

Bericht zum FGF- über mögliche Einflüsse von Mo

David J. Begley
Frank Gollnick

Bei dem international besetzten Fachtreffen im bayrischen Reisingburg in der Nähe von Ulm trafen sich vom 3. bis 6. November 2003 etwa 50 Experten zu einem grundlegenden Wissensaustausch.

In der Veranstaltung, die Teil einer von der Forschungsgemeinschaft Funk durchgeführten Veranstaltungsreihe in Kooperation mit der EU Aktion 'COST 281' war, gingen führende Experten aus zwölf Ländern der Frage nach, ob es zu einer vorübergehenden oder auch länger andauernden Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke (BHS; engl. „Blood-Brain-Barrier“ – BBB) durch Mobilfunkfelder kommen kann. Eine solche unnatürliche Öffnung der normalerweise relativ dichten Barriere zwischen Blutkapillaren und Gehirnflüssigkeit ist bei der Einwirkung *sehr starker* HF-Felder (Hochfrequenzfelder) jenseits der bestehenden Grenzwerte unumstritten. Die Öffnung der Barriere wäre sogar therapeutisch nutzbar, um Medikamente besser in das Gehirn schleusen zu können. Im „normalen“ Leben können Beeinträchtigungen der Blut-Hirn-Schranke



Workshop in Reisenburg

bilfunkfeldern auf die Blut-Hirn-Schranke

z.B. bei starkem Alkoholkonsum und bei Temperaturschock auftreten. Anlass zu Befürchtungen gaben in den letzten Jahren vor allem die Ergebnisse einer schwedischen Forschergruppe um den Mediziner Leif Salford, nach denen auch die Einwirkung *sehr schwacher* HF-Felder, wie z.B. im Mobilfunk üblich, im Tierexperiment zu einem Übertritt schädlicher Substanzen aus dem Blut in die Gehirnsubstanz führen soll.

In acht Grundlagen-orientierten Beiträgen und acht Fachbeiträgen aus den Bereichen der Zellbiologie, der Tierphysiologie und der Hochfrequenztechnik wurde das Thema aus unterschiedlichen Sichtwinkeln zum Teil kontrovers diskutiert. Im Einzelnen wurden dabei die Methoden zur akkuraten Messung der Durchlässigkeit der BHS und deren strukturelle und molekulare Komponenten sowie die vorliegenden

Ergebnisse von Experimenten an Zellkulturen und Ratten erörtert. Außerdem standen die Definition einer optimalen Simulation der Mobilfunkfelder im Labor sowie die exakte Temperaturüberwachung während der Experimente, aber auch die geeignete Tierhaltung zur Diskussion.

Das Programm des Workshops war entsprechend in die folgenden thematisch getrennten Sitzungen unterteilt:

- Struktur und Funktion der BHS
- Einflüsse von Mobilfunkfeldern auf die BHS anhand der Untersuchungsergebnisse an lebenden Tieren (*in vivo*)
- Einflüsse von Mobilfunkfeldern auf die BHS anhand der Untersuchungsergebnisse an Zellkulturen (*in vitro*)
- Diskussion der Dosimetrie und der thermischen Einflüsse von Mobilfunkfeldern auf die BHS.

Einführung zu Struktur und Funktion der Blut-Hirn-Schranke

In der einführenden Sitzung wurden Physiologie und Zellbiologie der normalen BHS im lebenden Organismus diskutiert. Außerdem stellte David Begley (Kings College London) die für die Durchlässigkeit der BHS relevanten Faktoren vor und erläuterte Methoden zur exakten Messung der Durchlässigkeit der BHS für lösliche Stoffe in Tieren, die auch auf Studien zum Einfluss von HF-Feldern anwendbar wären. Danach folgte ein Vortrag über Struktur, Funktion und Molekularbiologie der sogenannten 'tight junctions' (sehr gut abdichtende Verbindungsstrukturen zwischen den Zellen) in der BHS und in der

ebenfalls existierenden Blut-Liquor-Schranke sowie über Mechanismen der Regulation und Bildung solcher 'tight junctions' (Hartwig Wolburg, Universität Tübingen). Weitere Vorträge informierten über die auf den Menschen übertragbaren Methoden zur Bestimmung des Transports durch die BHS (Olaf Paulson, Universität Kopenhagen) und über das Potential von Experimenten an Zellkulturen zur Untersuchung von Einflüssen der HF-Felder auf die BHS (Hans-Joachim Galla, Universität Münster). Insgesamt bot die Sitzung einen aktuellen Überblick zum Thema BHS, die demnach als eine dynamische und reaktive Struktur aufgefasst werden muss, die auf physiologische Einflüsse und Umwelteinflüsse antwortet. Das moderne Konzept stellt die Schranke als eine strukturelle Barriere und als Transport- und Stoffwechselschnittstelle zwischen Blut und Gehirn dar, bestehend aus dem Hirnkapillarendothel (Zellschicht, welche die Blutkapillaren im Gehirn auskleidet) und den dazugehörigen angrenzenden Zellen.

Untersuchungen an Tieren

Den Anfang der Berichte über *In-vivo*-Studien (Experimente am Tier, hier typischerweise an Ratten) machte der Überblick von Florian Stögbauer (Universität Münster) über Einflüsse von HF-Feldern auf die BHS. Die vorliegende Literatur sei hier widersprüchlich: während einige Studien feststellen, dass HF-Felder im Tierexperiment zu einer messbar erhöhten „Extravasation“ großer Molekulargewichtsmarker (Austritt der Markierungsstoffe aus den Blutkapillaren in die Gehirnsubstanz





hinein) führen, konnten andere Arbeiten solche Befunde nicht reproduzieren. Das Verhältnis in solchen publizierten Studien läge bei etwa 3:1 negativer zu positiver Befunde.

Der folgende Vortrag (Konstantin-A. Hossmann und Klaus Fritze, Max-Planck-Institut für neurologische Forschung, Köln) berichtete unter anderem von einer punktförmig auftretenden, erhöhten Albuminextravasation (d.h. schädlicher Austritt von Eiweiß ins Gehirn) in Ratten nach Exposition in HF-Feldern, die allerdings erst bei dem höchsten angewandten Expositionswert mit einer Spezifischen Absorptionsrate (SAR) von 7,5 W/kg (also jenseits der geltenden Grenzwerte) signifikant war. Es wurde außerdem berichtet, dass mit der Untersuchungsmethode der „in situ Hybridisation“ eine geringe Induktion von HSP70 (ein Hitzeschockprotein) ebenfalls nur bei dem höchsten angewandten SAR-Wert demonstriert werden konnte. Das Fazit dieser Gruppe lautete, die gefundenen Effekte seien bei Feldstärken unterhalb der Grenzwerte vernachlässigbar gering und führten insofern nicht zu physiologisch bedeutsamen oder andauernden Veränderungen im Gehirn.

Bertil Persson (Universität Lund, Schweden) stellte aus einer großen Anzahl von Tieren gewonnene Daten vor, die Albuminextravasation nach HF-Exposition und zudem eine erhöhte Anzahl an „dark neurons“ („dunkle Neuronen“, d.h. nach entsprechender Anfärbung dunkel erscheinende, schadhafte Nervenzellen) im Gehirn auswiesen – Letzteres allerdings nur in einer neuen Studie an relativ wenigen Tieren gemessen. Bemerkenswert ist, dass in diesen Studien ein Anstieg der punktförmig auftretenden Albuminextravasation (s.o.) noch 50 Tage nach HF-Feldexposition beobachtet werden konnte. Die Bedeutung der dunklen Neuronen ist noch unklar; es könnte sich um Zellen an der Schwelle zur Apoptose (d.h. „programmierter Zelltod“) handeln oder aber um be-

schädigte Nervenzellen. Die Möglichkeit beschädigter Neuronen wurde auch von Leif Salford (Universität Lund) aus der selben Arbeitsgruppe in Schweden in Betracht gezogen. In dessen Studien konnte mittels des Farbstoffs „Cresyl Violet“ eine Zunahme der dunklen Neuronen nach HF-Exposition in einer relativ kleinen Stichprobe nachgewiesen werden. Die Neuronen im Cortex (Hirnrinde), im Hippokampus und in den Basalganglien (Hirnzellgruppen, die u.a. an der Bewegungssteuerung beteiligt sind) schienen besonders stark beeinflusst zu sein. Die Analyse der Hirngewebe-Präparate war allerdings nur halbquantitativ, die Forscher legten ein Bewertungsmuster von 0 (keine oder gelegentliche dunkle Neuronen) über 1 (moderates Auftreten) bis 2 (reichliches Auftreten) an. Eines der Kontrolltiere zeigte ein moderates Auftreten dunkler Neuronen ohne Exposition; in exponierten Tieren war im Allgemeinen eine signifikante Zunahme dunkler Neuronen zu verzeichnen, wobei einige der exponierten Tiere jedoch auch mit 0 bewertet wurden.

Stephanie Miller (Brooks Air Force Base, San Antonio, Texas) präsentierte Daten zum Thema Stress und BHS-Integrität unter Einwirkung von HF-Feldern, da diese Kombination in der Ausbildung des sogenannten „Golfkriegssyndroms“ eine entscheidende Rolle gespielt haben könnte (Das Syndrom bezeichnet eine rätselhafte Krankheit, aufgrund der heute etwa ein Viertel der Veteranen aus dem 1. Golfkrieg als arbeitsunfähig gilt). Die Studie an Ratten zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen in ihrer Bewegungsfreiheit eingeschränkten (d.h. einem gewissen Stress ausgesetzt) und freilaufenden Tieren. HF-Exposition bewirkte keine nachweisbar erhöhte Passage eines testweise verabreichten Sympathomimetikums (Pyridostigmin, ein zentralnervös erregendes Medikament) durch die BHS. Mit den gleichen Expositionseinrichtungen und vergleichbaren Versuchsbedin-

gungen wie bei Salford und Persson (s.o.) wurden deren Experimente nachvollzogen. Die noch nicht abgeschlossene Auswertung dieser Versuche zum Austritt von Eiweiß (Albumin) über die BHS ins Gehirn ergab bislang anhand einer photometrischen Auswertemethode keine erhöhten Werte in der Gruppe, die im Feld exponiert wurde. Hier wurde im Gegensatz zu Salford und Persson eine überzeugende Positivkontrolle durchgeführt (Verabreichung von Substanzen, welche die BHS öffnen), bei der deutlich sichtbare Effekte eintraten.

Der eingeladene australische Forscher John Finnie (Institute of Medical and Veterinary Science, Gilles Plains, Australien) musste seine Teilnahme an dem Workshop leider kurzfristig absagen. In seiner schriftlichen Zusammenfassung des Vortrags erörterte er die Lang- und Kurzzeitwirkungen von HF-Exposition auf die Durchlässigkeit der BHS im Gehirn von Mäusen. Als Maß der BHS-Dichtigkeit wurde erneut der Übertritt von Albumin gewählt. Sowohl in den Kontroll- als auch in den exponierten Gruppen war der Austritt des Eiweißes minimal.

James C. Lin (University of Illinois, Chicago) sprach über den Einfluss starker HF-Exposition auf die BHS und zeigte klar, dass ein thermischer Effekt bei einem Temperaturanstieg auf über 42° C die BHS öffnet. Dieser Effekt war innerhalb von nur 45 Minuten reversibel. Eine solche Öffnung der BHS könnte zu klinischen Zwecken genutzt werden, z.B. um bei der Behandlung von Hirntumoren chemotherapeutische Medikamente direkt und effektiver als bisher in das Gehirn einschleusen zu können.

Hiroshi Masuda und Chiyoji Ohkubo (National Institute of Public Health, Tokio) konnten mit einer sehr ausgefeilten neuen Methode die Blutkapillaren in der Pia Mater (zarte Bindegewebshülle auf der Hirnoberfläche) von Ratten direkt im lebenden Zustand mikroskopisch beobach-

ten. Mit dieser überzeugenden Technik und unter Anwendung sorgfältiger quantitativer Auswertemethoden konnten keine Veränderungen in der Blutzirkulation der Pia Mater und der BHS-Funktion in den dortigen Blutgefäßen nach HF-Exposition bis zu SAR-Werten von 4,8 W/kg (Mittelwert ganzes Gehirn, 3 x 10 Minuten Exposition) festgestellt werden (4 verschiedene Parameter). Im Gegensatz dazu demonstrierte Pierre Aubineau (Université Bordeaux 2) unter Einsatz einer sensiblen fluoreszenzmikroskopischen Technik, dass 900-MHz GSM HF-Felder zu einer erhöhten Albuminextravasation sowohl in den Mikrogefäßen der Gehirnmasse als auch in der Hirnhaut (Dura Mater, in der jedoch keine BHS ausgeprägt ist) führen. Hier fehlte eine quantitative Auswertung der Daten. Ein starkes Signal, das einen positiven Befund anzeigt, konnte nur in einigen wenigen Präparaten gezeigt werden.

Untersuchungen an Zellkulturen

Zwei Präsentationen mit *in vitro* an Zellkulturen erzielten Ergebnissen schlossen sich an. Helmut Franke (Universität Münster) stellte eine *In-vitro*-Studie vor, in der eine speziell angefertigte Apparatur zur reproduzierbaren, streng temperaturkontrollierten HF-Exposition von Monolayern (einlagige Zellschichten) aus frisch gewonnenen und dann in Kultur genommenen Endothelzellen des Schweins benutzt wurden. Die Tests an dem BHS-Modell ergaben unter Einfluss der Feldexposition keine Veränderung des gemessenen elektrischen Widerstands über die Zellschicht (Transendothelwiderstand, TER), eines sensiblen Anzeigers der 'tight junction'-Integrität in diesem Zellverband. Auch Änderungen in der Verteilung der 'tight junction'-Proteine ZO-1 und Occludin (die dort für den dichten Abschluss verantwortlich sind) nach Exposition mit einem SAR-Wert von 4,5 W/kg wurden nicht festgestellt. Der aktive Transport von Saccharose, Glukose (zwei Arten von Zucker) und einer im

Test verwendeten Aminosäure durch die Barrierschicht hindurch blieben ebenfalls unbeeinflusst.

Dariusz Leszczynski (STUK, Helsinki) präsentierte an zwei menschlichen Zelllinien gewonnene Ergebnisse (dauerhaft kultivierte Zellkulturen; Linien Eahy926 und Eahy926v1). Es handelt sich um zwei eng verwandte Zelllinien aus Endothelzellen der menschlichen Nabelschnur. Die gentechnischen Tests zeigten einen veränderten Status der Phosphorylierung von etwa 58 Proteinen nach HF-Exposition, darunter Hsp27 (ein Hitzeschock- oder Stressprotein) und einige der Proteine, die für die Regulierung der 'tight junctions' verantwortlich sind. Interessanterweise phosphorylierten die Proteine verschieden, sogar die aus den genannten sehr eng verwandten Zelllinien, die nicht aus dem Blutkreislauf im Gehirn stammen und normalerweise keine Monolayer mit hohem TER bilden (was ein Indiz für die Bildung von 'tight junctions' ist). Dennoch scheinen die Zellen auf HF-Feld-Stimulation zu reagieren.

Dosimetrie und Temperaturanalysen

In der Sitzung zu Dosimetrie und thermischen Einflüssen beschrieb Volkert Hansen (Universität Wuppertal) detailliert den Aufbau der *In-vitro*-Studien von Franke (s.o.) und hob die technischen Schwierigkeiten hervor, denen begegnet werden muss, um im Probenbereich gleichmäßige und gut quantifizierbare SAR-Werte zu erhalten. Außerdem wurde bei der Arbeit großer Wert auf die Temperaturmessungen während der Exposition und auf entsprechende Berechnungen gelegt. Hugo Kroeze (University Medical Center Utrecht) berichtete über ein einzigartiges, äußerst fein detailliertes Phantomkopfmodell, das eine exakte Untersuchung dreidimensionaler Temperatureffekte von HF-Exposition ermöglicht. Das Rechenmodell erlaubt auch die theoretische Untersuchung des exponierten Auges. Bei einer Exposition



mit 900 MHz war die Eindringtiefe in das menschliche Kopfmodell mit einem maximalen Temperaturanstieg von $0,12^{\circ}\text{C}$ in den äußeren Hirnschichten minimal; der Wert lag deutlich innerhalb der normalen, über den Tag verteilten physiologischen Schwankungen der Körperkerntemperatur. Ein Erwärmungseffekt beschränkte sich auf die Haut. Der Blutfluss im Gehirn ist ein Schlüsselfaktor für die Wärmeregulierung der bestrahlten Region und für die Begrenzung des Temperaturanstiegs. Dies kann mit solcher Genauigkeit nur mit derart detaillierten Modellen erforscht werden, weil hier sogar die Hirnkapillaren innerhalb der Auflösung liegen.

Diskussion und zusammenfassende Bewertung

Die Konferenz schloss mit einer Plenumsdiskussion. Helmut Franke fasste die präsentierten *In-vivo*-Studien zusammen, Christina Lohmann (Universität Münster) die *In-vitro*-Arbeiten. Einige der *In-vivo*-Studien zeigten eine Zunahme der Albuminextravasation nach HF-Exposition. Wie seit langem bekannt, ist ein Durchtritt einer kleinen Menge Albumin jedoch normal; der ventrikuläre Liquor (Hirnflüssigkeit) enthält etwa 16,7 Milligramm pro Deziliter Protein, davon 7,3 Milligramm Albumin (Cutler et al. 1970), ein Verhältnis von 1:820 zum Blutplasma. Cutler et al. errechneten einen Albuminfluss in den ventrikulären Liquor der Katze von $0,086 \pm 0,029$ Milligramm pro Minute, obgleich die Methode der ventrikulären und zisternalen Perfusion aus technischen Gründen das Hauptgewicht auf den Plexus choroidei (Adergeflecht im Gehirn, ausgehend von Pia Mater, und Hohlraumepithel) legt und nicht exakt den Beitrag extrazellulärer Hirnflüssigkeit am Übertritt über die BHS abschätzen kann.

Die in den meisten der auf der Konferenz vorgestellten *In-vivo*-Studien nachgewiesene Albuminextravasation in Kontrolltieren könnte Teil des regulären, normalerweise vorkommenden Albumin-

eintritts ins Gehirn sein. Womöglich versuchen wir einen geringen, aber harmlosen Anstieg zu erklären, der, wenn auch selten, ein normales Ereignis ist. Scheinbar braucht das Gehirn einen Anteil an Albumin in der extrazellulären Flüssigkeit, wenn auch in weit geringerer Konzentration als peripheres Gewebe. Die Bestimmung der Albuminextravasation in den bisher vorliegenden Studien und die in einigen Studien festgestellte merkliche Erhöhung dieser Extravasation sind kein exaktes Maß für die Albumindurchlässigkeit der BHS *per se* und somit auch nicht notwendigerweise ein Beleg für eine deutliche Erhöhung der Permeabilität der BHS für Albumin. Die BHS ist also nicht so absolut dicht für Eiweiße, Zucker, Aminosäuren und andere Stoffe, wie vielfach angenommen wird. Sie ist vielmehr vergleichbar mit dem Rumpf eines Holzschiffs, in das normalerweise immer eine gewisse Menge Wasser eindringt, das laufend herausgepumpt werden muss. Exakte Methoden gibt es für die Bestimmung der tatsächlichen Durchlässigkeit der BHS für lösliche Stoffe; eine Quantifizierung der Transportrate dieser Stoffe ist möglich. Solche exakten *In-vivo*-Permeabilitätsmessungen sollten auch in HF-Expositionsstudien angewendet werden. Nur so kann zuverlässig entschieden werden, ob von HF-Feldern möglicherweise hervorgerufene Permeabilitätsänderungen in einer signifikant erhöhten toxischen Belastung des Gehirns mit Albumin und anderen potentiell schädlichen, löslichen Stoffen des Blutserums resultieren.

Sobald durch HF-Felder induzierte Permeabilitätsänderungen *in vivo* gezeigt werden können, lassen sich mit Hilfe von *In-vitro*-Studien die Mechanismen dieser Veränderungen untersuchen. Die Durchführung von *In-vitro*-Studien allein hingegen kann dazu führen, dass wichtige Faktoren, wie die komplexe Zellverbindung aus Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten, Mikroglia und Neuronen, aus denen die BHS besteht, außer Acht gelassen bzw. *in vitro*

schwer oder gar nicht nachvollzogen werden können. Sind die Elemente eines Phänomens aber erst bekannt, dann können sie in einem *In-vitro*-System gut nachgestellt und näher untersucht werden.

Ein problematischer Faktor aller bisher vorliegenden *In-vivo*-Studien war die Exposition. Für die experimentelle Exposition von Tieren mit HF-Feldern entwickelte Systeme arbeiten mit verschiedenen SAR-Werten. In den meisten Fällen ist die Quantifizierung schwierig, besonders wenn die Versuchstiere sich während des Experiments bewegen können. Eine Bewegungseinschränkung der Tiere kann dagegen zu zusätzlichem Stress führen. Kritikpunkte in dieser Richtung wurden in der Diskussion vor allem gegen die Arbeiten von Leif Salford und Kollegen erhoben, weil deren Versuchsapparatur offenbar nicht den heute allgemein anerkannten Anforderungen genügt.

Die angemeldeten Zweifel konnten nicht ausgeräumt werden. Insofern muss es eine aktive, enge Zusammenarbeit zwischen Physikern, die verlässliche Expositionssysteme konstruieren, und den für die Auswertung der Effekte zuständigen Biologen geben. Beide Parteien müssen sich der Probleme der jeweils anderen bewusst sein und sich bemühen, geeignete Partnerlabors zu finden. Eine nachvollziehbare quantitative Auswertung der erhobenen Daten erscheint ebenfalls unabdingbar, da in dem Workshop auch die nur qualitativ ausgewerteten präsentierten Ergebnisse Zielpunkt der Kritik waren. Pierre Aubineaus positive Befunde hatten aus diesem Grund eher episodischen Charakter und konnten die anwesenden Experten zunächst nicht voll überzeugen. Hier müssen interne und unabhängige Reproduktionsstudien abgewartet werden, um eine eindeutige Aussage treffen zu können.

Es erscheint klar, dass HF-Felder im Bereich der Mobilfunkfrequenzen Effekte auf Gewebe haben können. Es bleibt jedoch zu klären, ob diese Wirkungen funktionell oder pathologisch von Bedeutung sind.

Dr. David Begley ist Neurowissenschaftler und einer der führenden Experten im Bereich der Blut-Hirn-Schranke. Er arbeitet in der 'Blood-Brain Barrier Group' am Centre for Neuroscience Research im Kings College in London.

Dr. rer. nat. Frank Gollnick ist Biologe und war lange Zeit Mitarbeiter im Physiologischen Institut II der Universität Bonn. Er ist nun als wissenschaftlicher Berater für die FGF tätig.

Literatur

- Cutler RPW, Murray JE and Cornick LR (1970) Variations in protein permeability in different regions of the cerebrospinal fluid. *Exper. Neurol.* 28: 257-265.

Anmerkung

- Ausführliche Berichte liegen in Form der Workshopbeiträge und eines Abschlusskommentars des Rapporteurs Helmut Franke im Internet unter <http://www.cost281.org> und <http://www.fgf.de> vor.
- Weiterführende und vertiefende Literatur zum Thema 'Blut-Hirn-Schranke' stellt auch der Bericht im FGF Newsletter Edition Wissenschaft Nr. 15 dar (zu finden unter <http://www.fgf.de/fup/publikat/edition.html>).