählt. Die Ähnlichkeit mit der optischen Disektormethode besteht darin, dass nicht nur zwei Bilder miteinander verglichen werden, sondern dass acht aufeinander folgende Schnitte (ähnlich den verschiedenen Fokustiefen) zur Auszählung herangezogen werden.

Als Nachteil der modifizierten Disektormethode muss ein Mehraufwand (mehr Einzelschnitte, größerer Zeitaufwand um selbe Stelle auf Folgeschnitten wieder zu finden, Ausrichten und Zurechtschneiden der Einzelbilder) hingenommen werden. Der Vorteil ist dafür eine größere Präzision da einzelne Objekte in die Tiefe „weiterverfolgt“ werden können, wodurch eine größere Sicherheit bei der Objektbestimmung entsteht (z.B. exaktere Unterscheidung zwischen Nervenzellen, Endothel, Gliazellen und anderen).

ERGEBNISSE

In den drei Versuchskammern (n jeweils 10) ergeben sich bei den Tiere CA1-Neuronendichten (CA1 sps) zwischen 239 und 334 x 10³/mm³. Die Durchschnittswerte der Gruppen liegen auch hier nahe beieinander (siehe Abbildung 18). Der Mittelwert der GSM bestrahlten Versuchstiere beträgt 282 x 10³/mm³. Für die UMTS-Versuchsgruppe errechnet sich ein Mittelwert von 286 x 10³/mm³. Bei den Kontrolltieren wird durchschnittlich eine CA1-Neuronendichte von 265 x 10³/mm³ erreicht.

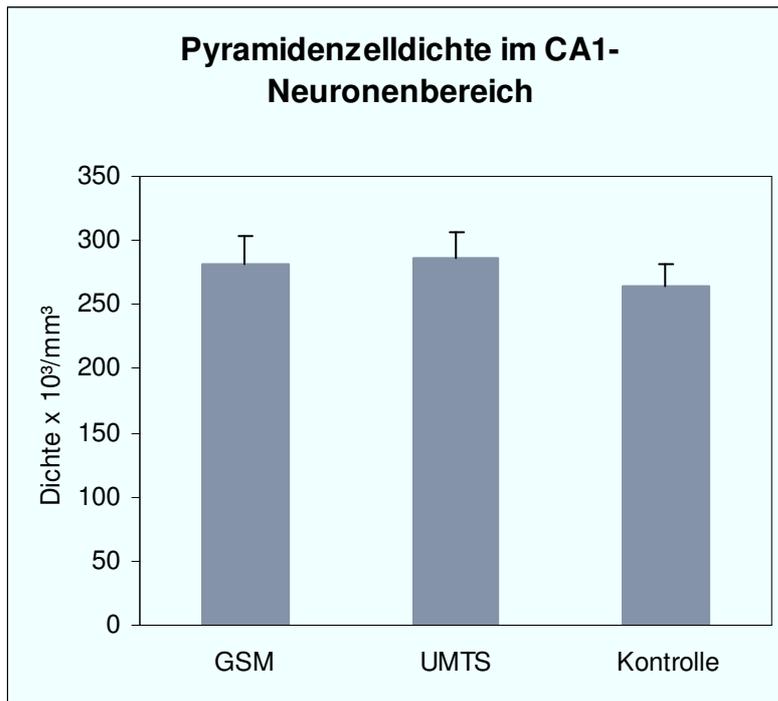


Abbildung 18: graphische Darstellung der Pyramidenzelldichte (CA1 sps) der drei Versuchsgruppen (n=10, Mittelwert mit Standardabweichung)

4.4 Gesamtzahl der CA1-Neuronen

Die Gesamtzahl der oberflächlichen Pyramidenzellen der dorsalen CA1-Region lässt sich mittels Dichte und Volumen bestimmen. Dazu wird die durchschnittliche numerische Dichte des Blockes mit dem entsprechenden Volumen multipliziert.

Die hier geschätzte Anzahl an Pyramidenzellen in der oberflächlichen CA1-Region der einzelnen Tiere ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Werte streuen dabei von knapp 70.000 bis etwa 140.000 Zellen pro unilateralem Hippocampus. Die Neuronenzahl beträgt bei den zehn GSM bestrahlten Tieren durchschnittlich 95.735 mit einer Standardabweichung von 15.293. In der „UMTS-Gruppe“ werden im Mittel Werte von 101.458 (SD 21.072) errechnet und bei den zehn scheinexponierten Kontrolltieren ergibt sich ein Durchschnittswert von 92.216 mit einer Standardabweichung von 15.270. Der Fehlerkoeffizient ($CE = \text{Standardabweichung} / \text{arithmetische Mittel}$) beträgt 0,16 für die GSM bestrahlten Tiere, 0,21 für die UMTS-Versuchsgruppe und 0,17 für die scheinexponierten Tiere der Kontrollgruppe.

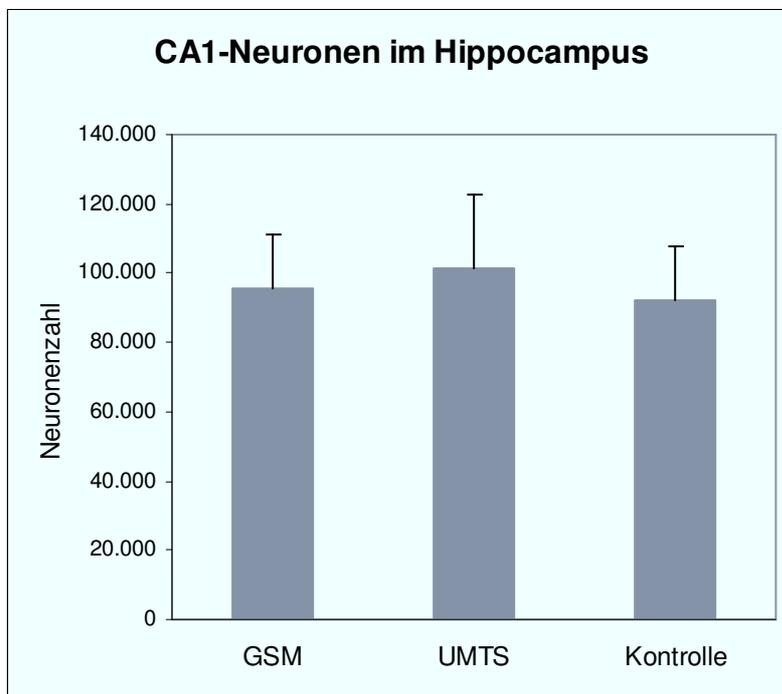


Abbildung 19: graphische Darstellung der CA1-Neuronenzahl (CA1 sps) der drei Versuchsgruppen (n=10, Mittelwert mit Standardabweichung)

ERGEBNISSE

Die statistische Analyse der Daten (siehe Kapitel 3.6) zeigt keine signifikanten Abweichungen zwischen den Gruppen. Dass heißt bei den Versuchstieren sind trotz der chronischen Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Pyramidenneuronen im oberflächlichen CA1-Bereich festzustellen (siehe Abbildung 19).

Tabelle 4: Anzahl der berechneten CA1-Neuronen in der oberflächlichen Pyramidenzellschicht des dorsalen Hippocampus, Angaben für alle zehn Hippocampusblöcke der einzelnen Versuchsgruppen

Hippocampusblöcke	Befeldungskriterien		
	GSM	UMTS	Kontrolle
1	84.560	74.484	69.524
2	70.792	101.109	88.015
3	100.261	77.865	101.738
4	85.046	118.695	101.923
5	93.939	104.542	95.431
6	103.865	116.519	80.805
7	103.714	139.554	123.565
8	128.448	95.641	88.161
9	95.462	109.717	77.116
10	91.263	76.454	95.882
Mittelwert	95.735	101.458	92.216
Standardabweichung	15.293	21.072	15.270

5 Diskussion

5.1 Diskussion der Methoden

5.1.1 Vergleich der publizierten Volumina der CA1-Region des Hippocampus

Die Volumenbestimmung ist eine wichtige Voraussetzung für die Berechnung der absoluten Neuronenzahlen im CA1-Bereich. In der Literatur werden hierfür sehr ähnliche Methoden verwendet. Nach einer Flächenbestimmung (Sigma-Scan: Sadowski et al., 1999; Rastergitter: Miki et al., 2005) erfolgt die Berechnung der Volumina mittels Cavalieri Prinzip (Boss et al., 1987, Miki et al., 2005 und Sousa et al., 1998) oder DeVito Formel (Sadowski et al., 1999). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Methode zur Volumenbestimmung (siehe Kapitel 3.4.2) wurde immer von derselben Person unter einheitlichen Kriterien angewandt. Für alle drei Gruppen (GSM, UMTS und Kontrolle) gelten die gleichen Auswertungsbedingungen, so dass ein geeigneter Vergleich zwischen den bestrahlten und den scheinexponierten Tieren gezogen werden kann.

Die publizierten Resultate der CA1-Volumenbestimmungen variieren unabhängig von der verwendeten Methode stark. Es ergeben sich Werte von $0,67 \text{ mm}^3$ (Sadowski et al., 1999) bis hin zu $1,64 \text{ mm}^3$ (Sousa et al., 1998). Bei unseren Untersuchungen erhalten wir Ergebnisse von $0,257$ bis $0,455 \text{ mm}^3$. Die Mittelwerte der drei Versuchsgruppen liegen mit $0,339 \text{ mm}^3$ (GSM), $0,353 \text{ mm}^3$ (UMTS) und $0,348 \text{ mm}^3$ (Kontrolle) nahe beieinander.

Die Arbeitsgruppe um Marcin Sadowski (Sadowski et al., 1999) errechnet für den gesamten CA1-Bereich bei 15 und 3 Monate alten Versuchstieren (Wistarratten) ein Volumen zwischen $7,04 (\pm 0,69)$ und $7,53 (\pm 0,89) \text{ mm}^3$. Die Pyramidenzellschicht macht davon zwischen $0,67 (\pm 0,07)$ und $0,82 (\pm 0,13) \text{ mm}^3$ aus. Die Auswertung erfolgt hier mittels koronarer Schnittbilder durch den gesamten Hippocampus.

Etwas größere Werte ermitteln Boss et al. (1987), die bei ihrer Volumenbestimmung für das Str. pyramidale der CA1-Region zwischen $0,84$ und $1,47 \text{ mm}^3$ (durchschnittlich $1,1 \text{ mm}^3$) errechnen. Auch hier werden koronare Schnitte durch den ganzen Hippocampus von Wistarratten gemacht.

Die Wissenschaftler um Takanori Miki (Miki et al., 2005) ermitteln für die 16 und 30 Tage alten Ratten ein Volumen in der CA1-Pyramidenzellschicht von $1.05 (\pm 0.07)$ und $0.85 (\pm 0.05) \text{ mm}^3$. Sie verwenden das Cavalieri Prinzip (zwei Körper mit derselben Höhe besitzen dasselbe Volumen, wenn ihre Schnittflächen parallel zu einer Grundebene in den entsprechenden Höhen den gleichen Flächeninhalt haben). Zur Flächenbestimmung wird ein Rastergitter über die einzelnen Schnitte gelegt und die Testpunkte (stehen stellvertretend für eine bestimmte Fläche, hier $0,013 \text{ mm}^2$) innerhalb des Str. pyramidale gezählt. Ausgewertet werden hier horizontale Schnitte durch den ganzen Hippocampus.

Genauso wie Miki et al. verwendet auch die Arbeitsgruppe um Nuno Sousa (Sousa et al., 1998) in ihrer Studie das Cavaliere Prinzip und horizontale Schnitte durch den gesamten Hippocampus von Wistarratten. Sie erhalten aber deutlich größere Werte. Für das Str. Pyramidale ergibt sich ein CA1-Volumen zwischen $1,61 (\pm 0,19)$ und $1,64 (\pm 0,11) \text{ mm}^3$. Bei den 30 und 180 Tage alten Ratten kommt es dabei zu keinen wesentlich Volumenunterschieden.

Verglichen mit anderen Arbeiten sind die von uns berechneten Volumina deutlich geringer. Das liegt zum einen daran, dass wir nur die oberflächliche CA1-Pyramidenzellschicht (CA1 sps) bestimmen und zum anderen unsere Auswertung nur im dorsalen Teilbereich des Hippocampus erfolgt, so dass zwangsläufig ein kleineres Volumen bestimmt wird. Des weiteren benutzten wir koronare Schnittserien, während der Hippocampus bei Miki und Sousa (Miki et al., 2005; Sousa et al., 1998) beispielsweise in horizontaler Richtung geschnitten wird, so dass möglicherweise nicht exakt die gleichen Bereiche zur Flächenbestimmung herangezogen werden.

Aber auch bei genau gleichen Versuchstieren und Auswertungsstrategien (Art und Alter der Ratten, verwendete Methoden zur Volumenbestimmung und ausgewertete Hippocampusbereiche; Miki et al., 2005 und Sousa et al., 1998) kommen die verschiedenen Arbeitsgruppen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Somit sind die Volumina der CA1-Regionen sehr variabel. Es muss auf die Fragestellung geachtet werden und wie man sie möglichst genau umsetzt. In unserem Fall wollten wir eine gute Vergleichbarkeit der drei Versuchstiergruppen (GSM, UMTS und Kontrolle), was durch die hier gemachten Einschränkungen (nur Auswertung der oberflächlichen Pyramidenzellschicht im dorsalen Hippocampus) auch gelungen ist.

5.1.2 Entwicklung einer modifizierten Disektormethode zur Dichtebestimmung

Zur Dichtebestimmung stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Angefangen von densitometrischen Messungen, über die verschiedenen Disektormethoden bis hin zur *optical fractionator*-Methode.

Die einfachste Methode wäre die densitometrische Messung der Zellzahl. Sie ist in dieser Arbeit für die Untersuchung der Hippocampusneuronen keine ausreichend genaue Methode, weil eine so bestimmte Reduktion der numerischen Dichte nicht unvoreingenommen als ein Beweis für einen Zellverlust gedeutet werden kann, da sie unter anderem von Faktoren wie der Schnittdicke, einer Schrumpfung oder Schwellung des Gewebes, von Zellgröße, -form und -orientierung beeinflusst wird (Sterio, 1984 und West, 1993). Eine so gemessene geringere numerische Dichte ist kein sicherer Nachweis für einen Neuronenverlust.

Da die Studie bei einem SAR-Wert von 0,4 W/kg (das entspricht dem Grenzwert für beruflich exponierte Personen) durchgeführt wurde, werden keine oder nur minimale Veränderungen erwartet. Daher ist eine einfache densitometrische Messung nicht genau genug. Ihre Fehleranfälligkeit ist aufgrund der oben erwähnten Parameter zu groß. Deshalb wird eine aufwendigere stereologische Methode, die modifizierte Disektormethode verwendet. Hierbei werden absolute Neuronenzahlen mit Hilfe der Dichte bestimmt, so dass auch geringfügige Änderungen der Zellzahlen unabhängig erfasst werden können.

Die Disektormethode wird gebraucht um Objekte in einem bestimmten Raum auszuzählen. Bei der physikalischen Disektormethode werden zwei einzelne Schnittbilder miteinander verglichen und bei der optischen Methode ein dickerer Gewebekblock mit mehreren Fokusebenen (siehe Kapitel 3.5.2). Die hier entwickelte modifizierte Disektormethode ist eine Kombination aus den beiden.

Der Vorteil der modifizierten Disektormethode gegenüber der physikalischen besteht darin, dass die Möglichkeit der 3-dimensionalen Rekonstruktion gegeben ist und dass einzelne Objekte in die Tiefe „weiterverfolgt“ werden können, wodurch eine größere Sicherheit bei der Objektbestimmung entsteht. Nachteilig ist der größere Arbeitsaufwand beim Schneiden der Blöcke (es sind mehr aufeinander folgende Schnitte und insgesamt mehr Schnitte nötig) und beim Auffinden derselben Stellen.

Außerdem ist die Beeinflussung durch Gewebeswellung oder -Schrumpfung beim Bearbeiten größer, da mehr Schnitte aufeinander folgen, die betroffen sein könnten.

Die optische Disektormethode hat gegenüber der modifizierten Variante den Vorteil, dass man insgesamt weniger Schnitte benötigt, da pro Präparat mehr Neuronen ausgezählt werden können. Das heißt, das Schneiden des Gewebes erfordert weniger Zeit. Die Beeinflussung durch unterschiedliche Gewebeschrumpfung/Stauchung beim Bearbeiten ist geringer (in der Regel ist der ganze Block betroffen, was sich dann nicht auf das Zählergebnis auswirkt). Das Suchen der jeweils entsprechenden Stellen auf den anderen Schnitten fällt weg (West, 1993). Der Nachteil besteht darin, dass spezielles Laborequipment (Mikrotom zum Schneiden der dicken Gewebeschnitte, konfokales Mikroskop mit der Möglichkeit die z-Achse auszumessen) gebraucht wird und dass beim Färben Fehler auftreten können, da das Färbemedium den dicken Gewebekblock eventuell nicht gleichmäßig durchdringen kann.

Eine weitere Methode zur Dichtebestimmung ist der *optical fractionator*. Mit seiner Hilfe lässt sich die CA1-Neuronenzahl ebenfalls ohne Beeinflussung von Größe, Form, räumlicher Orientierung und Streuung nach neuester Methode abschätzen (West, 1993 und Keuker et al., 2001). Er ist eine Kombination aus dem optischen Disektor mit einer dreidimensionalen Probe zum Auszählen, einer Stichprobennahme nach dem Zufallsprinzip und einem bestimmten Zählschema. Der *optical fractionator* ist eine häufig verwendete stereologische Methode in der Zellbiologie-Forschung (West et al., 1991; Sousa et al., 1998). Allerdings benötigt er spezielles Laborequipment (ein konfokales Mikroskop, welches auch die z-Achse mit ausmessen kann und ein Mikrotom, das dicke Gewebeschnitte schneidet) sowie ein geeignetes Computerprogramm zur Auswertung. Es kann zu Problemen beim Färben der dicken Gewebeschnitte kommen. Außerdem wird hier das Zufallsprinzip etwas eingeschränkt, da im Randbereich (den so genannten „guard zones“) Objekte nicht ausgewählt werden können (Bartheld, 2001).

In der Literatur werden unterschiedliche Methoden zur Dichtebestimmung verwendet. Die Arbeitsgruppe um Takanori Miki (Miki et al., 2005) gebraucht für ihre Schätzung der Neuronenzahlen die physikalische Disektormethode. Bei Bartheld (Bartheld, 2001) und Benes (Benes und Lange, 2001) stehen ebenfalls die Vorteile der physikalischen Disektormethode im Vordergrund. Während Hosseini-Sharifabad (Hosseini-Sharifabad und Nyengaard, 2007) und Keuker (Keuker et al., 2001) den *optical fractionator* bevorzugen. Barbara Boss (Boss et al., 1987) ermittelt ihre Werte mit Hilfe eines systematischen Zählschemas und der Abercrombie-Korrektur. Die Arbeitsgruppe um Mark J. West veröffentlicht mehrere Artikel in denen die verschiedenen Methoden beschrieben und ihr Vor- und Nachteile aufgezeigt werden (West et al., 1991; West 1993 und 1999). Selbst verwenden sie den *optical fractionator*.

In der vorliegenden Arbeit, in der nach chronischer Bestrahlung kein Zellverlust nachweisbar ist, wird im Gegensatz zu anderen Arbeiten eine Kombination aus physikalischer und optischer Disektormethode zur Zellquantifizierung verwendet. Die Dichtebestimmung ist hierbei mit der aufwendigste Teil dieser Arbeit. Da sehr viele Schnittbilder gemacht und anschließend ausgewertet werden müssen. In den drei Gruppen ergeben sich für die Dichte Einzelwerte zwischen 240 und 330 x 10³/mm³, der Mittelwert liegt bei etwa 278 x 10³/mm³.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommt auch die kalifornische Arbeitsgruppe um Barbara Boss (Boss et al., 1987), die mittels systematischem Zählschema und Abercrombie-Korrektur bei Wistar-Ratten eine Dichte von 250-370 x 10³/mm³ im Stratum Pyramidale errechnet. Aika et al. (Aika et al., 1994) verwenden die physikalische Disektormethode bei ihren Dichtebestimmungen im CA1-Bereich der Ratte. Für die Pyramidenzellschicht des dorsalen Hippocampus erhalten sie eine numerische Dichte von 272,4 x 10³/mm³.

Obwohl in diesen Studien verschiedene Methoden zur Dichtebestimmung angewendet werden, kommen alle zu etwa gleichen Resultaten.

Die japanische Forschergruppe um Takanori Miki (Miki et al., 2004 und 2005) verwendet zur Dichtebestimmung die physikalische Disektormethode und bekommt in beiden Versuchsreihen Mittelwerte von etwa 170 und 181 x 10³/mm³ für die CA1-Region bei 16 und 30 Tage alten Ratten. Die niedrigeren Ergebnisse lassen sich dadurch erklären, dass in dieser Studie eventuell nicht genau zwischen den

verschiedenen Schichten der CA1-Region unterschieden wird. Dadurch werden außer der neuronreichen Pyramidenzellschicht möglicherweise auch noch Teile von Str. radiatum oder Str. oriens mit einbezogen, wodurch sich die gesamte Neuronendichte verringert. Dafür spricht auch das in dieser Studie errechnete größere Volumen (siehe unter 5.1.1).

In der Arbeit von Sadowski (Sadowski et al., 1999) wird mittels optischem Disektor eine CA1-Neuronendichte von 400 bis 508 x 10³/mm³ bei drei und 15 Monate alten Ratten errechnet. Die Arbeitsgruppe ermittelt in ihren Versuchen eine altersabhängige Zunahme der Pyramidenzellichte (bei gleich bleibender Neuronenzahl durch Abnahme des Volumens). Die drei Monate alten Tiere haben dabei eine durchschnittliche CA1-Neuronendichte von 400 (± 57) x 10³/mm³, während bei den 15 Monate alten Ratten eine Dichte von 508 (± 110) x 10³/mm³ ermittelt wird. Warum sich bei diesen Versuchen so hohe Dichtewerte ergeben bzw. was es mit der altersabhängigen Zunahme der Zelldichte auf sich hat, wird aus der Veröffentlichung nicht ersichtlich. Im Gegensatz dazu finden Landfield et al. (1981) eine Reduktion der Pyramidenzellichte bei alten Ratten. Sadowski geht nur darauf ein, dass sich die Zellzahlen bei den drei und 15 Monate alten Tieren nicht wesentlich unterscheiden, da sich das berechnete Volumen gegenläufig verhält (statistisch nicht signifikant).

Verglichen mit anderen Studien (Aika et al., 1994; Boss et al., 1987) und deren Methoden kommen wir bei der Verwendung der modifizierten Disektormethode zu sehr ähnlichen Ergebnissen. Unter den gegebenen Bedingungen stellt dieses Verfahren die optimale Methode dar, um die drei Versuchsgruppen miteinander zu vergleichen.

5.2 Ursachen für die unterschiedlichen Ergebnisse bei der Ermittlung der Zahl von CA1-Neuronen

Die Anzahl der CA1-Neuronen der Ratte kann zwischen den verschiedenen Versuchstierstämmen variieren, sie ist unter anderem abhängig vom Alter der Nager und je nach angewandter (Zähl-/Schätz-) Methode ergeben sich unterschiedliche Werte, da oft nicht exakt die gleichen Bereiche ausgewertet werden.

Die hier berechneten CA1-Neuronenzahlen liegen bei etwa 100.000 Nervenzellen pro unilateralem Hippocampus. In allen drei Gruppen (GSM, UMTS und Kontrolle) gibt es natürliche Schwankungen zwischen den Werten (von knapp 70.000 bis etwa 140.000 Nervenzellen), die sich auch in anderen Studien wieder finden (324.000 \pm 170.000 Hosseini-Sharifabad und Nyengaard, 2007; 326.000 \pm 61.000 Sadowski et al., 1999; 382.000 \pm 190.000 West et al., 1991).

Die Auswertungsstrategien sind so ausgesucht, dass sich die drei Gruppen möglichst optimal miteinander vergleichen lassen. Dabei wird deutlich, dass sich die chronische Exposition mit elektromagnetischen Feldern nicht auf die Anzahl der CA1-Neuronen bei der Ratte auswirkt. In keiner der Versuchstiergruppen gibt es eine signifikante Veränderung der Anzahl an Nervenzellen im CA1-Bereich.

Die von uns berechneten Werte sind niedriger als in vielen anderen Veröffentlichungen, wo etwa zwischen 150.000 und 600.000 CA1-Neuronen ermittelt werden (Hosseini-Sharifabad und Nyengaard, 2007; Miki et al., 2005; Rasmusen et al., 1996; Sousa et al., 1998; West et al., 1991).

Die Anzahl der Nervenzellen im Hippocampus ist abhängig vom untersuchten Stamm der Versuchsratten. Barbara Boss (Boss et al., 1987) vergleicht die CA1-Neuronenzahlen vier Wochen alter Sprague-Dawley und Wistar Ratten und kommt zu dem Ergebnis, dass die Sprague-Dawley Ratten mit 420,000 (\pm 60,000) deutlich mehr CA1-Neuronen besitzen als die Wistar Ratten mit nur 320,000 (\pm 20,000) Nervenzellen in der CA1-Region.

In einigen Studien wird eine Veränderung der Neuronenzahlen in Abhängigkeit vom Alter der Versuchstiere untersucht. So weist beispielsweise die Arbeitsgruppe um Takanori Miki eine Verringerung der CA1-Neuronenzahl in den ersten Lebenswochen

nach (177.000 CA1-Neuronen bei 16 Tage alten Ratten und 153.000 CA1-Neuronen bei 30 Tage alten Tieren, Miki et al., 2004 und 2005). Diese Abnahme der CA1-Neuronen in den ersten Wochen nach der Geburt ist auf einen natürlichen postnatalen Zelluntergang zurückzuführen (Humphrey et al., 2002). Die Pyramidenneuronen des Hippocampus werden in der späten Trächtigkeit gebildet. Da Nervenzellen in frühen Entwicklungsphasen oft überproduziert werden, kommt es später zu einer Reduktion durch Apoptose (Bayer, 1980b; Ferrer et al., 1990; Schlessinger et al., 1978). In der Studie von Toger Rasmussen (Rasmussen et al., 1996) werden die CA1-Neuronen bei 10 Wochen und zwei Jahre alten Ratten ermittelt, hier kommt es zu keinem signifikanten altersabhängigen Neuronenverlust. Bei den Versuchstieren werden zwischen 570.000 (± 120.000) und 670.000 (± 120.000) CA1-Neuronen berechnet.

Die angewandte Methode könnte sich ebenfalls auf die errechnete Anzahl der CA1-Neurone auswirken. So lassen sich beispielsweise Schnittrichtung, ausgewertete (Teil-) Bereiche und erfasste Hippocampusschichten bei den verschiedenen Versuchen unterscheiden. Boss et al. (1987) und Sadowski et al. (1999) verwenden beispielsweise koronare Schnitte vom ganzen Hippocampus. Aika et al. (1994) benutzten wie wir koronare Schnittbilder des dorsalen Hippocampus. In mehreren anderen Veröffentlichungen (Miki et al., 2005; Rasmussen et al., 1996; West et al., 1991) werden horizontale Schnitte verwendet. Durch die ungleiche Ausrichtung der Bilder kann es dabei zur Auszählung unterschiedlicher Gebiete kommen. Außerdem erfassen wir bei der hier verwendeten Methode nur die Bereiche des dorsalen Hippocampus und zählen nur die CA1-Neuronen der oberflächlichen Pyramidenzellschicht (sps).

Das Ziel der vorliegenden Studie war nicht unbedingt den vollständigen Hippocampus zu erfassen, sondern die drei Versuchsgruppen (GSM, UMTS und Kontrolle) bestmöglich miteinander zu vergleichen, was durch die gemachten Modifikationen (nur Auswertung des dorsalen Hippocampus und der oberflächlichen CA1-Pyramidenzellschicht) optimal erreicht wurde.

5.3 Funktionelle Zusammenhänge mit anderen Teilen dieser Studie

Bei dem Forschungsvorhaben „in vivo-Experimente unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation“ handelte es sich um ein Langzeitprojekt, das vom Bundesamt für Strahlenschutz gefördert wurde. Es wurde als Teil des Deutschen Mobilfunk-Forschungsprogramms vom Forschungsverbund Elektromagnetische Verträglichkeit, Mensch und Umwelt (Forschungsverbund EMVU, 2007), der Technischen Universität München und der Ludwig-Maximilians-Universität München gemeinsam umgesetzt. Für diesen Zweck wurden Wistar Hannover Ratten über drei Generationen kontinuierlich Mobilfunkfeldern (GSM: 900 MHz, UMTS: 1966 MHz und Scheinexposition: 0 MHz) ausgesetzt. Die Feldstärken waren dabei so eingestellt, dass bei den Ratten SAR-Werte von 0,4 W/kg erreicht wurden.

Neben der Ermittlung der CA1-Neuronenzahl des Hippocampus, wurden Lern- und Gedächtnisleistungen überprüft, die Integrität der Blut-Hirn-Schranke untersucht sowie Immun- und Stressreaktionen erfasst.

Lern- und Gedächtnisleistungen:

Mit Hilfe von operanter Konditionierung in Skinnerboxen wurde die kognitive Leistung von jungen (10 Wochen alt, F₀-, F₁- und F₂-Generation) und älteren Ratten (10 Monate alt, F₀-Generation) untersucht. Nach einer bestimmten Trainingszeit erfolgte nacheinander jeweils die Verstärkung hoher (zwei Hebeldrücke innerhalb einer Sekunde, bzw. vier in zwei Sekunden) und niedriger (Sperrintervall von 16 Sekunden vor Hebeldruck) Verhaltenshäufigkeiten (differential reinforcement of high and low rates).

Weiterhin wurde die Gedächtnisleistung mittels social discrimination-Tests erfasst. Dabei wurden sexuell naiven und sexuell erfahrenen Tieren wiederholt Jungtiere dargeboten und die Schnüffeldauer an diesen aufgezeichnet.

Bei den Untersuchungen wurden sowohl zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen (GSM, UMTS, Kontrolle) als auch zwischen den drei

Rattengenerationen keine signifikanten Unterschiede in Lern- und Gedächtnisleistung festgestellt.

Die Resultate dieser Versuche passen gut mit denen der CA1-Zählung zusammen. Da im Hippocampus Informationen aus dem Kurzzeit- ins Langzeitgedächtnis überführt werden, ist er mitverantwortlich für die Lern- und Gedächtnisleistungen. Aufgrund der unveränderten Anzahl der CA1-Neuronen bei den Versuchstieren war bei den Lern- und Gedächtnisleistungen mit keinen Defiziten zu rechnen, was die Versuchsergebnisse auch bestätigen.

Integrität der Blut-Hirn-Schranke:

Bei den Versuchen wurden Tiere der F_0 - und der F_2 -Generation nach vier (F_{0b} und F_2) und elf (F_{0a}) Monaten untersucht. Dabei wurde mittels unidirektionaler Influxkonstante K_{in} von ^{14}C -Saccharose quantitativ die Integrität der Blut-Hirn-Schranke für sieben Hirnareale (Bulbus olfactorius, Cerebellum, Medulla oblongata, Pons, Mesencephalon, Diencephalon und Kortex) gemessen. Zusätzlich wurde zur Steigerung der Nachweisempfindlichkeit eine Challenge-Methode zur Labilisierung der Blut-Hirn-Schranke entwickelt.

Es kam bei keiner der untersuchten Rattengenerationen (F_0 und F_2) zu signifikanten Unterschieden zwischen den K_{in} -Werten der exponierten Tiere (GSM, UMTS und Scheinexposition). Das heißt weder unterschiedliche Bestrahlungsdauer (vier und elf Monate) noch Langzeitexposition über mehrere Generationen (Vergleich zwischen den Gruppen F_{0b} und F_2) ergaben signifikante Unterschiede der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität.

Die chronische Exposition der Versuchstiere mit einer SAR von 0,4 W/kg hatte also keinen Effekt auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke. Das Ergebnis wird durch die unveränderten CA1-Neuronenzahlen zusätzlich untermauert, da eine Öffnung der Blut-Hirn-Schranke bei den empfindlichen Pyramidenzellen Veränderungen hervorgerufen hätte.

DISKUSSION

Untersuchungen zum potentiellen Einfluss auf das Immunsystem und die Stressbelastung:

Bei diesem Teilprojekt wurden Tiere der F_0 und der F_2 -Generation nach unterschiedlicher Expositionsdauer und mit verschiedenen Altersstufen (F_{0b} und F_2 mit 19/ 20 Wochen, F_{0a} im Alter von 52 Wochen) untersucht. Dabei wurden immunologische und physiologisch-adaptive (Stress-) Parameter bestimmt. Die Untersuchungen zur Immunkompetenz der Tiere erfolgten durch die Injektion verschiedener Antigene (Ovalbumin und Huhn IgY) und die anschließende Messung des Titeranstieges der jeweiligen Antikörper (Gesamt IgG, Anti-OVA, Anti-IgY) nach 14 und 35 Tagen. Zwischen den einzelnen Versuchstiergruppen (GSM, UMTS, Kontrolle) waren mit einer Ausnahme (Gesamt IgG, Gruppe F_2 , GSM > Kontrolle, $p < 0,05$) keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

Bei den Untersuchungen zum Stressgeschehen wurde als standardisierter Stressor synthetisch hergestelltes ACTH (adrenocorticotropes Hormon) appliziert. Anschließend wurde der Anstieg des Stresshormons Kortikosteron in Serum (0, 15, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten nach der Injektion) kontrolliert. Die gemessenen Unterschiede (im Hinblick auf die Exposition) in der F_{0b} -Gruppe konnten bei den analog exponierten F_2 -Tieren nicht bestätigt werden, deshalb kam die Arbeitsgruppe zu dem Schluss, dass die Ratten adäquat auf den eingesetzten Stressor reagieren konnten. Dass heißt durch die Langzeitexposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern trat für die Versuchstiere keine dauerstressähnliche Belastung auf.

Diese Ergebnisse passen ebenfalls zu unseren Resultaten. Dauerstress-ähnliche Situationen können sich negativ auf die empfindlichen Pyramidenzellen auswirken (Pavlidis et al., 1996; Uno et al., 1989), wodurch sich strukturelle Veränderungen in Hippocampus ergeben können (Kerr et al., 1991; Sousa et al., 1998). Es wurden aber weder dauerstressähnliche Belastungen noch Veränderungen der CA1-Neuronenzahl nachgewiesen.

Es ergibt sich ein einheitliches Bild. Alle Teilbereiche dieser Studie kamen zu dem gleichen Ergebnis, dass sich die chronische Befeldung mit elektromagnetischen Strahlen im Mobilfunkfrequenzbereich nicht signifikant auf die Versuchstiere auswirkt.

5.4 Auswirkungen von EMF auf die Zahl von Neuronen

Obwohl schon seit Jahren über einen möglichen Einfluss der hochfrequenten elektromagnetischen Befeldung auf das zentrale Nervensystem diskutiert wird (siehe unter 2.6: Wirkung von EMF auf das EEG, die Kognition, verschiedene Schlafparameter, die Integrität der Blut-Hirn-Schranke und andere Effekte), gibt es bisher nur sehr wenige Veröffentlichungen die sich speziell mit den Auswirkungen auf die Anzahl der Hippocampusneuronen in vivo beschäftigen. Die meisten Studien, die zu dem Thema Neuronenverlust publiziert wurden, sind Arbeiten an Zellkultursystemen.

Im Folgenden werden kurz bisher veröffentlichte Arbeiten und deren Ergebnisse dargestellt. Dabei wird zwischen Expositionen unter und über dem geltenden Grenzwert unterschieden. Es fällt auf, dass bei Befeldung unter dem Grenzwert in der Regel keine physiologischen Veränderungen sichtbar werden, während es bei höheren Strahlendosen teilweise zu Abweichungen kommt.

Zu den Arbeiten mit einem SAR-Wert unter 0,4 W/kg (= Grenzwert für beruflich exponierte Personen) gehören beispielsweise die Versuche des französischen Forscherteams um Vanessa Joubert (Joubert et al., 2007). Sie beschäftigten sich indirekt mit dem Verlust von kortikalen Neuronen bei der Ratte. Dabei untersuchten sie, ob sich hochfrequente elektromagnetische Befeldung auf die neuronale Apoptose in vitro auswirkt. Es wurden kortikale Neuronen von Rattenembryonen in einem gepulsten 900 MHz GSM Feld über 24 Stunden exponiert. Der durchschnittliche SAR-Wert betrug 0,25 W/kg. Die Apoptoserate wurde gleich im Anschluss und 24 Stunden nach der Befeldung auf drei unterschiedliche Arten ermittelt. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede der Apoptoserate zwischen den Kontrollen und den befeldeten Neuronen nachgewiesen, weder direkt noch 24 Stunden nach der Exposition. Das heißt, bei unveränderter Apoptoserate kam es zu keinem vermehrten Neuronenverlust. Somit blieb auch die Gesamtzahl der Nervenzellen bei den verschiedenen Gruppen (befeldet/scheinexponiert) gleich. Diese Ergebnisse stimmen mit unseren Resultaten überein, da es auch bei uns keine signifikanten Veränderungen in der Anzahl der CA1-Neuronen gab.

Zu anderen Ergebnissen kam die schwedische Arbeitsgruppe um L.G. Salford (Salford et al., 2003). Die Versuchsratten wurden hier für zwei Stunden einem gepulsten 915 MHz Feld ausgesetzt, wobei Ganzkörper-SAR-Werte von 2, 20 und 200 mW/kg erreicht wurden. Bei der folgenden histologischen Analyse wurden signifikante morphologische Veränderungen einzelner Nervenzellen („dark neurons“) nach der GSM-Befeldung gefunden. Die von Salford erfassten Nervenzellschäden, in Form von so genannten „dark neurons“ werden in der Literatur unterschiedlich bewertet. „Dark neurons“ werden als Artefakte (Kövesdi et al., 2007) oder Folgen von neurologischen Erkrankungen und Traumen (pre- oder postmortem) eingeordnet (Cammermeyer, 1978, Gallyas et al., 2006 und Ishida et al., 2004). Sie entstehen durch Schrumpfung, Hyperbasophilie, Argyrophilie und Verdichtung der Ultrastrukturelemente der geschädigten Neuronen (Gallyas et al., 2006 und Zsombok et al., 2005). Die Veränderungen der Nervenzellen können dabei reversibel oder irreversibel sein (Gallyas et al., 2006). In letzterem Fall werden die Überreste der untergegangenen Zellen innerhalb weniger Tage resorbiert (Kövesdi et al., 2007). Bei den Versuchen von Salford muss daher erwähnt werden, dass die Versuchstiere noch 50 Tage nach der Exposition unter Beobachtung weiterlebten, bevor sie euthanasiert wurden und die histologische Untersuchung erfolgte. Auf Grund der Tatsache, dass die Reste von untergegangenen Neuronen binnen weniger Tage abgebaut werden, ist es äußerst unwahrscheinlich, dass die bei Salford beschriebenen Veränderungen („dark neurons“) etwas mit der über sechs Wochen zurückliegenden Bestrahlung der Versuchstiere zu tun hatten. Außerdem wurden nicht nur bei den bestrahlten Tieren, sondern auch bei einem Tier aus der scheinexponierten Kontrollgruppe Veränderungen in Form von „dark neurons“ festgestellt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind also sehr fraglich.

Die Arbeiten mit einem SAR-Wert über 0,4 W/kg kommen zu unterschiedlichen Resultaten. Die französische Arbeitsgruppe um Vanessa Joubert (Joubert et al., 2008) experimentierte mit neuronale Primärkulturen von Ratten unter veränderten Versuchsbedingungen. Diesmal wurde mit einer kontinuierlichen Welle (900 MHz) befeldet und die Zellkultursysteme höheren SAR-Werten (2 W/kg) ausgesetzt. Dabei kam es in den exponierten Zellkultursystemen zu einer Temperaturerhöhung von 37 auf 39 °C, so dass zusätzlich scheinexponierte „Kontrollneuronen“ bei 39°C inkubiert

wurden um Effekte durch die erhöhte Temperatur möglichst auszuschließen. Bei den befeldeten Nervenzellen kam es im Vergleich zu den scheinexponierten Neuronen zu einer signifikanten Erhöhung der Apoptoserate (Caspase-unabhängiger Signalweg der Apoptose) direkt sowie 24 Stunden nach der Exposition.

Die hier veröffentlichten Resultate lassen sich nicht ohne weiteres mit unseren Versuchsergebnissen vergleichen. Es handelt sich um in vitro-Experimente an Zellkultursystemen. Davon abgesehen werden 5fach höhere SAR-Werte erreicht. Zusätzlich kommt es zu einer Temperaturerhöhung im Medium, die sich eventuell auch auf eine Änderung der Apoptoserate auswirken kann.

Eine türkische Arbeitsgruppe (Odaci et al., 2008) kam bei ihrer in vivo Studie zu dem Ergebnis, dass sich die Befeldung während der Embryonalentwicklung negativ auf Anzahl und Morphologie (dunkel gefärbte Neuronen) der Körnerzellen des Gyrus dentatus auswirkt. Bei der Versuchsdurchführung waren einige Punkte methodisch fraglich. Die pränatale Befeldung der Tiere (900 MHz CW, Leistungsflussdichte 1 mW/cm², SAR-Spitzenwerte von 2W/kg) erfolgte während der gesamten Trächtigkeit eine Stunde pro Tag. Dafür wurden die Muttertiere in enge, belüftete Plastikröhren der Expositionseinrichtung gesetzt. Der Abstand zwischen Antenne und NachbarTier betrug dabei jeweils ein cm. Die trächtigen Kontrolltiere wurden nicht gehandelt, also weder Stress noch EMF ausgesetzt. Die Jungtiere wurden anschließend im Alter von 4 Wochen euthanasiert und untersucht. Da während des Versuchs der physiologische Zustand der Tiere nicht ausreichend berücksichtigt wurde (exponierte Ratten gestresst durch Immobilisation und NachbarTiere, während die Kontrollgruppe gar nicht gehandelt wird), ist es fraglich ob sich die gefundenen Veränderungen auf die pränatale Exposition oder den maternalen Stress während der Exposition zurückführen lassen (Stagg et al., 2001). In einer ähnlichen Studie von Bornhausen und Scheingraber (2000) wurden ebenfalls trächtige Ratten exponiert und anschließend die Nachkommen in Skinnerboxen auf kognitive Defizite getestet. Hierbei zeigten sich keine Unterschiede zwischen pränatal befeldeten und scheinexponierten Tieren. Da der Hippocampus mitverantwortlich für Gedächtnisbildung und -Abrufung ist, ist es unwahrscheinlich, dass es in diesem Bereich zu strukturellen Veränderung kam. In den Versuchen von Sousa (Sousa et al., 1998) wurden unter anderem neonatale Ratten (Tag 0 bis 30) einer Corticosteronbehandlung (was einem erhöhtem Stresslevel gleichkommt) ausgesetzt

und anschließend strukturelle Veränderungen im Hippocampus untersucht. Bei den behandelten Jungtieren waren dabei Volumen und Zellzahl im Gyrus dentatus reduziert. Es ist also durchaus möglich, dass sich die bei Odaci gefundenen Veränderungen auf die erhöhte Stressbelastung während der Exposition zurückführen lassen.

Die koreanischen Wissenschaftler um Tae-Hyung Kim (Kim et al., 2008) untersuchten in einem Langzeitexperiment an lebenden Mäusen die lokale Wirkung von EMF auf Neuronen und Gliazellen in Hippocampus und Kleinhirn. Die Expositionsdauer mit 849 bzw. 1763 MHz betrug eine Stunde pro Tag, fünf Tage pro Woche für sechs oder zwölf Monate. Dabei wurden am Gehirn durchschnittlich lokale SAR-Werte von 7,8 bzw. 5,28 W/kg erreicht. Bei den unterschiedlichen Gruppen (849 und 1763 MHz sowie Scheinexposition) kam es zu keinen Veränderungen von Gliazellen oder Neuronen. Es wurden weder eine Verstärkung der Zellproliferation noch der Apoptose beobachtet. Die Verteilung von Neuronen und Gliazellen war in den verschiedenen Gruppen unverändert. Die Ergebnisse dieser Experimente lassen sich gut mit unseren Resultaten vergleichen. Es handelt sich ebenfalls um eine in vivo-Untersuchung zu Auswirkungen von Langzeitexpositionen mit hochfrequenten EMF im Mobilfunkfrequenzbereich. Trotz der deutlich über dem Grenzwert liegenden SAR-Werte, kommt es in diesen Experimenten zu keiner Veränderung der Apoptoserate. Daraus lässt sich folgen, dass sich wahrscheinlich auch die Neuronenzahlen (wie in unseren Versuchen) zwischen den verschiedenen Gruppen nicht unterscheiden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die bisher veröffentlichten Ergebnisse nicht dafür sprechen, dass eine Bestrahlung mit elektromagnetischen Feldern im Mobilfunkfrequenzbereich unterhalb des Grenzwertes zu veränderten Neuronenzahlen im Hippocampus führt. Die in vitro Studien von Joubert (2007 und 2008) finden nur deutlich über dem Grenzwert Auswirkungen auf die neuronale Apoptoserate. Während bei Kim et al. (2008) selbst bei hohen SAR-Werten in vivo keine Beeinflussung der Neuronen festgestellt wird. Bei den von uns untersuchten Versuchstieren sind trotz chronischer elektromagnetischer Befeldung keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der Pyramidenneuronen im oberflächlichen CA1-Bereich festzustellen. Arbeiten, die zu anderen Ergebnissen kommen (Salford

DISKUSSION

et al. 2003 und Odaci et al., 2008), weisen deutliche methodische Mängel auf und sind dementsprechend wenig aussagekräftig.

5.5 Auswirkungen von EMF auf Funktion und Morphologie von Zellen im Gehirn

In der Literatur gibt es einige Arbeiten, die sich mit den Auswirkungen von elektromagnetischen Feldern auf verschiedene Zellen im Gehirn beschäftigen. So werden unter anderem die Dendritenentwicklung von Hippocampusneuronen, die Beeinflussung von Gliazellen, die metabolische Gehirnaktivität, die Genexpression im Gehirn und die Neuronenaktivität untersucht.

Damit Effekte sichtbar werden, erfolgt die Exposition in den meisten Arbeiten mit sehr hohen Strahlendosen. Bei niedrigerer Befeldung kommt es dagegen selten zu Veränderungen der untersuchten Parameter.

Dendritenentwicklung von Hippocampusneuronen:

In einer *in vitro* Studie (Ning et al., 2007) weisen die Forscher eine Beeinflussung der dendritischen Entwicklung von Hippocampusneuronen durch GSM-Exposition nach. Dabei werden Rattenneuronen neun Tage für jeweils 15 Minuten einem gepulsten 1800 MHz Feld ausgesetzt und anschließend Dendritenlänge sowie Dichte und Mobilität dendritischer Filopodien beurteilt. Bei einem SAR-Wert von 2,4 W/kg kommt es zu einer Verringerung der Dendritenlänge sowie zu einer Reduzierung von Dichte und Mobilität der dendritischen Filopodien. Bei einem niedrigeren SAR-Wert von 0,8 W/kg werden dagegen keine signifikanten Veränderungen sichtbar. Das heißt bei hohen Expositionsparametern werden die Dendriten der Nervenzellen beeinflusst, während bei niedrigeren Absorptionsraten keine Veränderungen auftreten, die Neuronen also nicht sichtbar beeinflusst werden.

Diese Ergebnisse unterstützen unsere Schlussfolgerungen, zumal es sich hier um noch sensiblere Parameter handelt. Sie bestätigen die Aussage, dass sich eine Exposition mit elektromagnetischen Feldern unter dem gültigen Grenzwert nicht auf diese Nervenzellen auswirkt.

Glia-Veränderungen (u.a. im Hippocampus):

In mehreren Arbeiten wird die Auswirkung von GSM-Exposition (900 MHz) auf Gliazellen in Rattenhirn untersucht. Dabei lassen sich in vivo und in vitro Versuche sowie akute (Mausset-Bonnefont et al., 2004) und chronische (Ammari et al., 2008a) Befeldung unterscheiden. Die im Gehirn erreichten SAR-Werte variieren von 1,5 bis 54 W/kg.

Bei Ammari et al. (2008a) werden die Tiere für 24 Wochen 45 bzw. 15 Minuten pro Tag, fünf Tage pro Woche befeldet. Im Gehirn werden dabei lokale SAR-Werte von 1,5 bzw. 6 W/kg erreicht. 10 Tage nach der Exposition wird die Glia-Entwicklung (unter anderem im Hippocampus) untersucht. Die bei 6 W/kg exponierten Tiere hatten dabei im Vergleich zu den bei 1,5 W/kg und den scheinexponierten Tieren eine erhöhte GFAP-Expression (GFAP = saures Gliafaserprotein). Das kann auf eine persistente Astroglia-Aktivierung im Gehirn und somit auf eine mögliche Gliosis hinweisen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch die Arbeitsgruppen um Brillaud (Brillaud et al., 2007) und Mausset-Bonnefont (Mausset-Bonnefont et al., 2004), die ihre Versuchstiere 15 Minuten bei 6 W/kg befelden und anschließend ebenfalls vermehrt GFAP-gefärbte Oberflächen-Gebiete im Gehirn bzw. gliale Immunreaktionen nachweisen. Thorlin et al. (2006) exponieren Astroglia- und Mikroglia-Zellen für 4 bis 24 Stunden (SAR 3 – 54 W/kg). Dabei kommt es weder zu morphologischen noch zu funktionellen Veränderungen (GFAP).

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es bei hohen SAR-Werten (6 W/kg) teilweise zu Veränderungen im Gehirn kommen kann, während bei einer schwächeren Exposition (1,5 W/kg) keine Abweichungen nachweisbar sind. Das heißt elektromagnetische Befeldung unter den Grenzwert (0,4 W/kg für beruflich exponierte Personen) induziert auch keine Glia-Veränderungen.

Gehirnmetabolismus:

In der Arbeit von Ammari et al. (2008b) werden Ratten für 7 Tage (45 oder 15 Minuten täglich) einem gepulsten 900 MHz EMF ausgesetzt. Die SAR-Werte liegen bei 1,5 und 6 W/kg. Um die regionale metabolische Aktivität zu erfassen, wird anschließend der Gehalt von Cytochrom-C-Oxidase (unter anderem im Hippocampus) untersucht. Bei 6 W/kg kommt es zu einer verminderten Cytochrom-C-Oxidase-Aktivität, während die Exposition mit 1,5 W/kg keinen Einfluss auf die Enzymaktivität hat.

Auch hier wird deutlich, dass hohe Expositionsparameter den Gehirnmetabolismus verändern können, während geringere Dosen keine Abweichungen hervorrufen.

Genexpression:

Einige Arbeitsgruppen untersuchen die Auswirkungen elektromagnetischer Felder auf die Genexpression im Gehirn. Die Wissenschaftler um Zhao (Zhao et al., 2007) befelden Kortex- und Hippocampusneuronen von Ratten bei 1800 MHz über 24 Stunden bei 2 W/kg. Bei der folgenden RNA-Aufbereitung stellt sich heraus, dass die Expression einiger Gene verändert ist. Im Unterschied dazu weisen Papparini et al. (2008) bei ihren in vivo-Versuchen mit Mäusen (1805 MHz über 24 Stunden bei 1 W/kg) keine Abweichung der Genexpression im Gehirn nach.

Da mit abnehmender Befeldungsstärke auch die Veränderungen der Genexpression weniger deutlich sind, ist es unwahrscheinlich, dass bei noch geringerer Befeldung unterhalb der Grenzwertes (0,4 W/kg) relevante Abweichungen der Genexpression auftreten.

Veränderte Neuronenaktivität:

Mehrere Studien beschäftigen sich mit der Frage, ob Expositionen mit elektromagnetischen Feldern die Neuronenaktivität beeinflussen. In einer Studie von Tattersall (Tattersall et al., 2001) werden CA1-Neuronen in Rattenhirnschnitten mit 700 MHz 5 bis 15 Minuten bestrahlt. Bei SAR-Werte von 1,6 bis 4,4 W/kg werden signifikante Änderungen der elektrischen Aktivität nachgewiesen. Zu ähnlichen Ergebnissen kommen Xu et al. (2006). Sie exponieren Hippocampusneuronen bei

einem SAR-Wert von 2,4 W/kg mit 1800 MHz 15 Minuten täglich über 8 Tage. Dabei kommt es zu einer Reduktion der synaptischen Aktivität. Im Gegensatz dazu kommt die Arbeitsgruppe um Pakhomov (Pakhomov et al., 2003) zu dem Schluss, dass die in ihrem Versuch beobachteten reversiblen Veränderungen (Abnahmen der population spikes) nur auf die Temperaturerhöhung (0,5 - 6°C) im Gewebe zurückzuführen sind.

Die Effekte auf die Neuronenaktivität werden nur bei vielfach über dem Grenzwert liegenden SAR-Werten beobachtet. Es kann nicht davon ausgegangen werden, dass es unterhalb des Grenzwertes zu ähnlichen Veränderungen kommt. In diesem Bereich sind weitere Untersuchungen nötig.

Grundsätzlich lässt sich aus den oben aufgeführten Studien schließen, dass elektromagnetische Felder die Funktion und Morphologie von Zellen im Gehirn beeinflussen können. Doch diese Veränderungen lassen sich erst deutlich über dem gültigen Grenzwert nachweisen. Bei Expositionen unterhalb von 0,4 W/kg gibt es weder Auswirkungen auf die Dendritenentwicklung von Hippocampusneuronen, noch kommt es zu Glia-Veränderungen. Auch der Metabolismus und die Genexpression im Gehirn werden nicht beeinflusst.

Die Resultate stimmen mit den im Rahmen dieser Arbeit gemachten Ergebnissen überein. Die chronische Exposition mit elektromagnetischen Feldern im Mobilfunkfrequenzbereich hatte keinen Einfluss auf die CA1-Neuronenzahl im Hippocampus der Ratte.

6 Zusammenfassung

Zum Einfluss elektromagnetischer Befeldung mit Mobilfunkstrahlen auf die Zahl der CA1-Neuronen im Hippocampus der Ratte

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen chronischer elektromagnetischer Exposition im Mobilfunkfrequenzbereich auf Neuronen zu untersuchen. Dazu wurden exemplarisch die empfindlichen CA1-Neuronen im Hippocampus von Ratten ausgewählt. Die Bestrahlung der Versuchstiere erfolgte unter Fernfeldbedingungen in drei abgeschirmten Hochfrequenzexpositions-kammern (GSM 900 MHz, UMTS 1966 MHz und Scheinexposition) kontinuierlich für 24 Stunden am Tag über sieben Monate. Dabei waren die Feldstärken so eingestellt, dass bei den Ratten Ganzkörper-SAR-Werte von 0,4 W/kg erreicht wurden, was dem Grenzwert für beruflich exponierte Personen entspricht.

Die Gehirnhälften der Versuchstiere wurden einzeln in Kunststoff eingebettet und anschließend wurden durch die linken Hippocampusregionen koronare Schnittserien mit dem Rotationsmikrotom angefertigt. Im Abstand von 300µm wurde jeweils eine Schnittreihe von acht aufeinander folgenden drei µm dicken Schnitten entnommen. Pro unilateralem Hippocampus entstanden so zwischen 11 und 15 Schnittserien. Die Schnitte wurden getrocknet und anschließend mit einer Kernfärbung (Hämatoxylin nach Mayer) gefärbt.

Die einzelnen Hippocampuschnitte wurden unter dem Mikroskop beurteilt und mit einer Kamera aufgenommen. Die Fläche der oberflächlichen CA1-Pyramidenzellschicht des dorsalen Hippocampus wurde in systematischen Stichproben im Abstand von 300µm ausgemessen (zur Berechnung des Volumens der CA1-Region). Für die Dichtebestimmung (CA1-Neuronen pro Volumen) wurde in den aufeinander folgenden Schnitten einer Serie dieselbe CA1-Region mit 40facher Vergrößerung eingelesen. Im Anschluss erfolgte die Bearbeitung der Bilderserie mit einem Computerprogramm, wodurch sich die Einzelschnittbilder exakt übereinander legen und zurechtschneiden ließen. Die neu hinzugekommenen CA1-Neuronen wurden nach einer modifizierten Disektormethode ausgezählt.

Die Anzahl der CA1-Neuronen im Hippocampus wurde als Produkt der CA1-Neuronendichte mit dem Volumen der Pyramidenschicht der CA1-Region des Hippocampus berechnet. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der CA1-Pyramidenzellen zwischen den bestrahlten Tieren (GSM 900 MHz und UMTS 1966 MHz) und der Kontrollgruppe gefunden.

Dies bedeutet, dass die kontinuierliche Langzeitbestrahlung der Versuchstiere mit elektromagnetischen Feldern im Mobilfunkfrequenzbereich bei einer SAR von 0,4 W/kg keine nachweisbaren Auswirkungen auf die Zahl der CA1-Neuronen im Hippocampus hatte.

7 Summary

The influence of exposure to electromagnetic fields of mobile communications on the number of hippocampal CA1 neurons in rats

The goal of the study was to investigate the effects of chronic electromagnetic exposure in the frequency range of mobile telephony on neurons. Sensitive hippocampal CA1 neurons in rats were chosen as exemplary indicators. The exposure of the animals took place under far field conditions in three isolated high frequency exposure chambers (frequencies: GSM 900 MHz, UMTS 1966 MHz, sham exposure) over a period of seven months on a continuous all-day basis. The field strengths were set to match a whole-body SAR value of 0.4 W/kg, which represents the limit for occupational exposed persons.

The cerebral hemispheres of the animals were each embedded in glycolmethacrylate resin. Consequently, a series of coronal slices was made through the left hippocampal region using a rotation microtome. Each 300 μ m, a series of eight adjacent, 3 μ m wide slices was made. A total of 11 up to 15 series were obtained per unilateral hippocampus. The slices were dried and stained with a nucleus dye (hematoxylin, according to Mayer).

After a microscopic examination, the single hippocampal slices were recorded by a camera and stored. The area of the superficial CA1 pyramid cell layer in the dorsal hippocampus was measured after systematic sampling of slices each 300 μ m (for the determination of the volume of the CA1 region). For the evaluation of the cell density (CA1 neurons per volume), the machable CA1 regions in each of the consecutive intraserial slices were magnified forty fold and stored. Afterwards, the image series were processed using a software which allowed exact superimposing and cropping of the single slice images. A modified disector method was applied to obtain counts of CA1 pyramid cells. The amount of hippocampal CA1 neurons was calculated as the product of the density of CA1 neurons and the volume of the pyramid cell layer of the hippocampal CA1 region. Statistically significant differences in the number of CA1 pyramidal cells were not found between exposed rats and the control group.

SUMMARY

A continuous long-term exposure of rats to electromagnetic fields in the range of mobile telephony frequencies at a SAR of 0.4 W/kg had no detectable effect on the amount of hippocampal CA1 neurons.

8 Literaturverzeichnis

- Aika Y., Ren J.Q., Kosaka Y.K., Kosaka T., Quantitative analysis of GABA-like-immunoreactive and parvalbumin-containing neurons in the CA1 region of the rat hippocampus using a stereological method, the dissector, *Experimental Brain Research* 99 (1994) 267-276
- Amaral D.G. und Witter M.P., The three-dimensional organisation of the hippocampal formation: A review of anatomical data, *Neuroscience* 31 (1989) 571-591
- Amaral D.G. und Witter M.P., Hippocampal formation, in: Paxinos G., *The Rat Nervous System*, Academic Press, San Diego (1995) 443-493
- Ammari M., Brillaud E., Gamez C., Lecomte A., Sakly M., Abdelmelek H., de Seze R., Effect of a chronic GSM 900MHz exposure on glia in the rat brain, *Biomedicine & Pharmacotherapy* 62 (2008a) 273-281
- Ammari M., Lecomte A., Sakly M., Abdelmelek H., de-Seze R., Exposure to GSM 900MHz electromagnetic fields affects cerebral cytochrome c oxidase activity, *Toxicology* 250 (2008b) 70-74
- Auer R.N., Wieloch T., Olsson Y., Siesjö B.K., The distribution of Hypoglycemic brain damage, *Acta Neuropathologica* 64 (1984) 177-191
- Bartheld C.S., Comparison of 2-D and 3-D counting: the need for calibration and common sense, *Trends in Neurosciences* 24 (2001) 504-506
- Bayer S.A., Development of the hippocampal region in the rat.II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life, *Journal of Comparative Neurology* 190 (1980b) 115-134
- Bayerisches Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit (Zugriff 18.03.09), http://www.stmugv.bayern.de/service/faq/anzeige_x.php?ID=AATdjUm82yOhtZsGQnmtQQ==

LITERATURVERZEICHNIS

Bayerisches Staatsministerium für Umwelt, Gesundheit und Verbraucherschutz (StMUGV), Broschüre Mobilfunk, www.umweltministerium.bayern.de (2007)

Benes F.M. und Lange N., Two-dimensional versus threedimensional cell counting: a practical perspective, *Trends in Neurosciences* 24 (2001) 11-17

Borbely A.A., Huber R., Graf T., Fuchs B., Gallmann E., Achermann P., Pulsed highfrequency electromagnetic field affects human sleep and sleep electroencephalogram, *Neuroscience Letters* 275 (1999) 207-210

BISchV Bundesimmissionsschutzgesetz, Sechszwanzigste Verordnung zur Durchführung des Bundes-Immissionsschutzgesetzes (Verordnung über elektromagnetische Felder - 26. BImSchV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 14.5.1990 (BGBl. IS. 880), geändert durch Art. 13 des Gesetzes vom 16. Dezember 1996 (BGBl. IS. 1966)

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

Boss B.D., Turlejski K., Stanfield B.B., Cowan W.M., On the numbers of neurons on fields CA₁ and CA₃ of the hippocampus of Sprague-Dawley and Wistar rats, *Brain Research* 406 (1987) 280-287

Bundesamt für Strahlenschutz (BfS) (Zugriff 31.03.08)

Elektromagnetische Felder <http://www.bfs.de/de/elektro/nff> und <http://www.bfs.de/de/elektro/hff>,
Deutsches Mobilfunkforschungsprogramm http://www.bfs.de/de/elektro/forsch_mobil.html

Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), Sektion Nichtionisierende Strahlung, Elektromog in der Umwelt, Schweiz 2005

Bundesnetzagentur, Teilnehmerentwicklung (Zugriff 18.03.09)

http://www.bundesnetzagentur.de/enid/75f28c7658c633758f8a3fea701e811e,0/Marktbeobachtung/Mobilfunkdienste_vw.html#mobiltelefoniedienst_teilnehmerentwicklung

- Cammermeyer J., Is the solitary dark neuron a manifestation of postmortem trauma to the brain inadequately fixed by perfusion? *Histochemistry* 56 (1978) 97-115
- Croft R.J., Chandler J.S., Burgess A.P., Barry R.J., Williams J.D., Clarke A.R., Acute mobile phone operation affects neural function in humans, *Clinical Neurophysiology* 113 (2002) 1623-1632
- Croft R.J., Hamblin D.L., Spong J., Wood A.W., McKenzie R.J., Stough C., The effect of mobile phone electromagnetic fields on the alpha rhythm of human electroencephalogram, *Bioelectromagnetics* 29 (2008) 1-10
- D'Andrea J.A., Cho, C.K., Johnston S.A., Adair E.R., Microwave effects on the nervous system, *Bioelectromagnetics* 6 (2003) 107-47
- European Communities, 1999/519/EC, Council Recommendation of 9 March 1999 on radio equipment and telecommunications terminal equipment and the mutual recognition of their conformity, *Official Journal of the European Communities*, 1999
- Ferrer I., Serrano T., Soriano E., Naturally occurring cell death in the subicular complex and hippocampus in the rat during development, *Neuroscience Research* 8 (1990) 60-66
- Finnie J.W., Blumbergs P.C., Manavis J., Utteridge T.D., Gebski V., Swift J.G., Vernon-Roberts B., Kuchel T.R., Effect of global system for mobile communication (gsm)-like radiofrequency fields on vascular permeability in mouse brain, *Pathology* 33 (2001) 338-340
- Finnie J.W., Blumbergs P.C., Manavis J., Utteridge T.D., Gebski V., Davies R.A., Vernon-Roberts B., Kuchel T.R., Effect of long-term mobile communication microwave exposure on vascular permeability in mouse brain, *Pathology* 34 (2002) 344-347
- Finnie J.W., Blumbergs P.C., Cai Z., Manavis J., Kuchel T.R., Effect of mobile telephony on blood-brain barrier permeability in fetal mouse brain, *Pathology* 38 (2006) 63-65
- Forschungsverbund EMVU der TUM/ LMU, In vivo – Experimente unter Exposition mit hochfrequenten elektromagnetischen Feldern der Mobilfunkkommunikation – A Langzeituntersuchungen, Forschungsvorhaben des Bundesamtes für Strahlenschutz, Abschlussbericht, München 2007, www.emf-forschungsprogramm.de/forschung/biologie/biologie_abges/bio_050_AB.pdf

- Franke H., Ringelstein E.B., Stögbauer F., Electromagnetic fields (GSM 1800) do not alter blood-brain barrier permeability to sucrose in models in vitro with high barrier tightness, *Bioelectromagnetics* 26 (2005) 529-535
- Fritzer G., Göder R., Friege L., Wachter J., Hansen V., Hinze-Selch D., Aldenhoff J.B., Effects of short- and long-term pulsed radiofrequency electromagnetic fields on night sleep and cognitive functions in healthy subjects, *Bioelectromagnetics* 28 (2007) 316-325
- Gallyas F., Gasz B., Szigeti A., Mázló M., Pathological circumstances impair the ability of "dark" neurons to undergo spontaneous recovery, *Brain Research* 1110 (2006) 211-220
- Gollnick F. und Dubois W., Wirkung von EMF auf das menschliche Gehirn, Newsletter der Forschungsgemeinschaft Funk e.V. (FGF) 4/2007, Newsletter online 1-13, <http://www.fgf.de/publikationen/newsletter2007.html>
- Haarala C., Bjornberg L., Ek M., Laine M., Revonsuo A., Koivisto M., Hamalainen H., Effect of a 902 MHz electromagnetic field emitted by mobile phones on human cognitive function: A replication study, *Bioelectromagnetics* 24 (2003) 283-288
- Haarala C., Ek M., Bjornberg L., Laine M., Revonsuo A., Koivisto M., Hamalainen H., 902 MHz mobile phone does not affect short term memory in humans, *Bioelectromagnetics* 25 (2004) 452-456
- Haarala C., Bergman M., Laine M., Revonsuo A., Koivisto M., Hamalainen H., Electromagnetic field emitted by 902 MHz mobile phones shows no effects on children's cognitive function *Bioelectromagnetics* (2005) 144-150
- Haarala C., Takio F., Rintee T., Laine M., Koivisto M., Revonsuo A., Hamalainen H., Pulsed and continuous wave mobile phone exposure over left versus right hemisphere: effects on human cognitive function, *Bioelectromagnetics* (2007) 289-295
- Hamblin D.L., Wood A.W., Croft R.J., Stough C., Examining the effects of electromagnetic fields emitted by GSM mobile phones on human event-related potentials and performance during an auditory task, *Clinical Neurophysiology* 115 (2004) 171-178

LITERATURVERZEICHNIS

- Hamblin D.L., Croft R.J., Wood A.W., Stough C., Spong J., The sensitivity of human eventrelated potentials and reaction time to mobile phone emitted electromagnetic fields, *Bioelectromagnetics* 27 (2006) 265-273
- Hermann D.M. und Hossmann K.-A., Neurological effects of microwave exposure related to mobile communication, *Journal of Neurological Sciences* 152 (1997) 1-14
- Herr C.E.W., Nieden A. zur, Lindenstruth M., Stilianakis N.I., Seitz H., Eikmann T.F., Relating use of mobile phones to reported sleep quality, *Somnologie* 9 (2005) 199-202
- Hettenbach N., Einfluss chronischer elektromagnetischer Befeldung mit Mobilfunkstrahlen auf die Integrität der Blut-Hirn Schranke von Ratten, Dissertation LMU München 2007
- Hosseini-Sharifabad M. und Nyengaard J.R., Design-based estimation of neuronal number and individual neuronal volume in the rat hippocampus, *Journal of Neuroscience Methods* 162 (2007) 206-214
- Hossmann K.-A. und Hermann D.M., Effects of Electromagnetic Radiation of Mobile Phones on the Central Nervous System, *Bioelectromagnetics* 24 (2003) 49-62
- Huber R., Treyer V., Borbely A.A., Schuderer J., Gottselig J.M., Landolt H.P., Werth E., Berthold T., Kuster N., Buck A., Achermann P., Electromagnetic fields, such as those from mobile phones, alter regional cerebral blood flow and sleep and waking EEG, *Journal of Sleep Research* 11 (2002) 289-295
- Huber R., Schuderer J., Graf T., Jutz K., Borbely A.A., Kuster N., Achermann P., Radio frequency electromagnetic field exposure in humans: Estimation of SAR distribution in the brain, effects on sleep and heart rate, *Bioelectromagnetics* 24 (2003) 262-276
- Humphrey W.M., Dong HX., Csernansky C.A., Csernansky J.G., Immediate and delayed hippocampal neuronal loss induced by kainic acid during early postnatal development in the rat, *Developmental Brain Research* 137 (2002) 1-12

- Hutter H.P., Moshammer H., Wallner P., Kundi M., Subjective symptoms, sleeping problems, and cognitive performance in subjects living near mobile phone base stations, *Occupational and Environmental Medicine* 63 (2006) 307-313
- International Commission on Non-Ionizing Radiation Protection (ICNIRP), Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic and electromagnetic fields (up to 300 GHz), *Health Physics* 74 (1998) 494-522
- Ishida K., Shimizu H., Hida H., Urakawa S., Ida K., Nishino H., Argrophilic dark neurons represent various states of neuronal damage in brain insults: Some come to die and others survive, *Neuroscience* 125 (2004) 633-644
- Joubert V., Levequeb P., Cueille M., Bourthoumieu S., Yardina C., No apoptosis is induced in rat cortical neurons exposed to GSM phone fields, *Bioelectromagnetics* 28 (2007) 115-121
- Joubert V., Bourthoumieu S., Levequeb P., Yardina C., Apoptosis is induced by radiofrequency fields through the caspase-independent mitochondrial pathway in cortical neurons, *Radiation Research* 169 (2008) 38-45
- Kerr D.S., Campbell L.W. Applegate M.D., Brodish A. Landfield P.W., Chronic stress-induced acceleration of electrophysiologic and morphometric biomarkers of hippocampal aging, *Journal of Neuroscience* 77 (1991) 1316-1324
- Keuker J.I.H., Vollmann-Honsdorf G.K., Fuchs E., How to use the optical fractionator: an example based on the estimation of neurons in the hippocampal CA1 and CA3 regions of tree shrews, *Brain Research Protocols* 7 (2001) 211-221
- Kim T.-H., Huang T.-Q., Jang J.-J., Kim M.H., Kim H.-J., Lee J.-S., Pack J.K., Seo J.-S., Park W.-Y., Local exposure of 849 MHz and 1763 MHz radiofrequency radiation to mouse heads does not induce cell death or cell proliferation in brain, *Experimental and Molecular Medicine* 40 (2008) 294-303
- Kirino T., Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia, *Brain Research* 239 (1982) 57-69

Kirino T., Delayed neuronal death, *Neuropathology* 20 (2000) 95-97

Koivisto M., Revonsuo A., Krause C., Haarala C., Sillanmaki L., Laine M., Hamalainen H., Effects of 902 MHz electromagnetic field emitted by cellular telephones on response times in humans, *Neuroreport* 11 (2000a) 413-415

Koivisto M., Krause C., Revonsuo A., Laine M., Hamalainen H., The effects of electromagnetic field emitted by GSM phones on working memory, *Neuroreport* 11 (2000b) 1641-1643

Kövesdi E., Pál J., Gallyas F., The fate of "dark" neurons produced by transient focal cerebral ischemia in a non-necrotic and non-excitotoxic environment: Neurobiological aspects, *Brain Research* 1147 (2007) 272-283

Krause C.M., Sillanmaki L., Koivisto M., Haggqvist A., Saarela C., Revonsuo A., Laine M., Hamalainen H., Effects of electromagnetic fields emitted by cellular phones on the electroencephalogram during a visual working memory task, *International Journal of Radiation Biology* 76 (2000a) 1659-1667

Krause C.M., Sillanmaki L., Koivisto M., Haggqvist A., Saarela C., Revonsuo A., Laine M., Hamalainen H., Effects of electromagnetic field emitted by cellular phones on the EEG during a memory task, *Neuroreport* 11 (2000b) 761-764

Krause C.M., Haarala C., Sillanmaki L., Koivisto M., Alanko K., Revonsuo A., Laine M., Hamalainen H., Effects of electromagnetic field emitted by cellular phones on the EEG during an auditory memory task: a double blind replication study, *Bioelectromagnetics* 25 (2004) 33-40

Krause C.M., Bjornberg C.H., Pesonen M., Hulten A., Liesivuori T., Koivisto M., Revonsuo A., Laine M., Hamalainen H., Mobile phone effects on children's event-related oscillatory EEG during an auditory memory task, *International Journal of Radiation Biology* 82 (2006) 443-450

Krause C.M., Pesonen M., Haarala Bjornberg C., Hamalainen H., Effects of pulsed and continuous wave 902 MHz mobile phone exposure on brain oscillatory activity during cognitive processing, *Bioelectromagnetics* 28 (2007) 296-308

- Krettek J.E. und Price J.L., Projections from the amygdaloid complex and adjacent olfactory structures to the entorhinal cortex and to the subiculum in the rat and cat, *Journal of Comparative Neurology* 172 (1977) 723-752
- Lai H., Horita A., Guy A.W., Microwave irradiation affects radial-arm maze performance in the rat, *Bioelectromagnetics* 15 (1994) 95-104
- Landfield P.W., Braun L.D., Pitler T.A., Lindsey J.D., Lynch G., Hippocampal aging in rats: A morphometric study of multiple variables in semithin sections, *Neurobiology of Aging* 2 (1981) 265-275
- Lebedeva N.N., Sulimov A.V., Sulimova O.P., Korotkovskaya T.I., Gailus T., Investigation of brain potentials in sleeping humans exposed to the electromagnetic field of mobile phones, *Critical Reviews in Biomedical Engineering* 29 (2001) 125-133
- Lin J.C. und Lin M.F., Microwave hyperthermia-induced blood-brain barrier alterations, *Radiation Research* 89 (1982) 77-87
- Lorente de Nó R., Studies on the structure of the cerebral cortex II. Continuation of the study of the ammonic system, *Journal für Psychologie und Neurologie* 46 (1934) 113-177
- Mann K. und Röschke J., Effects of pulsed high-frequency electromagnetic fields on human sleep, *Neuropsychobiology* 33 (1996) 41-47
- Masuda H., Ushiyama A., Hirota S., Wake K., Watanabe S., Yamanaka Y., Taki M., Okhubo C., Effects of subchronic exposure to a 1439 MHz electromagnetic field on the microcirculatory parameters in rat brain, *In Vivo* 21 (2007) 563-570
- Mausset-Bonnefont A.L., Hirbec H., Bonnefont X., Privat A., Vignon J., de Seze R., Acute exposure to GSM 900-MHz electromagnetic fields induces glial reactivity and biochemical modifications in the rat brain, *Neurobiol Dis* 17 (2004) 445-454
- Merritt J.H., Chamness A.F., Allen S.J., Studies on blood-brain barrier permeability after microwave-radiation, *Radiation and Environmental Biophysics* 15 (1978) 367-377

LITERATURVERZEICHNIS

- McRee D.I. und Wachtel H., The effects of microwave radiation on the vitality of isolated frog sciatic nerves, *Radiation Research* 82 (1980) 536-246
- Miki T., Harris S.J., Wilce P.A., Takeuchi Y. and Bedi K.S., Effects of Age and Alkohol exposure during early life on pyramidal cell numbers in the CA1-CA3 region of the rat hippocampus, *Hippocampus* 14 (2004) 124-134
- Miki T., Satriotomo I., Li H-P., Matsumoto Y., Gu H., Yokoyama T., Lee K-Y., Bedi K.S., Takeuchi Y., Application of the physical disector to the central nervous system: Estimation of the total number of neurons in subdivisions of the rat hippocampus, *Anatomical Science International* 80 (2005) 153-162
- Moltrecht E.K.W., *Amateurfunk-Lehrgang Technik für das Amateurfunkzeugnis Klasse A*, Verlag für Technik und Handwerk, Baden-Baden, 2007
- Müller C.H., Projekt NEMESIS Niederfrequente elektrische und magnetische Felder und Elektrosensibilität in der Schweiz, Dissertation ETH Zürich (Nr. 13903) 2000
- Ning W., Xu S.J., Chiang H., Xu Z.P., Zhou S.Y., Yang W., Luo J.H., Effects of GSM 1800 MHz on dendritic development of cultured hippocampal neurons, *Acta Pharmacologica Sinica* 28 (2007) 1873-1880
- Odaci E., Bas O., Kaplan K., Effects of prenatal exposure to a 900 MHz electromagnetic field on the dentate gyrus of rats: a stereological and histopathological study, *Brain Research* 1238 (2008) 224-229
- Otto M. und Mühlendahl von K.E., *Mobilfunk und Gesundheit – Eine Information für Ärzte, Kinderumwelt gemeinnützige GmbH der Deutschen Akademie für Kinder und Jugendmedizin e.V.*, Osnabrück 2003
- Pakhomov A.G., Doyle J., Stuck B.E., Murphy M.R., Effects of high power microwave pulses on synaptic transmission and long term potentiation in hippocampus, *Bioelectromagnetics* 24 (2003) 174-181

- Paparini A., Rossi P., Gianfranceschi G., Brugaletta V., Falsaperla R., De Luca P., Romano Spica V.,
No evidence of major transcriptional changes in the brain of mice exposed to 1800 MHz GSM
signal, *Bioelectromagnetics* 29 (2008) 312-323
- Pavlidis C. und McEwen B.S., Role of adrenal steroid mineralocorticoid and glucocorticoid receptors
in long-term potentiation in the CA1 field of hippocampal slices, *Brain Research* 738 (1996) 229-
235
- Persson B.R.R., Salford L.G., Brun A., Eberhardt J.L., Malmgren L., Increased permeability of the
blood–brain barrier induced by magnetic and electromagnetic fields, *Annals of the New York
Academy of Science* 649 (1992) 356-358
- Preece A.W., Goodfellow S., Wright M.G., Butler S.R., Dunn E.J., Johnson Y., Manktelow T.C.,
Wesnes K., Effect of 902 MHz mobile phone transmission on cognitive function in children,
Bioelectromagnetics 26 (2005) 138-143
- Rasmussen T., Schliemann T., Sorensen J.C., Zimmer J., West M.J., Memory impaired aged rats: No
loss of principal hippocampal and subicular neurons, *Neurobiology of Aging* 17 (1996) 143-147
- Regel S.J., Tinguely G., Schuderer J., Adam M., Kuster N., Landolt H.P., Achermann P., Pulsed radio-
frequency electromagnetic fields: dose-dependent effects on sleep, the sleep EEG and cognitive
performance, *Journal of Sleep Research* 16 (2007a) 253-258
- Sadgrove M.P., Beaver C.J., Turner D.A., Effects of relative hypoglycemia on LTP and NADH imaging
in rat hippocampal slices, *Brain Research* 1165 (2007) 30-39
- Sadowski M., Wisniewskia H.M., Jakubowska-Sadowskaa K., Tarnawski M., Lazarewicz J.W.,
Mossakowski M.J., Pattern of neuronal loss in the rat hippocampus following experimental
cardiac arrest-induced ischemia, *Journal of the Neurological Sciences* 168 (1999) 13-20
- Salford L.G., Brun A.E., Stuesson K., Eberhardt J.L., Persson B.R.R., Permeability of the blood–brain
barrier induced by 915 MHz electromagnetic radiation, continuous wave and modulated at 8, 50
and 200Hz, *Microscopy Research and Technique* 27 (1994) 535-542

LITERATURVERZEICHNIS

- Salford L.G., Brun A.E., Eberhardt J.L., Malmgren L., Persson B.R., Nerve cell damage in mammalian brain after exposure to microwaves from GSM mobile phones, *Environmental Health Perspectives* 111 (2003) 881-883
- Schelkshorn S., Tejero S., Detlefsen J., Exposure setup for animal experiments using a parabolic reflector, *Radiation Protection Dosimetry* (2007) 1-4
- Schirmacher A., Winters S., Fischer S., Goeke J., Galla H.J., Kullnick U., Ringelstein E.B., Stögbauer F., Electromagnetic fields (1.8 GHz) increase the permeability to sucrose of the blood-brain barrier in vitro, *Bioelectromagnetics* 21 (2000) 338-345
- Schlessinger A.R., Cowan W.M., Swanson L.W. ,The time of origin of neurons in ammon's horn and the associated retrohippocampal fields, *Anatomy and Embryology* 154 (1978) 153-73
- Schneider J., Zum Einfluss chronischer Exposition in hochfrequenten elektromagnetischen Feldern von zwei Mobilfunkstandards (GSM und UMTS) auf Lern- und Gedächtnisleistungen bei Ratten (*Rattus norvegicus*), Dissertation LMU München 2008
- Seaman R.L. und Wachtel H., Slow and rapid responses to cw and pulsed microwave radiation by individual *Aplysia* pacemakers, *The Journal of microwave power* 13 (1978) 77-86
- Silny J., Auswirkungen hochfrequenter Felder auf den Menschen, Literaturstudie, Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, 2003
- Sousa N., Madeira M.D., Paula-Barbosa M.M., Effects of corticosterone treatment and rehabilitation on the hippocampal formation of neonatal and adult rats. An unbiased stereological study, *Brain Research* 794 (1998) 199-210
- Stagg R.B., Hawel L.H. III, Pastorian K., Cain C., Adey W.R., Byus C.V., Effect of immobilization and concurrent exposure to a pulse-modulated microwave field on core body temperature, plasma ACTH and corticosteroid, and brain ornithine decarboxylase, Fos and Jun mRNA, *Radiation Research* 155 (2001) 584-592
- Sterio D.C. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector, *Journal of Microscopy* 134 (1984) 127-36.

Swanson L.W., Brain Maps: Structure of the rat brain, Elsevier (1992) 26-42

Tattersall J.E.H., Scott I.R., Wood S.J., Nettell J.J., Bevir M.K., Wang Z., Somasiri N.P., Chen X., Effects of low intensity radiofrequency electromagnetic fields on electrical activity in rat hippocampal slices, Brain Research 904 (2001) 43-53

Thorlin T, Rouquette JM, Hamnerius Y, Hansson E, Persson M, Bjorklund U, Rosengren L, Ronnback L, Persson M., Exposure of cultured astroglial and microglial brain cells to 900 MHz microwave radiation, Radiation Research 166 (2006) 409-421

Uno H., Tarara R., Else J.G., Suleman M.A., Sapolsky R.M., Hippocampal damage associated with prolonged and fatal stress in primates, Journal of Neuroscience 9 (1989) 1705-1711

Van Groen T. und Wyss J.M., Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: Olfactory, cortical, subcortical and bilateral hippocampal formation projections, Journal of Comparative Neurology 302 (1990b) 515-528

Wachtel H., Seaman R., Joines W., Effects of low-intensity microwaves on isolated neurons, Annals of the New York Academy of Science 247 (1975) 46-62

Wagner P., Röschke J., Mann K., Hiller W., Frank C., Human sleep under the influence of pulsed radiofrequency electromagnetic fields: a polysomnographic study using standardized conditions, Bioelectromagnetics 19 (1998) 199-202

Wagner P., Röschke J., Mann K., Fell J., Hiller W., Frank C., Grozinger M., Human sleep EEG under the influence of pulsed radio frequency electromagnetic fields. Results from polysomnographies using submaximal high power flux densities, Neuropsychobiology 42 (2000) 207-212

Wang W., Redekera C., Bidmonc H.-J., Witte O.W., Delayed neuronal death and damage of GDNF family receptors in CA1 following focal cerebral ischemia, Brain Research 1023 (2004) 92-101

Ward T.R., Elder J.A., Long M.D., Svendsgaard D., Measurement of bloodbrain barrier permeation in rats during exposure to 2450-MHz microwaves, Bioelectromagnetics 3 (1982) 371-383

- West M.J., Slomianka L., Gundersen H.J.G., Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator, *The Anatomical Record* 231 (1991) 482-497
- West M.J., New stereological methods for counting neurons, *Neurobiology of Aging* 14 (1993) 275-285
- West M.J., Stereological methods for estimating the total number of neurons and synapses: issues of precision and bias, *Trends in Neurosciences* 22 (1999) 51-61
- WHO Fact Sheet 296, Informationsblatt zur Elektrosensibilität, 2005, www.who.int/emf
- WHO Research Agenda for Radio Frequency Fields, 2006, http://www.who.int/peh-emf/research/rf_research_agenda_2006.pdf
- Wilde G. J. C., Pringle A. K., Wright P., Iannotti F., Differential vulnerability of the CA1 and CA3 subfields of the hippocampus to superoxide and hydroxyl radicals In vitro, *Journal of Neurochemistry* 69 (1997) 883-886
- Xu S., Ning W., Xu Z., Zhou S., Chiang H., Luo J., Chronic exposure to GSM 1800-MHz microwaves reduces excitatory synaptic activity in cultured hippocampal neurons, *Neuroscience Letters* 398 (2006) 253-257
- Zeng Y.-S. und Xu Z.C., Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia, *Neuroscience Research* 37 (2000) 113-125
- Zhao T.Y., Zou S.p., Knapp p.E., Exposure to cell phone radiation up-regulates apoptosis genes in primary cultures of neurons and astrocytes, *Neuroscience Letters* 412 (2007) 34-38
- Zsombok A., Tóth Z., Gallyas F., Basophilia, acidophilia and argyrophilia of “dark” (compacted) neurons during their formation, recovery or death in an otherwise undamaged environment, *Journal of Neuroscience Methods* 142 (2005) 145-152

9 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Grenzwerte für Ganzkörper- und Teilkörper-SAR bei beruflich exponierten Personen und der Bevölkerung** 19
- Tabelle 2: beispielhafte Auswertung eines Gewebelockes (Block 304218 li), Flächenbestimmung für jede Reihe einzeln sowie Gesamtfläche (1023600 μm^2) und daraus errechnetes Volumen (CA1 sps = 0,307 mm^3), Anzahl der neu hinzugekommenen Zellen sowie die Dichte in dem ausgezählten Volumen (306 $\times 10^3/\text{mm}^3$), daraus errechnete Gesamtzahl der oberflächlichen CA1-Neuronen (93939) im dorsalen Hippocampus dieses Blockes** 48
- Tabelle 3: Volumen der oberflächlichen Pyramidenschicht im CA1-Bereich des dorsalen Hippocampus in mm^3 , Angaben für alle zehn Hippocampusblöcke der einzelnen Versuchsgruppen** 55
- Tabelle 4: Anzahl der berechneten CA1-Neuronen in der oberflächlichen Pyramidenschicht des dorsalen Hippocampus, Angaben für alle zehn Hippocampusblöcke der einzelnen Versuchsgruppen** 59

10 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2: Schematische Darstellung der C-förmigen Hippocampusstruktur im Rattenhirn (modifiziert nach Amaral und Witter, 1995) 4**
- Abbildung 2a: Schematische Illustration des Hippocampus mit der Darstellung eines koronaren Schnittes (modifiziert nach Amaral und Witter, 1995) und b: mikroskopische Aufnahmen eines koronaren Schnittbildes durch den rostralen Teil des Hippocampus 5**
- Abbildung 3: Schematische Darstellung der Informationskette im Hippocampus (<http://www.pageoneuroplasticity.info/>) 6**
- Abbildung 4a: mikroskopische Aufnahme und b: schematische Darstellung eines koronaren Schnittbildes durch den Hippocampus (Swanson, 1992) 7**
- Abbildung 5: mikroskopische Aufnahmen von Pyramidenzellen in 40facher Vergrößerung a: Kernfärbung und b: Silbernitratfärbung nach Golgi (http://public.tfh-berlin.de/~miszalok/Lectures/L14_Cortex/Cortex_d.htm, Zugriff 31.03.08) 10**
- Abbildung 6: elektrisches Feld zwischen zwei Polen mit gegensätzlicher elektrischer Ladung 12**
- Abbildung 7: Magnetfeld eines Stabmagneten (Institut für Medizinische Physik und Biostatistik, Vet. Univ. Wien unter www-med-physik.vu-wien.ac.at/.../image002.jpg) 13**
- Abbildung 8: elektromagnetisches Feld bei vertikaler Polarisation (nach Moltrecht, 2007) 14**
- Abbildung 9: Schematische Darstellung des Frequenzspektrums mit bekannten biologischen Wirkungen, Frequenzkategorien und Beispielen technischer Anwendungen (nach Müller, 2000) 16**

- Abbildung 10: Auflistung der möglichen Wirkungen steigender Körperstromdichten im Organismus (Bundesamt für Strahlenschutz, <http://www.bfs.de/de/elektro/nff/wirkungen.html>)** 22
- Abbildung 11: Foto eines modifizierten Makrolon Käfigs (Typ III H) mit Kunststoffdeckel, Einstreu und Wasserflasche (Schneider, 2008)** 34
- Abbildung 12a: Foto und b: Schematische Seitenansicht der Befeldungsanlage und des Aufbaus einer Expositions-kammer am Beispiel der GSM-Kammer (modifiziert nach Schelkshorn et al., 2007)** 36
- Abbildung 13: koronare Bilder aus dem rostralen Teil des Hippocampus (Block 273901 links) beispielhafte Vorgehensweise bei der Flächenbestimmung, a: Nativbild in 2,5facher Vergrößerung, b: Übergang zwischen CA1- und CA2-Bereich in 10facher Vergrößerung anzeigt und c: Ende der oberflächlichen CA1-Pyramidenzellschicht (CA1 sps) in 10facher Vergrößerung gekennzeichnet und d: CA1 sps in 2,5facher Vergrößerung umgrenzt** 42
- Abbildung 14a: schematische Darstellung eines Zählrahmens (*counting frame*) mit grünen Einschlusslinien und roten Ausschlusslinien, b: schematische Darstellung des Referenzschnittes mit grünen eingeschlossenen Objekten sowie roten ausgeschlossenen Objekten und c: schematische Darstellungen des nachfolgenden Schnittes (*lookup section*) mit neu hinzugekommenen (grüne Pfeile) und somit mitgezählten Objekten** 45
- Abbildung 15: schematische Darstellung der einzelnen Fokusebenen mit Zählrahmen bei der optischen Disektormethode (nach MBF Bioscience - MicroBrightField, Inc., www.stereology.info/images/475.jpg)** 46
- Abbildung 16: koronare Schnittbilder in 2,5facher Vergrößerung, a: nativ und b: CA1 sps umgrenzt, aus dem rostralen Teil des Hippocampus (Block 273901 links, 900er Reihe), c: nativ und d: CA1 sps umgrenzt, aus dem kaudalen Teil des Hippocampus (Block 269275 links, 4500er Reihe)** 53
- Abbildung 17: graphische Darstellung des Volumens (CA1 sps) der drei Versuchsgruppen (n=10, Mittelwert mit Standardabweichung)** 54

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

**Abbildung 18: graphische Darstellung der Pyramidenzellichte (CA1 sps) der drei
Versuchsgruppen (n=10, Mittelwert mit Standardabweichung) 57**

**Abbildung 19: graphische Darstellung der CA1-Neuronenzahl (CA1 sps) der drei
Versuchsgruppen (n=10, Mittelwert mit Standardabweichung) 58**

11 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AM	Amplitudenmodulation
Aqua dest.	Aqua destillata
BfS	Bundesamt für Strahlenschutz
BHS	Blut-Hirn Schranke
BImSchV	Bundes Immissionsschutz Verordnung
Ca	Kalzium
CW	Continous wave – kontinuierliche Welle
DMF	Deutsches Mobilfunkforschungsprogramm
E	elektrische Feldstärke in [V/m]
EMF	elektromagnetisches Feld
EMW	elektromagnetische Welle
F	Filialgeneration
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GK-SAR	Ganzkörper-SAR
GSM	Global System for Mobile Telecommunication
H	magnetische Feldstärke in [A/m]
Hz	Hertz
ICNIRP	International Commission on Non-Ionising Radiation Protection
kHz	Kilohertz
kBit	Kilobit
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
mA	Miliampere
MHz	Megahertz

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MW	Mittelwert
n	Anzahl
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PW	Pulsed wave – gepulste Welle
S	Leistungsflussdichte in [W/m ²]
SAR	Spezifische Absorptionsrate
SD	Standardabweichung
sps	Stratum pyramidale superficiale
SSK	Strahlenschutz Kommission
Str	Stratum
TDMA	Time Division Multiple Access
THz	Terahertz
TK-SAR	Teilkörper SAR
UMTS	Universal Mobile Telecommunication System
V	Volt
W	Watt
WHO	World Health Organization
ZNS	Zentrales Nervensystem

12 Danksagung

Herrn Prof. Dr. M. Stangassinger danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit diese Dissertation umzusetzen.

Herrn Dr. M. Stohrer möchte ich für die Betreuung der Arbeit, für die Hilfe bei der Auswertung und für die konstruktiven Verbesserungsvorschläge danken.

Vielen Dank an Sieglinde Hirmer und Karin Begsteiger für die Vorarbeit, die lehrreiche Anweisung im Labor und die immer freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Frau Dr. J. Schneider und Herrn Dr. Z. Gravhovac danke ich herzlich für die Beantwortung vieler Fragen sowie für die große Hilfe bei der Bearbeitung und Fertigstellung der Dissertation.

Weiterhin danke ich meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt und ermutigt haben.