

Institut für Landwirtschaftliche Botanik  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

---

**Die Wirkung der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von  
Schwertträgerfischen (*Xiphophorus helleri*, Heckel) in einem geschlossenen,  
aquatischen Ökosystem: immunologische und hämatologische Untersuchungen**

**I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Grades

Doktor der Agrarwissenschaften

(Dr. agr.)

der

Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

zu Bonn

vorgelegt am 29. April 2005

von

Klaus Piepenbreier

aus

Essen

Referent: Prof. Dr. Roland Goerlich

Koreferent: Prof. Dr. Heinrich Enbergs

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.2005

Erscheinungsjahr: 2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

**Kurzfassung: Die Wirkung der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von Schwerträgerfischen (*Xiphophorus helleri*, Heckel) in einem geschlossenen, aquatischen Ökosystem: immunologische und hämatologische Untersuchungen**

**Problemstellung:** Die Wirkung von Raumflugbedingungen auf das Immun- und Abwehrsystem von Menschen und Nagetieren wurde seit Beginn der Weltraumfahrt untersucht. Wie sich die Mikrogravitation auf hämatologische und immunologische Parameter von Fischen auswirkt, ist dagegen bisher nicht Gegenstand der Forschung gewesen. Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, welche Wirkung die Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von Teleostern hat.

**Methoden:** An Bord der 9- bzw. 16-tägigen Weltraumflüge der STS-89 und STS-90 Space Shuttle-Missionen befanden sich jeweils vier Schwerträgerfische (*Xiphophorus helleri*, Heckel 1848), die im Closed Equilibrated Biological Aquatic System (C.E.B.A.S.) gehalten wurden. Zu den Raumflügen fanden parallel laufende Bodenkontrollexperimente statt. Zusätzlich wurden Fische aus vier terrestrischen C.E.B.A.S.-Testläufen und 39 weibliche *X. helleri*, die unter optimalen Bedingungen in Aquarien gehalten wurden, untersucht. Bei allen Versuchstieren ist das Differentialblutbild des Nierengewebes, die spontane Zellteilungsaktivität des Nierengewebes und die Phagozytoseaktivität von Phagozyten des Nierengewebes ermittelt worden.

**Ergebnisse:** Zwischen den Schwerträgern aus den Flug- und Bodenkontrollexperimenten traten bei den untersuchten Abwehrparametern keine signifikanten Unterschiede auf. Dagegen zeigten Fische aus terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten signifikante Veränderungen gegenüber den Aquarienkontrollen. Es kam zu einem Rückgang des prozentualen Anteils der Monozyten und Lymphozyten im Differentialblutbild sowie zu einem Rückgang der Phagozytoseaktivität und der spontanen Zellteilungsaktivität. Der Rückgang von Monozyten und Lymphozyten und die Hemmung der Phagozytoseaktivität gelten bei Teleostern als typische Stresssymptome. Außerdem kam es häufig zu signifikanten Differenzen zwischen den Daten von Schwerträgern aus terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten mit unterschiedlicher Dauer. Da es sich beim C.E.B.A.S. um ein selbsterhaltendes Ökosystem handelte, entwickelten sich die Umweltbedingungen im Verlauf einiger Experimente in der Weise, dass sie für die Schwerträger kritisch waren. So wirkten neben der Mikrogravitation weitere Umweltfaktoren auf das Abwehrsystem der *X. helleri* ein.

**Schlussfolgerung:** Anhand der vorliegenden Ergebnisse war es nicht möglich nachzuweisen, dass die Mikrogravitation einen Einfluss auf die untersuchten Abwehrparameter hatte. Wegen der signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der *X. helleri* aus terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten und denen der Aquarienkontrollen ist es wahrscheinlich, dass die kritischen Umweltbedingungen im C.E.B.A.S. die untersuchten Abwehrparameter - unabhängig von der Mikrogravitation - beeinflusst haben. So zeigten *X. helleri* aus terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten Symptome, die Teleosteer unter Einfluss von Stressoren ausbilden. Das häufige Auftreten von signifikanten Unterschieden zwischen den Daten von Schwerträgern aus terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten mit unterschiedlicher Dauer weist auf einen Zusammenhang zwischen der Dauer der Haltung unter kritischen Umweltbedingungen und dem Zustand des Abwehrsystems hin. Die Ergebnisse zeigen, dass es erst möglich sein wird die Wirkung der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von Teleostern zu beurteilen, wenn während der Weltraumflüge optimale Haltungsbedingungen gewährleistet sind.

**Abstract: The effect of microgravity on the defence system of swordtail fish (*Xiphophorus helleri*, Heckel) in a closed, aquatic ecosystem: immunological and haematological investigations**

**Background:** The effect of space flight conditions on the immune system of humans and rodents was investigated since the beginning of space flight. Until now there were no investigations of the influence of microgravity on haematological parameters and defence functions in fish. The objective of this work was to investigate the influence of microgravity on the defence system of teleosts.

**Methods:** Aboard the 9 and 16 days lasting STS-89 and STS-90 space shuttle missions were four female swordtail fish (*Xiphophorus helleri*, Heckel 1848) each. During the space flights the Closed Equilibrated Biological Aquatic System (C.E.B.A.S.) was the habitat of the fish. Parallel to the space flights ground control experiments were performed. In addition fish from four terrestrial C.E.B.A.S. test runs and 39 female *X. helleri* that were kept under optimal conditions in aquaria were examined. In all tested fish the differential haemogram of nephritic tissue, the spontaneous cell proliferation activity of nephritic tissue and the phagocytosis activity of nephritic phagocytes were determined.

**Results:** A comparison of the examined defence system parameters of *X. helleri* from the C.E.B.A.S. space flight and from ground control experiments did not show statistically significant differences. However fish of some terrestrial C.E.B.A.S. experiments showed significant differences compared to the aquarium controls. They showed a decrease of the percentage of monocytes and lymphocytes in the differential haemograms as well as a reduction of phagocytosis and spontaneous cell proliferation activity. The decrease of monocytes and lymphocytes and the inhibition of phagocytosis are typical stress symptoms of teleosts. In addition it frequently came to significant differences between the data of swordtails from terrestrial C.E.B.A.S. experiments with different duration. Since the C.E.B.A.S. was a self-sustaining ecosystem environmental conditions developed during some C.E.B.A.S. experiments in a way that they were critical for the swordtails. Thus in addition to microgravity other environmental factors had an influence on the defence system of *X. helleri*.

**Conclusion:** On the basis of the available results it was not possible to show an influence of microgravity on the examined defence system parameters. Due to the significant differences between the data of fish from terrestrial C.E.B.A.S. experiments and the aquarium controls it is probable that, regardless of microgravity, the environmental conditions in the C.E.B.A.S. module had an influence on the examined defence parameters. Hence swordtails of terrestrial C.E.B.A.S. experiments showed symptoms that teleosts develop under the influence of stress. The frequent occurrence of significant differences between data of swordtails from terrestrial C.E.B.A.S. experiments with different durations indicates a correlation between the duration of exposure of *X. helleri* to critical environmental conditions and the state of their defence system. The results show that realistic assessments of the influence of microgravity on the defence system of swordtail fish will be possible when optimal environmental conditions for swordtail fish can be maintained during space flights.

## Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	VI
	Tabellenverzeichnis	VIII
	Abbildungsverzeichnis	IX
<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	1
<b>2</b>	<b>Literaturübersicht</b> .....	3
<b>2.1</b>	<b>Immun- und Abwehrsystem der Teleosteer</b> .....	3
2.1.1	Lymphatische Organe der Teleosteer .....	3
2.1.2	Unspezifisches Abwehrsystem .....	5
2.1.2.1	Physikalische und chemische Barrieren .....	7
2.1.2.2	Unspezifische humorale Abwehrmechanismen .....	7
2.1.2.3	Unspezifische zelluläre Abwehrmechanismen .....	7
2.1.3	Spezifisches Abwehrsystem .....	9
2.1.3.1	Spezifische zelluläre Immunität .....	10
2.1.3.2	Spezifische humorale Immunität .....	11
2.1.4	Funktion der Leukozytentypen .....	12
<b>2.2</b>	<b>Wirkung von Umweltbedingungen auf das Immun- und Abwehrsystem von Teleosteen</b> .....	14
2.2.1	Wirkung der Mikrogravitation auf das Immunsystem von Säugetieren .....	14
2.2.2	Wirkung von Stressoren auf das Abwehrsystem von Teleosteen .....	16
2.2.2.1	Stress und allgemeines Anpassungssyndrom .....	16
2.2.2.2	Neuroendokrines System und Stress bei Teleosteen .....	17
2.2.2.3	Umweltbedingungen und Stress bei Teleosteen .....	18
2.2.2.4	Sozialer Stress bei Teleosteen .....	19
2.2.2.5	Wirkung der Dauer einer Stresssituation auf die Gesundheit von Teleosteen .....	20
2.2.2.6	Wirkung von Stressoren auf die Phagozyten von Teleosteen .....	21
2.2.2.7	Wirkung von Stressoren auf die Lymphozyten von Teleosteen .....	23
2.2.3	Direkte Wirkung von Umweltbedingungen auf das Abwehrsystem von Teleosteen .....	24

2.2.3.1	Wirkung von Ammonium, Ammoniak, Nitrit und Nitrat auf das Abwehrsystem von Teleosteen .....	24
2.2.3.2	Wirkung der Wassertemperatur auf die Phagozyten von Teleosteen .....	26
2.2.3.3	Wirkung der Temperatur auf das Differentialblutbild des Nierengewebes von Teleosteen .....	28
2.2.3.4	Wirkung der Temperatur auf die Zellteilungsaktivität der Nierenzellen von Teleosteen .....	30
2.2.3.5	Wirkungen von Sauerstoffmangel auf das Abwehrsystem von Teleosteen .....	31
<b>3</b>	<b>Zielsetzung</b> .....	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>34</b>
<b>4.1</b>	<b>C.E.B.A.S.-Experimente</b> .....	<b>34</b>
<b>4.2</b>	<b>C.E.B.A.S.-MINI MODUL</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>Differentialblutbild, spontane Zellteilungsaktivität, Phagozytoserate</b> .....	<b>41</b>
4.3.1	Nierenentnahme .....	42
4.3.2	Differentialblutbild .....	42
4.3.2.1	Nierenquetschpräparate .....	42
4.3.2.2	Färbung der Nierenquetschpräparate .....	42
4.3.2.3	Erstellen des Differentialblutbildes .....	43
4.3.3	Spontane Zellteilungsaktivität .....	44
4.3.3.1	Aufarbeitung der Proben .....	47
4.3.3.2	Färbung der Proben .....	47
4.3.3.3	Messung des DNA-Gehaltes .....	48
4.3.4	Phagozytoserate .....	49
4.3.4.1	Aufarbeitung der Proben .....	49
4.3.5	Statistik .....	51
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>53</b>
<b>5.1</b>	<b>Wasserwerte und Housekeepingdaten der C.E.B.A.S.-Experimente</b> .....	<b>53</b>

<b>5.2</b>	<b>Einfluss der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf das Abwehrsystem von <i>X. helleri</i></b> .....	56
5.2.1	Vergleich der Wasserwerte und Housekeepingdaten von Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten .....	56
5.2.2	Vergleich der Differentialblutbilder von <i>X. helleri</i> aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten .....	57
5.2.2.1	Anteil der Monozyten .....	57
5.2.2.2	Anteil der Makrophagen .....	59
5.2.2.3	Anteil der Metagranulozyten .....	60
5.2.2.4	Anteil der stabkernigen Granulozyten .....	61
5.2.2.5	Anteil der segmentkernigen Granulozyten .....	62
5.2.2.6	Anteil der eosinophilen Granulozyten .....	64
5.2.2.7	Anteil der Lymphozyten .....	65
5.2.2.8	Anteil der blastären Zellen .....	66
5.2.3	Spontane Zellteilungsaktivität .....	67
5.2.4	Phagozytoserate .....	68
<b>5.3</b>	<b>Einfluss der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von <i>X. helleri</i></b> .....	71
5.3.1	Vergleich der Wasserwerte und Housekeepingdaten von Flug- und Bodenkontrollexperimenten .....	71
5.3.2	Vergleich der Differentialblutbilder von <i>X. helleri</i> aus den Flug- und Bodenkontrollexperimenten .....	72
5.3.2.1	Anteil der Monozyten .....	72
5.3.2.2	Anteil der Makrophagen .....	73
5.3.2.3	Anteil der Metagranulozyten .....	74
5.3.2.4	Anteil der stabkernigen Granulozyten .....	75
5.3.2.5	Anteil der segmentkernigen Granulozyten .....	75
5.3.2.6	Anteil der eosinophilen Granulozyten .....	76
5.3.2.7	Anteil der Lymphozyten .....	77
5.3.2.8	Anteil der blastären Zellen .....	78
5.3.3	Spontane Zellteilungsaktivität .....	78
5.3.4	Phagozytoserate .....	79

<b>5.4</b>	<b>Einfluss der Dauer der orbitalen C.E.B.A.S.-Haltung auf das Abwehrsystem von <i>X. helleri</i></b> .....	80
5.4.1	Vergleich der Wasserwerte und Housekeepingdaten der orbitalen C.E.B.A.S.-Experimente mit unterschiedlicher Dauer .....	80
5.4.2	Vergleich der Differentialblutbilder von <i>X. helleri</i> aus orbitalen C.E.B.A.S.-Experimenten mit unterschiedlicher Dauer .....	81
5.4.2.1	Anteil der Monozyten .....	81
5.4.2.2	Anteil der Makrophagen .....	82
5.4.2.3	Anteil der Metagranulozyten .....	82
5.4.2.4	Anteil der stabkernigen Granulozyten .....	83
5.4.2.5	Anteil der segmentkernigen Granulozyten .....	83
5.4.2.6	Anteil der eosinophilen Granulozyten .....	84
5.4.2.7	Anteil der Lymphozyten .....	84
5.4.2.8	Anteil der blastären Zellen .....	85
5.4.3	Spontane Zellteilungsaktivität .....	85
5.4.4	Phagozytoserate .....	86
<b>5.5</b>	<b>Einfluss der Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf das Abwehrsystem von <i>X. helleri</i></b> .....	87
5.5.1	Vergleich der Wasserwerte und Housekeepingdaten der terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimente mit unterschiedlicher Dauer .....	87
5.5.2	Vergleich der Differentialblutbilder von <i>X. helleri</i> aus terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten mit unterschiedlicher Dauer .....	88
5.5.2.1	Anteil der Monozyten .....	88
5.5.2.2	Anteil der Makrophagen .....	89
5.5.2.3	Anteil der Metagranulozyten .....	90
5.5.2.4	Anteil der stabkernigen Granulozyten .....	91
5.5.2.5	Anteil der segmentkernigen Granulozyten .....	92
5.5.2.6	Anteil der eosinophilen Granulozyten .....	93
5.5.2.7	Anteil der Lymphozyten .....	93
5.5.2.8	Anteil der blastären Zellen .....	94
5.5.3	Spontane Zellteilungsaktivität .....	95
5.5.4	Phagozytoserate .....	96



<b>6</b>	<b>Diskussion</b> .....	98
<b>6.1</b>	<b>Wirkung der Mikrogravitation</b> .....	102
<b>6.2</b>	<b>Wirkung von Stress auf den Gesundheitszustand und das Abwehrsystem von Teleostern</b> .....	108
6.2.1	Wasserchemische und wasserphysikalische Bedingungen und Stress .....	109
6.2.2	Soziale Bedingungen und Stress .....	112
6.2.3	Dauer einer Stresssituation. ....	114
6.2.4	Wirkung von Stress auf Phagozyten .....	117
6.2.5	Wirkung von Stress auf Lymphozyten .....	120
<b>6.3</b>	<b>Direkte Wirkung von Umweltbedingungen auf den Gesundheitszustand und das Abwehrsystem von Teleostern</b> .....	122
6.3.1	Wirkung von Ammonium und Ammoniak auf den Gesundheitszustand .....	122
6.3.2	Wirkung von Nitrit auf den Gesundheitszustand .....	124
6.3.3	Wirkung von Ammonium, Ammoniak, Nitrit und Nitrat auf das Abwehrsystem .....	126
6.3.4	Wirkung der Umgebungstemperatur auf das Abwehrsystem .....	129
6.3.4.1	Wirkung der Umgebungstemperatur auf Phagozyten .....	130
6.3.4.2	Wirkung der Umgebungstemperatur auf das Differentialblutbild .....	131
6.3.4.3	Wirkung der Umgebungstemperatur auf die spontane Zellteilungsaktivität .....	135
6.3.5	Wirkung von Sauerstoffmangel auf den Gesundheitszustand und das Abwehrsystem .....	136
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	139
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	147
<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	169

Danksagung

Lebenslauf

## Abkürzungsverzeichnis

°dH	Grad deutscher Härte
µg	Mikrogravitation im Orbit
1g	Gravitation auf der Erdoberfläche
89BE	STS-89-Bodenkontrollexperiment
89FE	STS-89-Flugexperiment
89NT1	STS-89-Nutzlasttest 1
89NT2	STS-89-Nutzlasttest 2
90BE	STS-90-Bodenkontrollexperiment
90FE	STS-90-Flugexperiment
90NT1	STS-90-Nutzlasttest 1
90NT2	STS-90-Nutzlasttest 2
C.E.B.A.S.	Closed Equilibrated Biological Aquatic System
Con A	Concanavalin A
CRP	C-reactive-Protein
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DLR	Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V.
DNA	Desoxyribonucleid-Acide
DTH	Delayed-Type-Hypersensitivity
FKS	fötales Kälberserum
<i>g</i>	Gravitation
GALT	Gut-associated-lymphoid-Tissue
GvHR	Graft-versus-Host-Reaktion
HPA-Achse	Hypothalamo-Pituitary-Adrenal-Axis
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Konz.	Konzentration
KSC	Kennedy Space Center
LPS	Lipopolysaccharide
MAF	makrophagenaktivierender Faktor
MHC	Major-Histocompatibility-Complex
n	Stichprobenumfang

NASA	National Aeronautics and Space Administration
NCC	Natural-cytotoxic-Cells
PBS	Phosphate-buffered-Saline
PHA	Phythämagglutinin
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PVT	Payload-Verification-Test
sIg	Surface-Immunglobulin
STS	Space Transportation System

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Die lymphoiden Zellen und Gewebe der Fische .....	3
<b>Tabelle 2:</b>	Durchschnittliche Wasserwerte in der Standardhaltung am KSC .....	34
<b>Tabelle 3:</b>	C.E.B.A.S.-Experimente, die im Rahmen der STS-89- und STS-90-Mission durchgeführt wurden .....	35
<b>Tabelle 4:</b>	Technische Daten des C.E.B.A.S.-MINI MODULs .....	37
<b>Tabelle 5:</b>	Gewicht der in die C.E.B.A.S.-Experimente der STS-89 und STS-90 Space Shuttle-Missionen eingesetzten adulten <i>X. helleri</i> -Weibchen zu Beginn und am Ende der Versuche .....	41
<b>Tabelle 6:</b>	Filter und Funktion der Filter im Partec CA II Zellanalysesystem .....	48
<b>Tabelle 7:</b>	Signifikanzklassen und „Sternchen-Konvention“ .....	52
<b>Tabelle 8:</b>	Wasserchemische Kenndaten der STS-89 und STS-90 C.E.B.A.S.-Experimente .....	54
<b>Tabelle 9:</b>	Housekeepingdaten, die während der C.E.B.A.S.-Experimente aufgezeichnet wurden .....	55
<b>Tabelle 10:</b>	Veränderung funktioneller Parameter bei Leukozytenpopulationen von Vertebraten nach Einwirkung von Mikrogravitation .....	103
<b>Tabelle 11:</b>	Nach Weltraumflügen auftretende Veränderungen innerhalb der Leukozytenpopulationen bei verschiedenen Vertebratenspezies .....	106
<b>Tabelle 12:</b>	CEBAS-Experimente der STS-89- und STS-90-Mission .....	139
<b>Tabelle 13:</b>	Signifikante Veränderungen der Abwehrparameter von <i>X. helleri</i> aus terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten gegenüber Tieren aus der Standardhaltung .....	142
<b>Tabelle 14:</b>	Signifikante Unterschiede des Differentialblutbildes zwischen <i>X. helleri</i> -Populationen aus Weltraumexperimenten mit unterschiedlicher Dauer .....	143
<b>Tabelle 15:</b>	Signifikante Unterschiede des Differentialblutbildes zwischen <i>X. helleri</i> -Populationen aus terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten mit unterschiedlicher Dauer .....	144

## Abbildungsverzeichnis

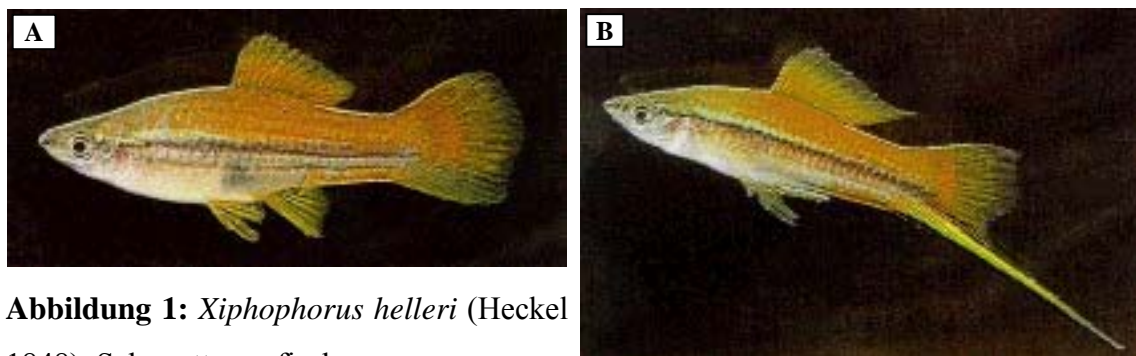
<b>Abbildung 1:</b>	<i>Xiphophorus helleri</i> (Heckel 1848), Schwertträgerfisch .....	1
<b>Abbildung 2:</b>	Histologischer Schnitt des haematopoetischen Nierengewebes von <i>X. helleri</i> .....	4
<b>Abbildung 3:</b>	Quetschpräparat des haematopoetischen Nierengewebes von <i>X. helleri</i> .....	5
<b>Abbildung 4:</b>	Übersicht über die wichtigsten bisher bekannten Immunfunktionen der Teleosteer .....	6
<b>Abbildung 5:</b>	Konstruktionsschema des C.E.B.A.S.-MINI MODULs .....	38
<b>Abbildung 6:</b>	Tanksystem des C.E.B.A.S.-MINI MODULs .....	39
<b>Abbildung 7:</b>	Aufsicht auf das C.E.B.A.S.-MINI MODUL in geschlossenem Zustand .....	39
<b>Abbildung 8:</b>	Zellzyklus im stark schematisierten DNA-Histogramm .....	45
<b>Abbildung 9:</b>	DNA-Histogramm vom Nierengewebe eines <i>X. helleri</i> .....	46
<b>Abbildung 10:</b>	Housekeepingdaten Experiment 89NT1 .....	170
<b>Abbildung 11:</b>	Housekeepingdaten Experiment 89NT2 .....	171
<b>Abbildung 12:</b>	Housekeepingdaten Experiment 89BE .....	172
<b>Abbildung 13:</b>	Housekeepingdaten Experiment 89FE .....	173
<b>Abbildung 14:</b>	Housekeepingdaten Experiment 90NT1 .....	174
<b>Abbildung 15:</b>	Housekeepingdaten Experiment 90NT2 .....	175
<b>Abbildung 16:</b>	Housekeepingdaten Experiment 90BE .....	176
<b>Abbildung 17:</b>	Housekeepingdaten Experiment 90FE .....	177

## 1 Einleitung

Im Januar und April 1998 befand sich das C.E.B.A.S.-MINI MODUL (Closed Equilibrated Biological Aquatic System, kurz C.E.B.A.S.) im Rahmen der STS-89 und STS-90 Space Shuttle-Missionen für neun bzw. sechzehn Tage im Weltraum. Die Weltraumflüge des C.E.B.A.S. waren bis dahin die vorläufigen Höhepunkte des C.E.B.A.S.-Projektes, einem Forschungsprogramm mit dem primären Ziel, ein artifizielles, aquatisches Ökosystem für den Einsatz unter Schwerelosigkeit zu entwickeln und dessen Funktionsfähigkeit unter Weltraumbedingungen zu überprüfen (Andriske et al., 2000). Das C.E.B.A.S. bot zudem die Möglichkeit zur Durchführung von Multigenerationsversuchen und zur Erforschung des Einflusses von Weltraumbedingungen auf aquatische Organismen (Blüm et al., 1994a,b; Blüm et al., 1995 a,b; Slenzka, 1998, 1999; Blüm, 2000a).

Beim C.E.B.A.S. handelte es sich um ein artifizielles, selbsterhaltendes, aquatisches Ökosystem, welches aus einer zoologischen, einer botanischen und einer mikrobiologischen Funktionseinheit bestand, wobei die zoologische Komponente als Haltungs-, Zucht- und Experimentiersystem für aquatisch lebende Organismen genutzt werden konnte (Blüm, 2000a).

Für die STS-89 und STS-90 Space Shuttle-Missionen wurden neben anderen Organismen vier adulte weibliche *Xiphophorus helleri* (Heckel 1848) (Schwertträgerfisch, Stamm: HELLERI 3, Abbildung 1) als Versuchstiere in das C.E.B.A.S. eingesetzt. Bei diesen Teleosteen (echte Knochenfische oder Neufische) sollte untersucht werden, wie sich die Mikrogravitation auf ausgewählte Parameter des Abwehrsystems auswirkte.



**Abbildung 1:** *Xiphophorus helleri* (Heckel 1848), Schwertträgerfisch.

A: adultes Weibchen, B: adultes Männchen (Foto: McDowall, 1990).

Die Erforschung des Abwehrsystems von Fischen, die unter Mikrogravitationsbedingungen gehalten wurden, ist im Hinblick auf die Entwicklung eines geschlossenen, aquatischen Ökosystems, das dem Menschen im Weltraum als alimentäres Lebenserhaltungssystem (Blüm, 2000b) dienen könnte, von besonderer Bedeutung. Fische werden in einem Ökosystem, wie dem C.E.B.A.S., nur dann ihre Rolle als Konsumenten und Produzenten tierischer Biomasse optimal ausfüllen können, wenn ihre Gesundheit und damit die uneingeschränkte Funktion ihres Abwehrsystems gewährleistet ist.

Eine Möglichkeit, Fische bei intensiver Kultur gesund zu erhalten, ist der prophylaktische Einsatz von „klassischen“ Vakzinen bzw. rekombinanten DNA-Vakzinen (Leong et al., 1997). Im Falle des Ausbruchs einer Krankheit muss zudem eine optimale Therapie gewährleistet sein. Um Prophylaxe und Therapie wirkungsvoll gestalten zu können, ist eine möglichst genaue Kenntnis der Mechanismen der Immun- und Abwehrfunktionen der Fische von größter Bedeutung. Nur wenn die Wirkung von Umweltfaktoren, Arzneimitteln, Chemotherapeutika und Vakzinen/Vakzinationsmethoden auf das Abwehrsystem und das spezifische zelluläre und humorale Immunsystem des Fischorganismus bekannt ist, ist ihr effektiver Einsatz zur Gesunderhaltung der Bestände gewährleistet (Nieber, 1988; Campos und Godson, 2003; Dumont et al., 2004).

Ziel der Untersuchungen an den *X. helleri*, die sich an Bord der STS-89 und STS-90 Space Shuttle-Missionen befanden, war es zu untersuchen, ob und in welcher Weise sich die Schwerelosigkeit auf das Abwehrsystem der Schwertträger auswirkte. Die gewonnenen Daten können dazu beitragen, die Auswahl geeigneter Prophylaxen, z. B. Vakzinierung und Selektion, zur Zucht unter Weltraumbedingungen geeigneter Fischarten zu erleichtern. Außerdem war es aufgrund der definierten Bedingungen im C.E.B.A.S. möglich, den Einfluss der Umweltbedingungen im C.E.B.A.S. auf das Abwehrsystem der *X. helleri* zu untersuchen (Goerlich und Piepenbreier, 2000).

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Immun- und Abwehrsystem der Teleosteer

Im Folgenden sollen die wichtigsten Bestandteile und Funktionen des Abwehrsystems der Teleosteer vorgestellt werden.

#### 2.1.1 Lymphatische Organe der Teleosteer

Bei den Teleosteen unterscheidet man zwischen primären (Niere und Thymus) und sekundären lymphatischen Organen (Milz, GALT (Gut-associated-lymphoid-Tissue)) (Zapata et al., 1996). In den primären lymphatischen Organen finden die Bildung und die antigenunabhängige Differenzierung von Vorläuferzellen zu immunkompetenten Lymphozyten statt (Hansen und Zapata, 1998). In den sekundären lymphatischen Organen kommt es zu einem Zusammentreffen zwischen den immunkompetenten Lymphozyten und dem Antigen (Zapata et al., 1996). Tabelle 1 gibt einen Überblick über die lymphoiden Gewebe und Zellen der Fische.

**Tabelle 1:** Die lymphoiden Zellen und Gewebe der Fische (nach Nakanishi, 2003).

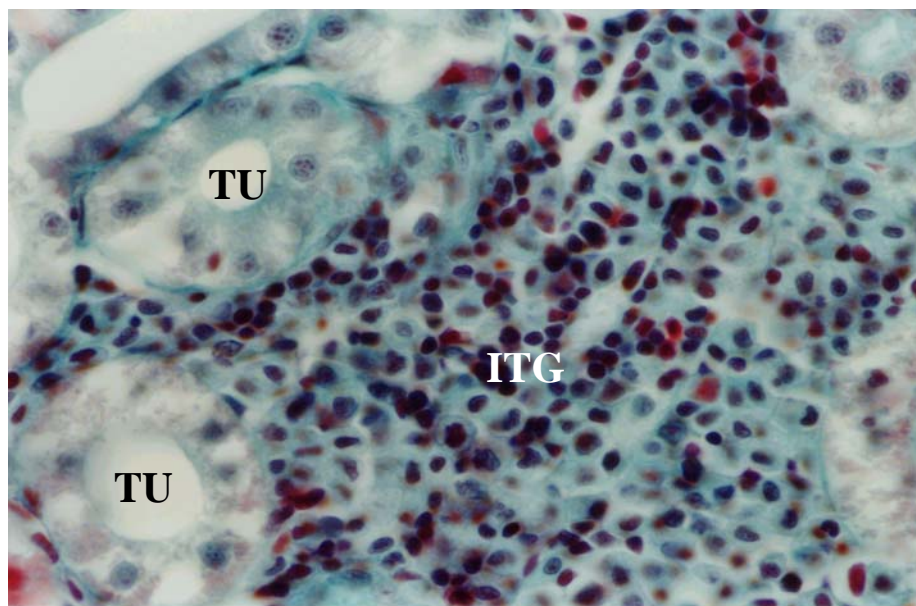
Lymphoide Zellen und Gewebe der Fische						
	Agnatha Cyclostomata		Chondrichthyes		Osteichthyes	
	Myxini	Petromy- zones	Holocephali	Elasmo- branchii	Actinopterygii, Chondrostei, Holostei	Teleostei
Thymus	○	○	●	●	●	●
Milz	○	○	●	●	●	●
Knochenmark	○	○	○	○	○	○
Lymphknoten	○	○	○	○	○	○
GALT	○	○	●	●	●	●
Lymphozyten	○	●	●	●	●	●
Plasmazellen	○	●	●	●	●	●
Makrophagen	●	●	●	●	●	●
Granulozyten	●	●	●	●	●	●

Myxini = Schleimaale, Petromyzones = Neunaugen, Holocephali = Chimären, Elasmobranchii = Haie und Rochen, Actinopterygii = Strahlflosser, Chondrostei = Altfische, Holostei = Mittelfische, Teleostei = Neufische, GALT = Gut-associated-lymphoid-Tissue, ● = vorhanden, ○ = nicht vorhanden.

Die Niere ist bei den Teleosteen das wichtigste lymphatische Organ, da es für die Differenzierung immunkompetenter Zellen von besonderer Bedeutung und zugleich ein

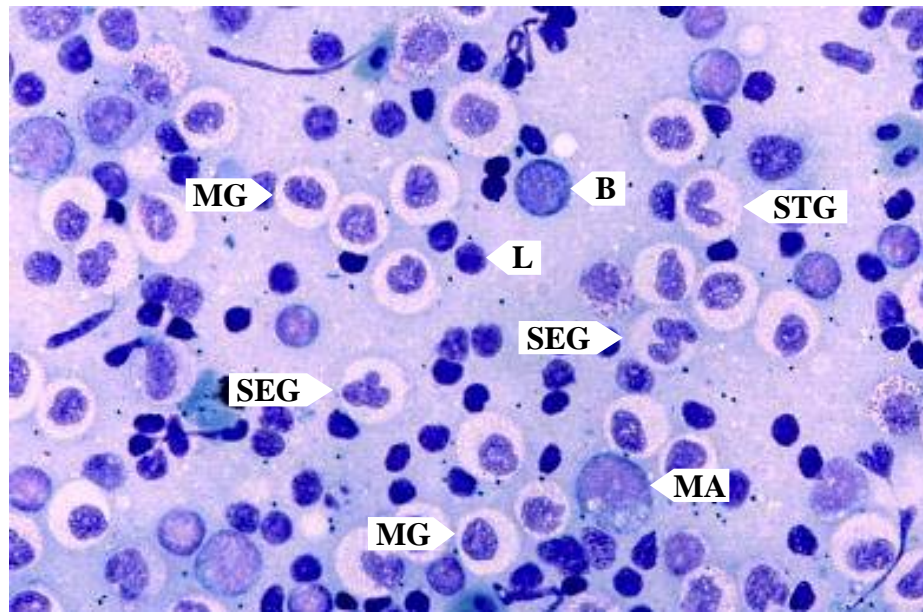


wichtiges hämatopoetisches Organ ist (Hansen und Zapata, 1998; Press und Evensen, 1999). Bei *X. helleri* wird die Niere als wichtigstes hämatopoetisches und immunopoetisches Organ angesehen (Schütt, 1994; Goerlich und Hamers, 1994; Hamers und Goerlich, 1995). Im Nierengewebe des Schwertträgers (Abbildung 2 und 3) konnten Hamers et al. (1997) sieben verschiedene Blutzelltypen und deren unterschiedliche Reifestadien nachweisen. Dies waren Erythrozyten, Lymphozyten, Thrombozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen. Die neutrophilen Granulozyten traten in drei verschiedenen Reifestadien auf. Dabei handelte es sich um Metagranulozyten, stabkernige Granulozyten und segmentkernige Granulozyten. Bis auf die Erythrozyten spielen alle genannten Zellen eine wichtige Rolle im Abwehrgeschehen der Teleosteer, was die Bedeutung der Niere als lymphatisches Organ unterstreicht. Al-Adhami und Kunz (1976) sprechen von der Teleosteerniere als postembryonale Quelle von haematopoetischen Stammzellen. Außerdem konnten antigenpräsentierende Zellen, antigenbindende Zellen, T-Lymphozyten und B-Lymphozyten in der Niere von Teleosteen nachgewiesen werden (Zapata und Cooper, 1990; Zapata et al., 1996; Hansen und Zapata, 1998).



**Abbildung 2:** Histologischer Schnitt des hämatopoetischen Nierengewebes von *X. helleri*.

Histologischer Schnitt (Aldehydfuchsin-Goldner-Färbung) mit Nierentubuli (TU) und intertubulärem, hämatopoetischem Gewebe (ITG) (1000-fache Vergrößerung).



**Abbildung 3:** Quetschpräparat des hämatopoetischen Nierengewebes von *X. helleri*.

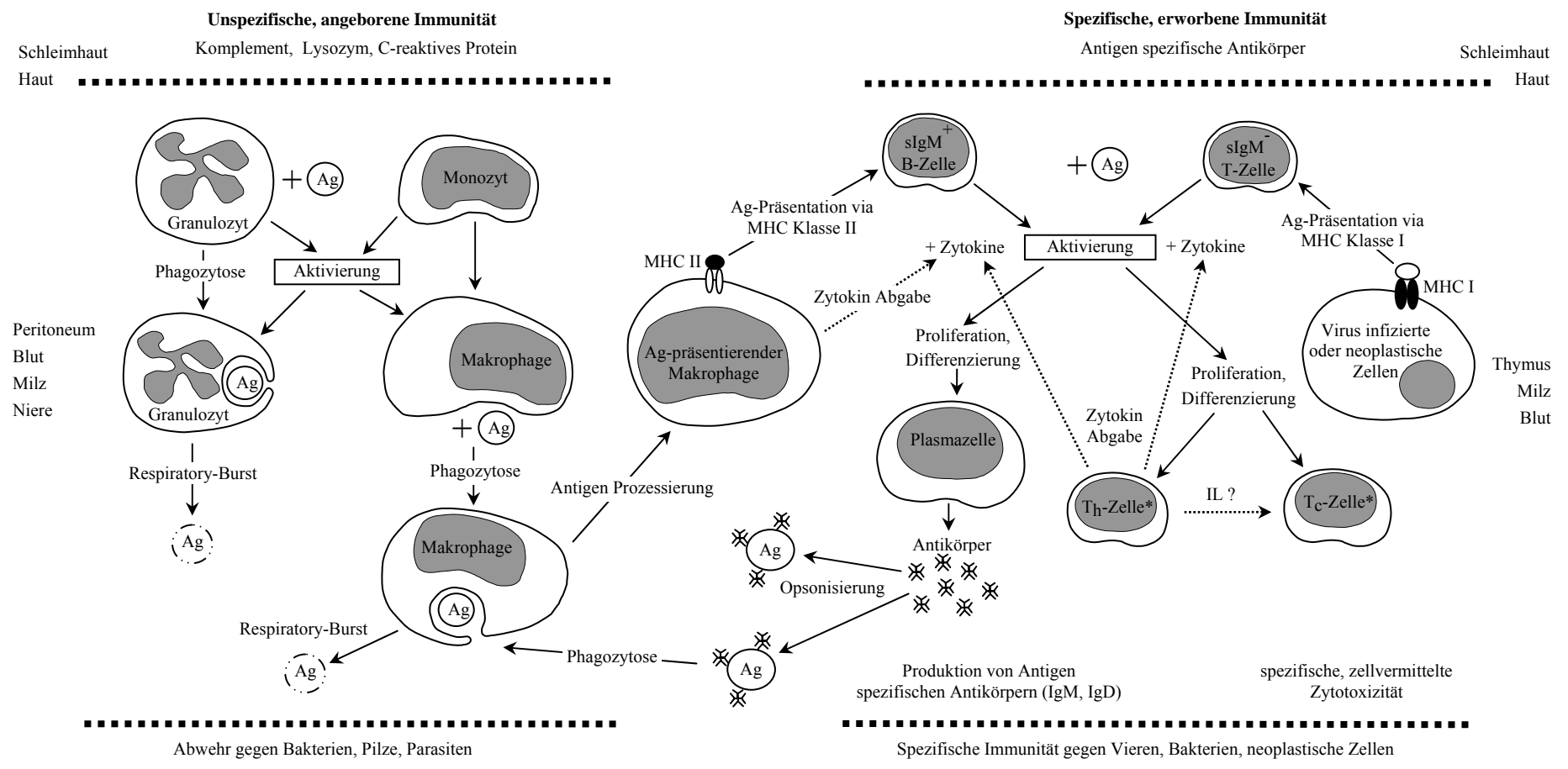
Quetschpräparat (Pappenheimfärbung) mit verschiedenen leukozytären Immunzelltypen (1000-fache Vergrößerung). B = blastäre Zelle, L = Lymphozyt, MA = Makrophage, MG = Metagranulozyt, SEG = segmentkerniger Granulozyt, STG = stabkerniger Granulozyt.

### 2.1.2 Unspezifisches Abwehrsystem

Bei Teleostern kann man zwischen einem spezifischen und einem unspezifischen Abwehrsystem unterscheiden. Abbildung 4 gibt einen Überblick über die wichtigsten, bisher bekannten Immunfunktionen der Teleosteer.

Folgende Mechanismen gehören bei den Teleostern zur unspezifischen Abwehr:

- physikalische und chemische Barrieren gegen das Eindringen von Mikroorganismen, wie z. B. Schuppen, Epithelzellen und Schleimhäute (Ellis, 2001),
- unspezifische humorale Abwehrmechanismen, wie z. B. das Komplement (Ellis, 2001; Holland und Lambris, 2002), die Lysozyme, das Alpha2-macroglobulin und das C-reaktive-Protein (Watts et al., 2001),
- unspezifische zelluläre Abwehrmechanismen, wie z. B. die Phagozytose (Neumann et al., 2001) und die unspezifische Zytotoxizität (Ishimoto et al., 2004).



**Abbildung 4:** Übersicht über die wichtigsten bisher bekannten Immunfunktionen der Teleostee.

Gepunktete Pfeile zeigen Funktionen, die aufgrund der Ergebnisse von Proliferationsassays wahrscheinlich sind.  
 Ag = Antigen, Ig = Immunglobulin, MHC = major histocompatibility complex, sIg = surface-Immunglobulin, IL = Interleukin, T<sub>h</sub>-Zelle = T-Helfer-Lymphozyt, T<sub>c</sub>-Zelle = zytotoxischer T-Lymphozyt (\* Die Existenz von T-Helfer und zytotoxischen T-Zellen ist aufgrund der Ergebnisse von funktionellen Proliferationsassays sehr wahrscheinlich. Beide Zelltypen konnten bisher noch nicht als eigenständige Zellpopulationen nachgewiesen werden). Abbildung nach Köllner et al. (2002).

### **2.1.2.1 Physikalische und chemische Barrieren**

Schuppen, Haut und Schleimhäute der Teleosteer schützen vor Verletzungen und verhindern das Eindringen von Mikroorganismen. Sie bilden daher eine erste physikalische und chemische Barriere (Ellis, 2001). Dabei bilden die Schuppen einen mechanischen Schutz. Haut und Schleimhäute der Fische beinhalten zudem Stoffe, die bakterizide Wirkungen besitzen, wie z. B. antibakterielle Peptide, Lysozyme, Lektine und Proteasen (Ellis, 2001).

### **2.1.2.2 Unspezifische humorale Abwehrmechanismen**

Humorale Substanzen und Zellsekrete, wie die Faktoren des Komplementsystems, das C-reaktive-Protein, Interferone und Transferine, tragen ebenfalls zur unspezifischen humoralen Abwehr von infektiösen Erregern bei (Yano, 1996; Ingram, 1998).

### **2.1.2.3 Unspezifische zelluläre Abwehrmechanismen**

Neben den unspezifischen humoralen Abwehrmechanismen existieren bei den Teleostern auch unspezifische zelluläre Abwehrfunktionen. Dazu gehören die Phagozytose, Entzündungsreaktionen und die unspezifische Zytotoxizität. An diesen unspezifischen zellulären Reaktionen sind Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten und basophile Granulozyten sowie unspezifische zytotoxische Zellen beteiligt (Secombes, 1996).

Unter Phagozytose versteht man die Aufnahme, Abtötung und Verdauung von Organismen durch Phagozyten (Secombes, 1996; Köllner et al., 2002).

Ein Pathogen, welches in das Gewebe eines Wirtes eingedrungen ist, aktiviert ein Netzwerk von phagozytierenden Zellen (z. B. Granulozyten, Monozyten, Makrophagen), welches dazu beiträgt, die eingedrungenen Erreger vollständig zu zerstören oder ihre Verbreitung zu verhindern (Secombes, 1996; Gerwick et al., 2002). Eine besonders wichtige Rolle spielt die Phagozytose von infektiösen Agenzien bei Entzündungsreaktionen des Teleosteerorganismus (Secombes, 1996).

Bei den Teleostern sind Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten und bei manchen Spezies eosinophile Granulozyten die wichtigsten phagozytierenden Zellen (Ainsworth, 1992; Neumann et al., 2001; Köllner et al., 2002). Sie sind dazu in der Lage, eine Vielzahl verschiedener immunogener und nicht immunogener Partikel und löslicher Stoffe aufzunehmen und zu verdauen (Ainsworth, 1992; Secombes und Fletcher, 1992; Dorin et al., 1993; Steinhagen und Jendrysek, 1994; Dannevig et al., 1994; Neumann et al., 2001). Dannevig et al. (1994) konnten auch bei Endothelzellen der Niere und parenchymatischen Zellen der Leber Phagozytoseaktivität feststellen.

Die Phagozytoseleistung kann durch so genannte Oponine gefördert werden. Bei Teleostern konnten Oponisierungseffekte durch das C-reaktive-Protein (CRP) (Nakanishi et al., 1991; Kodama et al., 1999; Bayne und Gerwick, 2001; Ellis, 2001; Watts et al., 2001), Antikörper (Chen et al., 1998; Barnes et al., 2002) und Komponenten des Komplementsystems gezeigt werden (Nakao und Yano, 1998; Nonaka und Smith, 2000; Holland und Lambris, 2002; Lange et al., 2004).

Die Aufnahme von Partikeln in die Zelle ist ein aktiver Prozess, dessen Kinetik viele verschiedene Faktoren beeinflussen können. Leiro et al. (1995) zeigten, dass *in vitro* sowohl die Temperatur als auch die Inkubationszeit und das Verhältnis von Phagozyten zum Pathogen Einfluss auf die Phagozytose haben.

Die Mechanismen, mit denen phagozytierte Pathogene abgetötet werden, lassen sich in sauerstoffabhängige und sauerstoffunabhängige unterteilen. Bei den Erstgenannten kommt es während des Phagozytosevorgangs zum so genannten Respiratory-Burst, einem sprunghaften Anstieg der O<sub>2</sub>-Aufnahme durch phagozytierende Zellen. Der Anstieg der Sauerstoffaufnahme ist auf die Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (z. B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bzw. Stickstoffverbindungen (z. B. NO<sub>2</sub>) zurückzuführen, die dazu in der Lage sind, pathogene Erreger abzutöten (Secombes, 1996; Neumann et al., 2001).

Neben den Tötungsmechanismen, die sauerstoffabhängig sind, besitzen Phagozyten auch eine Vielzahl von Enzymen (z. B. Lysozym), die dazu in der Lage sind, Pathogene abzutöten. Aber auch kationische Proteine mit bakterizider Wirkung (Kelly et al., 1990; Neumann et al., 2001) und zytotoxische Zytokine (z. B. Tumor-Nekrose-Faktoren) können zur sauerstoffunabhängigen Abtötung von Pathogenen beitragen (Secombes, 1996).

Die Phagozyten spielen nicht nur eine wichtige Rolle bei der Abtötung pathogener

Erreger, sondern sind auch als akzessorische Zellen von großer Bedeutung für das Abwehrsystem der Fische (Köllner et al., 2002). Außerdem sind sie ein wichtiges Bindeglied zwischen der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr. Akzessorische Zellen sind nicht lymphoide Zellen, die durch Präsentation von Antigen, Membrankontakt und Sekretion von Zytokinen kostimulatorische Aktivität entwickeln und die Proliferation und Differenzierung von T- und B-Zellen begünstigen (Keller, 1994; Köllner et al., 2002). Clem et al. (1991) und Vallejo et al. (1992) zeigten, dass akzessorische Zellen auch bei den Fischen eine notwendige Voraussetzung für eine Lymphozytenreaktion sind.

Eine wichtige Funktion akzessorischer Zellen ist die Antigenpräsentation prozessierter Antigene mit Hilfe des MHC I- bzw. MHC II-Komplexes (Major-Histocompatibility-Complex) und die Abgabe von löslichen Zytokinen, wie z. B. IL-1 $\beta$  (IL = Interleukin) und Eicosanoide, die Lymphozyten aktivieren können (Dijkstra et al., 2001; Hansen und Patra, 2002; Köllner et al., 2002; Nakanishi et al., 2002). Durch histologische Untersuchungen an Makrophagen aus Niere, Milz und Darm konnte nachgewiesen werden, dass diese Zellen nach einer Immunisierung Antigene auf ihrer Zelloberfläche tragen und Lymphozyten präsentieren (Lamers und De Haas, 1985; Rombout und van den Berg, 1989; Vallejo et al., 1990).

Die oben beschriebenen unspezifischen Abwehrmechanismen haben eine große Bedeutung für das Abwehrsystem der Teleosteer. Sie stellen poikilothermen Tieren schnell wirkende und relativ temperaturunabhängige Abwehrmechanismen bereit, die viele Vorteile gegenüber dem langsameren und temperaturempfindlicheren spezifischen Immunsystem haben (Ellis, 2001). Für die besondere Rolle der unspezifischen Abwehrmechanismen spricht außerdem, dass sie wahrscheinlich nicht unwesentlich dazu beitragen, spezifische Immunreaktionen auszulösen und zu steuern (Dixon und Stet, 2001).

### **2.1.3 Spezifisches Abwehrsystem**

Fische sind die phylogenetisch ältesten Vertebraten, die ein spezifisches Immunsystem besitzen, was sich insbesondere in dem Vorhandensein von Lymphozyten, Immunglobulin, MHC und T-Zell-Rezeptoren widerspiegelt (Nakanishi, 2003). Das

Abwehrsystem der Teleostee ist dazu in der Lage, eine spezifische Immunantwort auszubilden, die der der Säugetiere ähnlich ist. Dennoch ist das Abwehrsystem der Teleostee wesentlich einfacher und undifferenzierter aufgebaut als das der Mammalia (Nakanishi, 2003).

### 2.1.3.1 Spezifische zelluläre Immunität

Die verschiedenen Abwehrfunktionen der spezifischen zellulären Immunität werden durch Zellen vermittelt (Manning und Nakanishi, 1996). Eine besonders wichtige Rolle spielen hierbei die T-Lymphozyten. *In vivo* zeigt sich die spezifische zellvermittelte Immunität u.a. in Form der Transplantat-Abstoßungsreaktion, der Transplantat-gegen-Wirt-Reaktion (Graft-versus-Host-Reaktion (GvHR)) und der Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (Delayed-Type-Hypersensitivity, DTH) (Nakanishi et al., 1999).

Bei der Transplantat-Abstoßungsreaktion kommt es zu einer Infiltration des übertragenen Gewebes durch Lymphozyten und Makrophagen, was zu einer Zerstörung des Transplantates führt. CD8<sup>+</sup>-Zellen, die bei den Mammaliern die Transplantatabstoßung vermitteln, konnten bei *Oncorhynchus mykiss* (Regenbogenforellen) nachgewiesen werden (Hansen und Strassburger, 2000). Außerdem war es bei *Ictalurus punctatus* (Getüpfelter Gabelwels) möglich, zwei verschiedene Zelltypen mit spezifischer zytotoxischer Aktivität nachzuweisen. Beide Zelltypen zeigten T-Zell-Rezeptoren und lytisch wirkender Granula (Zhou et al., 2001). Bei der GvH-Reaktion handelt es sich um eine Reaktion des Transplantates gegen das Wirtsgewebe. Voraussetzung für eine solche Reaktion ist das ausreichende Vorhandensein von immunkompetenten Zellen im transplantierten Gewebe. Im Wesentlichen kommt es dabei zu ähnlichen Immunreaktionen wie bei der Transplantat-Abstoßungsreaktion (Nakanishi, 1994).

Auch die DTH-Immunantwort konnte bei Teleosteen nachgewiesen werden (Manning und Nakanishi 1996; Nakanishi et al., 1999). Typische Symptome einer DTH-Reaktion treten auf, wenn einem vorher sensibilisierten Teleostee das entsprechende bakterielle Antigen erneut intradermal injiziert wird. Nach ein bis zwei Tagen kommt es zu einer Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen und einer Anschwellung und

Verhärtung am Ort der Injektion (Manning und Nakanishi, 1996). Allerdings können nicht mit allen Antigenen derartige Reaktion hervorgerufen werden. Manning und Nakanishi (1996) schließen daraus, dass bei Teleostern nur sehr starke und persistierende Immunogene dazu in der Lage sind, eine Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ auszulösen.

### **2.1.3.2 Spezifische humorale Immunität**

Unter spezifischer humoraler Immunität versteht man die Immunreaktionen, die durch spezifische, d.h. gegen ganz bestimmte Erreger/Antigene gerichtete Antikörper vermittelt werden. Die immunkompetenten B-Lymphozyten sind die Träger der spezifischen humoralen Immunität, da sie die Produzenten der spezifischen Antikörper sind (Köllner et al., 2002; Castillo et al., 1993). Teleostere sind in der Lage, spezifische Antikörper gegen eine Vielzahl von Antigenen zu bilden. Bisher konnten bei Teleostern zwei Antikörpertypen nachgewiesen werden: IgM und IgD (Ig = Immunglobulin) (Wilson et al., 1997; Stenvik et al., 2001; Hirono et al., 2003). Das tetramere IgM der Teleostere gleicht in vielerlei Hinsicht dem pentameren IgM der Säugetiere (Wilson und Warr, 1992). Über die Funktion des IgD bei Teleostern ist noch wenig bekannt, jedoch lassen Untersuchungen von Stenvik et al. (2001) darauf schließen, dass IgD hauptsächlich als B-Zell-Rezeptor exprimiert wird, ähnlich dem IgD der Säugetiere.

Eine bedeutende Eigenschaft der spezifischen Immunität der Säugetiere ist das immunologische Gedächtnis. Bei Teleostern konnte gezeigt werden, dass es bei der zweiten Begegnung mit einem Antigen zu einer verstärkten Antikörperproduktion kommt. Diese ist in ihrer Intensität aber nicht annähernd so stark wie bei den Säugetieren (Tatner, 1986; Arkoosh und Kaattari, 1991). Arkoosh und Kaattari (1991) wiesen nach, dass die Sensitivität für das Antigen bei einem Zweitkontakt verstärkt ist. Die bei den Säugetieren typischen Merkmale dieses Mechanismus (exponentieller Anstieg der monomeren Immunglobuline im Serum, Isotyp Switch, Anstieg der Affinität der monomeren Immunglobuline beim Zweitkontakt mit dem Antigen) existieren bei den Fischen - wenn überhaupt - nur in stark abgeschwächter Form (Kaattari und Piganelli, 1996).

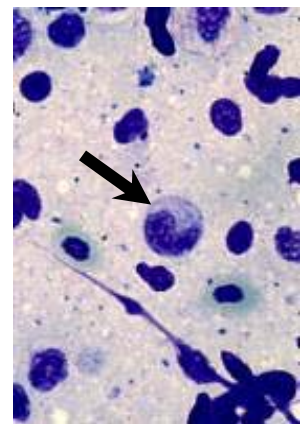


### 2.1.4 Funktion der Leukozytentypen

Im Folgenden sind die Funktionen der Leukozytenpopulationen, die bisher bei *X. helleri* beschrieben wurden, aufgeführt. Die Bilder zeigen Quetschpräparate von Nierengewebe von *X. helleri* (Pappenheimfärbung, 1000-fache Vergrößerung), die im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurden. Die Pfeile in den Abbildungen verweisen auf typische Exemplare des jeweiligen Zelltyps. T- und B-Lymphozyten sind anhand der Abbildung nicht voneinander zu unterscheiden.

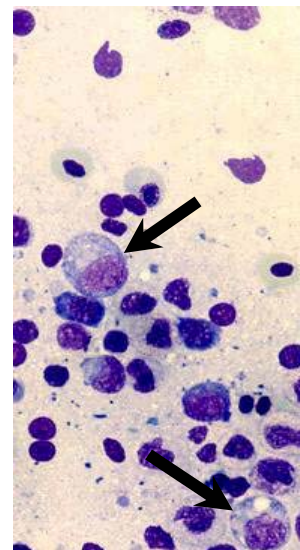
#### **Monozyten:**

- Phagozytose (Hunt und Rowley, 1986; Secombes und Fletcher, 1992)
- Unspezifische zytotoxische Aktivität (Cuesta et al., 1999)
- Chemotaxis (Griffin, 1984)
- Antigenpräsentation mit Hilfe von MHC II-ähnlichen Strukturen (Vallejo et al., 1990; Vallejo et al., 1992; Secombes, 1996)
- Produktion von Zytokinen, Leucotrienen und anderen immunstimulierenden Faktoren (Secombes, 1991; Secombes und Fletcher, 1992)
- Produktion von IL-1 (Secombes und Fletcher, 1992)



#### **Makrophagen:**

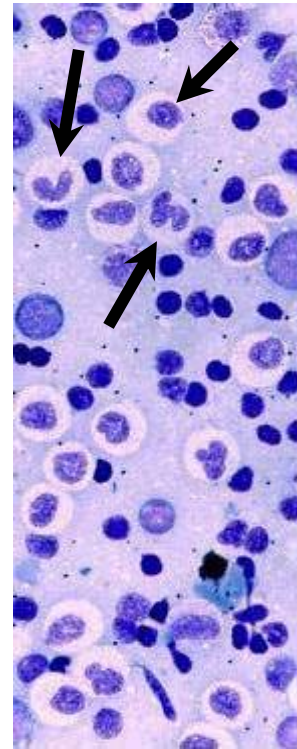
- Phagozytose (Secombes und Fletcher, 1992)
- Chemotaxis (Taylor und Hoole, 1993)
- Unspezifische zytotoxische Aktivität (Cuesta et al., 1999)
- Antigenpräsentation mit Hilfe von MHC II-ähnlichen Strukturen (Lamers und De Haas, 1985; Rombout und van den Berg, 1989; Vallejo et al., 1990; Secombes und Fletcher, 1992; Vallejo et al., 1992)
- Produktion von IL-1 (Clem et al., 1991)
- Abgabe von Leukotrienen und Lipoxinen (Immunregulation, proinflammatorisch, Hemmung leukozytärer Immunantworten) (Tocher und Sargent, 1987; Pettitt et al., 1989; Pettitt et al., 1991; Rowley, 1991; Secombes und Fletcher, 1992)
- Produktion von TNF $\alpha$  (Zelikoff et al., 1990)



### Neutrophile Granulozyten

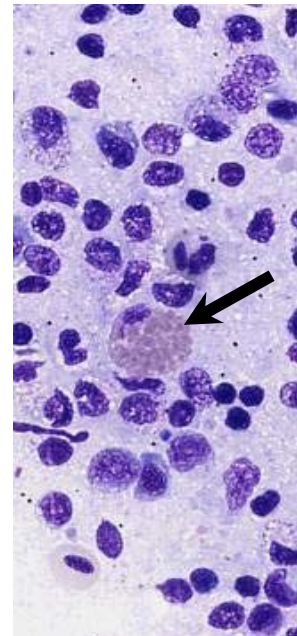
- Phagozytose (Weinreb, 1963; Lester und Budd, 1979; Suzuki, 1984; Siwicki et al., 1985; Finco-Kent und Thune, 1987; Kusuda und Ikeda, 1987; Lehmann et al., 1987; Ainsworth und Dexiang, 1990)
- Chemotaxis (Weeks et al., 1986; Wood und Matthews, 1987; Rowley et al., 1988; Sharp et al., 1991; Ainsworth, 1992; Taylor und Hoole, 1993; Newton et al., 1994)
- Degranulation (Abgabe von Enzymen an die Umgebung zwecks Abtötung von Pathogenen) (Ellis, 1986; Wood et al., 1986)
- Spontane zytotoxische Aktivität (Kurata et al., 1995)
- Abtötung von Pathogenen (Secombes und Fletcher, 1992)
- Abgabe von Leukotrienen und Lipoxinen (Immunregulation, proinflammatorisch, Hemmung leukozytärer Immunantworten) (Tocher und Sargent, 1987; Pettitt et al., 1989; Pettitt et al., 1991; Secombes und Fletcher, 1992)

Die Pfeile markieren drei typische Exemplare von Reifestadien der neutrophilen Granulozyten. Von oben nach unten: Meta-granulozyt, stabkerniger Granulozyt, segmentkerniger Granulozyt.



### Eosinophile Granulozyten

- Funktion analog zu den Mastzellen der Mammalia (Reite, 1998; Matzuyama und Iida, 1999)
- Phagozytose (Bodammer, 1986 ; Dorin et al., 1993; Secombes, 1996)
- Chemotaxis (Lamas et al., 1991)
- Anlagerung an Parasiten (Huizinga, 1980)
- Teil der Enzystierung (Einkapselung) von Parasiten (Cone und Wiles, 1985; Secombes, 1996)
- Abtötung von Parasiten (Huizinga, 1980)
- Chemotaktische Anziehung von Leukozyten (Huizinga, 1980)
- Neutralisation parasitärer Produkte (Huizinga, 1980)
- Degranulation (Abgabe von Histaminen (Powell et al., 1993; Secombes, 1996) und von Migrationsfaktoren neutrophiler Granulozyten (Matzuyama et al., 2000))
- Spontane zytotoxische Aktivität (Cammarata und Vazzana, 2000)



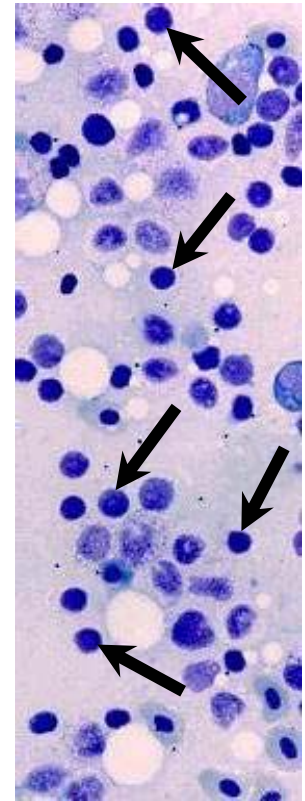
## **Lymphozyten**

### B- Lymphozyten:

- Antigenpräsentation (Secombes, 1996)
- Antikörpersynthese (Castillo et al., 1993; Köllner et al., 2002)
- IL-1-Rezeptor (Kaattari und Piganelli, 1996)
- Anregung der B-Lymphozyten zur Antikörperproduktion durch thymusabhängige und thymusunabhängige Antigene (Kaattari und Piganelli, 1996)

### T- Lymphozyten:

- Produktion von IL-2-ähnlichen Faktoren (Anregung der Proliferation von T-Lymphozyten) (Miller et al., 1994)
- Produktion von IL-4-ähnlichen Faktoren (dient der B-Zell-Aktivierung) (Miller et al., 1994)
- Produktion von IFN- $\gamma$ -ähnlichen Faktoren (Aktivierung von Makrophagen, Schutz gegen virale Infekte, verstärkter Respiratory-Burst) (Graham und Secombes, 1988, 1990; Manning und Nakanishi, 1996)
- T-Zell-Rezeptor (Partula et al., 1994, 1995a, b)
- T-Helferzellen-Aktivität (Manning und Nakanishi, 1996)



## **2.2 Wirkung von Umweltbedingungen auf das Immun- und Abwehrsystem von Teleostern**

### **2.2.1 Wirkung der Mikrogravitation auf das Immunsystem von Säugetieren**

Im Rahmen des C.E.B.A.S.-Projektes wurde zum ersten Mal der Einfluss der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von Teleostern bzw. von niederen Vertebraten untersucht. Die Wirkung der Mikrogravitation auf das Immunsystem von Menschen, Ratten und Mäusen ist dagegen schon häufig Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen gewesen, denn seit Beginn der bemannten Raumfahrt sind Infektionen, die kurz vor bzw. im Verlauf von Weltraumflügen auftreten, ein bekanntes Problem. Während des Apollo-Programms konnten bei vielen Astronauten Infektionen der Atemwege, des Darmes, der Harnwege und der Haut festgestellt werden (Hawkins und Ziegelschmid, 1975). Später reduzierte ein NASA-Programm zur Verbesserung der Gesundheit von Astronauten das Auftreten von Infektionserkrankungen. Dennoch

kommt es bei Astronauten bis in die Gegenwart des Space Shuttle-Programms zu infektiösen Erkrankungen (Taylor et al., 1977). Stressoren, denen Astronauten vor und während Weltraumflügen ausgesetzt sind, spielen vermutlich eine wichtige Rolle bei der Entstehung des immunologischen Bildes, welches sich nach Weltraumflügen zeigte (Taylor und Dardano, 1983; Stowe et al., 1999). Dafür, dass Stresshormone eine wichtige Rolle bei der Ausprägung des immunologischen Befundes bei Raumfahrern spielen, sprechen Rezeptoren für Stresshormone auf Lymphozyten und polymorphkernigen Granulozyten. Beobachtet wurden Neutrophilie, Lymphopenie und reduzierte T-Zell-Blastogenese (Besedovski et al., 1983; Christou et al., 1980).

Nach Weltraumaufenthalten kam es zu quantitativen Veränderungen der Leukozytenpopulationen im peripheren Blut von Astronauten (Kimzey et al., 1976; Taylor und Dardano, 1983; Taylor et al., 1986; Leach, 1992; Meehan et al., 1992; Allebban et al., 1994; Ichiki et al., 1996). Es traten aber auch funktionelle Veränderungen innerhalb der Leukozytenpopulationen auf. So konnte sowohl eine Hemmung (Cogoli und Tschopp, 1985; Bechler et al., 1986; Taylor et al., 1986; Cogoli et al., 1988; Konstantinova et al., 1993) als auch eine Steigerung (Bechler et al., 1992; Cogoli et al., 1993) der mitogeninduzierten T-Zell-Aktivierung/Proliferation festgestellt werden.

Welche Wirkung Weltraumaufenthalte auf Reifung, Morphologie und Funktion von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen haben, ist nur selten untersucht worden (Stowe et al., 1999).

Stowe et al. (1999) zeigten einen Anstieg der chemotaktischen Aktivität und eine Zunahme der Adhäsion an endothelialen Zellen bei neutrophilen Granulozyten von Astronauten. Zugleich wies der Urin der Astronauten eine erhöhte Konzentration des Stresshormons Cortisol auf. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen auf einen hypermetabolen Zustand der neutrophilen Granulozyten aufgrund von Stresshormonen, die während und nach Weltraumflügen ausgeschüttet wurden.

Der Respiratory-Burst, d.h. die gesteigerte Sauerstoffaufnahme der Phagozyten und die Bildung reaktiver (gegenüber Erregern aggressiver) Sauerstoffspezies (z. B.  $H_2O_2$ ) von murinen neutrophilen Granulozyten, war bei Hypogravitation und Parabolflügen erhöht. Dies spricht für eine Aktivierung dieses Zelltyps unter Hypogravitationsbedingungen (Fleming et al., 1991; Armstrong et al., 1995).

Murine Makrophagen zeigten nach Weltraum- bzw. Parabolflügen sowohl eine

beschleunigte Proliferation als auch eine gehemmte Differenzierung. Außerdem breiteten sie sich bei Hypogravitation verstärkt aus, das so genannte „Spreading“. Nach Ansicht der Autoren war dies ebenfalls ein Zeichen für eine gesteigerte Aktivität (Armstrong et al., 1995).

Bei humanen Monozyten wurde eine deutliche Hemmung der IL-1-Produktion unter Mikrogravitationsbedingungen festgestellt. IL-1 ist ein interzellulärer Botenstoff, der für die T-Zell-Aktivierung notwendig ist (Limouse et al., 1991; Bechler et al., 1992). Gegenteiliges beobachteten Chapes et al. (1992). Bei murinen Makrophagen des Knochenmarks, die unter Weltraumbedingungen kultiviert wurden, stellten sie eine 100%ige Steigerung der IL-1-Produktion fest.

### **2.2.2 Wirkung von Stressoren auf das Abwehrsystem von Teleostern**

Wie oben erwähnt, können die Bedingungen, die während eines Weltraumfluges herrschen, bei Astronauten Stress verursachen. Auch die Schwertträger standen während der C.E.B.A.S.-Experimente neben der Mikrogravitation unter dem Einfluss vieler weiterer Umweltfaktoren bzw. Stressoren, die dazu in der Lage waren, über den Weg des allgemeinen Anpassungssyndroms (Selye, 1950a,b, 1956) Einfluss auf das Abwehrsystem der Versuchstiere zu nehmen. Wegen des Einflusses, den Stressoren auf das Abwehrsystem von Teleostern haben, soll im Folgenden näher auf dieses Phänomen eingegangen werden.

#### **2.2.2.1 Stress und allgemeines Anpassungssyndrom**

Stress ist eine generelle, unspezifische Reaktion eines Organismus auf einen exogenen oder endogenen Reiz, genannt Stressor (Selye, 1956). Das grundlegende Stress-Effektorsystem bei Säugetieren ist der neuroendokrine Pfad vom Hypothalamus über die Hypophyse zur Nebenniere, die HPA-Achse (Hypothalamo-Pituitary-Adrenal-Axis). Ein Stimulus, der dazu in der Lage ist, die HPA-Achse zu aktivieren, ist ein potentieller Stressor und physiologische Veränderungen, die durch die Aktivierung der HPA-Achse hervorgerufen werden, können als Stress bezeichnet werden (Selye, 1950a,b). Das

einheitliche Muster, dem die durch Stress verursachten physiologischen Veränderungen folgen, werden als allgemeines Anpassungssyndrom bezeichnet (Selye, 1950a,b; Swift, 1981). Das allgemeine Anpassungssyndrom läuft bei Menschen in drei Phasen ab:

1. Alarmphase
2. Adaptationsphase
3. Erschöpfungsphase.

In der Alarmphase kommt es zu einer Erhöhung der Leukozytenzahl im peripheren Blut und zu einer Rückbildung des Thymus und anderer lymphatischer Organe. Im Anschluss beginnt die Widerstands- oder Adaptationsphase, in der z. B. verstärkt Entzündungsreaktionen auftreten. Hält der Stressor weiter an, tritt der Organismus in die Erschöpfungsphase des allgemeinen Anpassungssyndroms ein. In dieser Phase kommt es zu so genannten Anpassungskrankheiten.

Einige der wichtigsten Adaptationsmechanismen der Säugetiere betreffen das Immunsystem. Dazu gehören z. B. die oben schon erwähnten Entzündungsreaktionen, Phagozytosefunktionen und eine Vielzahl anderer spezifischer und unspezifischer Immunantworten, die von den Komponenten des lymphoiden Systems vermittelt werden. Da Monozyten und Makrophagen Rezeptoren für die in Stresssituationen freigesetzten Glucocorticoide Cortison, Corticosteron und Progesteron besitzen, können diese Hormone einen Einfluss auf die genannten Zellen und somit auch auf die Phagozytose haben (Cooper und Parrinello, 1996). Zudem wirken sie sich auf die Leukozytenzahl, die Proliferation der Lymphozyten, die ontogenetische Entwicklung der Lymphozytenfunktionen und die Modulation der Immunantwort aus (Cooper und Parrinello, 1996).

#### **2.2.2.2 Neuroendokrines System und Stress bei Teleostern**

Das Stresskonzept hat auch bei Studien mit Fischen eine breite Akzeptanz gefunden. Schon bald nach der Etablierung dieses Modells beim Menschen wurde auch bei Teleostern nach Beweisen für das Auftreten von Stress in Selyes' Sinne gesucht (Slicher, 1961; Ball und Slicher, 1962; Weatherley, 1963; McKim, 1966; Pickford et al.,

1971a,b,c). Bei Teleostern existiert ein zu der HPA-Achse analoges System, die so genannte Hypophysen-interrenal-Achse (Pituitary-interrenal-Axis), bei der die Interrenaldrüse die gleichen Typen von Corticosteroiden abgibt wie bei Säugetieren (Swift, 1981). Die Corticosteroide besitzen im Großen und Ganzen auch die gleichen physiologischen Funktionen (Bentley, 1976). Die bei Teleostern durch Stress hervorgerufenen physiologischen Veränderungen zeigen so große Ähnlichkeiten mit den Veränderungen bei Säugetieren, dass davon ausgegangen werden kann, dass die Grundlagen der Stressantwort bei beiden die gleichen sind (Swift, 1981).

Nach Stresseinwirkung konnte bei Teleostern ein erhöhter Plasmacortisolspiegel gemessen werden (Strange et al., 1977; Strange und Schreck, 1980; Tomasso et al., 1981; Ellsaesser und Clem, 1986, 1987). Bei verschiedenen Salmonidenspezies und beim Getüpfelten Gabelwels (*Ictalurus punctatus*) war das Stresshormon Cortisol dazu in der Lage, die humorale Immunantwort herabzusetzen (Anderson et al., 1982; Ellsaesser und Clem, 1986, 1987; Bennett und Wolke, 1987; Tripp et al., 1987; Maule et al., 1989). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Stressoren spezifische und unspezifische Abwehrmechanismen der Teleosteer beeinträchtigen und ihre Anfälligkeit für pathogene Erreger erhöhen (Plumb et al., 1976; Wedemeyer, 1976; Walters und Plumb, 1980; Peters et al., 1988; Wise et al., 1993). Auch Pickering und Duston (1983), Peters et al. (1988) und Maule et al. (1989) konnten zeigen, dass die Immunantwort nach Stresseinwirkung und die damit einhergehende Freisetzung von Corticosteroiden bei Teleostern unterdrückt wird und es so zu einer verminderten Widerstandsfähigkeit gegen Krankheitserreger kommen kann.

### **2.2.2.3 Umweltbedingungen und Stress bei Teleostern**

Nach Cooper und Parrinello (1996) ist es möglich, die Stressreaktion eines Organismus in direkte Verbindung mit Schadstoffen und Umweltgiften zu bringen. Bei Teleostern können Umweltvariablen wie der Sauerstoffgehalt, die Temperatur, der pH-Wert, die Konzentrationen von Abbauprodukten des Stickstoffkreislaufes, soziale Faktoren und Xenobiotika eine Stressreaktion hervorrufen. Wasserverschmutzungen (Walters und Plumb, 1980; Weeks und Wariner, 1986; Anderson, 1996), Temperaturveränderungen (Meyer, 1970; Kindler und Witmore, 1986; Magnadóttir et al., 1999), Hypoxie

(Sauerstoffmangel) (Plumb et al., 1976; Schreck, 1996) und saisonale Rhythmen (Zapata et al., 1992; Köllner et al., 2002) gelten als Faktoren, die Einfluss auf den Verlauf von Fischkrankheiten nehmen können.

#### **2.2.2.4 Sozialer Stress bei Teleostern**

Der Begriff „sozialer Stress“ steht hier in erster Linie für Rangordnungskämpfe und ungeeignete Populationsdichten bei der Fischhaltung. Anhand der Wirkung von aggressivem Verhalten auf das Immunsystem von Teleostern ist deutlich geworden, dass sozialer Stress drastische Auswirkungen auf viele physiologische Mechanismen, das Immunsystem und die Gesundheit haben kann (Ejike und Schreck, 1980; Cooper et al., 1988; Ghoneum et al., 1988; Faisal et al., 1990; Chiappelli et al., 1993). Cooper und Parrinello (1996) beschreiben durch sozialen Stress hervorgerufene, degenerative Veränderungen der Leukozyten. Bei Tilapien (*Oreochromis niloticus*) wurde die Auswirkung von sozialem Stress auf funktionale Aktivitäten von Natürlichen-zytotoxischen-Zellen (NCC, Natural-cytotoxic-Cells) untersucht. Zehn Stunden nach Beginn der Stresssituation konnten die Tiere, anhand verminderter zytotoxischer Reaktivität, in dominante Tiere ( $\alpha$ -Tiere), untergeordnete Tiere ( $\beta$ -Tiere) und Tiere, die keiner der beiden Klassen angehörten, unterteilt werden. Der Rückgang der NCC-Aktivität bei Fischen, die sozialer Aggressivität ausgesetzt waren, ist laut Ghoneum et al. (1988) ein Hinweis darauf, dass Veränderungen der zellvermittelten Immunität auf soziale Stressoren zurückgeführt werden können. Bei Untersuchungen von Kurogi und Iida (1999), bei denen Tilapien (*Oreochromis niloticus*) Rangordnungskämpfen und damit sozialem Stress ausgesetzt waren, zeigte sich bei den unterlegenen Tieren ein erhöhter Cortisolspiegel im peripheren Blut. Außerdem war bei diesen Tieren sowohl die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten unterdrückt, in Entzündungsherde einzuwandern, als auch die Phagozytosefähigkeit und der Respiratory-Burst vermindert.



### 2.2.2.5 Wirkung der Dauer einer Stresssituation auf die Gesundheit von Teleostern

Der Aspekt der zeitlichen Ausdehnung der Stresseinwirkung ist im Zusammenhang mit den Daten dieser Arbeit von Bedeutung, da die C.E.B.A.S.-Experimente von unterschiedlicher Dauer waren (vgl. Tabelle 3).

Der physiologische Effekt von Umweltstressoren ist abhängig von der Dauer und der Intensität des Stressors (Mosconi et al., 1998; Pickering, 1998). Ainsworth et al. (1991a) vermuten einen Zusammenhang zwischen der Dauer einer Stresssituation und der immunsuppressiven Wirkung. Eine akute Stressreaktion entsteht bei Fischen durch leichte, kurzfristige Stressoren (Demers und Bayne, 1997; Rottlant und Tort, 1997; Ruis und Bayne, 1997). Dagegen wird durch lang anhaltende, starke Stressoren eine chronische Stressreaktion hervorgerufen (Pickering, 1998). Dabei verstärkt akuter Stress eher das Immunsystem, als dass er es schwächt. So wurde bei akutem Stress die Zunahme von Lysozymen und Komplementfaktoren oder eine verstärkte Phagozytoseaktivität nachgewiesen. Diese Faktoren tragen zum Schutz gegen Pathogene bei (Demers und Bayne, 1997; Ruis und Bayne, 1997). Chronische Stresseinwirkung führt dagegen nach den Beobachtungen vieler Autoren zu einer Schwächung der humoralen und zellulären Immunparameter (Yin et al., 1995; Tort et al., 1996; Bly et al., 1997; Clearwater und Pankhurst, 1997).

Ortuno et al. (2001) schließen aus ihren Ergebnissen, dass es Stressformen gibt, die auch bei kurzfristiger Einwirkung auf den Fischorganismus sowohl zur Ausprägung von akuten als auch von chronischen Stresssymptomen führen. Bei ihren Versuchen zeigten Goldbrassen (*Sparus aurata*), die kurzfristig intensivem (zwei Stunden) sozialem Stress ausgesetzt waren, einen schnellen, signifikanten Anstieg der Plasmacortisolkonzentration, eine Verminderung des Complementtiters und eine signifikante Abnahme der Phagozytosefähigkeit und Phagozytosekapazität.

Yin et al. (1995) untersuchten, wie sich die Dauer einer Stresssituation auf unspezifische Immunfunktionen von Karpfen (*Cyprinus carpio*) auswirkt. Entsprechende Parameter wurden nach 1, 7, 14 und 30 Tagen gemessen. Die Anfälligkeit für Krankheitserreger nahm mit der Dauer der Stresssituation nicht zu. Zu Beginn war sie gegenüber den Kontrolltieren zwar signifikant erhöht, doch stieg sie im Verlauf des Experimentes nicht weiter an.

### 2.2.2.6 Wirkung von Stressoren auf die Phagozyten von Teleostern

Verschiedene Autoren haben die zelluläre Immunaktivität der Teleosteer dazu genutzt, um den Status des Immunsystems nach Einwirkung von Stressoren zu bestimmen (Scott und Klessius, 1981; Ghoneum et al., 1988; Yin et al., 1995).

So konnte bei Karpfen (*Cyprinus carpio*), die durch Populationsdichten von 24-26 g Fisch/l gestresst wurden (Populationsdichte Kontrollen: 4,5-5,5 g Fisch/l), eine Verminderung der Chemiluminiszensantwort von Phagozyten des Pronephros festgestellt werden (Yin et al., 1995). Diese Beobachtung unterstützt die Ergebnisse von Scott und Klessius (1981). Sie konnten eine Schwächung der Opsonisierungsaktivität und der Phagozytosefunktion bei Phagozyten von gestressten Fischen feststellen.

Narnaware und Baker (1996) stellten fest, dass Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), die durch intraperitoneale Injektion einer Salzlösung gestresst wurden, innerhalb von drei Stunden eine verminderte Phagozytoseaktivität der Makrophagen aus Milz und Pronephros zeigten. Auch Ortuno et al. (2001) wiesen nach, dass die Phagozytoseaktivität von Leukozyten des Pronephros gestresster Goldbrassen (*Sparus aurata*), die einer Populationsdichte von 100 kg Fisch/m<sup>3</sup> ausgesetzt waren, stark geschwächt war gegenüber den Versuchstieren aus dem Kontrollexperiment, welches eine Besatzdichte von 9 kg Fisch/m<sup>3</sup> aufwies. Erst zwei Tage nach Beendigung der Stresssituation wurde die normale Phagozytosefähigkeit erneut erreicht.

Ainsworth et al. (1991a) beschäftigten sich mit der Funktion neutrophiler Granulozyten des peripheren Blutes transportgestresster Getüpfelter Gabelwelse (*Ictalurus punctatus*). Ihre Versuchstiere zeigten eine starke Zunahme der neutrophilen Granulozyten: Ihr Anteil lag vor der Stresssituation bei 4,2 % und nach der Stresssituation bei 20,9 %. Gegenüber den Kontrollen veränderte sich der Anteil der phagozytierenden neutrophilen Granulozyten jedoch nur unwesentlich: Ihr Anteil lag vor der Stresssituation bei 73,2 % und nach der Stresssituation bei 68,6 %. Und dies, obwohl die Serumcortisolwerte bei den Versuchstieren signifikant erhöht waren. Diese lagen vor der Stresssituation bei 1,2 µg/dl und nach der Stresssituation bei 2,5 µg/dl. Auch die *in vitro* Incubation mit Cortisol führte zu keiner Abnahme der phagozytierenden neutrophilen Granulozyten. Dagegen folgte auf die intraperitoneale Applikation von Cortisol (Injektion von 2 ml einer 50 µg/dl Hydrocortisollösung), die zu einem Anstieg der Serumcortisolkonzentration von 3,8 µg/dl auf 25,3 µg/dl führte, ein signifikanter

Rückgang des Anteils der phagozytierenden neutrophilen Granulozyten von 49,0 % auf 35,2 %. Die Autoren schließen daraus, dass eine andauernde, hohe physiologische Konzentration von Cortisol *in vivo* zu einer Unterdrückung der Phagozytosefunktion führen kann. Die verminderte Phagozytoseaktivität trägt nach Ansicht von Ainsworth et al. (1991a) unter Umständen dazu bei, dass sich Infektionen leichter etablieren können. Auch Kurogi und Iida (1999) beschäftigten sich mit den Auswirkungen von Stress auf die neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes. Die Zellen von Tilapien (*Oreochromis niloticus*), die sozialem Stress durch Rangordnungsverhalten ausgesetzt waren, zeigten eine Einschränkung der Fähigkeit zur chemotaktischen Migration und eine verminderte Fähigkeit zur Phagozytose pathogener Erreger bzw. zu deren intrazellulären Abtötung.

Wie oben dargestellt, konnte von einigen Autoren gezeigt werden, dass die Phagozytoseleistung von Phagozyten durch Stresssituationen beeinflusst wird. Aber auch der Anteil der phagozytierenden Leukozytenpopulationen im hämatopoetischen Gewebe ist dem Einfluss von Stressoren unterworfen. Ortuno et al. (2001) untersuchten an Goldbrassen (*Sparus aurata*) das Auftreten einer Zellpopulation aus Vorderniere und Blut, die sie als große und stark granuliert Leukozyten beschrieben und als Phagozyten bezeichneten. Wahrscheinlich handelte es sich dabei um neutrophile Granulozyten. Die Versuchstiere wurden einer Populationsdichte von 100 kg/m<sup>3</sup>, die Kontrollen einer Populationsdichte von 9 kg/m<sup>3</sup> ausgesetzt. Die Untersuchungen zeigten, dass die Phagozytenpopulation, die zu einem beträchtlichen Teil aus neutrophilen Granulozyten bestand, im Nierengewebe abnahm, jedoch im Blut zunahm. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Ellsaesser und Clem (1986). Nach ihren Experimenten mit durch Transport gestressten Getüpfelten Gabelwelsen (*Ictalurus punctatus*) kam es zu einer starken Zunahme der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut. Eine starke Neutrophilie des peripheren Blutes wurde auch von anderen Autoren als Folge einer Stresssituation beschrieben (Anderson et al., 1982; Chilmonczyk, 1982; Klinger et al., 1983; Pickering, 1984; Ainsworth et al. 1991a).

#### **2.2.2.7 Wirkung von Stressoren auf die Lymphozyten von Teleostern**

Leuko- und Lymphopenien des peripheren Blutes sind bei gestressten Teleostern von

vielen Autoren beschrieben worden (McLeay, 1975; Johansson-Sjöbeck et al., 1978; Peters et al., 1980; Anderson et al., 1982; Chilmonczyk, 1982; Pickering, 1984; Elsaesser und Clem 1986) und können somit als typisches Stresssymptom bezeichnet werden.

Selye (1976) führt eine bei Stress auftretende Lymphopenie des peripheren Blutes direkt auf den immunsuppressiven Effekt der freigesetzten Corticosteroide zurück. Klinger et al. (1983) konnten bei Getüpfelten Gabelwelsen (*Ictalurus punctatus*) mit Hilfe klassischer hämatologischer Untersuchungsmethoden Effekte von sieben Wochen anhaltendem sozialen Stress nachweisen. Bei ihren Untersuchungen nahm die Zahl der Leukozyten des peripheren Blutes mit zunehmender Populationsdichte ab und in Blutaussstrichen konnte ein Rückgang der Lymphozyten festgestellt werden. Auch Narnaware und Baker (1996) wiesen bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), die durch eine intraperitoneale Injektion einer Kochsalzlösung gestresst wurden, einen Rückgang der Lymphozyten/Thrombozytenpopulation im peripheren Blut nach. Sehr detailliert untersuchten Elsaesser und Clem (1986) die Lymphozytenpopulationen des peripheren Blutes von Getüpfelten Gabelwelsen (*Ictalurus punctatus*), nachdem diese transportbedingtem Stress ausgesetzt waren. Sie stimulierten Lymphozytenkulturen mit T- und B-Zell-Mitogenen (Con A (Concanavalin A) bzw. LPS (Lipopolysaccharide)) und T-Zell-abhängigen bzw. T-Zell-unabhängigen Antigenen. So wollten sie Hinweise darauf erhalten, ob die stressbedingte Immunsuppression eventuell auch auf die Beeinträchtigung der T- und/oder B-Zell-Funktionen zurückzuführen ist. Die Autoren konnten einen Rückgang der gesamten Lymphozytenpopulation (T- und B-Lymphozyten) und eine verminderte Proliferationsfähigkeit von B- und T-Zellen feststellen. Außerdem zeigten B-Lymphozyten sowohl bei T-Zell-abhängigen als auch T-Zell-unabhängigen Antigenen einen Rückgang der Antikörperproduktion. Unter anderem schlossen die Autoren aus diesen Ergebnissen, dass durch Stresseffekte sowohl T- als auch B-Lymphozyten so in ihrer Funktion beeinträchtigt werden, dass sie nicht mehr dazu in der Lage sind, adäquat auf Erreger zu reagieren.

Ainsworth et al. (1991a) wiesen mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern im peripheren Blut transportgestresster Getüpfelter Gabelwelse (*Ictalurus punctatus*) einen Rückgang der B-Lymphozyten um 15 % nach und, im Gegensatz zu Elsaesser und Clem (1986), eine signifikante Zunahme der T-Lymphozyten-/Thrombozytenpopulation

um 13 % bzw. 7 %.

### **2.2.3 Direkte Wirkung von Umweltbedingungen auf das Abwehrsystem von Teleostern**

Wie oben beschrieben, können sich Umweltbedingungen über eine Stressreaktion bzw. die Auslösung des allgemeinen Anpassungssyndroms auf die Gesundheit und das Abwehrsystem von Teleostern auswirken. Wasserphysikalische und wasserchemische Bedingungen können aber auch unmittelbar auf den Fischorganismus Einfluss nehmen. Schon seit langer Zeit werden hämatologische Untersuchungen als Indikatoren für den Gesundheitsstatus von Teleostern herangezogen (Blaxhall, 1972; Bell und Margolis, 1976; Hickey, 1976). Außerdem dienen sie dazu, die Wirkungsweise von Umweltverschmutzungen auf den Fischorganismus besser zu verstehen (McKim et al., 1970; Swift und Lloyd, 1974; Bills und Hunn, 1976; Iwama et al., 1976; Soivio und Oikari, 1976; Bly et al., 1997; Köllner et al., 2002).

Im Folgenden soll dargestellt werden, wie sich spezifische Umweltbedingungen direkt auf das Abwehrsystem von Teleostern auswirken können.

#### **2.2.3.1 Wirkung von Ammonium, Ammoniak, Nitrit und Nitrat auf das Abwehrsystem von Teleostern**

Hrubec et al. (1997a) untersuchten die Wirkung von Ammoniak und Nitrat auf hämatologische Parameter von Hybriden zwischen Seebarsch und Gestreiftem Seebarsch (*Morone chrysops x Morone saxatilis*). Nitrat wird häufig als für Fische ungiftig angesehen (Bromage et al., 1988). Dennoch fanden Hrubec et al. (1997a) in ihren Versuchen Anzeichen pathologischer Veränderungen, die durch den erhöhten Nitrat- bzw. Ammoniakgehalt des Wassers hervorgerufen wurden. Sie setzten die Versuchstiere für sechs Wochen einer Ammoniakkonzentration von 0,15 mg/l bzw. einer Nitratkonzentration von 200 mg/l aus. Signifikante Unterschiede zwischen den Blutzellpopulationen der Kontrollen und den Tieren, die einer erhöhten Ammoniak- bzw. Nitratkonzentration ausgesetzt waren, traten bei der Zahl der neutrophilen

Granulozyten und Monozyten des peripheren Blutes auf. Die Zahl beider Zelltypen war gegenüber dem Kontrollwert signifikant angestiegen, wobei der Wert der Tiere aus Versuchen mit erhöhter Nitratkonzentration am höchsten lag. Zwischen Ammoniak- und Nitratgruppe bestanden keine signifikanten Abweichungen. Folgende Konzentrationen an neutrophilen Granulozyten wurden gemessen: Kontrollexperiment  $1,03 \times 10^3/\mu\text{l}$ , Ammoniak-Exp.  $2,89 \times 10^3/\mu\text{l}$ , Nitrat-Exp.  $4,69 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Die Konzentration der Monozyten lag beim Kontrollexperiment bei  $3,81 \times 10^3/\mu\text{l}$ , beim Ammoniak-Exp. bei  $6,13 \times 10^3/\mu\text{l}$  und beim Nitrat-Exp. bei  $8,85 \times 10^3/\mu\text{l}$ . Bei keinem der anderen Blutzelltypen (Lymphozyten, eosinophile Granulozyten, Thrombozyten, Erythrozyten) traten signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen auf. Die Autoren vermuten, dass es sich bei der erhöhten Zahl an neutrophilen Granulozyten und Monozyten zwar um signifikante, aber dennoch nicht um klinisch relevante Veränderungen handelte.

Banerjee und Bhattacharya (1994) überprüften, wie sich hohe Ammoniakkonzentrationen (UIA = un-ionized ammonia) auf das Nierengewebe von Punktierten Schlangenköpfen (*Channa punctata*) auswirkten. Dabei stellten sie fest, dass die hämatopoetischen Bereiche des Nierengewebes nekrotisch waren. Die Autoren deuten an, dass die Hämatopoese der Blutzellen durch die Nekrose beeinträchtigt gewesen sein könnte. Da das hämatopoetische Gewebe der Teleosteeer wegen der dort stattfindenden Bildung von immunrelevanten Leukozyten auch das wichtigste immunopoetische Gewebe ist, ist es wahrscheinlich, dass eine Nekrose dieses Gewebes zugleich eine dramatische Auswirkung auf die Immunabwehr der Fische hat. Gernhöfer et al. (2001) konnten bei Bachforellen (*Salmo trutta f. fario*) und Schmerlen (*Barbatula barbatula*), die bei erhöhten Ammoniakkonzentrationen gehalten wurden, ebenfalls schwerwiegende ultrastrukturelle Veränderungen des Nierengewebes feststellen. Allerdings machen diese Autoren keine Angaben über den Zustand des hämatopoetischen Gewebes, sondern beschreiben in erster Linie Veränderungen der exkretorischen Strukturen (Nephronen) des Nierengewebes. So kam es bei ihren Untersuchungen nach Einwirkung erhöhter Ammoniakkonzentrationen zu erheblichen Veränderungen der Basallamina der renalen Corpuskel und zu einer völligen Zerstörung der Glomeruli. Wedemeyer und Yasutake (1978) untersuchten Gewebe von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), die 28 Wochen bei subletalen Nitritkonzentrationen gehalten wurden, und konnten keine Schäden an Niere, Blut oder

Thymus feststellen.

Ein weiteres wichtiges Organ der Immunabwehr, welches durch erhöhte Ammoniakkonzentrationen geschädigt werden kann, scheint das Darmgewebe zu sein. Banerjee und Bhattacharya (1995) konnten zeigen, dass die Struktur des Intestinums von Punktierten Schlangenköpfen (*Channa punctata*) bei chronischer Einwirkung von nicht letalen Ammoniakkonzentrationen stark beschädigt wurde. Bei Einwirkungszeiten zwischen 7 und 90 Tagen kam es zu Veränderungen der Villistruktur, bis hin zu Veränderungen der submucosalen Schichten und der weitreichenden Zerstörung aller Darmschichten. Die Zerstörung der Darmstrukturen als Folge erhöhter Ammoniakkonzentration könnte Auswirkungen auf wichtige Abwehrfunktionen des Darmassoziierten-lymphatischen-Gewebes (Gut-associated-lymphoid-Tissue, GALT) haben. So befinden sich im lymphatischen Gewebe des Darms der Teleosteer Lymphozyten, Plasmazellen, Granulozyten und Makrophagen (Zapata, 1979; Hart et al., 1988). Rombout et al. (1993) konnten in der intestinalen Mucosa von Karpfen (*Cyprinus carpio*) alle Zellen nachweisen, die für eine lokale Immunantwort notwendig sind. Einige der genannten Abwehrzellen sind zwischen den Epithelzellen des Darms lokalisiert, während sich andere über die Lamina propria verteilen (Zapata, 1979; Hart et al., 1988). Banerjee und Bhattacharya (1995) halten die von ihnen beobachteten Veränderungen des Darmgewebes für so typisch, dass sie diese als Parameter für das Screening von Umwelttoxinen vorschlagen, die sich spezifisch auf die Absorption und Sekretion im Darmgewebe auswirken.

### **2.2.3.2 Wirkung der Wassertemperatur auf die Phagozyten von Teleostern**

Die Wassertemperatur kann erheblichen Einfluss auf die Phagozytosefunktion der poikilothermen, d.h. wechselwarmen Teleosteer haben.

Dexiang und Ainsworth (1991) beobachteten, dass die Adaption von Phagozyten an niedrige Temperaturen zu einer Verbesserung des Respiratory-Burst führte, was auf eine verbesserte Fähigkeit Bakterien abzutöten hinweisen könnte. Auch Collazos et al. (1994) konnten bei Schleien (*Tinca tinca*) eine erhöhte Effektivität der Phagozytose bei niedrigen Umgebungstemperaturen feststellen.

Hardie et al. 1994 untersuchten Makrophagen aus Nierengewebe von Regenbogenforellen, die sie bei einer Temperatur von 14 °C hielten. Die bei 6 °C kultivierten Makrophagen zeigten gegenüber Zellen, die bei 18 °C kultiviert wurden, einen höheren relativen Anstieg des Respiratory-Burst bei Stimulation durch den makrophagenaktivierenden Faktor (MAF).

Ainsworth et al. (1991b) zeigten eine hemmende Wirkung niedriger Temperaturen auf die Phagozytosefähigkeit neutrophiler Granulozyten von Getüpfelten Gabelwelsen (*Ictalurus punctatus*). Dennoch kamen sie zu dem Ergebnis, dass diese Zellen gegenüber niedrigen Temperaturen weniger empfindlich sind als Lymphozyten und daher im Verhältnis zu diesen bei niedrigen Temperaturen effektiver arbeiten.

Le Morvan et al. (1997) untersuchten beim Karpfen (*Cyprinus carpio*) den Einfluss der Umgebungstemperatur auf die Makrophagenaktivität. Zu diesem Zweck wurden die Makrophagen aus dem Pronephros der Tiere isoliert. Die Wassertemperaturen, bei denen die Karpfen gehalten wurden, betragen 12, 20 und 28 °C, wobei eine Wassertemperatur von 20 °C als Standardtemperatur angesehen wurde. Nach Stimulation der Phagozyten wurde die Chemiluminiszensantwort der Makrophagen gemessen. Zusätzlich ist mit den isolierten Makrophagen ein Phagozytoseassay durchgeführt worden. Die Chemiluminiszensantwort der Karpfen, die an die niedrigste Temperatur adaptiert waren, war am höchsten, gefolgt von der jener Tiere, die bei 20 °C gehalten wurden. Die niedrigste Chemiluminiszensintensität zeigten die bei 28 °C gehaltenen Karpfen. Auch der Phagozytoseindex war bei den Fischen, die bei der niedrigsten Temperatur gehalten wurden, am höchsten. Dagegen war er bei den bei 28 °C gehaltenen Tieren am niedrigsten. Nach Ansicht der Autoren unterstreichen ihre Ergebnisse die Bedeutung der unspezifischen Immunfunktionen bei der Abwehr von Krankheitserregern bei niedrigen Wassertemperaturen.

Anders als bei Le Morvan et al. (1997), die bei supraoptimalen Wassertemperaturen einen Rückgang der Phagozytoseaktivität zeigten, konnten Langston et al. (2002) keinerlei Hinweise darauf finden, dass sich eine erhöhte Temperatur hemmend auf die Phagozytoseaktivität auswirkt. In ihren Experimenten wurden drei regionale Varianten vom Heilbutt (*Hippoglossus hippoglossus*) drei Monate bei 8, 12, 13, 15 und 18 °C gehalten. Dabei nahmen sie eine Temperatur von 13 °C als optimale Haltungstemperatur an. Zwischen den Tieren der verschiedenen Temperaturgruppen kam es weder zu Unterschieden beim Anteil der phagozytierenden Makrophagen noch



bei der Zahl der phagozytierten Partikel.

### **2.2.3.3 Wirkung der Temperatur auf das Differentialblutbild des Nierengewebes von Teleosteern**

Kurata et al. (1997) untersuchten den prozentualen Anteil von Lymphozyten, neutrophilen Granulozyten und Makrophagen an den Leukozyten des Pronephros vom Karpfen (*Cyprinus carpio*) bei Wassertemperaturen von 25 und 10 °C. Die Autoren wählten diese Temperaturen für ihren Versuch, da laut Avtalion (1969, 1981) Karpfen bei 25 °C eine verstärkte und bei 10 °C eine unterdrückte Antikörperproduktion zeigten. Die Autoren machten keine Angabe über die optimale Haltungstemperatur, noch weist ihr Versuch die Daten eine Kontrollgruppe auf, die bei einer Standardtemperatur gehalten wurde. Wie oben erwähnt, geben z. B. Le Morvan et al. (1997) für Versuche an Karpfen eine Wassertemperatur von 20 °C als Standardtemperatur an. Somit kann für die Haltung von Karpfen eine Wassertemperatur von 25 °C als supraoptimal angesehen werden. Die Studie von Kurata et al. (1997) zeigte folgende Ergebnisse: Der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten war bei den Tieren, die bei 25 °C (30,8 % ± 5,0 %) gehalten wurden, signifikant niedriger als bei denen, die sich an eine Temperatur von 10 °C (50,4 % ± 12,0 %) adaptiert hatten. Dagegen zeigten die Lymphozyten und Makrophagen ein entgegengesetztes Bild. Ihr Anteil lag bei einer Temperatur von 25 °C (Lymphozyten: 63,8 % ± 4,0 %; Makrophagen: 3,3 % ± 1,7 %) höher als bei den Tieren, die bei 10 °C (Lymphozyten: 46,2 % ± 12,9 %; Makrophagen: 0,9 % ± 0,2 %) gehalten wurden. Die Autoren deuten ihre Ergebnisse aufgrund der langfristigen, ca. vierwöchigen Adaptation an die Temperaturen als Anpassung der Versuchstiere an eine neue Umgebungstemperatur und nicht als Stressreaktion.

Langston et al. (2002) untersuchten beim Heilbutt (*Hippoglossus hippoglossus*) den Effekt unterschiedlicher Wassertemperaturen auf quantitative Veränderungen von Leukozytenpopulationen des peripheren Blutes. Die Tiere wurden drei Monate bei 8, 12, 15 und 18 °C gehalten. Die Daten der Tiere, die bei 12 °C gehalten wurden, dienten als Referenzwerte. Die Temperaturunterschiede beeinflussten verschiedene hämatologische Parameter. Die niedrigste Leukozytenzahl trat bei 18 °C auf (prozentualer Anteil an den Blutzellen: 3,64 %), die höchste bei 12 °C (prozentualer

Anteil an den Blutzellen: 8,94 %). Der größte Anteil an Plasmazellen (Plasmazellen = aktivierte, antikörperproduzierende B-Lymphozyten) war bei 15 °C (prozentualer Anteil an den gesamten Leukozyten: 15,94 %), der niedrigste bei 8 °C (prozentualer Anteil an den gesamten Leukozyten: 4,93 %) zu finden. Außerdem kam es bei 18 °C zu einer erhöhten Zahl von Granulozyten im peripheren Blut (prozentualer Anteil an den gesamten Leukozyten bei 18 °C: 11,88 % und bei 12 °C: 2,81 %).

Dunn et al. (1989) setzten sich mit der Wirkung unterschiedlicher Wassertemperaturen auf das Differentialblutbild des Blutes von Goldfischen (*Carassius auratus*) auseinander. Sie hielten die Tiere drei Wochen bei Wassertemperaturen von 5, 15, 25, oder 35 °C. Bei ihren Untersuchungen wurde eine Wassertemperatur von 25 °C als für diese Spezies optimal angesehen. Den Temperaturanstieg von 25 °C auf 35 °C bezeichnen die Autoren als moderaten Temperaturanstieg, der folgende Wirkung auf die prozentuale Verteilung der Leukozyten im peripheren Blut der Goldfische zeigte:

1. Der prozentuale Anteil der Lymphozyten nahm deutlich ab (25 °C: 51,4 %, 35 °C: 26,6 %).
2. Der Anteil der Monozyten blieb konstant (25 °C: 0,4 %, 35 °C: 0,4 %).
3. Die neutrophilen Granulozyten nahmen zu (25 °C: 5,0 %, 35 °C: 9,8 %).
4. Die eosinophilen Granulozyten nahmen zu (25 °C: 0,3 %, 35 °C: 1,5 %).
5. Die Zahl der blastären Zellen nahm ebenfalls leicht zu (25 °C: 2,8 %, 35 °C: 3,4 %).

Da bekannt ist, dass die unterschiedlichsten Stressoren zu Lymphopenien und Neutrophilien führen können (Elsaesser und Clem, 1986), ist fraglich, ob die von Dunn et al. (1989) beschriebenen Veränderungen im Blutbild auf die direkte Wirkung der Temperatur zurückzuführen waren, oder ob es sich dabei evtl. um Stresssymptome handelte.

Dheer (1988) kam bei Punktierten Schlangenköpfen (*Channa punctata*) teilweise zu entgegengesetzten Ergebnissen. Er untersuchte hämatologische und hämatopoetische Parameter des peripheren Blutes von Versuchstieren, die bei Wassertemperaturen von 25, 30 und 35 °C gehalten wurden. Kontrollversuche führte er bei 14 °C durch. Nach mündlicher Mitteilung von Dr. R. Hamers, Fischereiforschungsstelle des Landes Baden-Württemberg, Langenargen, liegt die Standardhaltungstemperatur von Punktierten

Schlangenköpfen (*Channa punctata*) hingegen zwischen 22 und 28 °C.

Bei den Messwerten der Parameter, die Dheer (1988) untersuchte, war die Differenz zwischen den Kontrolltieren und den Tieren, die bei 30 °C gehalten wurden, geringer als zwischen den Kontrolltieren und den Tieren, die bei 35 °C gehalten wurden.

Gegenüber dem Kontrollwert nahm die Zahl der Leukozyten im peripheren Blut ab. Innerhalb der Leukozytenpopulation kam es zu einer signifikanten Zunahme der großen und kleinen Lymphozyten. Dagegen nahm die Zahl der neutrophilen Granulozyten und der Metamyelozyten im peripheren Blut ab.

Hrubec et al. (1997b) setzten Hybriden zwischen Seebarsch und Gestreiftem Seebarsch (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) Umgebungstemperaturen von 10, 18, 24 und 29 °C aus. Nach Woiwode und Adelman (1991) zeigten Seebarschhybriden bei 21 °C eine maximale Wachstumsrate, die sowohl bei höheren als auch bei niedrigeren Temperaturen abnahm. Die Fische, die von Hrubec et al. (1997b) bei 10 °C gehalten wurden, zeigten weniger Leukozyten, weniger kleine und große Lymphozyten, Monozyten und eosinophile Granulozyten als die Tiere, die bei den anderen Temperaturen gehalten wurden. Zwischen den Tieren aus den Versuchen mit einer Wassertemperatur von 18, 24, und 29 °C kam es zu keinen signifikanten Unterschieden. Somit konnten Hrubec et al. (1997b) den Temperaturen, die über 21 °C lagen, keine Auswirkung auf das Blutbild der Seebarschhybriden nachweisen.

#### **2.2.3.4 Wirkung der Temperatur auf die Zellteilungsaktivität der Nierenzellen von Teleostern**

Dunn et al. (1989) untersuchten die leukopoetische Kapazität bei Goldfischen (*Carassius auratus*), die bei 5, 25 und 35 °C gehalten wurden, wobei sie eine Wassertemperatur von 25 °C als optimal betrachteten. Unter leukopoetischer Kapazität verstanden die Autoren die Wirkung der Temperatur auf die Proliferation von Leukozyten nach peritonealer *In-vivo*-PHA-(Phythämagglutinin-)Stimulation. Bei ihren Versuchen zeigte sich, dass die Wassertemperatur die Antwort auf das Mitogen beeinflusste. Bei einer Temperaturen von 5 °C war die Reaktion auf den Proliferationsstimulus vermindert und verzögert. Die Autoren schlossen aus einer sowohl bei 5 °C als auch bei 35 °C reduzierten Zahl an Blasten (Zellen/mm<sup>3</sup>) im

peripheren Blut, dass die Proliferation sowohl bei sub- als auch bei supraoptimalen Temperaturen vermindert war.

### **2.2.3.5 Wirkungen von Sauerstoffmangel auf das Abwehrsystem von Teleostern**

Teleosteer haben nur ein begrenztes Repertoire an physiologischen Mechanismen und Verhaltensformen, das körpereigene Niveau an gelösten Gasen und den pH-Wert zu regulieren (Burnett, 1997; Burnett und Stickle, 2001). So spiegeln Änderungen des Sauerstoffpartialdruckes ( $pO_2$ ) im Blut von Fischen Änderungen des  $pO_2$  im Wasser wieder. Nikinmaa und Solvio (1982) konnten bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) innerhalb von drei Stunden eine Anpassung des Blut- $pO_2$  an den  $pO_2$  des Wassers feststellen. Dies macht deutlich, dass hypoxische Bedingungen im Wasser schnell zu hypoxischen Bedingungen im Inneren von Teleostern führen können. Entsprechend sind die Zellen des Immunsystems einem hypoxischen Milieu ausgesetzt (Boleza et al., 2001).

Niedrige Konzentrationen gelösten Sauerstoffs und niedrige pH-Werte können bei Teleostern die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Phagozyten und damit die Abtötung von pathogenen Erregern beeinträchtigen (Boleza et al., 2001). Dies macht deutlich, dass subletale Hypoxien direkten Einfluss auf einen bedeutenden Abwehrmechanismus der Teleostern nehmen können.

Boleza et al. (2001) schließen daraus, dass der Sauerstoffgehalt des Wassers von großer Bedeutung für die Widerstandsfähigkeit von Teleostern gegen Krankheitserreger ist.

### 3 Zielsetzung

Im Hinblick auf die Entwicklung eines aquatischen, bioregenerativen Lebenserhaltungssystems für die Langzeitnutzung in Raumschiffen und Raumstationen ist die Wirkung, welche die Mikrogravitation auf den Fischorganismus hat, von großem Interesse. Insbesondere den Funktionen des Abwehrsystems, die direkten Einfluss auf die Gesundheit der Fische haben, kommt eine besondere Bedeutung zu. Weltraumexperimente, deren Ziel es war, die Funktion des Abwehrsystems von Fischen unter Mikrogravitationsbedingungen zu erforschen, wurden bisher nicht durchgeführt.

Die Untersuchungen an den *X. helleri*, die sich an Bord der STS-89 und STS-90 Space Shuttle-Missionen befanden, hatten das Ziel, im direkten Vergleich zwischen den Boden- und Flugexperimenten zu zeigen, in welcher Weise sich die Schwerelosigkeit auf das Abwehrsystem der Schwertträger auswirkte.

Zunächst musste jedoch der Frage nachgegangen werden, ob sich die Umweltbedingungen im C.E.B.A.S. - unabhängig vom Einfluss der Mikrogravitation - auf die Abwehrparameter ausgewirkt haben. Dies machten die besonderen Haltungsbedingungen im C.E.B.A.S.-Modul notwendig, welche durch die Größe und die Auslegung des Moduls als selbsterhaltendes Ökosystem bestimmt wurden.

Die unterschiedliche Dauer der orbitalen und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimente ermöglichten es zudem Fragestellungen einzubeziehen, die den Einfluss der Dauer der Experimente auf das Abwehrsystem der *X. helleri* betrafen.

Anfänglich wurden der Auswertung der C.E.B.A.S.-Experimente somit folgende Fragestellungen zu Grunde gelegt:

1. Beeinflusst die C.E.B.A.S.-Haltung unter terrestrischen Gravitationsbedingungen das Abwehrsystem von *X. helleri*?
2. Beeinflusst die Mikrogravitation während eines Weltraumfluges im C.E.B.A.S. das Abwehrsystem von *X. helleri*?
3. Beeinflusst die Dauer der Weltraumflüge das Abwehrsystem von *X. helleri*?
4. Beeinflusst die Dauer der Haltung im C.E.B.A.S. unter terrestrischen Gravitationsbedingungen das Abwehrsystem von *X. helleri*?

Entsprechend dieser Fragestellungen sind die Resultate der Untersuchungen im Ergebnisteil geordnet und dargestellt worden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 C.E.B.A.S.-Experimente

Gegenstand dieser Arbeit waren nicht nur Daten von Schwertträgern aus C.E.B.A.S.-Weltraumexperimenten (89FE und 90FE) und den dazugehörigen Bodenkontrollexperimenten (89BE und 90BE), sondern auch Daten von Tieren aus terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, welche im Vorfeld der Space Shuttle-Flüge stattfanden und der Vorbereitung der Weltraumflüge dienten (89NT1, 89NT2 und 90NT1, 90NT2). Diese wurden als Nutzlasttests (NT) bezeichnet und bestanden ebenfalls aus zwei parallel verlaufenden C.E.B.A.S.-Experimenten.

Außerdem wurden die Daten von 39 Schwertträgerweibchen erhoben, die aus einer am Kennedy Space Center lokalisierten Standard- bzw. Aquarienhaltung stammten und dort unter optimalen Bedingungen (Tabelle 2) in 200 Liter-Aquarien gehalten wurden. Im Folgenden werden diese Tiere als „Fische aus der Standardhaltung“ bzw. „Aquarienkontrollen“ bezeichnet, ihr Mittelwert repräsentiert den Standardwert. Aus ihrer Population wurden die Versuchstiere für die C.E.B.A.S.-Experimente entnommen.

**Tabelle 2:** Durchschnittliche Wasserwerte in der Standardhaltung am Kennedy Space Center.

Wasserparameter	Standardhaltung
Härte (in °dH = Grad deutscher Härte)	8°dH
Nitrat (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )	14,0 mg/l
Nitrit (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> )	0,036 mg/l
Ammonium (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	0,028 mg/l
Ammoniak (NH <sub>3</sub> )	keine Angabe
Chlorid	37,5 mg/l
Phosphat (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> )	0,3 mg/l
pH-Wert	7,6
Sauerstoff (O <sub>2</sub> )	keine Angabe

Tabelle 3 gibt einen Überblick über alle C.E.B.A.S.-Experimente, die im Rahmen der STS-89 und STS-90 Space Shuttle-Mission durchgeführt wurden. Die Abkürzungen, die im Verlauf dieser Arbeit für die Experimente genutzt wurden, können ebenfalls aus Tabelle 3 entnommen werden.

**Tabelle 3:** C.E.B.A.S.-Experimente, die im Rahmen der STS-89- und STS-90-Mission durchgeführt wurden.

<b>Mission</b>	<b>Experiment</b>	<b>Interne Bezeichnung</b>	<b>Kurz</b>	<b>Gravitation</b>	<b>Dauer (Tage)</b>
-	Aquarium KSC	Standard- bzw. Aquarienhaltung	-	1g	-
<b>STS-89</b>	Nutzlasttest	STS-89-Nutzlasttest 1	89NT1	1g	11
		STS-89-Nutzlasttest 2	89NT2	1g	11
	Weltraumexperiment	STS-89-Bodenkontrollexperiment	89BE	1g	9
		<b>STS-89-Flugexperiment</b>	<b>89FE</b>	<b>&lt;10<sup>-3</sup>g</b>	<b>9</b>
<b>STS-90</b>	Nutzlasttest	STS-90-Nutzlasttest 1	90NT1	1g	22
		STS-90-Nutzlasttest 2	90NT2	1g	22
	Weltraumexperiment	STS-90-Bodenkontrollexperiment	90BE	1g	16
		<b>STS-90-Flugexperiment</b>	<b>90FE</b>	<b>&lt;10<sup>-3</sup>g</b>	<b>16</b>

In Tabelle 3 sind die C.E.B.A.S.-Experimente aufgeführt, die im Rahmen der STS-89- und STS-90-Mission durchgeführt wurden. Zu jedem Weltraumexperiment, bestehend aus Flug- und Bodenkontrollexperiment, wurde ein so genannter Nutzlasttest durchgeführt, der ebenfalls aus zwei parallel verlaufenden C.E.B.A.S.-Versuchen bestand. Als Standard- bzw. Aquarienhaltung ist die Haltung der Schwerträger in den Aquarien am Kennedy Space Center (KSC) bezeichnet worden. Die Dauer der Experimente wurde in Tagen angegeben.

BE = Bodenkontrollexperiment, FE = Flugexperiment, NT = Nutzlasttest, 1g = Gravitation auf der Erdoberfläche; Gravitation <10<sup>-3</sup> g = Gravitation, die auf ein Space Shuttle in der Erdumlaufbahn wirkt.

#### 4.2 C.E.B.A.S.-MINI MODUL

Das Closed Equilibrated Biological Aquatic System-MINI MODUL (kurz C.E.B.A.S.-MINI MODUL oder C.E.B.A.S.) wurde in enger Zusammenarbeit zwischen der Ruhr-Universität Bochum (Fakultät für Biologie, Arbeitsgruppe für vergleichende Endokrinologie, Prof. Dr. V. Blüm), dem Unternehmen Orbital- und Hydrotechnologie Bremen-System GmbH (OHB-System GmbH) und dem Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt e.V. (DLR) entwickelt. Beim C.E.B.A.S. handelte es sich um ein kleinvolumiges, sich selbst stabilisierendes, künstliches Süßwasser-Ökosystem, das es erlaubte, die verschiedensten aquatischen Organismen unter kontrollierten Bedingungen für die Dauer von bis zu drei Wochen an Bord eines Space Shuttles zu halten. Mit einem zweiten, baugleichen Exemplar des C.E.B.A.S.-Moduls konnten parallel zu den Weltraumexperimenten Bodenkontrollexperimente durchgeführt werden.

So machte es das C.E.B.A.S. möglich, die Wirkung der Schwerelosigkeit sowohl auf einzelne Organismen als auch auf ein ganzes Ökosystem zu untersuchen (Slenzka,



1998, 1999).

Die Philosophie und das Design des C.E.B.A.S. basierten auf verschiedenen Modellen unterschiedlicher Größe, die an der Ruhr-Universität Bochum entwickelt und gebaut wurden. Für die STS-89- und STS-90-Missionen wurde ein Besatz des Systems gewählt, der ein stabiles biologisches Gleichgewicht gewährleistete. Dieser bestand aus Schwerträgerfischen (*Xiphophorus helleri*, Heckel 1848), Wasserschnecken (*Biomphalaria glabrata*) und Mikroorganismen als Konsumenten, dem Flutenden Hornkraut (*Ceratophyllum demersum*) und diversen Mikroalgen als Produzenten. Jede dieser Spezies war sowohl wissenschaftliches Objekt als auch integrierter Bestandteil des Ökosystems, welches der Aufrechterhaltung der Wasserqualität diente und zugleich in seiner Gesamtheit Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen war (Slenzka, 1998, 1999).

Das C.E.B.A.S. bestand aus einem experimentellen aquatischen Teil mit 8,6 Litern Volumen und einer sensorisch-regulatorischen Servicekomponente, die zugleich der Dokumentation der Experimente und der Unterstützung des ökologischen Systems diente. Der aquatische Teil des C.E.B.A.S. besaß voneinander zu trennende Kompartimente, die für die Haltung von Fischen, Schnecken, Pflanzen und Mikroorganismen (Filterkompartiment) genutzt werden konnten. Während der Experimente der STS-89- und STS-90-Missionen war dieser in vier Bereiche unterteilt, die mäandrisch vom Wasser durchflossen wurden. Der Teil, in dem sich die adulten Schwerträgerweibchen befanden, hatte ein Wasservolumen von ca. 2 Litern (Slenzka, 1998, 1999).

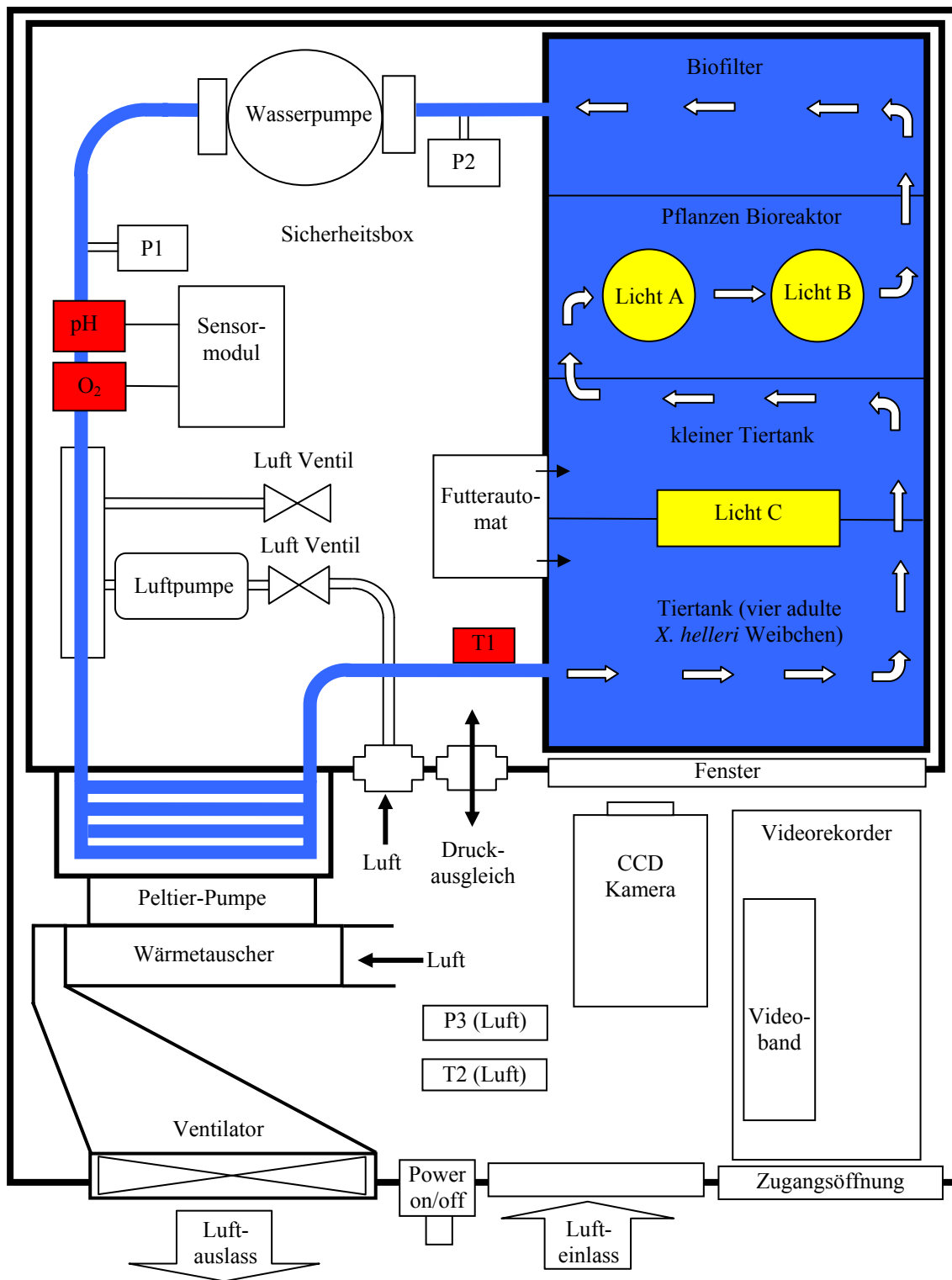
Die sensorisch-regulatorische Servicekomponente des Moduls kontrollierte den Wasserfluss, die Temperatur, die Sauerstoffkonzentration und die beiden voneinander unabhängig gesteuerten Beleuchtungszyklen des Pflanzen- und Tierbereiches. Falls die Sauerstoffkonzentration während der C.E.B.A.S.-Experimente unter 1,5 bzw. 2,5 mg/l O<sub>2</sub> fiel, setzte ein Gasaustauscher ein, der die O<sub>2</sub>-Konzentration auf einen Wert anhob, der für *X. helleri* unkritisch war. Außerdem konnten im Verlauf der Versuche die wichtigsten Wasserdaten aufgezeichnet und gespeichert werden (Temperatur, pH-Wert, Sauerstoffkonzentration).

Eine in das System integrierte Videokamera erlaubte es, Videoaufnahmen der adulten *X. helleri* zu machen (Slenzka, 1998, 1999). Diese konnten im Nachhinein, z. B. im Hinblick auf das Sozialverhalten der Fische, ausgewertet werden.

In Tabelle 4 sind die technischen Daten des C.E.B.A.S.-MINI MODULs zusammengefasst. Die Abbildungen 5-7 zeigen das Konstruktionsschema des C.E.B.A.S. und Darstellungen, die seinen Aufbau verdeutlichen.

**Tabelle 4:** Technische Daten des C.E.B.A.S.-MINI MODULs (Slenzka, 1998, 1999).

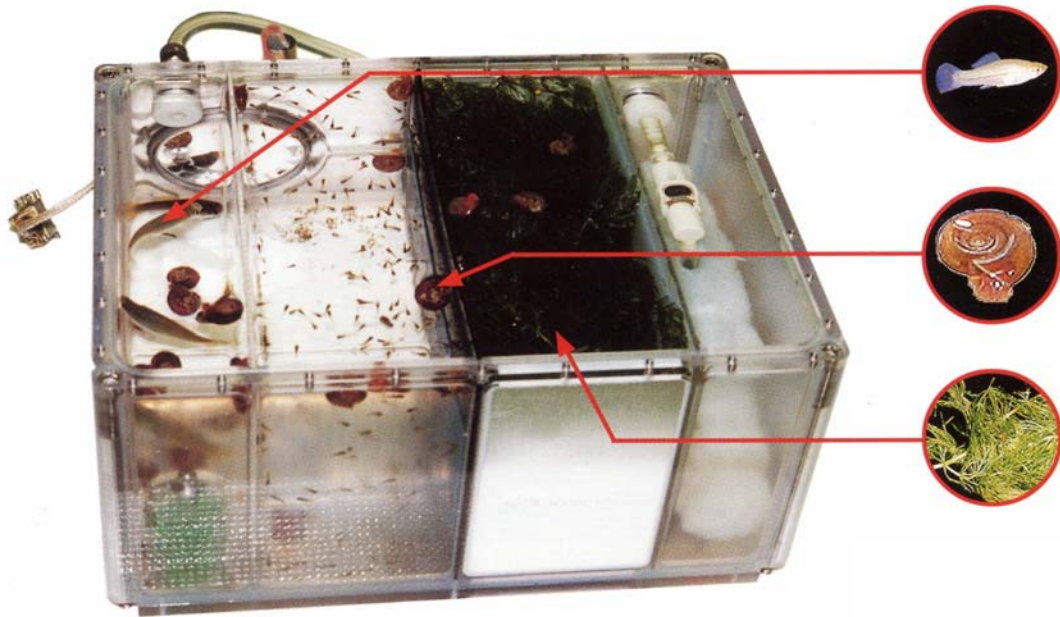
<b>Typ des Weltraumexperimentes</b>	Middeck-Locker Facility	
<b>Dimension</b>	Gesamt (h × b × t)	201 × 365 × 515 mm
	Safety Box (h × b × t)	165 × 339 × 309 mm
	Tank System (h × b × t)	149 × 222 × 307 mm
<b>Stromverbrauch</b>	< 114 W	
<b>Gesamtgewicht</b>	26,3 kg	
<b>Sensoren für</b>	Flussrate des Wassers Wasserdruck Umgebungsdruck Wassertemperatur Lufttemperatur im System O <sub>2</sub> -Konzentration pH-Wert	
<b>Beleuchtung</b>	Pflanzentank	3450-89060 lx
	Tiertank	168-40000 lx 16:8 Stunden (Tag : Nacht)
<b>Thermische Kontrolle</b>	Peltier Wärmepumpe Kühlung durch Umgebungsluft der Shuttle Kabine Umgebungstemperatur	
<b>Videoaufnahmen</b>	CCD Kamera Recorder, 8 mm PAL	120 min; P5 8-mm-Videoband; 16-20 Videobänder (Abhängig von der Länge der Mission)
<b>Wasserparameter</b>	Gesamtwasservolumen Wasservolumen des Kompartimentes der adulten <i>X. helleri</i> -Weibchen Temperaturbereich pH-Wert O <sub>2</sub> -Konzentration Flussrate Salinität	≥ 8,6 Liter ca. 2 Liter 25 °C ± 2 °C 5 - 10 2,5 - 6,5 mg/l 25 l/h entsprechend der Adaptation des Wassers
<b>Futtermittelsversorgung</b>	Futterautomat mit 2 x 20 Futterkompartimenten	Dies entspricht 40 × 0,141 cm <sup>3</sup> bzw. 5,64 cm <sup>3</sup> Futtermittelsvolumen.
	Während STS-89 und STS-90	Fütterung einmal pro Tag 65 g pelletiertes Trockenfutter für vier adulte Schwerträgerweibchen.
	Während der STS-90 Mission	für die gesamte Versuchsdauer zusätzlich 6,3 g „Weekendfutter“



**Abbildung 5:** Konstruktionsschema des C.E.B.A.S.-MINI MODULs (nach Slenzka, 1998; Blüm et al., 2000).

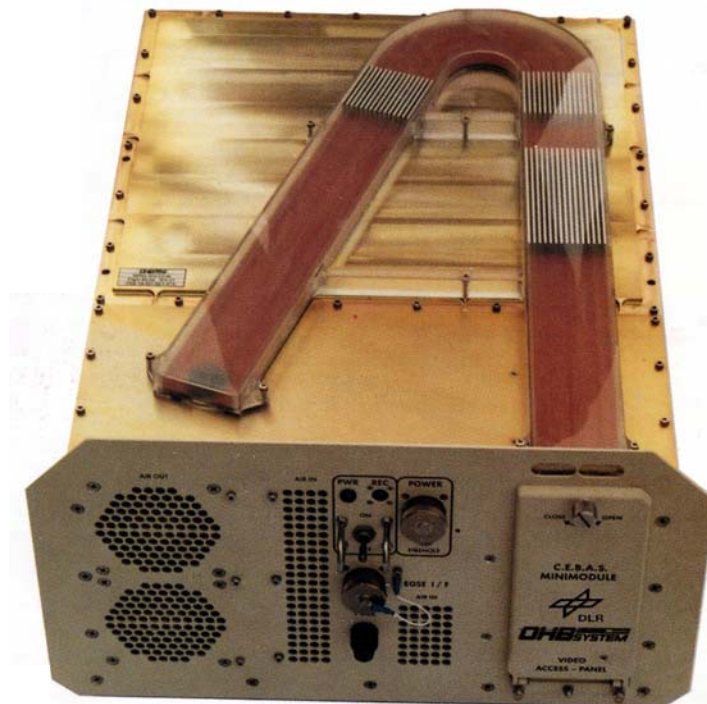
Die wasserführenden Elemente sind blau unterlegt. Der mäandrische Wasserfluss durch das Tanksystem ist mit Hilfe von Pfeilen deutlich gemacht.

P1, P2 = Sensoren Wasserdruck, P3 = Sensor Luftdruck, T1 = Temperatursensor Wasser, T2 = Temperatursensor Luft, pH = pH-Wert-Sensor, O<sub>2</sub> = Sauerstoff-Sensor.



**Abbildung 6:** Tanksystem des C.E.B.A.S.-MINI MODULs.

Auf der linken Seite befindet sich der Bereich für die adulten *X. helleri*-Weibchen. Daneben folgen das Kompartiment für die juvenilen *X. helleri*, das Pflanzenkompartiment und rechts die biologische Filtereinheit (Foto: OHB-System GmbH).



**Abbildung 7:** Aufsicht auf das C.E.B.A.S.-MINI MODUL in geschlossenem Zustand.

In dieser Form (h x b x t = 201 x 365 x 515 mm) wird es in die Konsole des Middecks eingebaut. Vorn rechts ist der Zugang zum Wechselschacht des Videobandes zu erkennen. Der Wechsel der Videobänder war der einzige Eingriff, der routinemäßig während der Weltraumflüge am C.E.B.A.S.-MINI MODUL vorgenommen wurde (Foto: OHB-System GmbH).

Die Vorbereitungen der C.E.B.A.S.-Experimente verliefen weitgehend nach einem einheitlichen Schema und ließen sich in zwei Phasen unterteilen. Die erste Phase, die zwölf Tage vor dem Shuttlestart begann (L -12; gelesen: Launch minus 12 Tage; L = Launch = Shuttlestart), umfasste die Selektion und soziale Konditionierung der für den Flug vorgesehenen Schwerträger, die Adaptation der Bakterienfilter und die Aufbereitung des Wassers (Optimierung mit Stickstoff und Phosphat; Einstellung von Alkalinität und pH-Wert) mit dem das C.E.B.A.S. befüllt werden sollte. Diese Vorbereitungen erfolgten nicht im C.E.B.A.S., sondern in externen Tanks bzw. Aquarien (Andriske et al., 2000).

Fünf Tage vor dem Start (L -5 = Launch minus 5 Tage) begann die zweite Phase, die durch die Integration der Organismen in das C.E.B.A.S. bestimmt wurde. Dabei wurde wie folgt vorgegangen:

- L -5: Integration des Bakterienfilters in das System.
- L -4: Einsetzen von vier adulten Schwerträgerweibchen, 38 Schnecken und 50 g Pflanzen in das System.
- L -3: Einsetzen von 200 juvenilen Schwerträgern.
- L -2: Einsetzen von 30 juvenilen Schnecken.
- L -1: Schließen des Systems, Übergabe an NASA und Integration des C.E.B.A.S in das Space Shuttle.

Pro Versuch wurden vier gesunde *X. helleri*-Weibchen aus der Zucht des Kennedy Space Centers (KSC) eingesetzt. Tabelle 5 zeigt das Gewicht der Tiere zu Beginn und am Ende der C.E.B.A.S.-Experimente. Für die Nutzlasttests beider Missionen liegt nur das Gesamtgewicht aller eingesetzten Schwerträger vor.

Während der gesamten Vorbereitungsphase wurden die Vitalität der Pflanzen und die Effizienz der Bakterienfilter überprüft. Die aufwändige Vorbereitung der Experimente ermöglichte es, die Stabilisierung des Systems allein durch die biologischen Komponenten und nicht durch technische Mittel zu erreichen (Andriske et al., 2000; Blüm et al. 2000).

**Tabelle 5:** Gewicht der in die C.E.B.A.S.-Experimente der STS-89 und STS-90 Space Shuttle-Missionen eingesetzten adulten *X. helleri*-Weibchen zu Beginn und am Ende der Versuche.

		Fisch 1	Fisch 2	Fisch 3	Fisch 4
<b>89NT1</b>	Start	12,9			
	Ende	11,0			
<b>89NT2</b>	Start	12,9			
	Ende	10,3			
<b>89BE</b>	Start	3,00	2,40	2,69	2,98
	Ende	tot	2,44	2,89	2,48
<b>89FE</b>	Start	4,08	2,21	2,39	2,29
	Ende	3,82	1,81	2,00	1,97
<b>90NT1</b>	Start	14,8			
	Ende	3,7 (nur ein überlebendes Weibchen)			
<b>90NT2</b>	Start	11,9			
	Ende	10,3			
<b>90BE</b>	Start	1,48	1,59	1,22	1,71
	Ende	1,43	1,64	tot	tot
<b>90FE</b>	Start	2,02	1,71	1,72	1,56
	Ende	1,96	1,41	1,78	1,31

Bei den Nutzlasttests (89NT1, 89NT2, 90NT1, 90NT2) ist nur das Gesamtgewicht der Tiere angegeben. Gewichtsangaben in Gramm.

### 4.3 Differentialblutbild, spontane Zellteilungsaktivität, Phagozytoserate

Um die Auswirkungen der Schwerelosigkeit auf das Abwehrsystem der Schwerträger beurteilen zu können, wurden im Anschluss an die Weltraumflüge folgende für die Immunabwehr relevante Parameter von Nierengewebsleukozyten bestimmt:

1. Das Differentialblutbild des Nierengewebes (der quantitative Anteil verschiedener Leukozytenpopulationen an den gesamten Leukozyten des Nierengewebes).
2. Die spontane Zellteilungsaktivität von Nierengewebszellen.
3. Die Phagozytoserate von Nierengewebsphagozyten.

### **4.3.1 Nierenentnahme**

Zur Entnahme des Nierenmaterials wurde der Schädel der Schwertträger in Höhe des hinteren Kiemendeckelrandes abgetrennt. Die Niere (rechter und linker Teil) lag nun sattelförmig und frei zugänglich unterhalb der Wirbelsäule im Rumpf der Fische. Von dort konnte das Nierenmaterial mit Hilfe einer spitzen Pinzette leicht herauspräpariert werden.

### **4.3.2 Differentialblutbild**

#### **4.3.2.1 Nierenquetschpräparate**

Kleine Teile des Nierenmaterials wurden auf Objektträger gebracht, die zuvor mit Aceton entfettet wurden. Im Anschluss daran wurde das Nierenmaterial mit Hilfe eines Ausstrichglases auf dem Objektträger dünnsschichtig ausgestrichen. Die Fixierung des Präparates für die folgende panoptische Färbung erfolgte durch Lufttrocknung.

#### **4.3.2.2 Färbung der Nierenquetschpräparate**

Die panoptische Färbung der Nierenquetschpräparate erfolgte in Küvetten mit Hilfe der Pappenheimfärbung, die sich bei Fischblut bewährt hat (Hallmann, 1980; Lehmann und Stürenberg, 1974).

Die Pappenheimfärbung ist eine Kombination aus einer May-Grünwald- und einer darauf folgenden Giemsa-Färbung. Zellbestandteile, die sich mit basischem Methylenblau anfärben lassen, werden als basophil bezeichnet. Diejenigen Strukturen, die durch saures Eosin eine gelb-rote Farbe annehmen, werden eosinophil genannt. Da diese Färbereigenschaften vom pH-Wert des Mediums abhängig sind, wird bei der May-Grünwald-Färbung Weise-Puffer mit einem konstanten pH-Wert von 7,2 benutzt.

- Fixierung in May-Grünwald-Lösung (Merck, 1424)	5 min
- May-Grünwald-Lösung in Weise-Puffer (Merck, 9468) (1:1)	75 sec
- 2 x spülen in Weise-Puffer	
- Giemsa-Gebrauchslösung (4,5 ml Giemsa-Stammlösung (Merck, 9204) in 150 ml kaltem Leitungswasser)	60 min
- kaltes Leitungswasser	1 min
- Lufttrocknen	

#### 4.3.2.3 Erstellen des Differentialblutbildes

Das Differentialblutbild diente dazu, eventuell auftretende quantitative und qualitative Veränderungen im Blutbild der Versuchsfische unter Raumfahrtbedingungen nachzuweisen. Mit Hilfe der Differenzierung der Blutausrichthe war es möglich, den Zustand und die Menge der verschiedenen Blutzelltypen, ihre Entwicklungsstadien und eventuell auftretende krankhafte Veränderungen festzustellen. Die Differenzierung der Nierenquetschpräparate erfolgte lichtmikroskopisch (Mikroskop: Forschungsmikroskop DMRB, Leica, Wetzlar) nach einer Methode von Peters und Schwarzer (1985). Zur Vereinfachung des Zählvorgangs wurde mit einem Blutbilddifferenziergerät gearbeitet (Karl Hecht Assistent GmbH, Counter AC-12). Die Blutzellen wurden bei 1000-facher Vergrößerung gezählt. Dabei wurden alle Leukozyten innerhalb des Sichtfeldes berücksichtigt. Pro Fisch wurden zwischen 300 und 600 Blutzellen gezählt und der prozentuale Anteil der verschiedenen Leukozytentypen an den gesamten Leukozyten im Nierengewebe bestimmt.

Folgende Leukozytenpopulationen wurden bei der Differenzierung berücksichtigt:

- Monozyten
- Makrophagen
- Metagranulozyten
- stabkernige Granulozyten
- segmentkernige Granulozyten
- eosinophile Granulozyten



- Lymphozyten
- blastäre Zellen.

Bei der Differenzierung der Lymphozyten im Nierengewebe von *X. helleri* traten, wie bei fast allen Fischarten, Schwierigkeiten bei der Unterscheidung zwischen kleinen Lymphozyten und Thrombozyten auf (Hamers et al., 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurden bei den untersuchten *X. helleri* solche Zellen als Lymphozyten betrachtet, die den Kriterien für diesen Zelltyp nach Schütt et al. (1997) entsprachen:

- runde, leicht ovale Zellen von einer Größe zwischen 6 und 8  $\mu\text{m}$
- großer, runder und zentrischer Kern
- basophiler, schmaler Zytoplasmasaum um den Zellkern.

#### **4.3.3 Spontane Zellteilungsaktivität**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die spontane Proliferation im Nierengewebe anhand der durchflusszytofluorometrischen Messung des Anteils der Zellen bestimmt, die sich in der DNA-Synthesephase (S-Phase) der Mitose befanden.

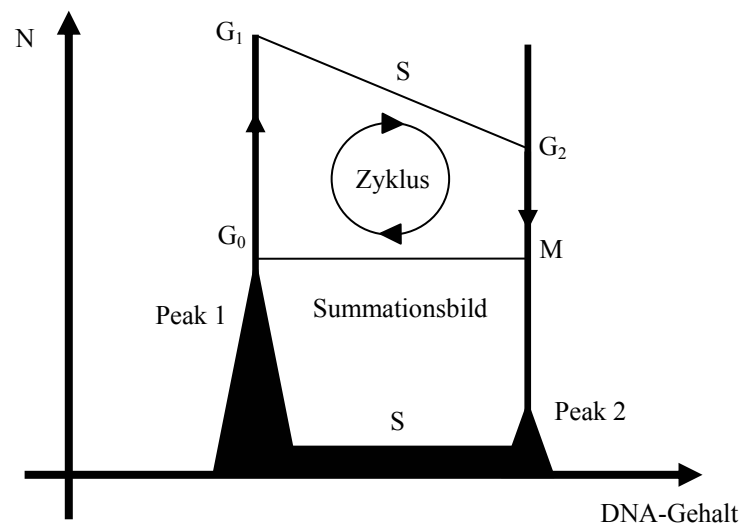
Die Technik der Durchflusszytofluorometrie (Zytometrie) wurde durch Göhde und Dittrich (1969) und Van Dilla et al. (1969) eingeführt. Seit Beginn der 90er Jahre hat die durchflusszytofluorometrische Messung des zellulären DNA-Gehaltes in der humanen klinischen Analytik immer mehr an Bedeutung gewonnen (Otto und Liedl, 1994).

Das Prinzip der Durchflusszytofluorometrie beruht darauf, dass der DNA-Gehalt einer einzelnen Zelle durch die Anfärbung mit einem DNA-spezifischen Fluorochrom zytometrisch quantifizierbar wird. Für eine durchflusszytofluorometrische Messung des DNA-Gehaltes von Zellen einer Einzelzellsuspension werden Zellen, deren DNA zuvor mit Hilfe von spezifischen fluoreszierenden Farbstoffen markiert wurde, durch einen mikroskopisch feinen Flüssigkeitskanal geleitet. Der Messkanal wird an einem Punkt von einem Lichtstrahl getroffen, der den DNA-Farbstoff zur Emission von Licht anregt. Die Stärke des emittierten Lichtes ist proportional zu der Menge des Farbstoffes, den die DNA im Zellkern gebunden hat. Je mehr DNA eine Zelle enthält, um so stärker ist

das emittierte Lichtsignal. Dieses Lichtsignal wird von einem Detektor registriert.

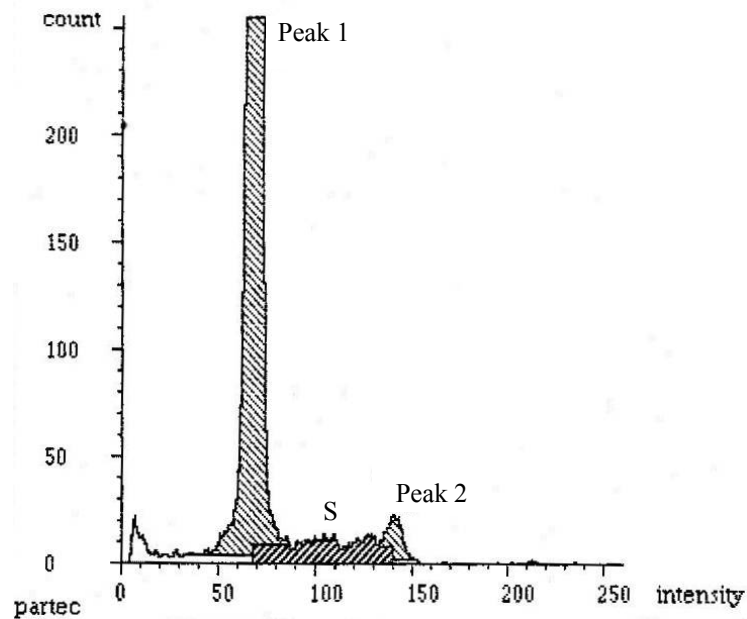
Aus der Messung einer Vielzahl einzelner Zellen entsteht das lineare DNA-Histogramm, in dem auf der X-Achse die Größe des DNA-Fluoreszenzsignals und auf der Y-Achse die Anzahl der gemessenen Teilchen pro Intensitätsklasse gegeneinander aufgetragen sind. Das Histogramm einer zytometrischen DNA-Analyse gibt Aufschluss über die zytogenetische Zusammensetzung und das Proliferationsverhalten der gemessenen Zellpopulation (Otto und Liedl, 1994). Der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase der Mitose befinden und somit proliferieren, kann mit Hilfe der Daten des Histogramms vom Auswertungsprogramm (Partec DPAC V2.0, Fa. Partec, Münster) berechnet werden.

Abbildung 8 zeigt die idealisierte Form eines entsprechenden Histogramms und Abbildung 9 ein DNA-Histogramm, welches im Rahmen der vorliegenden Arbeit gemessen wurde. Das DNA-Histogramm eines Gewebes das Zellen beinhaltet, die sich in Teilung befinden, zeigt zwei deutliche Peaks. In den Abbildungen 8 und 9 stellt der linke Peak die Zellen dar, die einen "normalen" diploiden Chromosomensatz enthalten. Der rechte Peak zeigt die Zellen, deren Chromosomensatz sich in der Synthesephase (S-Phase) der Mitose verdoppelt hat.



**Abbildung 8:** Zellzyklus im stark schematisierten DNA-Histogramm (nach Otto und Liedl, 1994).

X-Achse = Größe des DNA-Fluoreszenzsignals (DNA-Gehalt), Y-Achse = Anzahl der gemessenen Teilchen (Zellen) pro Intensitätsklasse, G<sub>0</sub> = Ruhephase, G<sub>1</sub> = präsynthetische Phase, S = Synthesephase, G<sub>2</sub> = prämitotischen Phase, M = Mitosephase, Peak 1 = Peak der Zellen mit diploidem Chromosomensatz (2c), Peak 2 = Peak der Zellen mit verdoppelten Chromosomensatz (4c).



**Abbildung 9:** DNA-Histogramm vom Nierengewebe eines *X. helleri*.

Die Proben wurden mit dem Zellanalysesystem CA II (Einkanalmessgerät) der Firma Partec, Münster gemessen.

Peak 1 = Peak der Zellen, die sich in der präsynthetischen Phase befinden (doppelter Chromosomensatz).  
S = Zellen, die sich in der Synthesephase befinden (Verdopplungsphase der DNA). Peak 2 = Zellen, die sich in der prämitotischen Phase befinden (vierfacher Chromosomensatz).

Im oberen Bereich von Abbildung 8 ist ein mitotischer Zellzyklus wiedergegeben, der die Entwicklung der Zelle von einer Zellgeneration zur nächsten umfasst. Die Zelle besitzt während der Ruhephase ( $G_0$ ) und der präsynthetischen Phase ( $G_1$ ) einen diploiden Chromosomensatz ( $2c$ ). In der Synthesephase (S) wird die DNA-Menge durch Replikation vermehrt. Mit dem Erreichen der prämitotischen Phase ( $G_2$ ), in der die Zelle einen reduplizierten Chromosomensatz ( $4c$ ) und den doppelten DNA-Gehalt aufweist, endet die S-Phase. In der nachfolgenden, kurz andauernden Mitosephase (M) kommt es zur gleichmäßigen Aufteilung der Chromosomen auf zwei Tochterzellen, die dann jeweils wieder einen diploiden Chromosomensatz ( $2c$ ) enthalten, so dass der Zyklus von Neuem beginnen kann (Otto und Liedl, 1994).

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Verfahren zur Messung der spontanen Zellproliferation wurde zunächst eine Einzelzellsuspension aus dem Nierengewebsmaterial hergestellt. Darauf folgte die Färbung der Kern-DNA mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff. Mit Hilfe der Durchflusszytofluorometrie konnte im Anschluss daran die Proliferationsrate erfasst werden.

### 4.3.3.1 Aufarbeitung der Proben

Zunächst wurde das Nierenmaterial wie unter 4.2 beschrieben entnommen und zur Resuspension (Herauslösung und Vereinzeln der Zellen des Nierengewebes) in eine kleine Petrischale ( $\varnothing$  3 cm) mit Aufschlusslösung (1,3 ml C 100 T) gegeben. Das C 100 T diente der Zersetzung des Gewebes und der Perforation der Zell- und Zellkernwände, um diese für den DAPI-Farbstoff (4', 6-Diamidino-2-phenylindol) durchlässig zu machen. Die Resuspension des Gewebes erfolgte für eine Dauer von mindestens 20 Minuten und wurde durch wiederholtes Aufziehen der Lösung mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze (Verminderung der Scherkräfte, die auf die Zellen während des Aufziehens wirken) unterstützt. Um Gewebereste, die sich nicht aufgelöst hatten, zu entfernen, wurde die Suspension anschließend durch Gaze mit einem Porendurchmesser von 50  $\mu$ m filtriert. Die Fixierung der Einzelzellsuspension erfolgte durch Zugabe von 1 ml des Filtrates zu 9 ml 80%igem Alkohol. Vor der Messung wurden die Proben mindestens drei Tage bei 4 °C in dieser Form aufbewahrt.

### 4.3.3.2 Färbung der Proben

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4', 6-Diamidino-2-phenylindol) ausgewählt. DAPI wurde von Göhde et al. (1978) in die Durchflusszytofluorometrie eingeführt und eignet sich aufgrund seiner bevorzugten Bindung an adenin-/thymidinreiche DNA-Sequenzen besonders gut für die DNA-Analyse (Hamers, 1994).

Zum Zweck der zytometrischen Messung wurde 1 ml der gut durchmischten und fixierten Einzelzelllösung entnommen und 10 min bei zweihundertfacher Erdbeschleunigung und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der vollständigen Entfernung des Überstandes erfolgte die Resuspension des Pellets in 500  $\mu$ l C 100 T. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 4 ml DAPI Färbelösung, die vier Stunden bei Dunkelheit und Raumtemperatur inkubierte, gefärbt. Darauf folgte die durchflusszytofluorometrische Messung.

Ansetzen der Aufschlusslösung (C 100 T):

100 ml A. bidest.

+ 2,1 g Zitronensäure (Sigma C1909)

+ 500 µl Tween 20 (Sigma P1379)

Lagerung bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Die Lösung ist maximal eine Woche haltbar.

Ansetzen der DAPI-Stammlösung:

3,5 mg DAPI-Pulver (Serva 18860)

+ 10 ml A. bidest.

Lagerung bei Dunkelheit und + 4°C. Haltbar, bis Trübung einsetzt.

Ansetzen der DAPI-Färbelösung:

100 ml A. bidest

+ 7,12 g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> × 2 H<sub>2</sub>O (Merck 6580)

+ 500 µl DAPI Stammlösung.

Lagerung bei Dunkelheit und Raumtemperatur. Drei Wochen haltbar.

#### 4.3.3.3 Messung des DNA-Gehaltes

Die durchflusszytofluorometrische Messung der Proben erfolgte mit dem Zellanalysesystem CA II (Einkanalmessgerät) der Firma Partec, Münster. Für die DAPI-Messungen mit dem Partec CA II wurden folgende Filter verwendet:

**Tabelle 6:** Filter und Funktion der Filter im Partec CA II Zellanalysesystem.

Bezeichnung der Filter bzw. Spiegel (in der Reihenfolge des Lichtdurchtritts)	Funktion der Filter bzw. Spiegel
KG 1	Wärmeschutzfilter
BG 38	Infrarotfilter
UG 1	Anregungsfilter
TK 420	Dichroischer Spiegel (Teilerkante)
Spiegel 20/80	Teilerspiegel
GG 455	Sperrfilter
Spiegel	Vollspiegel
GG435	Sperrfilter

Als Lichtquelle diente eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO 100) der Firma

Osram, welche ultraviolettes Licht abgibt. Die Histogramme der Messungen wurden mit Hilfe des Analyseprogramms Partec DPAC V2.0 der Firma Partec, Münster, analysiert. Die Auswertung der Histogramme bezüglich des Anteils der Zellen, die sich in der S-Phase der Mitose befanden, erfolgte mit dem gleichen Programm.

#### **4.3.4 Phagozytoserate**

Die Messung der Phagozytoseaktivität von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen spielt eine wichtige Rolle bei der Feststellung des Gesundheitsstatus von Fischen und anderen Organismen (einschl. Menschen) (Mathews et al., 1990; Schmitz und Rothe, 1994). Die Phagozytoseleistung von Phagozyten kann mit Hilfe einer lichtmikroskopischen Zähltechnik festgestellt werden (Mathews et al., 1990). Basierend auf der Methode von Mathews et al. (1990) wurde die folgende Technik von Goerlich und Hamers (1996) für die Evaluierung der Phagozytoserate von Phagozyten aus den C.E.B.A.S.-Experimenten entwickelt.

Zu diesem Zweck wurden die Leukozyten aus dem Nierengewebe der Versuchsfische isoliert und mit Latex Beads von 1µm Durchmesser inkubiert. Nach der 30-minütigen Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet wurde auf einen Objektträger aufgebracht. Lichtmikroskopisch wurde der prozentuale Anteil der Zellen bestimmt, der Latex-Beads phagozytiert hatte.

##### **4.3.4.1 Aufarbeitung der Proben**

Zunächst wurde das Nierenmaterial, wie unter 4.2 beschrieben, entnommen und in eine kleine Petrischale (Ø 3 cm) mit Kulturmedium (siehe unten) gegeben. Die Resuspension (Herauslösung und Vereinzeln der Nierengewebszellen) des Gewebes erfolgte für eine Dauer von mindestens 20 Minuten und wurde durch vorsichtiges, wiederholtes Aufziehen der Lösung und der darin enthaltenen Nierengewebsstücke mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze (Verminderung der Scherkräfte, die auf die Zellen während des Aufziehens wirken) unterstützt. Um Gewebereste, die sich nicht auflösten, zu entfernen, wurde die Suspension anschließend durch Gaze mit einem

Porendurchmesser von 50 µm filtriert.

Mit Hilfe einer Trypan-Blau-Färbung (Sigma T8154) wurde anschließend die Konzentration und die Vitalität der Zellen mittels einer Neubauer-Zählkammer (improved) (Brand, Wertheim) bestimmt. Das Verhältnis zwischen Kulturmedium und Trypan-Blau betrug 1:1, wobei das Trypan-Blau zuvor mit PBS (Phosphate buffered saline) (Verhältnis 1:2) verdünnt wurde.

Nach Feststellung der Zellkonzentration konnte die Einzelzellsuspension auf 400 Zellen/µl eingestellt werden. Im Anschluss daran wurden 50 µl der auf 400 Zellen/µl eingestellten Einzelzellsuspension in 1,5-ml-Reaktionsgefäße gegeben und mit 10 µl der Latex-Beads-Verdünnung versetzt, so dass pro Zelle ca. 100 Latex-Beads vorhanden waren (siehe unten). Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei einer Temperatur von 25 °C.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Eppendorfgefäße 10 min bei 200-facher Erdbeschleunigung und 25 °C zentrifugiert und der Überstand wurde vorsichtig abgenommen. Das Pellet mit den darin enthaltenen Phagozyten wurde in 10 µl eiskaltem FKS (fötales Kälberserum) aufgenommen und auf gereinigte Objektträger aufgetragen.

Ansetzen des Kulturmediums:

Das Kulturmedium wurde kurz vor der Probenverarbeitung in 50 ml Portionen angesetzt.

RPMI-1640 Medium, HEPES Modifizierung	(Sigma R5886)
+ 10 % FKS	(Sigma F4135)
+ 1 % Gentamycin	(Sigma G1397)
+ 0,004 M L-Glutamin	(Sigma G5713)

Ansetzen der Latex-Beads-Verdünnung:

Die Konzentration der Latex-Beads in den Inkubationsansätzen betrug ca. 100 Beads pro Zelle.

Um diese Konzentration zu erreichen, wurde die Stammlösung der Beads (Polyscience Inc., Polybead Polystyrene Microspheres, 1,0 µ Ø, CAT# 07310,) mit PBS (Sigma P5886) verdünnt:

5 µl Stammlösung (ca. 80 Mio. Beads) + 400 µl PBS ~ 2 Mio. Latex-Beads/10 µl

Von dieser Latex-Beads-Verdünnung wurden jeweils 10 µl zu den Inkubationsansätzen (50 µl mit 400 Zellen/µl) gegeben.

Die Präparate wurden luftgetrocknet und anschließend entsprechend einer Pappenheimfärbung gefärbt. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch bei 1000-facher Vergrößerung. Pro Präparat wurden insgesamt 300 Zellen gezählt. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Zellen, die Latex-Beads aufgenommen hatten, berechnet.

Färben der Phagozytoseproben:

Die panoptische Färbung der Phagozytoseproben erfolgte mit Hilfe der Pappenheimfärbung. Der Färbeprozess wurde jedoch leicht modifiziert, da die Erfahrung zeigte, dass sich die Proben trotz gründlicher Entfettung der Objektträger, besonders bei der Gegenfärbung mit Giemsa, von diesen ablösen können. Folgende Maßnahmen halfen, den Ablösevorgang zu unterbinden:

- Objektträger während der Färbung nicht oder nur wenig und vorsichtig bewegen
- Temperierung der Färbebäder auf 25 – 30 °C
- Spülvorgang am Ende der Färbung sehr vorsichtig durchführen

Die Färbungen wurden nach folgendem Schema durchgeführt:

- |  |         |
|--|---------|
| - Fixierung in May-Grünwald-Lösung (Merck, 1424)   | 5 min   |
| - May-Grünwald-Lösung in Weise-Puffer (Merck, 9468) (1:1)  | 75 sec. |
| - 2 x spülen in Weise-Puffer   |         |
| - Giemsa-Gebrauchslösung (4,5 ml Giemsa-Stammlösung (Merck, 9204) in 150 ml kaltem Leitungswasser) | 5 min   |
| - kaltes Leitungswasser  | 1 min   |
| - Lufttrocknen   |         |

#### 4.3.5 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten aus den C.E.B.A.S.-Läufen umfasste neben der Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen auch die Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den Experimenten.

Die Daten der vorliegenden Arbeit stammen aus acht unterschiedlichen C.E.B.A.S.-Versuchen (vergleiche Tabelle 9). Sie entspringen somit verschiedenen Grundgesamtheiten (jeweilige *X. helleri*-Population im Experiment), wobei bei jeder Beobachtungseinheit (ein Fisch) die Zielgröße (z. B. der prozentuale Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten des Nierengewebes) bestimmt wurde. Die aus den



C.E.B.A.S.-Experimenten gewonnenen Daten sind somit Messwerte aus unabhängigen Stichproben, bei denen die Stichprobenumfänge verschieden sein dürfen (Stahel, 2000). Da keine begründete Hypothese vorlag, in welche „Richtung“ (Zunahme/Abnahme) sich die experimentellen Bedingungen auf die untersuchten Parameter auswirkten, war es notwendig, einen zweiseitigen statistischen Test durchzuführen (Sachs, 1999). Zweiseitige statistische Tests können sowohl signifikante Zu- als auch Abnahmen nachweisen. Die ermittelten Daten wurden zunächst mit Hilfe des Kolmogoroff-Smirnoff-Anpassungstests, der bei kleinen Stichprobenumfängen angewendet wird (Sachs, 1999), auf Normalverteilung überprüft. Da sich dabei zeigte, dass die Messwerte innerhalb einer Versuchstiergruppe nicht in jedem Fall normalverteilt waren (z. B. prozentualer Anteil der Makrophagen bei *X. helleri* aus der Standardhaltung) wurde der verteilungsunabhängige U-Test (Wilcoxon, Mann und Whitney-Test (Sachs, 1999)) zur Bestimmung signifikanter Unterschiede zwischen den C.E.B.A.S.-Experimenten herangezogen. Nichtparametrische Tests (verteilungsunabhängige Tests) haben gegenüber parametrischen (verteilungsabhängige Tests) zudem den Vorteil einer höheren Wirksamkeit bei niedrigen Stichprobenumfängen ( $n < 15$ ) (Sachs, 1999). Folgende Signifikanzklassen wurden angewendet:

**Tabelle 7:** Signifikanzklassen und „Sternchen-Konvention“.

<b>Fall</b>	<b>Interpretation</b>	<b>Notation</b>
$p > 0,05$	nicht signifikant	
$0,05 \geq p > 0,01$	schwach signifikant	*
$0,01 \geq p > 0,001$	stark signifikant	**
$0,001 \geq p$	sehr stark signifikant	***

Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem Programmsystem SPSS für Windows (Version 10.0.7) durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

Inhalt dieses Teils der Arbeit sind die Daten des Abwehrsystems von Schwerträgern aus acht C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-89 und STS-90 Space Shuttle-Missionen ermittelt wurden. Diese teilten sich, wie in Tabelle 3 im Material- und Methoden-Teil dargestellt, in Daten von Tieren aus der Standard- bzw. Aquarienhaltung (Standard), aus Nutzlasttests (NT), aus Bodenkontrollexperimenten (BE) und orbitalen Flugexperimenten (FE) auf.

Um die Arbeit trotz der großen Anzahl an untersuchten Parametern und der verschiedenen Fragestellungen, zu deren Beantwortung sie herangezogen wurden, übersichtlich strukturieren zu können, wurden Daten in unterschiedlichen Zusammenhängen mehrfach dargestellt.

### 5.1 Wasserwerte und Housekeepingdaten der C.E.B.A.S.-Experimente

An dieser Stelle soll auf die Wasserwerte und Housekeepingdaten der C.E.B.A.S.-Experimente eingegangen werden, da die Umweltbedingungen im C.E.B.A.S. möglicherweise dazu in der Lage waren, die untersuchten Abwehrparameter zu beeinflussen. Zusätzlich wird im weiteren Verlauf des Ergebnisteils auf wichtige Unterschiede zwischen den C.E.B.A.S.-Experimenten bezüglich der Wasserwerte und Housekeepingdaten eingegangen werden.

Die Wasserwerte (Wasserhärte, Nitrat, Nitrit, Ammonium, Chlorid, Phosphat, pH-Wert) wurden zwei Tage vor dem Start des Space Shuttles und sofort nach Abschluss der Experimente bestimmt (Tabelle 8). Unter Housekeepingdaten sind die während eines C.E.B.A.S.-Laufes in Intervallen von 10 Minuten aufgezeichneten Werte von Sauerstoff, pH-Wert und Wassertemperatur zu verstehen. Die Abbildungen 10-17 im Anhang zeigen diese Daten. Außerdem sind sie in Tabelle 9 in schriftlicher Form zusammengefasst worden.

Leider liegen nur wenige Angaben über den Toleranzbereich von *X. helleri* bezüglich der Wasserwerte vor. In Tabelle 8 sind unter der Rubrik „Normbereich“ die Anforderungen, die *X. helleri* an die Wasserqualität stellt, aufgeführt.

**Tabelle 8:** Wasserchemische Kenndaten der STS-89 und STS-90 C.E.B.A.S.-Experimente.

		89NT1	89NT2	89BE	89FE	90NT1	90NT2	90BE	90FE	Standardhaltung	Normbereich
Dauer der Experimente		11	11	9	9	22	22	16	16	-	-
Anzahl der Tiere	Start	4	4	4	4	4	4	4	4	-	-
	Ende	4	4	3	4	1	4	2	4	-	-
Härte (°dH)	Start	6	6	8	9,5	6	6	10	10	8	< 30
	Ende	4	6	8,5	7	5	6	25	38,5	-	
Nitrat (NO <sub>3</sub> ) mg/l	Start	12	13	14	15	11	13	18	18	14,00	< 100,00
	Ende	15	38	16	16,7	12	22	38	35	-	
Nitrit (NO <sub>2</sub> ) mg/l	Start	0,021	0,019	0,012	0,068	0,045	0,008	0,050	0,062	0,036	< 1,00
	Ende	1,473	0,052	0,066	0,04	0,023	0,065	0,181	0,027	-	
Ammonium (NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> ) mg/l	Start	0,045	0,011	0,028	0,011	0,037	0,021	0,043	0,029	0,028	< 0,250
	Ende	0,088	0,049	0,107	0,11	0,070	0,039	0,176	0,166	-	
Ammoniak (NH <sub>3</sub> ) mg/l *	Max.	0,0432	-	0,0209	0,0540	0,0344	0,0119	0,0864	0,0558	-	< 0,020
Chlorid mg/l	Start	36,5	35,9	nd	nd	42,9	44,9	4,51	4,27	37,5	-
	Ende	40,2	35,8	nd	nd	35,8	47,7	1,62	0,98	-	
Phosphat (PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ) mg/l	Start	0,47	0,49	0,272	0,16	0,334	0,418	0,154	0,102	0,300	-
	Ende	0,096	0,06	0,414	nd	0,211	0,104	0,331	0,459	-	
pH-Wert	Start	8,11	7,98	7,0	7,32	7,87	8,1	7,2	7,2	7,6	7,0-8,1
	Ende	8,67	7,21	7,88	8,1	7,51	7,54	8,4	8,8	-	
Sauerstoff (O <sub>2</sub> )	Start	5,0	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	-	> 3,0
	Ende	5,0	6,0	3,5	4,5	2,5**	3,0**	4,5**	4,5**	-	

Tabelle 10 zeigt wichtige Kenndaten der terrestrischen und orbitalen C.E.B.A.S.-Experimente, die im Rahmen der STS-89- und STS-90-Mission durchgeführt wurden. Tabelle 9 und die Abbildungen 10-17 geben einen besseren Eindruck von der Entwicklung der Sauerstoffkonzentration und des pH-Wertes im Verlauf der Experimente. nd = nicht nachweisbar, Start = Messung vor Beginn des Experimentes, Ende = Messung nach Abschluss des Experimentes, Standardhaltung = Mittlere Wasserwerte in den Aquarien am Kennedy Space Center, Normbereich = Normwerte für die Haltung von *X. helleri*, °dH = Grad deutscher Härte.

\* Mit Hilfe einer Tabelle von Emerson et al. (1975) berechnete, maximale Ammoniakkonzentration. Grundlage der Berechnungen waren die Ammoniumkonzentrationen, die nach Abschluss der Experimente gemessen wurden, sowie der maximale pH-Wert, der bei maximaler Temperatur gemessen wurde. Die berechnete Ammoniakkonzentration ist also diejenige, die unter den ungünstigsten Bedingungen im Experiment hätte entstehen können und keine real gemessene.

\*\* Gasaustauscher musste einsetzen, damit diese Sauerstoffkonzentration erreicht wurde.

**Tabelle 9:** Housekeepingdaten, die während der C.E.B.A.S.-Experimente aufgezeichnet wurden.

	<b>89NT1</b>	<b>89NT2</b>	<b>89BE</b>	<b>89FE</b>	<b>90NT1</b>	<b>90NT2</b>	<b>90BE</b>	<b>90FE</b>
<b>O<sub>2</sub>-Konz.</b>	zwischen ca. 3,8 und 6,5 mg/l, häufig Minimum von ca. 3,0 mg/l.	zwischen 4,5 und 6,5 mg/l	zwischen 4,5 und 6,5 mg/l, gegen Ende zwischen ca. 6,5 und 3,0 mg/l	zwischen 4,5 und 6,5 mg/l, gegen Ende zwischen ca. 6,5 und 4,0 mg/l, selten weniger als 3,5 mg/l	Tag 1 und 2: zwischen 4,0 und 6,5 mg/l Tag 3: Konz. sinkt auf 3,0 mg/l, anschließend innerhalb von 4 Tagen auf 1,5 mg/l (Gasaustauscher setzt ein), ab Tag 7 fällt die O <sub>2</sub> -Konz. regelmäßig auf 1,5 mg/l	bis Tag 7 zwischen ca. 4,0 und 6,5 mg/l, ab Tag 7 nimmt Konz. innerhalb von 15 Tagen auf 1,5 mg/l ab, ab Tag 9 Konz. unter 3 mg/l, am Tag 21 Konz. unter 1,5 mg/l (Gasaustauscher setzt ein)	bis Tag 8 zwischen 4,5 und 6,5 mg/l, von Tag 8 nimmt Konz. innerhalb von 6 Tagen bis auf 2,5 mg/l ab (Gasaustauscher setzt ein)	bis Tag 9 zwischen 4,5 und 6,5 mg/l, ab Tag 10 nimmt Konz. innerhalb von 3 Tagen bis auf 2,5 mg/l ab (Gasaustauscher setzt ein)
<b>pH-Wert</b>	Mittlerer pH-Wert nimmt zu. Minimum bei ca. 8,0, ab Tag 2 Maximum häufig bei ca. pH 9,2	Mittlerer pH-Wert nimmt kontinuierlich von pH 6,7 auf ca. 6,4 ab.	Mittlerer pH-Wert nimmt zu. Minimum ca. pH 7,3 Maximum ca. pH 8,7	Mittlerer pH-Wert nimmt zu. Minimum bei ca. pH 7,3 Maximum ca. pH 9,2	Mittlerer pH-Wert nimmt zunächst stark zu. Minimum ca. pH 7,5, Maximum ca. pH 9,2. Ab Tag 5 nimmt das pH Niveau von pH 9,2 auf pH 6,0 ab.	Mittlerer pH-Wert nimmt zu. Minimum bei ca. pH 7,4 Maximum bei ca. pH 8,8	Mittlerer pH-Wert nimmt gleichmäßig zu. Minimum ca. pH 7,3 Maximum bei ca. pH 9,2	Mittlerer pH-Wert nimmt gleichmäßig zu. Minimum bei ca. pH 7,2 Maximum bei ca. pH 9,2
<b>Wassertemp.</b>	zwischen 24 °C und 26 °C	zwischen 25 °C und 27 °C	zwischen 24 °C und 26 °C	zwischen 24 °C und 26 °C	zwischen 24 °C und 26 °C	zwischen 27 °C und 28 °C	zwischen 25 °C und 27 °C.	Temperatur bis Tag 3 zwischen 24 °C und 25 °C. Ab Tag 9 kontinuierliche Zunahme auf ca. 30 °C (Tag 14). Abnahme auf 25 °C zwischen Tag 15 und 16.
<b>überlebende Fische</b>	4	4	3	4	1	4	2	4

Beschrieben ist die Entwicklung des Sauerstoffgehaltes, des pH-Wertes und der Wassertemperatur während der C.E.B.A.S.-Experimente vom Zeitpunkt des Starts der Space Shuttle bzw. Tag eins der Bodenexperimente bis zum Ende der Versuche. Vergleiche auch Abbildungen 10-17. Die Experimente, die der Schwerelosigkeit ausgesetzt waren, sind grau unterlegt.

Normbereich *X. helleri* O<sub>2</sub>-Konzentration: > 3,0 mg/l, Normbereich *X. helleri* pH-Wert: pH 7,0-8,1, Normbereich *X. helleri* Wassertemperatur: 22-28 °C.

## **5.2 Einfluss der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf das Abwehrsystem von *X. helleri***

Um beurteilen zu können, inwieweit die Bedingungen eines Weltraumfluges einen Einfluss auf das Abwehrsystem von *X. helleri* hatten, musste zunächst geklärt werden, ob nicht schon allein deren Haltung im C.E.B.A.S. - unabhängig von der Mikrogravitation - einen Einfluss auf die untersuchten Abwehrparameter hatte. Zu diesem Zweck wurden die Daten der Schwertträger aus den terrestrischen Nutzlasttests (NT) und den Bodenkontrollexperimenten (BE) der STS-89- und STS-90-Mission mit den Daten der Tiere aus der Standardhaltung (Standard) verglichen. Dieser Vergleich war notwendig, da sich die Umweltbedingungen im C.E.B.A.S. in starkem Maße von den Bedingungen der Standardhaltung am KSC unterschieden (vergleiche Tabelle 8, 9; Abbildungen 10-17).

Da die Ergebnisse aus Experimenten mit unterschiedlicher Dauer (89BE: 9 Tage; 89NT1, 89NT2: 11 Tage; 90BE: 16 Tage; 90NT1, 90NT2: 22 Tage) nicht ohne weiteres miteinander verglichen werden können, sind sie getrennt voneinander dargestellt worden. Auf den Einfluss der Dauer der terrestrischen Haltung im C.E.B.A.S. wird zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen werden (siehe Kapitel 5.5).

### **5.2.1 Vergleich der Wasserwerte und Housekeepingdaten von Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten**

Die Tabellen 8 und 9 und die Abbildungen 10-12 und 14-16 zeigen, dass es sowohl bei den Wasserwerten als auch bei den Housekeepingdaten zu teilweise beträchtlichen Unterschieden zwischen der Standardhaltung und den terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten kam. Hervorzuheben sind der hohe Nitritwert am Ende von 89NT1 (Anstieg von 0,021 auf 1,473 mg/l  $\text{NO}_2^-$ ), der verhältnismäßig hohe Ammoniumgehalt nach 89BE (Anstieg von 0,028 auf 0,107 mg/l  $\text{NH}_4^+$ ) und 90BE (Anstieg von 0,043 auf 0,176 mg/l  $\text{NH}_4^+$ ) und die starke Zunahme der Gesamthärte nach 90BE (Anstieg von 10 auf 25 gdH).

Während 89NT1, 90NT1 und 90BE wurden sehr hohe pH-Werte gemessen (89NT1: pH 9,2 ; 90NT1: pH 9,2; 90BE: pH 9,2). Auf der Grundlage der Wassertemperatur, des pH-Wertes und der Ammoniumkonzentration wurde die maximal mögliche

Ammoniakkonzentrationen der C.E.B.A.S.-Läufe berechnet (89NT1: 0,0432 mg/l NH<sub>3</sub>; 89NT2: < 0,0003 mg/l NH<sub>3</sub>; 89BE: 0,0209 mg/l NH<sub>3</sub>; 90 NT1: 0,0344 mg/l NH<sub>3</sub>; 90NT2: 0,0119 mg/l NH<sub>3</sub>; 90BE: 0,0864 mg/l NH<sub>3</sub>).

In den Experimenten 89NT1 und 89BE kam es zu einer Abnahme der Sauerstoffkonzentration auf 3 mg/l. Während 90BE sank sie auf 2,5 mg/l und im Verlauf von 90NT1 und 90NT2 fiel sie auf 1,5 mg/l ab, bevor ein Gasaustauscher einsetzte und die Sauerstoffkonzentration auf einen Wert anhob, der für die Schwerträger unkritisch war. Bei 89NT1, 89NT2 und 90NT2 überlebten vier, bei 89BE drei, bei 90BE zwei und bei 90NT1 nur ein Schwerträger.

## **5.2.2 Vergleich der Differentialblutbilder von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten**

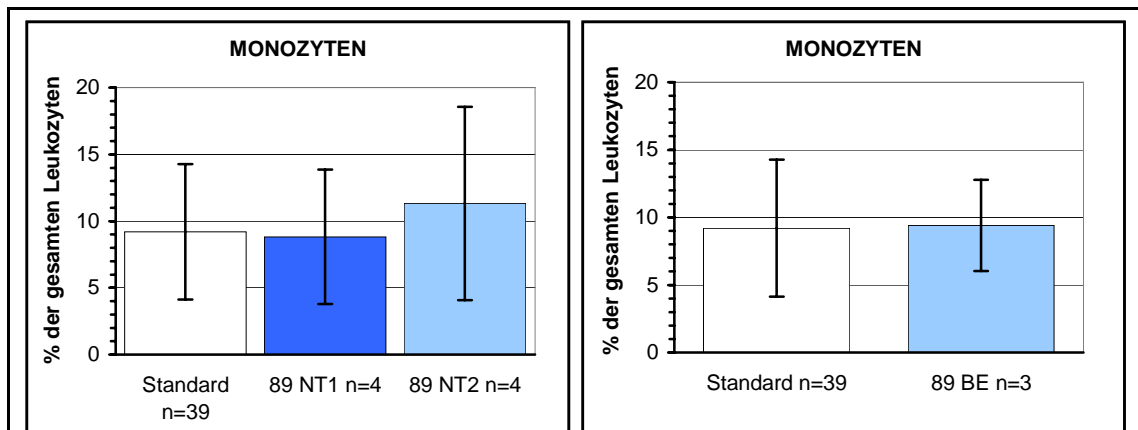
Zu Beginn sollen die Differentialblutbilder des Nierengewebes von *X. helleri* verglichen werden.

### **5.2.2.1 Anteil der Monozyten**

Der prozentuale Anteil der Monozyten an den gesamten Leukozyten im Nierengewebe von *X. helleri* zeigte bei den terrestrischen Experimenten, die im Rahmen der STS-89-Mission stattgefunden haben, keine signifikanten Unterschiede zwischen dem Standard (9,20 %) und C.E.B.A.S.-Experimenten (Diagramm 1).

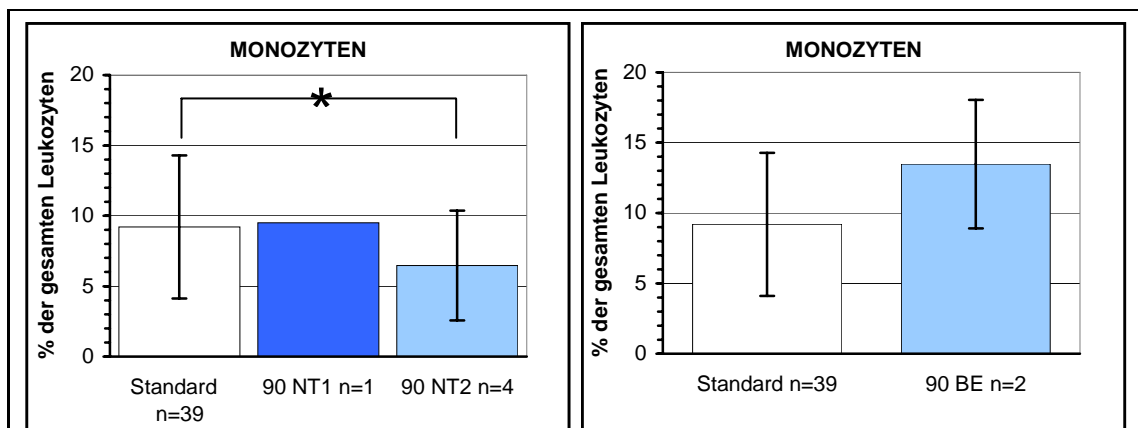
Nach 89NT1 (8,82 %) und 89BE (9,41 %) verblieb der Monozytenanteil auf dem Niveau des Standardwertes. Bei 89NT2 (11,32 %) zeigte er eine deutliche, nicht signifikante Zunahme der Monozyten.

Nach 90NT2 (6,47 %) (Diagramm 2) wurde eine signifikante Abnahme der Monozyten festgestellt. Dagegen zeigte das einzige überlebende Tier aus 90NT1 (9,50 %) einen Wert, der annähernd dem Standard entsprach. Im Anschluss an 90BE (13,48 %) ist eine nicht signifikante Zunahme der Monozyten zu beobachten gewesen.

**Diagramm 1:**

Prozentualer Anteil der Monozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-89 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, n = Stichprobenumfang

**Diagramm 2:**

Prozentualer Anteil der Monozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-90 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

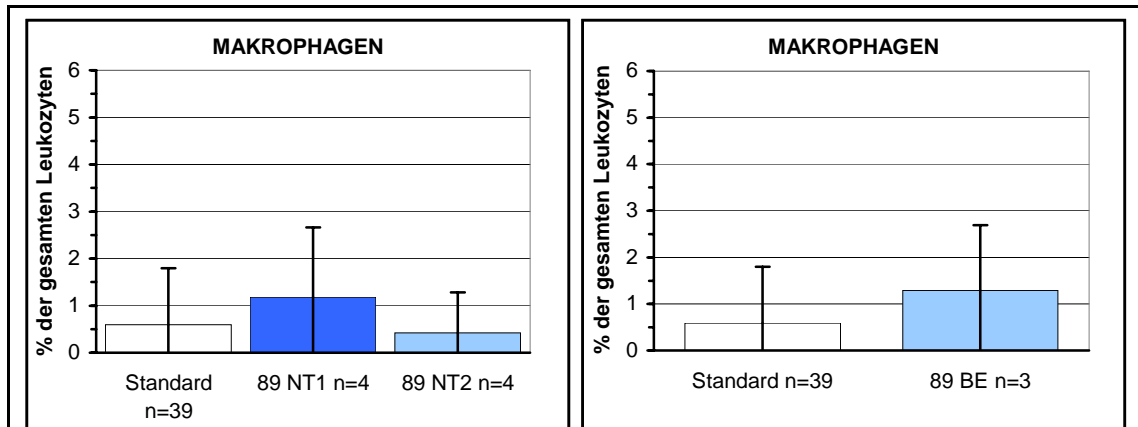
Signifikanzniveau:

\* =  $0,05 \geq p > 0,01$  schwach signifikant

Die Monozytenwerte der Tiere aus der C.E.B.A.S.-Hal tung unterschieden sich nur in einem von sechs Experimenten statistisch nachweisbar vom Standardwert. Bei zwei Experimenten kam es zu einer Zunahme der Monozytenpopulation. Bei den übrigen drei traten nur unbedeutende Unterschiede zwischen Standardhaltung und C.E.B.A.S.-Experimenten auf.

### 5.2.2.2 Anteil der Makrophagen

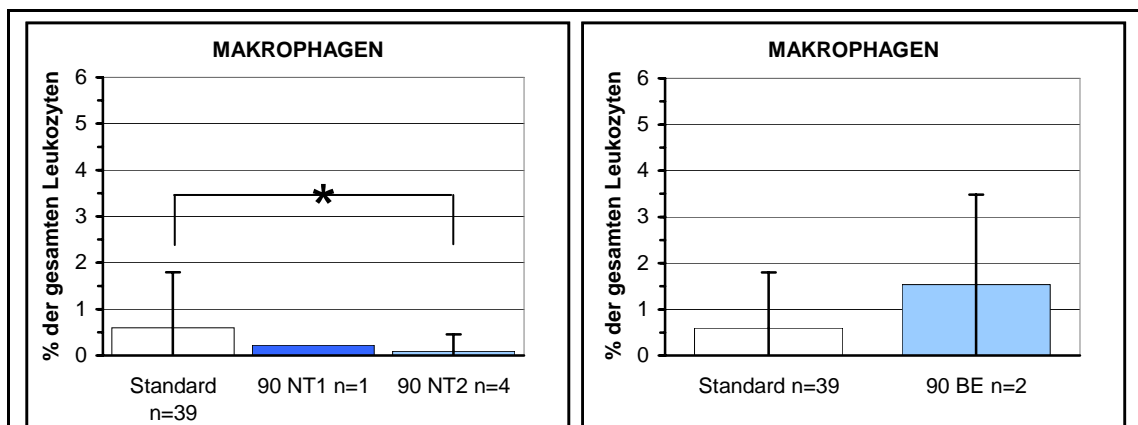
Der prozentuale Anteil der Makrophagen an den Leukozyten im Nierengewebe zeigte nach den terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten der STS-89-Mission keinen signifikanten Unterschied zum Standardwert (0,59 %) (Diagramm 3).



**Diagramm 3:**

Prozentualer Anteil der Makrophagen an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-89 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, n = Stichprobenumfang



**Diagramm 4:**

Prozentualer Anteil der Makrophagen an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-90 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Signifikanzniveau:

\* =  $0,05 \geq p > 0,01$  schwach signifikant

89NT1 (1,18 %) und 89BE (1,29 %) ließen eine Erhöhung dieses Zelltyps erkennen,



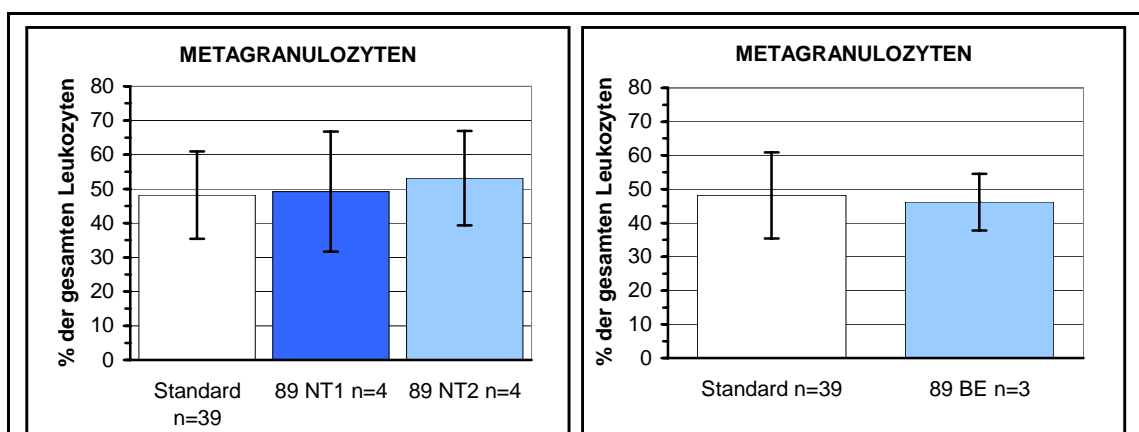
wegen die Makrophagenpopulation von 89NT2 (0,42 %) in etwa auf dem Niveau der Aquarienkontrollen verblieb.

Nach 90NT1 (0,22 %) und 90NT2 (0,09 %) kam es zu einem Rückgang der Makrophagen gegenüber dem Standard (Diagramm 4 links). Bei 90NT2 war dieser signifikant. Im Gegensatz dazu führte 90BE (1,54 %) (Diagramm 4 rechts) zu einem deutlichen, aber nicht signifikanten Anstieg der Makrophagenzahl im Nierengewebe.

Die Makrophagenpopulation war gegenüber den Aquarienkontrollen bei einem von sechs terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten signifikant vermindert. Bei einem weiteren Versuch kam es ebenfalls zu einer Abnahme dieser Leukozytenpopulation. Drei terrestrische C.E.B.A.S.-Läufe führten zu einer Erhöhung des Makrophagenanteils; nach einem Lauf verblieb er auf dem Niveau der Aquarienkontrollen.

### 5.2.2.3 Anteil der Metagranulozyten

Bezüglich der Metagranulozytenzahl konnten zwischen den 1g-Experimenten der STS-89-Mission (89NT1: 49,23 %, 89NT2: 53,12 %) und dem Standardwert (48,16 %) (Diagramm 5) keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Es traten lediglich geringe Schwankungen auf, die im Verhältnis zum großen Anteil dieses Zelltyps an den gesamten Leukozyten (ca. 48 %) unauffällig waren.

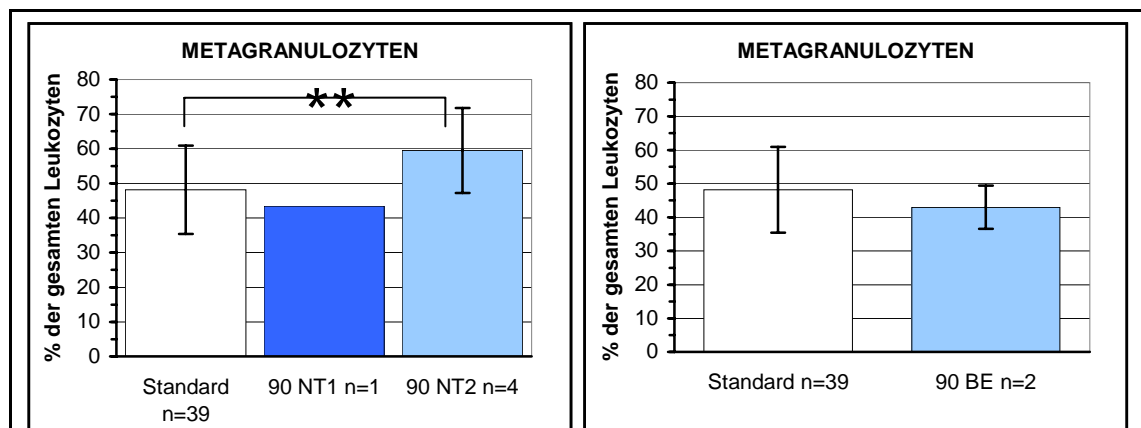


**Diagramm 5:**

Prozentualer Anteil der Metagranulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-89 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, n = Stichprobenumfang

Ein anderes Ergebnis zeigte 90NT2 (59,51 %). Hier kam es zu einer signifikanten Zunahme der Metagranulozyten gegenüber dem Standard.



**Diagramm 6:**

Prozentualer Anteil der Metagranulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-90 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

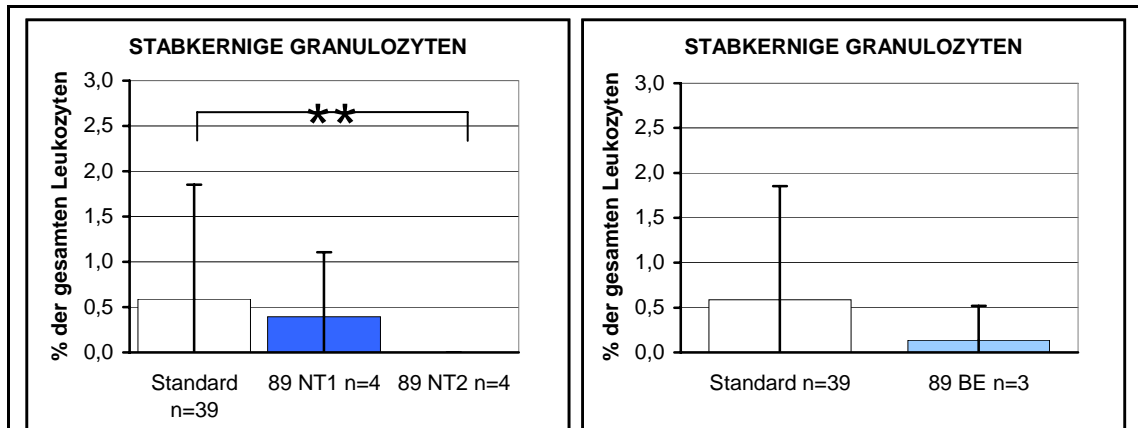
Signifikanzniveau:

\*\* = 0,01  $\geq$  p > 0,001 stark signifikant

Bei den terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten war der Metagranulozytenanteil gegenüber dem Standardwert in nur einem von sechs Experimenten signifikant erhöht. Bei den anderen Versuchen war er weder signifikant noch auffällig verändert.

#### 5.2.2.4 Anteil der stabkernigen Granulozyten

Bei allen Experimente der STS-89 und -90-Mission (89NT1: 0,39 %, 89NT2: 0,00 %, 89BE: 0,14 %, 90NT1: 0,00 %, 90NT2: 0,29 %, 90BE: 0,34 %), die unter terrestrischen Bedingungen stattgefunden hatten, kam es zu einer Abnahme des Anteils der stabkernigen Granulozyten gegenüber dem Standardwert (0,59 %) (Diagramm 7, 8). Lediglich bei 89NT2 war diese Abnahme signifikant.

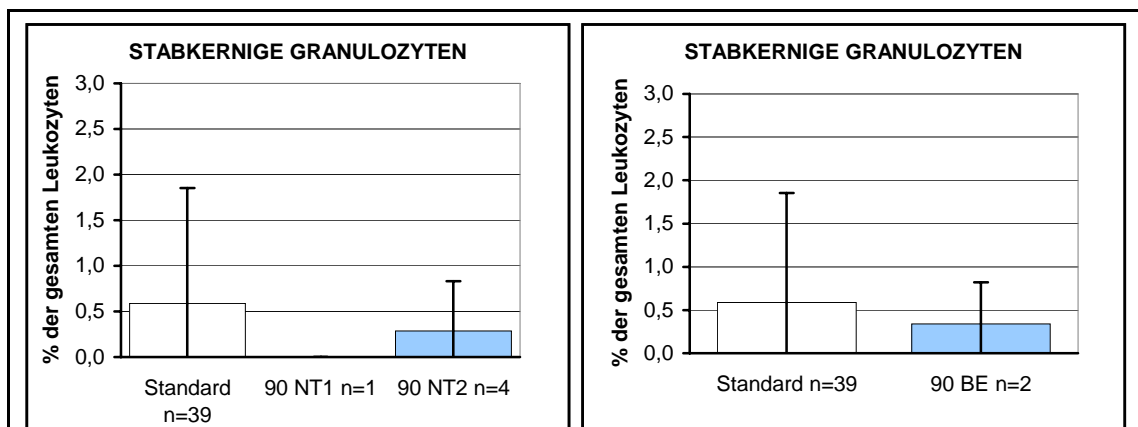
**Diagramm 7:**

Prozentualer Anteil der stabkernigen Granulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-89 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, n = Stichprobenumfang

Signifikanzniveau:

\*\* = 0,01  $\geq$  p > 0,001 stark signifikant

**Diagramm 8:**

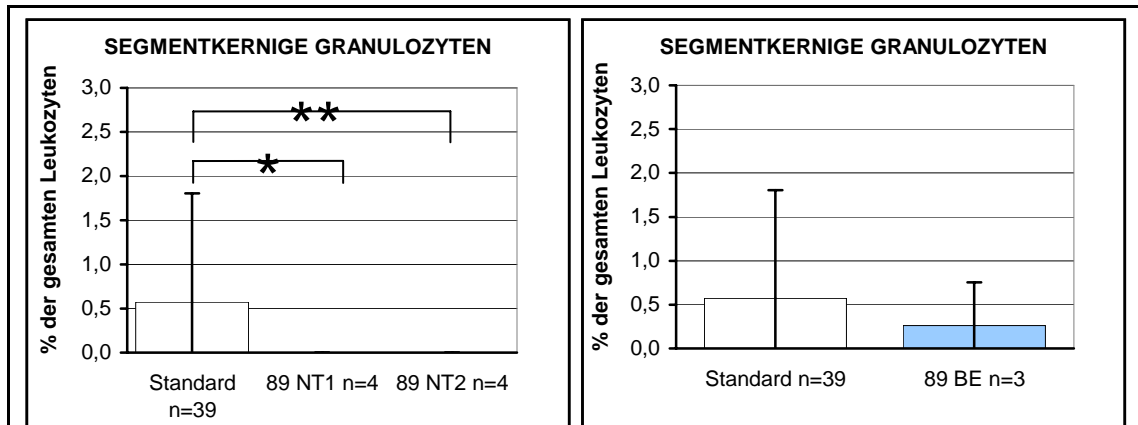
Prozentualer Anteil der stabkernigen Granulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-90 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

### 5.2.2.5 Anteil der segmentkernigen Granulozyten

Das Ergebnis der segmentkernigen Granulozyten war dem der stabkernigen Granulozyten sehr ähnlich. Fünf von sechs terrestrischen C.E.B.A.S.-Läufen (89NT1: 0,00 %, 89NT2: 0,00 %, 89BE: 0,26 %, 90NT1: 0,00 %, 90NT2: 0,34 %, 90BE: 0,61 %) zeigten gegenüber dem Standard (0,57 %) einen Rückgang dieser

Zellpopulation (Diagramm 9, 10). Bei 89NT1 und 89NT2 war dieser schwach bzw. stark signifikant. Nur nach 90BE verblieb der Anteil der segmentkernigen Granulozyten auf dem Niveau des Standards.



**Diagramm 9:**

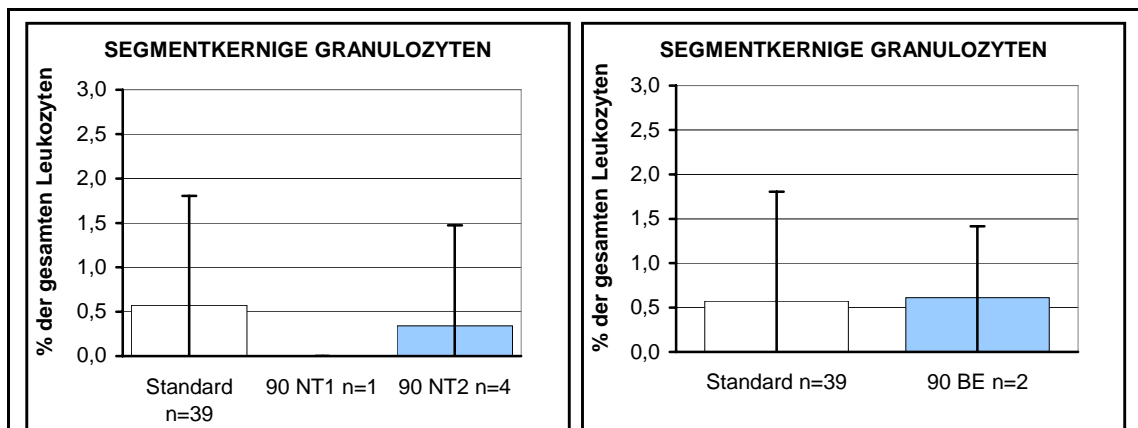
Prozentualer Anteil der segmentkernigen Granulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-89 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, n = Stichprobenumfang

Signifikanzniveau:

\* =  $0,05 \geq p > 0,01$  schwach signifikant

\*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$  stark signifikant



**Diagramm 10:**

Prozentualer Anteil der segmentkernigen Granulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-90 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

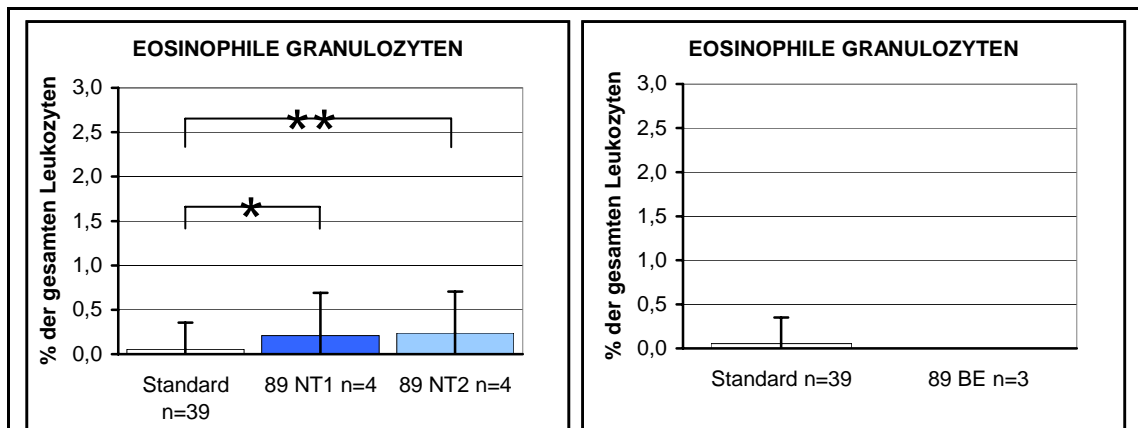
Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Nach fünf von sechs terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten kam es zu einem Rückgang der segmentkernigen Granulozyten gegenüber dem Standard. In zwei Fällen war dieser signifikant. Nur ein Versuch zeigte einen Wert, der mit dem Standard

vergleichbar war.

### 5.2.2.6 Anteil der eosinophilen Granulozyten

Die eosinophilen Granulozyten (Diagramm 11, 12) waren in der Niere der Tiere aus der Standardhaltung am KSC der seltenste Zelltyp (0,05 %).



**Diagramm 11:**

Prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-89 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

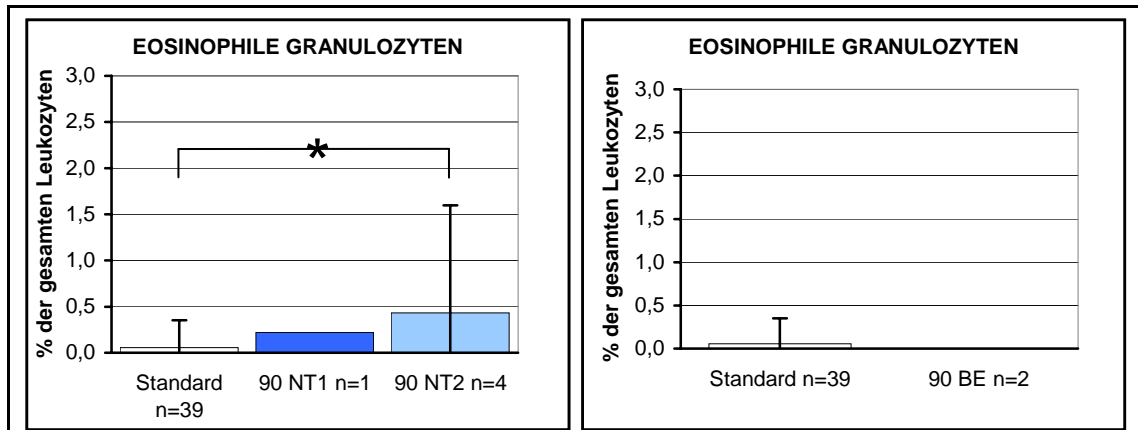
Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, n = Stichprobenumfang

Signifikanzniveau:

\* =  $0,05 \geq p > 0,01$  schwach signifikant

\*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$  stark signifikant

Bei vielen Tieren konnten sie im Rahmen der Blutbilddifferenzierung nicht gefunden werden. Nach vier von sechs Nutzlasttestläufen der STS-89 und STS-90-Mission (89NT1: 0,21 %, 89NT2: 0,24 %, 90NT1: 0,22 %, 90NT2: 0,43 %) kam es im Vergleich mit dem Standard zu einer Zunahme der eosinophilen Granulozyten. Bei 89NT1, 89NT2 und 90NT2 war die Zunahme signifikant. Ein gegenteiliger Effekt war nach 89 und 90BE zu erkennen. Hier wurden keine eosinophilen Granulozyten gefunden.

**Diagramm 12:**

Prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-90 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

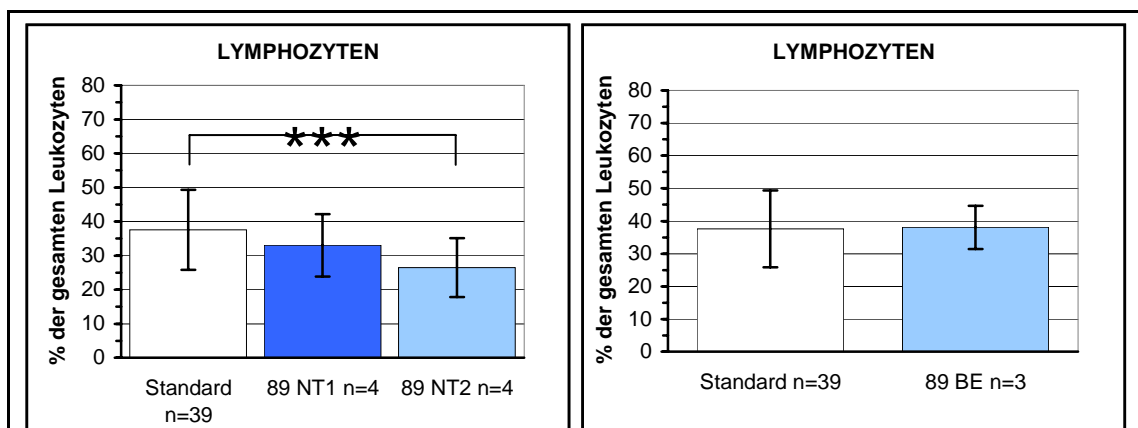
Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Signifikanzniveau:

\* =  $0,05 \geq p > 0,01$  schwach signifikant

### 5.2.2.7 Anteil der Lymphozyten

Lymphozyten (Diagramm 13, 14) waren bei *X. helleri* aus der Standardhaltung nach den Metagranulozyten die zweithäufigsten Zellen des Nierengewebes (37,57 %).

**Diagramm 13:**

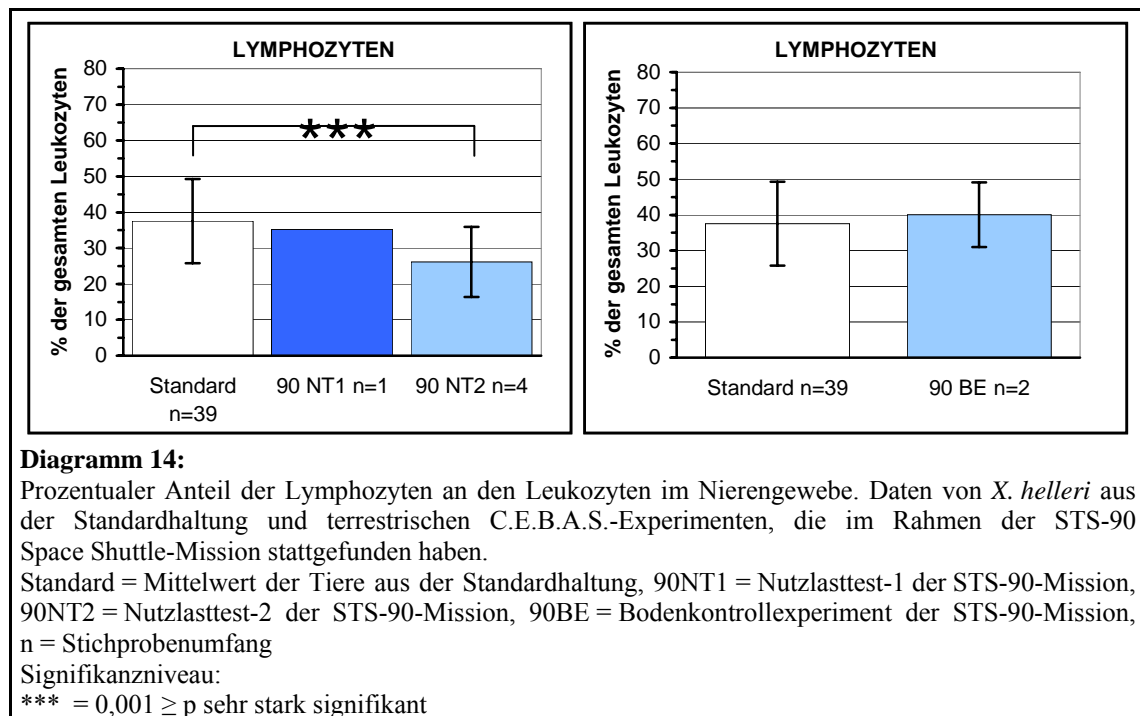
Prozentualer Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-89 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, n = Stichprobenumfang

Signifikanzniveau:

\*\*\* =  $0,001 \geq p$  sehr stark signifikant

Nach den Nutzlasttests 89NT2 (26,46 %) und 90NT2 (26,17 %) zeigten die Lymphozyten gegenüber dem Standard einen signifikanten Rückgang. Bei allen weiteren terrestrischen Experimenten (89NT1: 33,03 %, 89BE: 38,05 %, 90NT1: 35,22 %, 90BE: 40,05 %) verblieb ihr Anteil in etwa auf dem Niveau der Aquarienkontrollen.

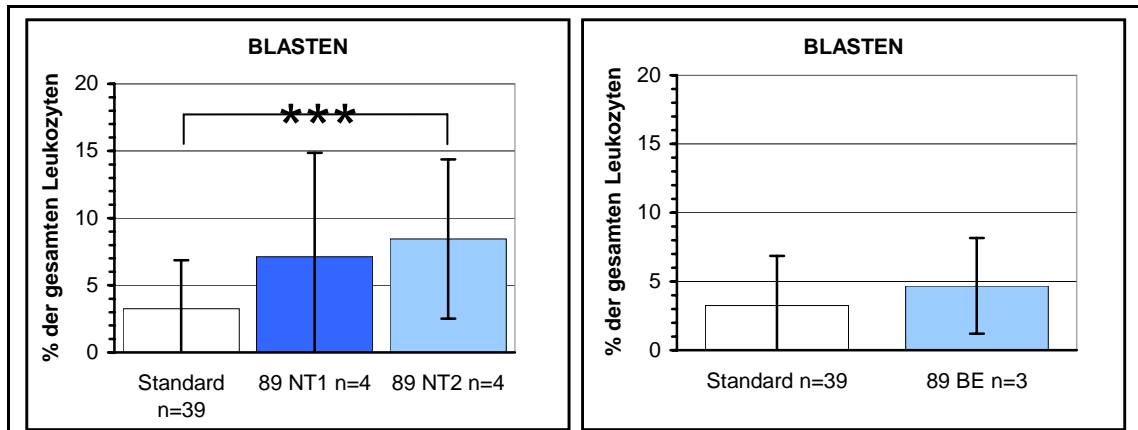


### 5.2.2.8 Anteil der blastären Zellen

Bei der Blutzelldifferenzierung wurden unter der Gruppe der Blasten alle Zellen zusammengefasst, die sich in einem blastären Stadium ihrer Zellentwicklung befanden. Bei Tieren aus der Standardhaltung waren Zellen im blastären Stadium (Diagramm 15, 16) selten (3,3 %).

Die Auswertung ergab nach 89NT1 (7,13 %), 89NT2 (8,44 %), 89BE (4,68 %), 90NT1 (11,40 %) und 90NT2 (6,70 %) eine Zunahme der Blasten gegenüber den Aquarienkontrollen (3,26 %). Bei 89NT2, 90NT1 und 90NT2 waren die Zunahmen signifikant. Lediglich 90BE (1,00 %) führte zu einer schwach signifikanten Abnahme.

Fünf von sechs terrestrischen Experimenten zeigten eine Zunahme der Blastenpopulation gegenüber dem Standard. In drei Fällen war diese signifikant. Nur nach einem C.E.B.A.S.-Lauf kam es zu einer signifikanten Abnahme.

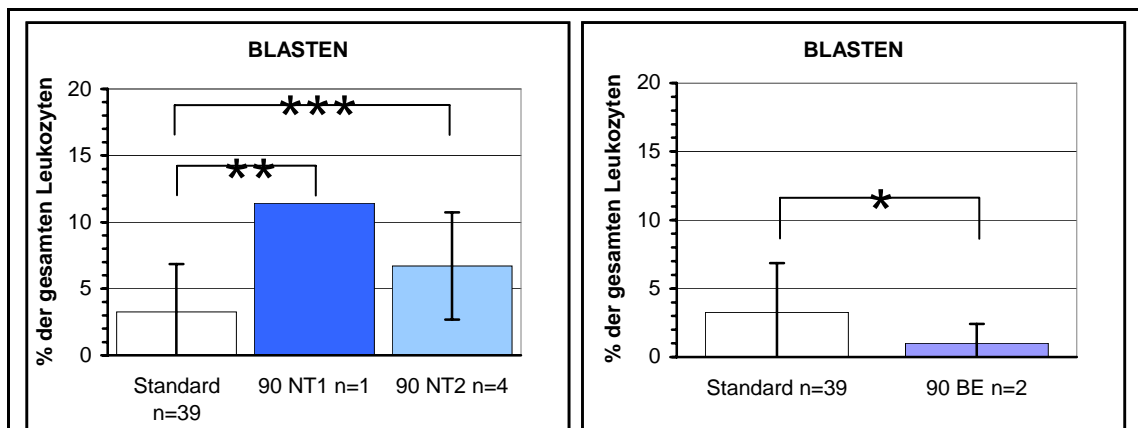
**Diagramm 15:**

Prozentualer Anteil der blastären Zellen an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-89 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, n = Stichprobenumfang

Signifikanzniveau:

\*\*\* = 0,001  $\geq$  p sehr stark signifikant

**Diagramm 16:**

Prozentualer Anteil der blastären Zellen an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-90 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Signifikanzniveau:

\* = 0,05  $\geq$  p > 0,01 schwach signifikant

\*\* = 0,01  $\geq$  p > 0,001 stark signifikant

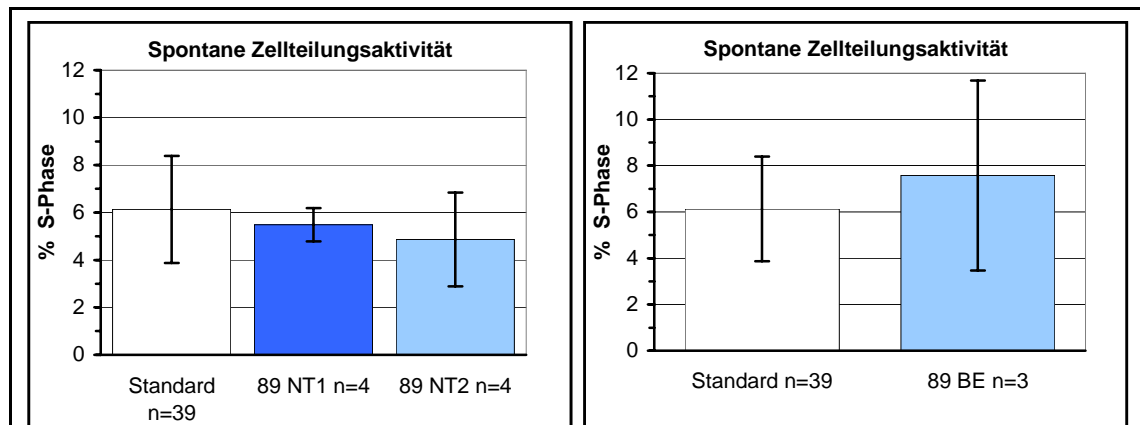
\*\*\* = 0,001  $\geq$  p sehr stark signifikant

### 5.2.3 Spontane Zellteilungsaktivität

Die spontane Zellteilungsaktivität der Zellen des Nierengewebes war nach den Nutzlasttests und den Bodenkontrollexperimenten der STS-89- und 90-Mission



unterschiedlich ausgeprägt (Diagramm 17, 18).



**Diagramm 17:**

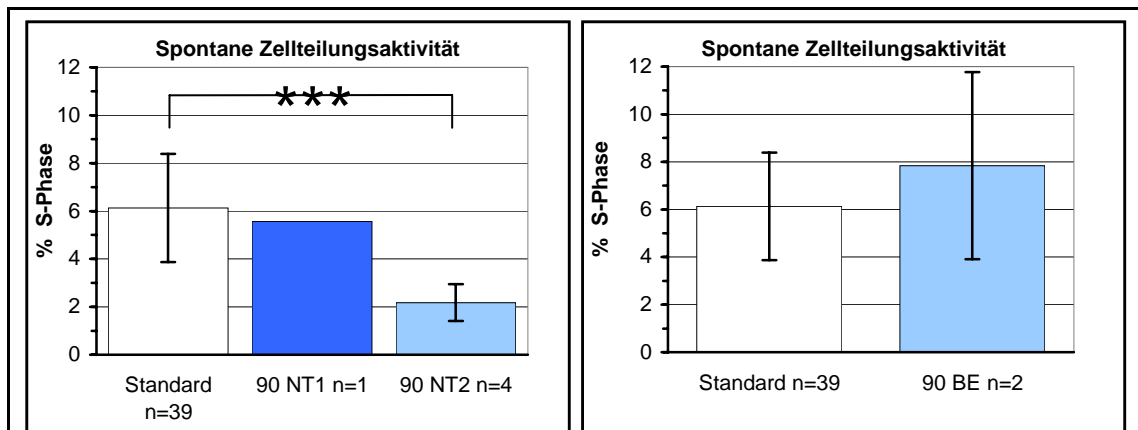
Spontane Zellteilungsaktivität im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-89 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben. Als Parameter für die Zellteilungsaktivität wurde der prozentuale Anteil der Zellen im Nierengewebe gemessen, der sich in der S-Phase der Mitose befand. Weil in der S-Phase der mitotischen Zellteilung die Synthese der DNA stattfindet, ist die Zu- oder Abnahme der Zellen, die sich in dieser Phase befinden, ein Maß für die Teilungsaktivität im Gewebe.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, n = Stichprobenumfang

Nach den beiden Nutzlasttestläufen der STS-89-Mission kam es gegenüber dem Standard (6,13 %) zu einer schwachen, nicht signifikanten Abnahme der Zellen, die sich in der S-Phase der Mitose befanden (89NT1: 5,48 %; 89NT2: 4,86 %). Ein anderes Bild zeigte sich nach dem Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission. Hier konnte eine Steigerung der Teilungsaktivität (89BE: 7,58 %) gemessen werden, die aber ebenfalls nicht signifikant war.

Die Ergebnisse der terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimente der STS-90-Mission waren den terrestrischen Experimenten der STS-89-Mission ähnlich. Auch hier zeigten die Schwerträger aus den beiden Nutzlasttests eine Abnahme der Teilungsaktivität. Diese war nach dem 90NT1-Experiment nur schwach und nicht signifikant (90NT1: 5,56 %), nach dem 90NT2-Testlauf (90NT2: 2,18 %) dagegen sehr stark signifikant. Bei der Beurteilung des Ergebnisses von 90NT1 ist zu beachten, dass es sich hier um die Daten eines einzelnen Tieres handelt.

Bei dem Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission kam es, wie bei dem der STS-89-Mission, zu einer deutlichen jedoch nicht signifikanten Zunahme der Teilungsaktivität (90BE: 7,84 %).

**Diagramm 18:**

Spontane Zellteilungsaktivität im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-90 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben. Als Parameter für die Zellteilungsaktivität wurde der prozentuale Anteil der Zellen im Nierengewebe gemessen, der sich in der S-Phase der Mitose befand. Weil in der S-Phase der mitotischen Zellteilung die Synthese der DNA stattfindet, ist die Zu- oder Abnahme der Zellen, die sich in dieser Phase befinden, ein Maß für die Teilungsaktivität im Gewebe.

Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Signifikanzniveau:

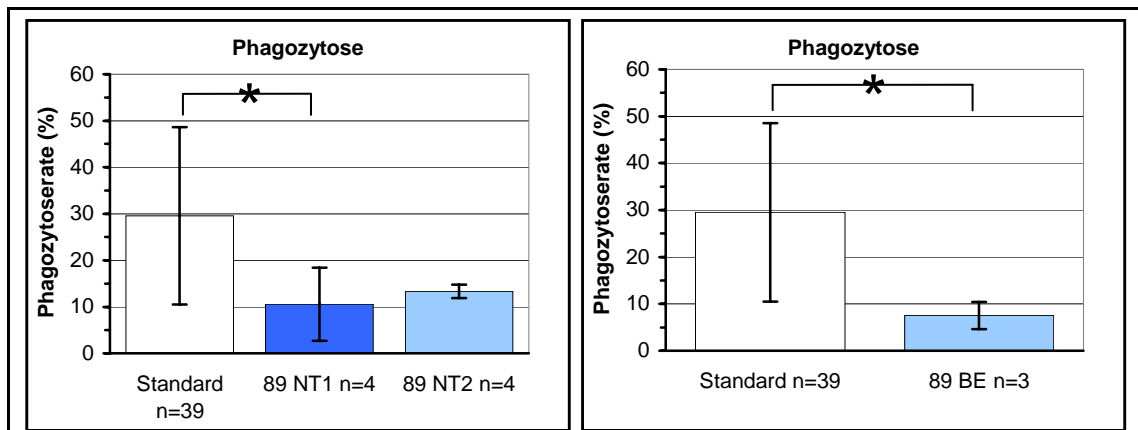
\*\*\* = 0,001  $\geq$  p sehr stark signifikant

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es gegenüber dem Standard nach vier von sechs C.E.B.A.S.-Bodenexperimenten zu einer Verminderung der Zellteilungsaktivität im Nierengewebe kam. In einem Fall kam es zu einer sehr stark signifikanten Abnahme (90NT2), die übrigen waren schwach ausgeprägt und nicht signifikant. Nach zwei terrestrischen Experimenten kam es gegenüber dem Standard zu einer nicht signifikanten Zunahme der Zellteilungsaktivität.

#### 5.2.4 Phagozytoserate

Die Diagramme 19 und 20 zeigen die Ergebnisse der Messung der Phagozytoserate isolierter Nierenzellen nach den C.E.B.A.S.-Experimenten, die unter terrestrischen Bedingungen stattgefunden haben.

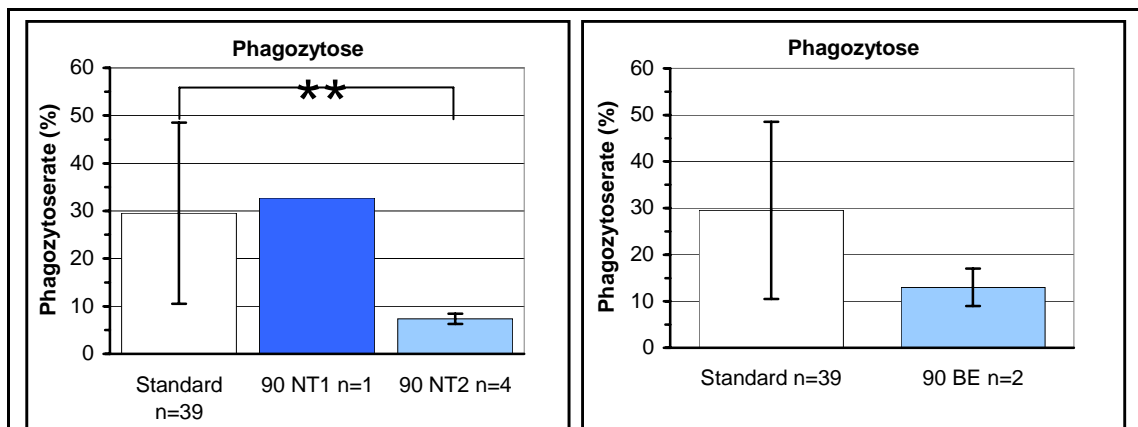
Nach fünf Versuchen kam es zu einer Abnahme der Phagozytoserate gegenüber dem Standard. Diese Abnahme fiel in zwei Fällen schwach (Standard: 29,53 %; 89NT1: 10,55 %, 89BE: 7,56 %) und nach einem Experiment stark signifikant aus (90NT2: 7,35 %). In zwei weiteren Fällen kam es ebenfalls zu einer deutlichen Abnahme der Phagozytoserate, die jedoch nicht signifikant war (89NT2: 13,33 %; 90BE: 13,00 %).

**Diagramm 19:**

Phagozytoserate isolierter Nierenzellen. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-89 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben. Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, n = Stichprobenumfang

Signifikanzniveau:

\* =  $0,05 \geq p > 0,01$  schwach signifikant

**Diagramm 20:**

Phagozytoserate isolierter Nierenzellen. Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten, die im Rahmen der STS-90 Space Shuttle-Mission stattgefunden haben. Standard = Mittelwert der Tiere aus der Standardhaltung, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Signifikanzniveau:

\*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$  stark signifikant

Bei dem einzigen überlebenden Tier des 90NT1-Versuchs konnte gegenüber dem Standard eine Zunahme der Phagozytoserate gemessen werden (90NT1: 32,7 %). Diese war allerdings nur gering.

Nach der C.E.B.A.S.-Haltung von *X. helleri* unter terrestrischen Bedingungen kam es im Vergleich mit Tieren aus der Standardhaltung in fünf von sechs Fällen zu einer Abnahme der Phagozytoserate. In drei dieser fünf Fälle fiel sie signifikant aus, ansonsten war die Abnahme deutlich. Lediglich bei dem einzigen überlebenden Tier aus

90NT1 kam es nur zu einer geringfügigen Zunahme der Phagozytoserate.

### **5.3 Einfluss der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von *X. helleri***

Um den Einfluss eines Weltraumfluges auf *X. helleri* von dem Einfluss der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung unterscheiden zu können, wurde im vorherigen Kapitel gezeigt, wie sich die Bedingungen im C.E.B.A.S. auf das Abwehrsystem der Schwertträger ausgewirkt haben. Vor diesem Hintergrund soll nun durch den Vergleich der Daten von *X. helleri* aus den Flug- und Bodenkontrollexperimenten der STS-89- und STS-90-Weltraummissionen überprüft werden, ob und in welcher Weise sich die Mikrogravitation auf das Abwehrsystem der Fische ausgewirkt hatte.

#### **5.3.1 Vergleich der Wasserwerte und Housekeepingdaten von Flug- und Bodenkontrollexperimenten**

Zwischen den Wasserwerten des Flug- und Bodenkontrollexperimentes der STS-89-Mission traten nur geringe Unterschiede auf (siehe Tabelle 8, 9; Abbildung 12, 13). Nach beiden Versuchen wurde eine verhältnismäßig starke Zunahme des Ammoniumgehaltes gemessen (89FE: Zunahme von 0,011 auf 0,110 mg/l  $\text{NH}_4^+$ ; 89BE: Zunahme von 0,028 auf 0,107 mg/l  $\text{NH}_4^+$ ). Der pH-Wert stieg während beider Experimente an (89FE: Zunahme von pH 7,3 auf pH 9,2; 89BE: Zunahme von pH 7,3 auf pH 8,7). Gegen Ende von 89BE lag die  $\text{O}_2$ -Konzentration über längere Zeit unter 3,5 mg/l. Auf der Grundlage von Wassertemperatur, pH-Wert und Ammoniumkonzentration ließ sich eine maximale Ammoniakkonzentration von 0,0540 mg/l  $\text{NH}_3$  für 89FE und 0,0209 mg/l  $\text{NH}_3$  für 89BE berechnen.

Nach 90BE und 90FE wurde aufgrund der Zugabe von so genanntem „Weekendfutter“, ein Kalziumsulfatblock, in dem Futter eingepresst ist, eine starke Zunahme der Wasserhärte gemessen (90BE: Zunahme von 10 auf 25 gdH; 90FE: Zunahme von 10 auf 38,5 gdH). Der Ammoniumgehalt stieg auch im Verlauf dieser Experimente deutlich an (90FE: Zunahme von 0,029 auf 0,166 mg/l  $\text{NH}_4^+$ ; 90BE: Zunahme von 0,043 auf 0,176 mg/l  $\text{NH}_4^+$ ). Gleiches gilt für den pH-Wert (90FE: Zunahme von pH 7,2 auf pH 9,2; 90BE: Zunahme von pH 7,3 auf pH 9,2). In Verbindung mit den hohen pH-

Werten kann dies zu einer negativen Beeinflussung des Stickstoffstoffkatabolismus (Akkumulation von Ammoniak) geführt haben. Die berechneten Werte für die maximale Ammoniakkonzentration betragen 0,0558 mg/l NH<sub>3</sub> für 90FE und 0,0864 mg/l NH<sub>3</sub> für 90BE. Der O<sub>2</sub>-Gehalt nahm im Verlauf von 90BE und 90FE so stark ab (90BE: Minimum 2,5 mg/l; 90FE: Minimum 2,5 mg/l), dass der Gasaustauscher einsetzte (vergleiche auch Tabelle 9 und Abbildungen 16 und 17).

Die Flugexperimente 89FE und 90FE überlebten alle eingesetzten Schwerträger, die Bodenkontrollexperimente 89- und 90BE drei bzw. zwei Tiere (Tabelle 8).

### **5.3.2 Vergleich der Differentialblutbilder von *X. helleri* aus den Flug- und Bodenkontrollexperimenten**

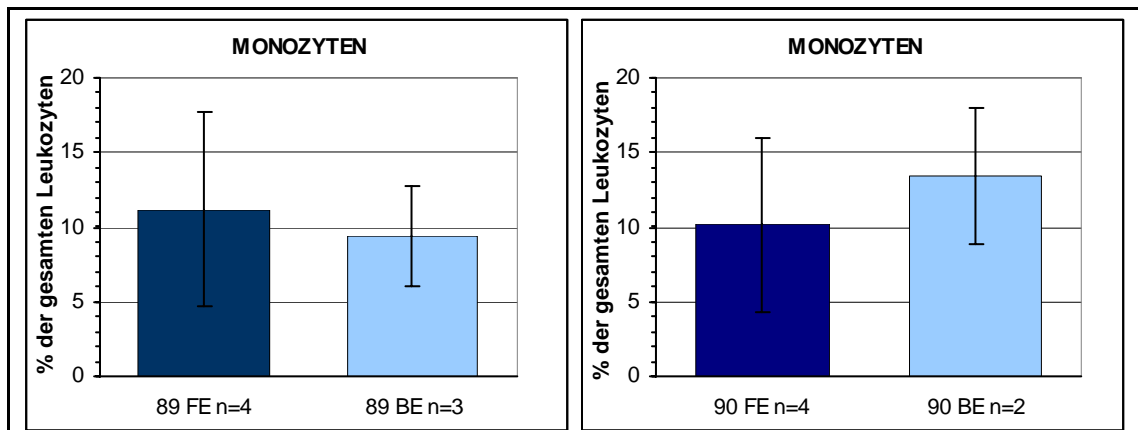
#### **5.3.2.1 Anteil der Monozyten**

Diagramm 21 zeigt den Vergleich der Monozytenpopulationen zwischen den Tieren aus den Flug- und Bodenkontrollexperimenten der STS-89- und STS-90-Missionen.

Nach 89FE (11,19 %) konnte kein signifikanter Unterschied zum Bodenkontrollexperiment 89BE (9,41 %) festgestellt werden. Das Flugexperiment besaß gegenüber dem Bodenmodell lediglich eine leicht erhöhte Monozytenzahl.

Die Monozytenpopulation aus 90FE (10,16 %) zeigte im Vergleich zu 90BE (13,48 %) ebenfalls keinen signifikanten Unterschied. Dennoch besaß 90BE eine deutlich größere Zahl dieser Zellen. Allerdings ergab sich dieser Wert lediglich aus den Daten von zwei überlebenden Tieren. Der ohnehin geringe Stichprobenumfang (n) war nach 90BE also nochmals reduziert.

Die orbitalen C.E.B.A.S.-Versuche zeigten gegenüber den terrestrischen Experimenten keine statistisch signifikanten Veränderungen der Monozytenpopulation. Nach einem Weltraumexperiment war diese gegenüber dem Bodenkontrollexperiment leicht erhöht, ein anderes Mal deutlich vermindert.

**Diagramm 21:**

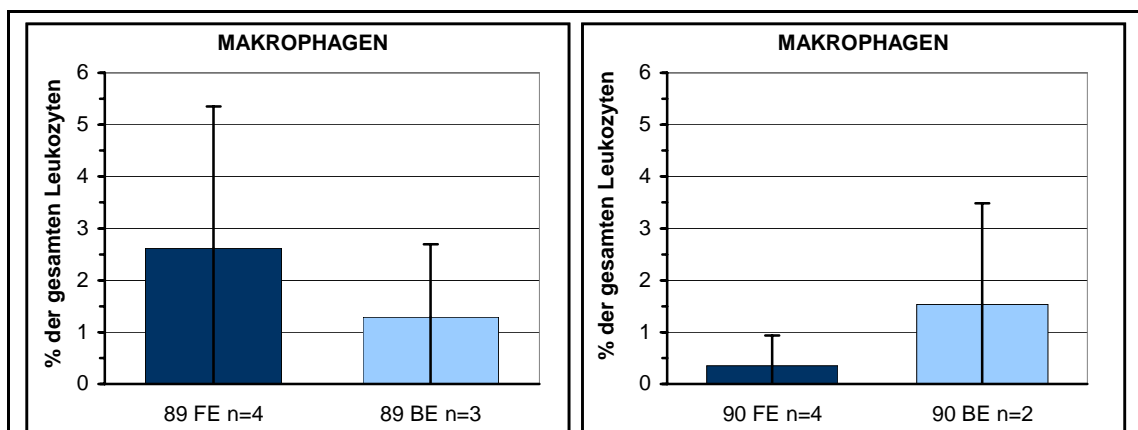
Prozentualer Anteil der Monozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus den Flug- und Bodenkontrollexperimenten der STS-89- und STS-90-Missionen.

89FE = Flugexperiment der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 90FE = Flugexperiment der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 9,2 %

### 5.3.2.2 Anteil der Makrophagen

Bei den Makrophagen (Diagramm 22) kam es nach der STS-89- und STS-90-Mission zu einem ähnlichen Bild wie bei den Monozyten.

**Diagramm 22:**

Prozentualer Anteil der Makrophagen an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus den Flug- und Bodenkontrollexperimenten der STS-89- und STS-90-Missionen.

89FE = Flugexperiment der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 90FE = Flugexperiment der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 0,59 %

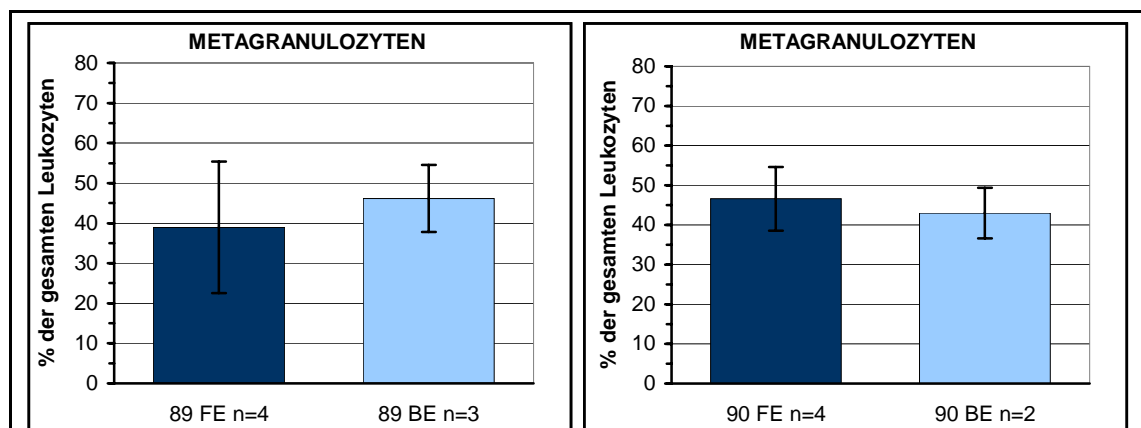
Auch hier konnte zwischen den Flug- und Bodenkontrollexperimenten keine signifikante Differenz festgestellt werden. Dennoch zeigt der Vergleich von 89FE

(2,62 %) und 89BE (1,29 %) eine deutlich größere Makrophagenpopulation nach dem Flugexperiment.

Ein umgekehrtes Bild war dagegen nach 90FE (0,35 %) zu beobachten. Bei diesem Experiment lag der Makrophagenanteil gegenüber dem Bodenkontrollexperiment (90BE:1,54 %) wesentlich niedriger.

### 5.3.2.3 Anteil der Metagranulozyten

Die Ergebnisse der Flugexperimente der STS-89- und STS-90-Missionen (Diagramm 23) zeigten gegenüber den Bodenkontrollexperimenten weder eine signifikante noch eine relevante Wirkung auf die Metagranulozytenpopulation im Nierengewebe von *X. helleri*.



**Diagramm 23:**

Prozentualer Anteil der Metagranulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus den Flug- und Bodenkontrollexperimenten der STS-89- und STS-90-Missionen.

89FE = Flugexperiment der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 90FE = Flugexperiment der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

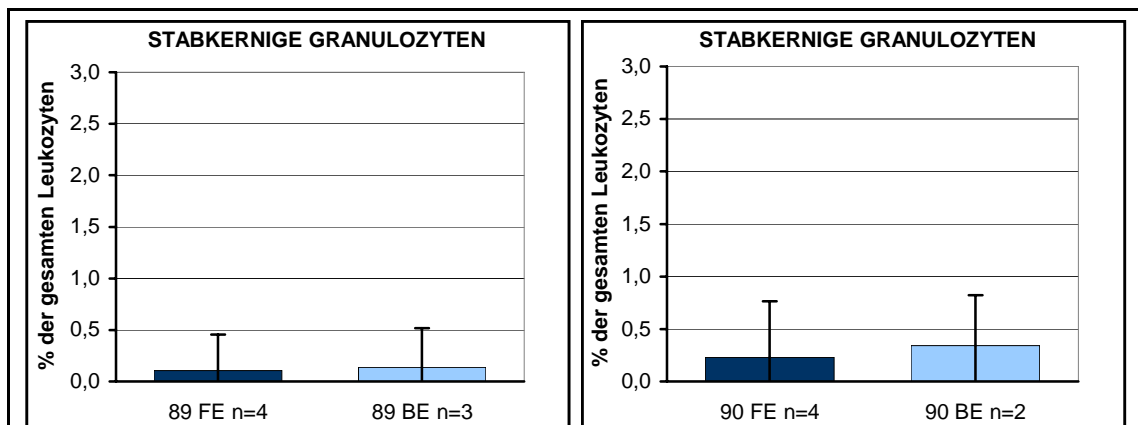
Standardwert: 48,16 %

Bei den Schwerträgern aus 89FE (38,9 %) lag der Anteil der Metagranulozyten im Vergleich zu 89BE (46,2 %) auf einem etwas niedrigeren Niveau. Die Metagranulozytenpopulation des 90er Flugexperimentes (90FE: 46,60 %) lag in etwa auf dem Niveau von 90BE (42,98 %).

### 5.3.2.4 Anteil der stabkernigen Granulozyten

Beim prozentualen Anteil der stabkernigen Granulozyten an der Gesamtzahl der Leukozyten des Nierengewebes (Diagramm 24) bestand zwischen 89FE (0,11 %) und 89BE (0,14 %) weder ein signifikanter noch ein relevanter Unterschied.

Ein ähnliches Bild zeigte sich beim Vergleich zwischen dem Flug- und Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission. Auch hier kam es zu keiner signifikanten oder relevanten Differenz (90FE: 0,23 %; 90BE: 0,34 %).



**Diagramm 24:**

Prozentualer Anteil der stabkernigen Granulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus den Flug- und Bodenkontrollexperimenten der STS-89- und STS-90-Missionen.

89FE = Flugexperiment der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 90FE = Flugexperiment der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 0,59 %

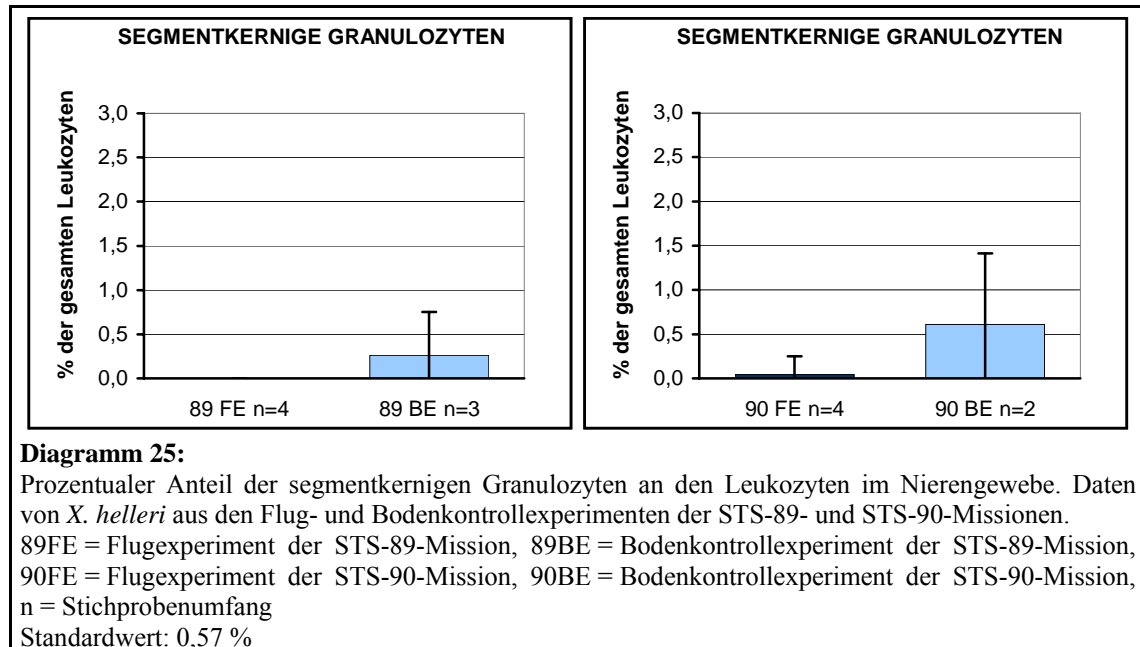
Der Vergleich zwischen Flug- und Bodenkontrollexperimenten der STS-89- und STS-90-Missionen zeigt, dass die Bedingungen der orbitalen Experimente keinen signifikanten Einfluss auf den prozentualen Anteil der stabkernigen Granulozyten hatten. Die stabkernigen Granulozyten traten nach den Versuchen der STS-90-Mission etwa doppelt so häufig auf wie nach denen der STS-89-Mission.

### 5.3.2.5 Anteil der segmentkernigen Granulozyten

Nach 89FE (0,00 %) konnten keine segmentkernigen Granulozyten (Diagramm 25) nachgewiesen werden, wogegen sie bei den drei überlebenden Tieren aus 89BE einen Anteil von 0,26 % ausmachten. Diese Differenz war jedoch nicht signifikant.



Wie bei der STS-89-Mission zeigte das Flugexperiment der STS-90-Mission (90FE: 0,04 %) gegenüber dem Bodenkontrollexperiment (90BE: 0,61 %) einen geringeren Anteil segmentkerniger Granulozyten.



Bei den segmentkernigen Granulozyten führten die Bedingungen der orbitalen C.E.B.A.S.-Versuche, im Vergleich zu den Bodenkontrollen, zu keinen signifikanten Veränderungen. Dennoch zeigten die Weltraumexperimente einen deutlich niedrigeren Anteil dieses Zelltyps.

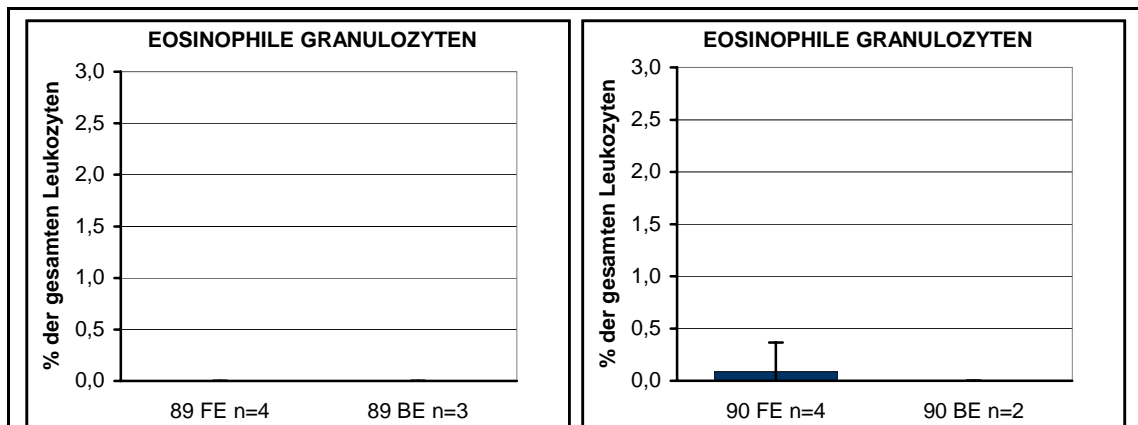
### 5.3.2.6 Anteil der eosinophilen Granulozyten

Nach der STS-89-Mission konnten im Nierengewebe der Schwerträger keine eosinophilen Granulozyten (Diagramm 26) festgestellt werden (89FE: 0,00 %, 89BE: 0,00 %).

Auch bei den beiden überlebenden Tieren aus 90BE (0,00 %) trat dieser Zelltyp nicht auf. Anders sah es nach 90FE aus. Hier betrug der Anteil der eosinophilen Granulozyten an den Leukozyten des Nierengewebes 0,08 %.

Die Bedingungen der Weltraumflüge hatten keine signifikante Wirkung auf das Vorkommen der eosinophilen Granulozyten. Jedoch zeigten die Tiere aus dem Flugexperiment der STS-90-Mission im Vergleich zum Bodenmodell eine erhöhte Zahl

dieser Zellen.



**Diagramm 26:**

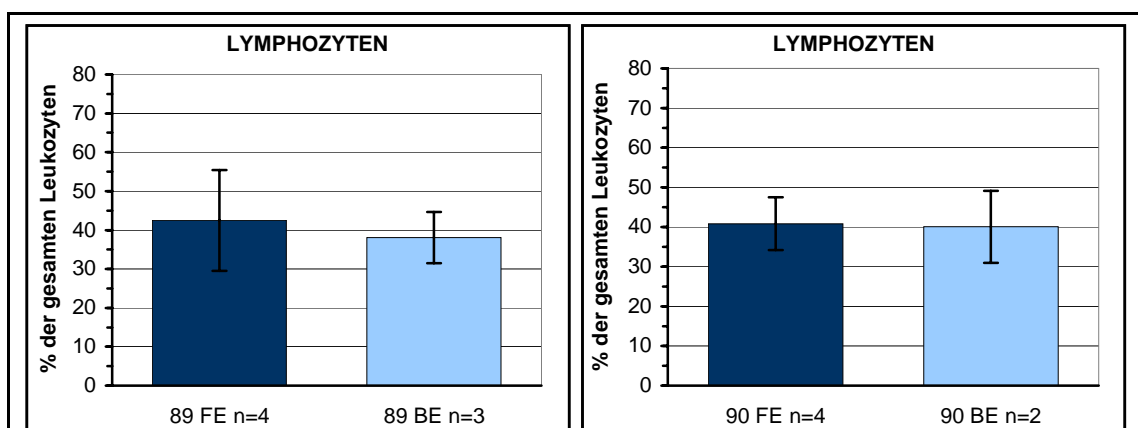
Prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus den Flug- und Bodenkontrollexperimenten der STS-89- und STS-90-Missionen.

89FE = Flugexperiment der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 90FE = Flugexperiment der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 0,05 %

### 5.3.2.7 Anteil der Lymphozyten

Diagramm 27 zeigt, dass Flug- und Bodenkontrollexperimente der STS-89- und STS-90-Mission keine signifikanten Unterschiede in den Lymphozytenwerten aufwiesen (89FE: 42,48 %; 89BE: 38,05 % und 90FE: 40,83 %; 90BE: 40,05 %).



**Diagramm 27:**

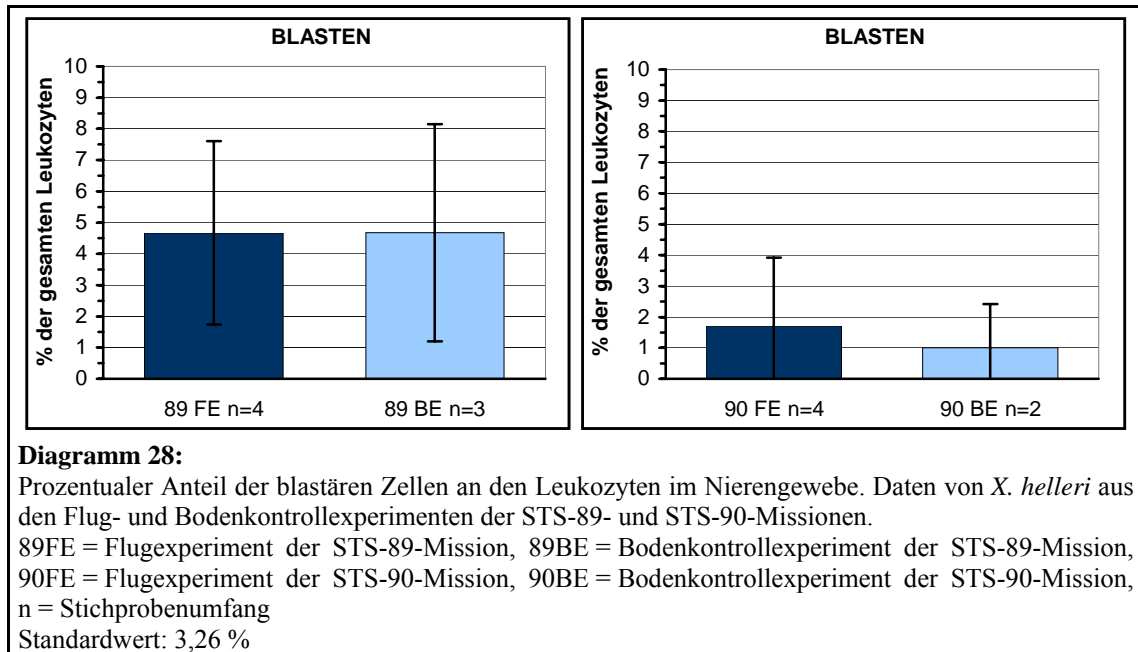
Prozentualer Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten im Nierengewebe. Daten von *X. helleri* aus den Flug- und Bodenkontrollexperimenten der STS-89- und STS-90-Missionen.

89FE = Flugexperiment der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 90FE = Flugexperiment der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 37,57 %

### 5.3.2.8 Anteil der blastären Zellen

Die Weltraumexperimente besaßen im Vergleich zu den terrestrischen Kontrollexperimenten keinen signifikanten Einfluss auf die Population der blastären Zellen (Diagramm 28).



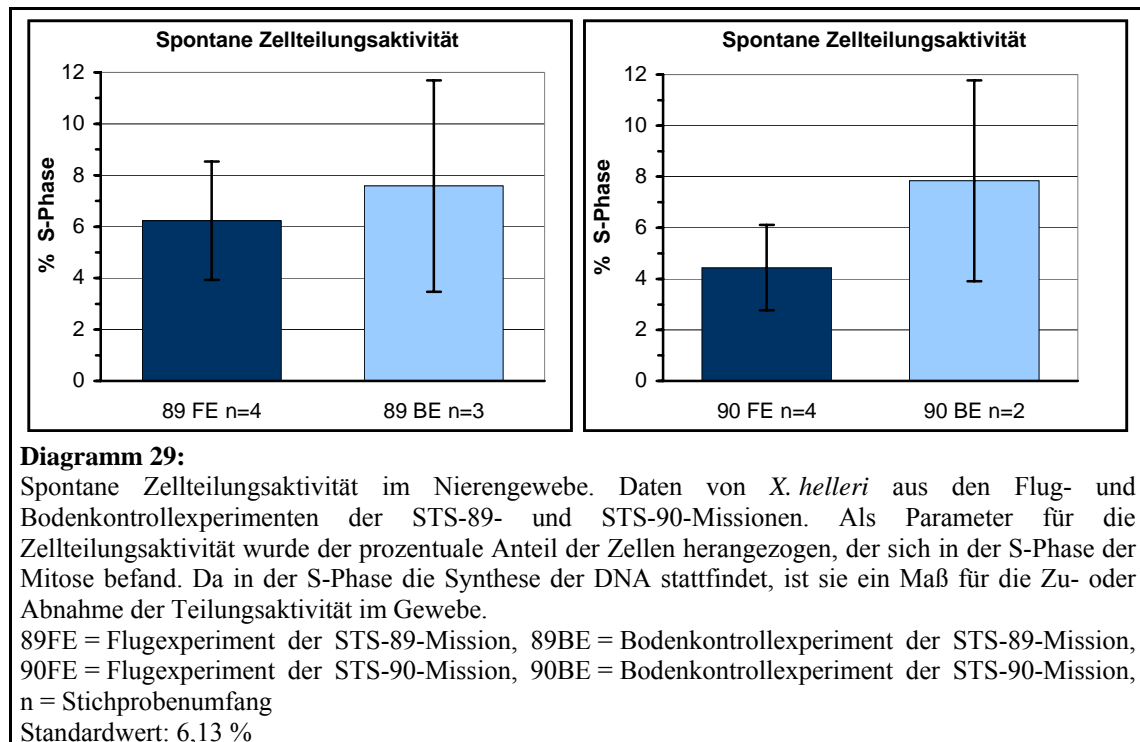
Ihr prozentualer Anteil war bei 89FE (4,67 %) und 89BE (4,68 %) nahezu identisch. Gegenüber 90BE (1,00 %) nahm dieser Zelltyp nach 90FE (1,70 %) zu. Auffällig ist, dass sich der Blastenanteil nach beiden STS-90-Experimenten auf einem wesentlich niedrigeren Niveau befand als nach den Versuchen der STS-89-Mission (1-2 % gegenüber 4,70 %).

### 5.3.3 Spontane Zellteilungsaktivität

Die orbitale C.E.B.A.S.-haltung von *X. helleri* zeigte im Vergleich zur terrestrischen weder nach der STS-89- noch nach der STS-90-Mission eine signifikante Veränderung der spontanen Zellteilungsaktivität (Diagramm 29).

Bei beiden sehr ähnlich ausfallenden Bodenkontrollexperimenten (89BE:7,58 %, 90BE: 7,84 %) lag die Teilungsaktivität höher als bei den orbitalen C.E.B.A.S.-Läufen (90FE: 4,44 %, 89FE: 6,23 %). Nach STS-89 fiel die Differenz zwischen Flug- und

Bodenexperiment schwächer aus als nach STS-90.

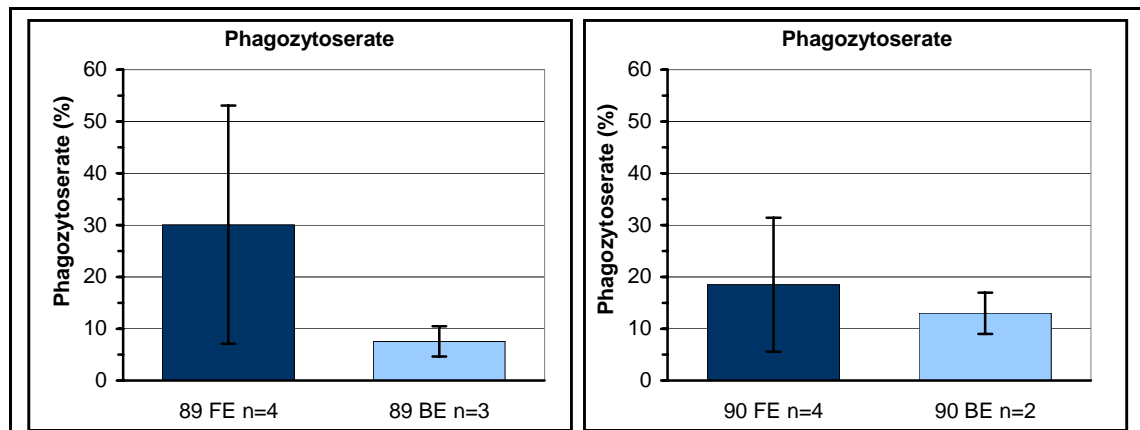


### 5.3.4 Phagozytoserate

Nach den Flugexperimenten (89FE: 30,08 %, 90FE: 18,50 %) der STS-89- und STS-90-Mission lag die Phagozytoserate höher als nach den entsprechenden Bodenkontrollexperimenten (89BE: 7,56 %, 90BE: 13,00 %) (Diagramm 30).

Dabei fiel die Differenz zwischen dem orbitalen und dem terrestrischen C.E.B.A.S.-Lauf bei den STS-89-Versuchen deutlicher aus als bei den STS-90-Experimenten. Dies lag in erster Linie daran, dass sich die Phagozytoserate nach 90FE auf einem deutlich niedrigeren Niveau als nach 89FE befand.

Trotz einer gegenüber dem Bodenkontrollexperiment deutlich erhöhten Phagozytoserate bei den Tieren der STS-89-Mission konnte nach beiden Weltraumexperimenten keine signifikante Veränderung der Phagozytoserate festgestellt werden.

**Diagramm 30:**

Phagozytoserate isolierter Nierenzellen. Daten von *X. helleri* aus den Flug- und Bodenkontrollexperimenten der STS-89- und STS-90-Missionen.

89FE = Flugexperiment der STS-89-Mission, 89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 90FE = Flugexperiment der STS-90-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 29,53 %

## 5.4 Einfluss der Dauer der orbitalen C.E.B.A.S.-Haltung auf das Abwehrsystem von *X. helleri*

Die Weltraumflüge der STS-89- und STS-90-Mission haben sich in einem wesentlichen Punkt voneinander unterschieden. Das C.E.B.A.S.-Experiment der STS-89-Mission befand sich 9 Tage im Orbit, das Experiment der STS-90-Mission 16 Tage. Dies bedeutet, dass die Schwerträger der STS-90-Mission fast doppelt so lange Raumfahrtbedingungen ausgesetzt waren wie die des STS-89-Flugexperimentes.

Im Folgenden soll gezeigt werden, ob und in welcher Weise sich die unterschiedliche Flugdauer auf die untersuchten Parameter ausgewirkt hat. Zu diesem Zweck werden die Daten der Schwerträger aus den Flugexperimenten 89FE und 90FE miteinander verglichen.

### 5.4.1 Vergleich der Wasserwerte und Housekeepingdaten der orbitalen C.E.B.A.S.-Experimente mit unterschiedlicher Dauer

In Tabelle 8 sind die Daten der STS-89- und STS-90-Flugexperimente (89FE, 90FE) vor und nach den Weltraumflügen bezüglich der Dauer der Experimente, des Besatzes mit *X. helleri* und der Wasserwerte dargestellt. Zusätzlich zeigen die

Housekeepingdaten (Abbildungen 13 und 17) den Verlauf von Sauerstoffgehalt, pH-Wert und Wassertemperatur während der Missionen.

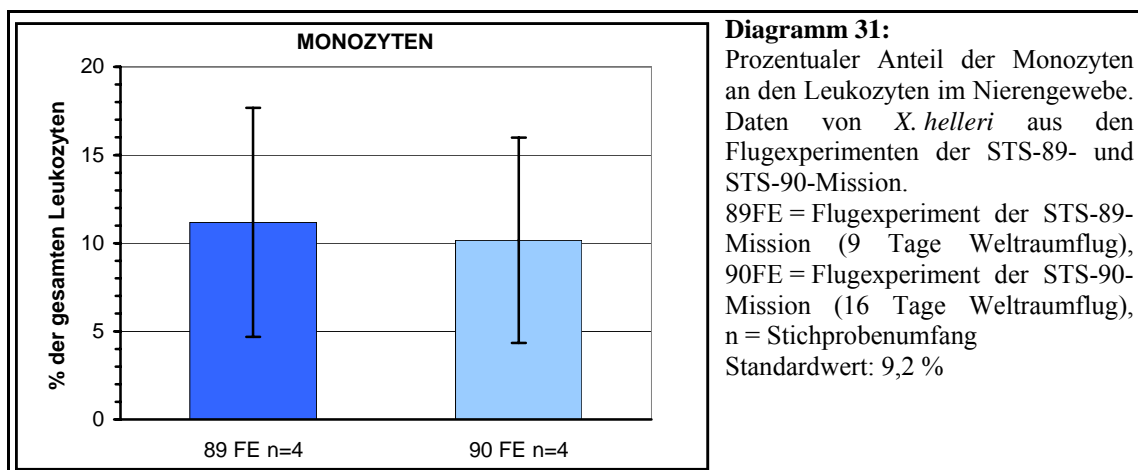
Wichtige Unterschiede zwischen den Flugexperimenten waren die unterschiedliche Dauer der Raumflüge (89FE: 9 Tage; 90FE: 16 Tage) und der Anstieg der Gesamthärte und der Wassertemperatur während 90FE (Wasserhärte 90FE: Anstieg von 10 auf 38,5 gdH; Temperatur 90FE: Anstieg von 24 auf 30 °C). Außerdem zeigte 90FE über einen längeren Zeitraum einen hohen pH-Wert (90FE: Anstieg von pH 7,2 auf pH 9,2) und eine niedrige Sauerstoffkonzentration (90FE: Minimum 2,5 mg/l).

Gemeinsam ist beiden Experimenten die starke Zunahme des Ammoniumgehaltes (89FE: Anstieg von 0,011 auf 0,110 mg/l  $\text{NH}_4^+$ ; 90FE: Anstieg von 0,029 auf 0,166 mg/l  $\text{NH}_4^+$ ). Dies kann in Verbindung mit einem hohen pH-Wert und einer hohen Wassertemperatur zur Bildung des toxischen Ammoniaks führen (berechnete Werte 89FE: 0,0540 mg/l  $\text{NH}_3$ ; 90FE: 0,0558 mg/l  $\text{NH}_3$ ). Beide Experimente haben alle in das C.E.B.A.S. eingesetzten adulten *X. helleri* überlebt.

## 5.4.2 Vergleich der Differentialblutbilder von *X. helleri* aus orbitalen C.E.B.A.S.-Experimenten mit unterschiedlicher Dauer

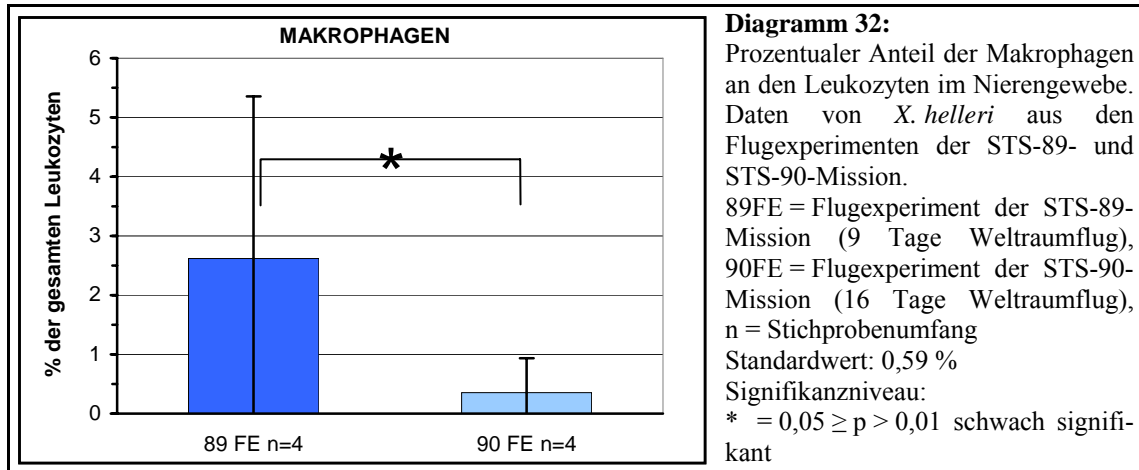
### 5.4.2.1 Anteil der Monozyten

Diagramm 31 zeigt den prozentualen Anteil der Monozyten an den Leukozyten im Nierengewebe der Schwerträger aus den Weltraumexperimenten der STS-89- und STS-90-Mission.



### 5.4.2.2 Anteil der Makrophagen

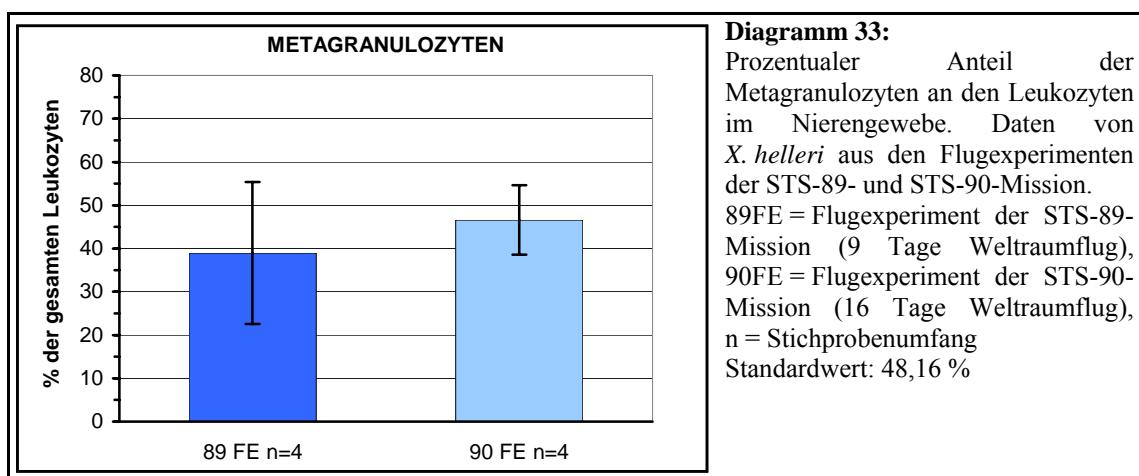
Die Makrophagen (Diagramm 32) zeigten ein völlig anderes Bild als ihre Vorläuferzellen, die Monozyten.



Die Schwerträger aus 89FE (2,62 %) besaßen einen signifikant höheren Makrophagenanteil als die aus 90FE (0,35 %).

### 5.4.2.3 Anteil der Metagranulozyten

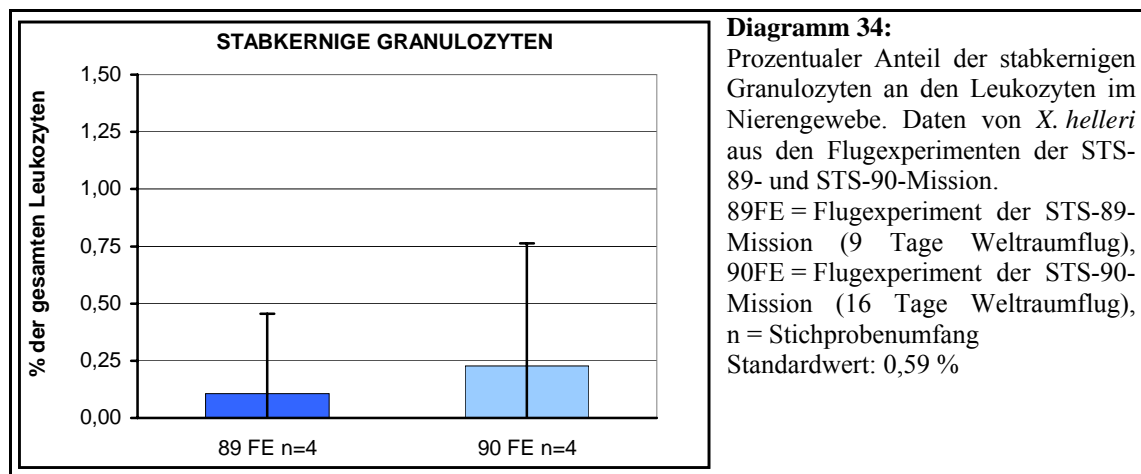
Die Dauer der orbitalen C.E.B.A.S.-Experimente und deren Haltungsbedingungen zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Metagranulozytenpopulation im Nierengewebe der Schwerträger (Diagramm 33).



Dennoch war ihr Anteil an den Leukozyten des Nierengewebes nach dem 9-tägigen 89FE-Experiment (38,95 %) niedriger als nach dem 16-tägigen Flug von 90FE (46,60 %).

#### 5.4.2.4 Anteil der stabkernigen Granulozyten

Die stabkernigen Granulozyten (Diagramm 34) zeigten ein ähnliches Bild wie ihre Vorläuferzellen, die Metagranulozyten. Zwischen den Experimenten unterschiedlicher Dauer konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (89FE: 0,11 %; 90FE: 0,23 %).



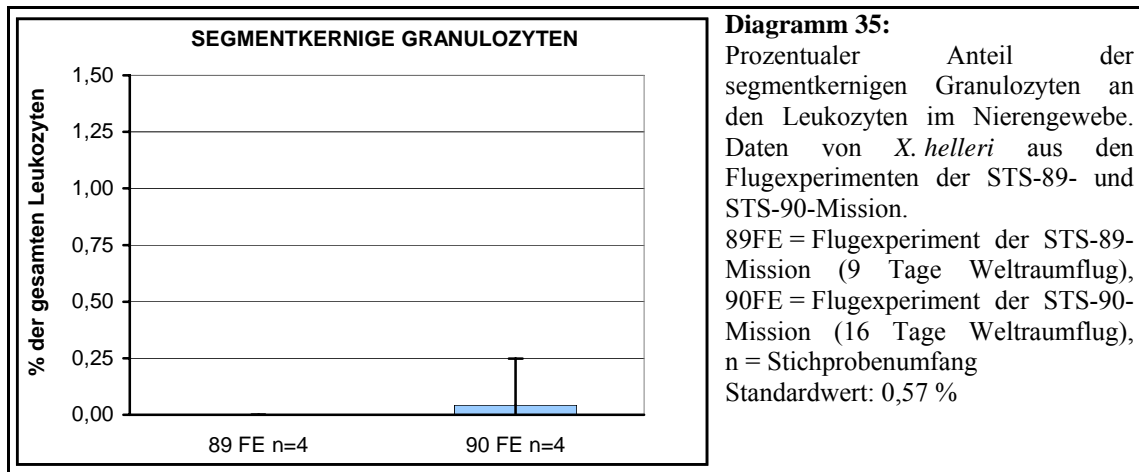
Dennoch traten bei der Differenzierung der Blutzellen nach dem 16-tägigen 90FE-Experiment mehr als doppelt so viel stabkernige Granulozyten auf wie nach dem 9-tägigen 89FE-Versuch.

#### 5.4.2.5 Anteil der segmentkernigen Granulozyten

Beim Vergleich der orbitalen Experimente 89FE und 90FE zeigten die ausgereiften segmentkernigen, neutrophilen Granulozyten (Diagramm 35) keinen signifikanten Unterschied. Nach dem längeren 90FE-Versuch lag ihr Anteil

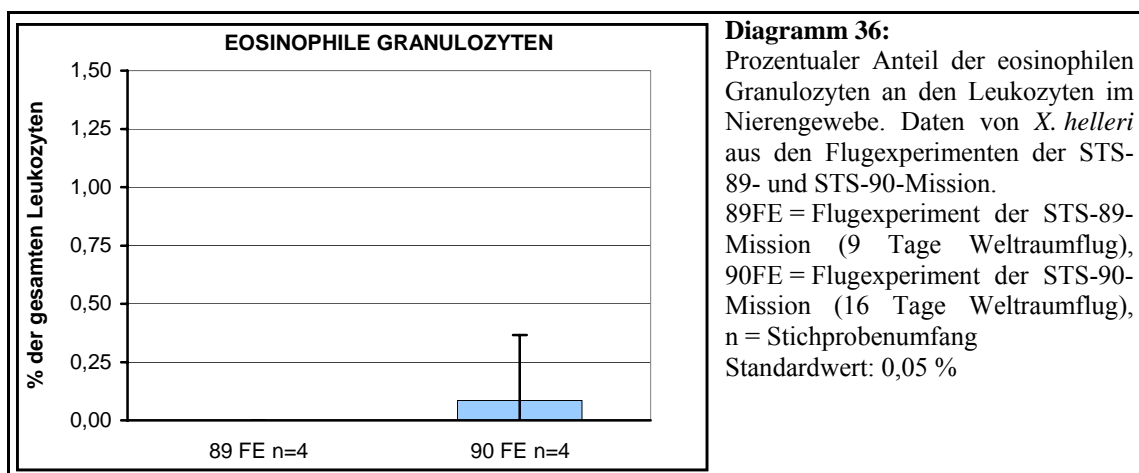


höher (0,04 %) als nach 89FE (0,00 %).



#### 5.4.2.6 Anteil der eosinophilen Granulozyten

Wie Diagramm 36 zeigt, hatte die unterschiedliche Dauer der STS-89 und STS-90 Weltraumexperimente auf die Population der eosinophilen Granulozyten keinen signifikanten Einfluss.

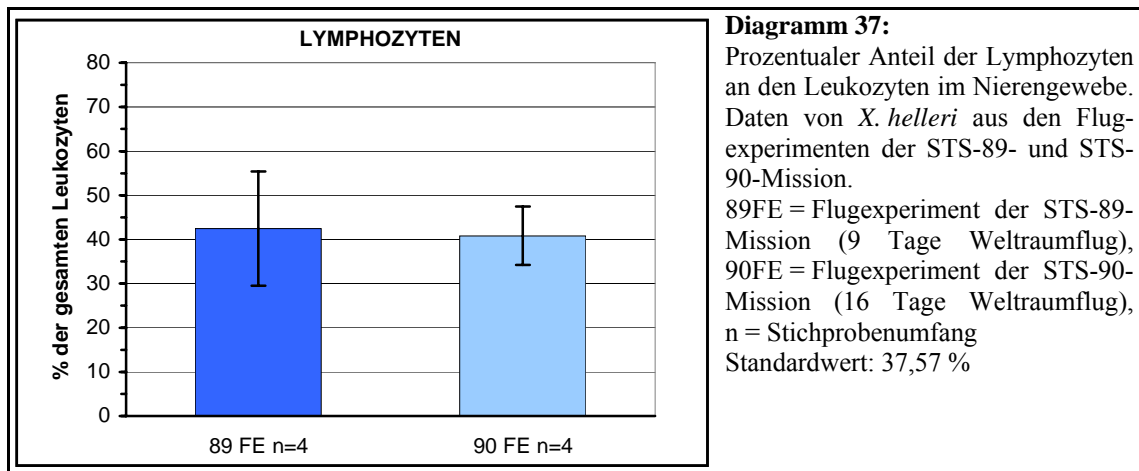


Nach dem längeren 90FE-Experiment (0,08 %) traten sie geringfügig häufiger auf als nach 89FE (0,00 %).

#### 5.4.2.7 Anteil der Lymphozyten

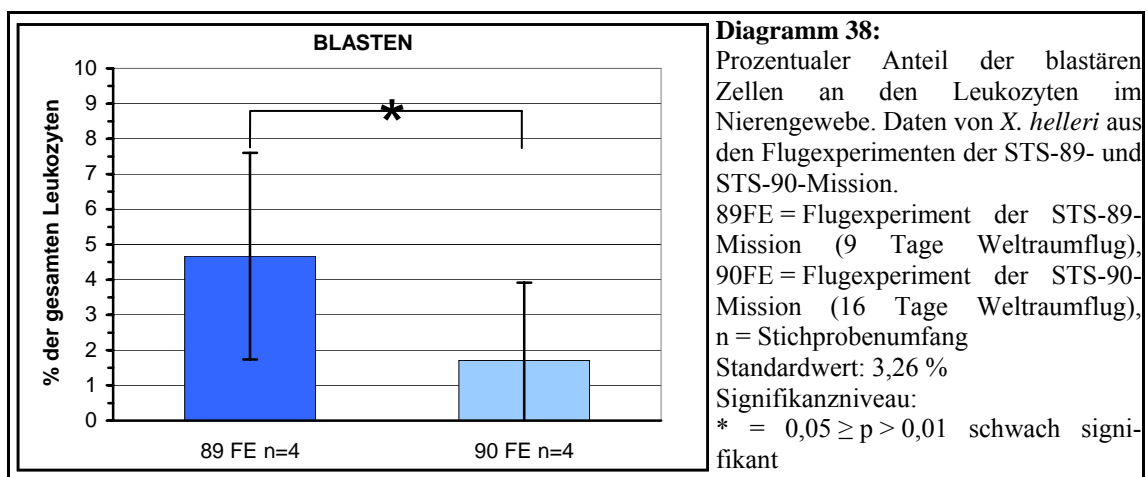
Die Lymphozytenpopulation zeigte weder einen signifikanten noch einen relevanten Unterschied zwischen dem 9-tägigen 89FE- (42,48 %) und dem 16-tägigen 90FE-

(40,83 %) Weltraumexperiment (Diagramm 37). Die unterschiedliche Dauer der orbitalen C.E.B.A.S.-Läufe besaß somit keinen Einfluss auf diese Zellpopulation.



#### 5.4.2.8 Anteil der blastären Zellen

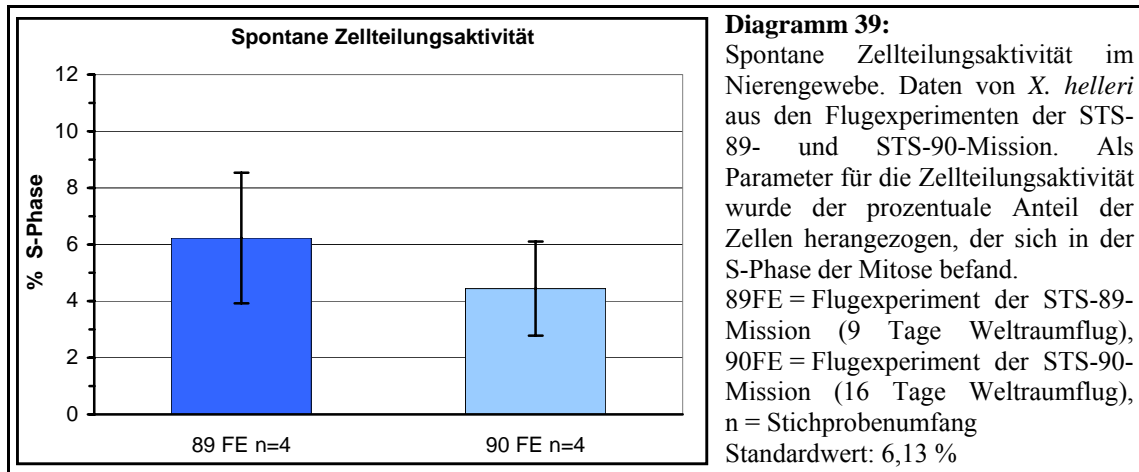
Die blastären Zellen (Diagramm 38) zeigten einen deutlichen (89FE: 4,67 %; 90FE: 1,70 %) und stark signifikanten Unterschied zwischen den Flugexperimenten der STS-89- und STS-90-Mission. Nach dem 16-tägigen 90FE-Experiment lag ihr Anteil wesentlich niedriger als nach 89FE.



#### 5.4.3 Spontanen Zellteilungsaktivität

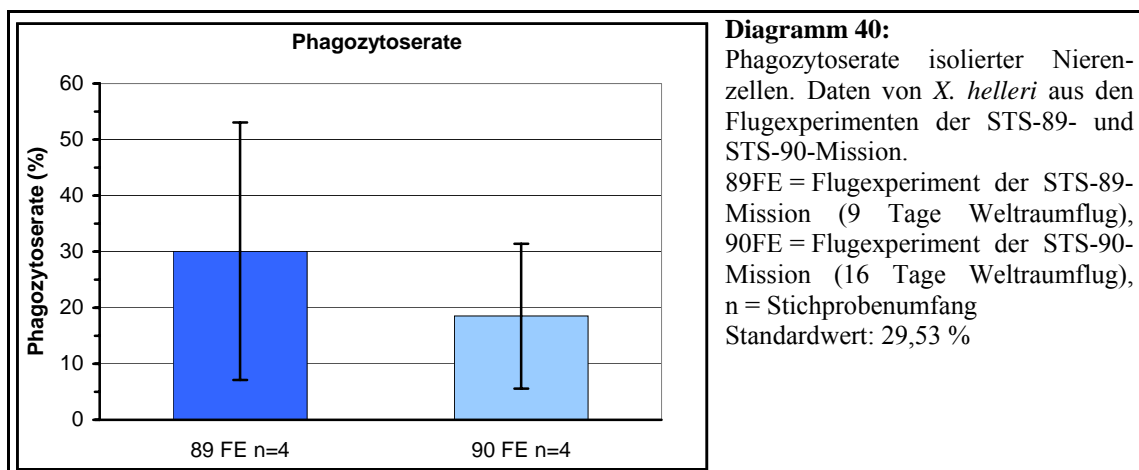
Zwischen 89FE und 90FE konnte im Hinblick auf die spontane Zellteilungsaktivität im

Nierengewebe von *X. helleri* (Diagramm 39) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Dennoch war die Teilungsaktivität nach der länger andauernden STS-90-Mission deutlich schwächer als nach 89FE (89FE: 6,23 %, 90FE: 4,44 %).



#### 5.4.4 Phagozytoserate

Diagramm 40 zeigt die Phagozytoserate der Phagozyten nach 89FE und 90FE (89FE: 30,08 %, 90FE: 18,50 %). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Experimenten festgestellt werden, doch lag die Rate bei den Tieren aus 90FE deutlich niedriger.



## **5.5 Einfluss der Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf das Abwehrsystem von *X. helleri***

Die terrestrischen Experimente, die im Rahmen der STS-89- und STS-90-Missionen stattfanden, waren wie die beiden Weltraumexperimente von unterschiedlicher Dauer. Für die Funktion des Abwehrsystems und damit auch für den Gesundheitszustand der Schwerträger spielt die Dauer der Haltung unter suboptimalen Bedingungen eine wichtige Rolle. Abhängig von der Art der Umweltveränderungen können kurzfristige Verschlechterungen von den Schwerträgern toleriert werden. Dagegen können anhaltend schlechte Bedingungen (vergleiche Abbildungen 10-12 und 14-16) einen negativen Einfluss auf das Abwehrsystem der Schwerträger nehmen.

Im Folgenden soll gezeigt werden, welchen Einfluss die Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung unter den gegebenen Umweltbedingungen auf das Abwehrsystem der Schwerträger hatte. Zu diesem Zweck werden die Daten von Schwerträgern verglichen, die sich während 89BE für 9 Tage, während 89NT1 und 89NT2 für 11Tage, während 90BE für 16 Tage und während 90NT1 und 90NT2 für 22 Tage im C.E.B.A.S.-Modul befanden.

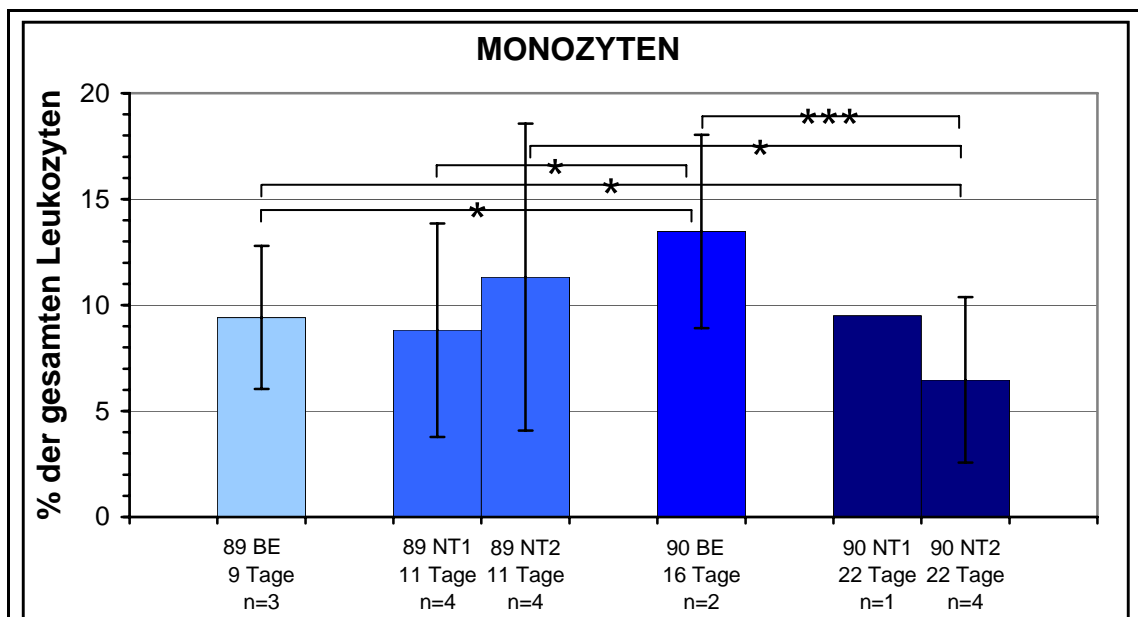
### **5.5.1 Vergleich der Wasserwerte und Housekeepingdaten der terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten mit unterschiedlicher Dauer**

In den Tabellen 8 und 9 und den Abbildungen 10-12 und 14-16 sind die Daten der terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimente in Bezug auf ihre Dauer, den Besatz mit *X. helleri*, die Wasserwerte und die Housekeepingdaten dargestellt. Die Daten machen deutlich, dass sich die terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimente nicht nur bezüglich ihrer Dauer voneinander unterschieden. Zusätzlich kam es zu erheblichen Unterschieden bei den Wasserwerten und Housekeepingdaten.

## 5.5.2 Vergleich der Differentialblutbilder von *X. helleri* aus terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten mit unterschiedlicher Dauer

### 5.5.2.1 Anteil der Monozyten

Der Anteil der Monozyten an den Leukozyten des Nierengewebes zeigte erhebliche Differenzen zwischen den Experimenten unterschiedlicher Dauer (Diagramm 41).



**Diagramm 41:**

Prozentualer Anteil der Monozyten an den Leukozyten im Nierengewebe von *X. helleri*. Um den Einfluss der Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf die Monozytenpopulation beurteilen zu können, sind Daten von *X. helleri* dargestellt, die sich zwischen 9 und 22 Tagen im C.E.B.A.S. befanden. Die Experimente sind von links nach rechts nach zunehmender Dauer geordnet.

89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 9,2 %

Signifikanzniveau:

\* =  $0,05 \geq p > 0,01$  schwach signifikant

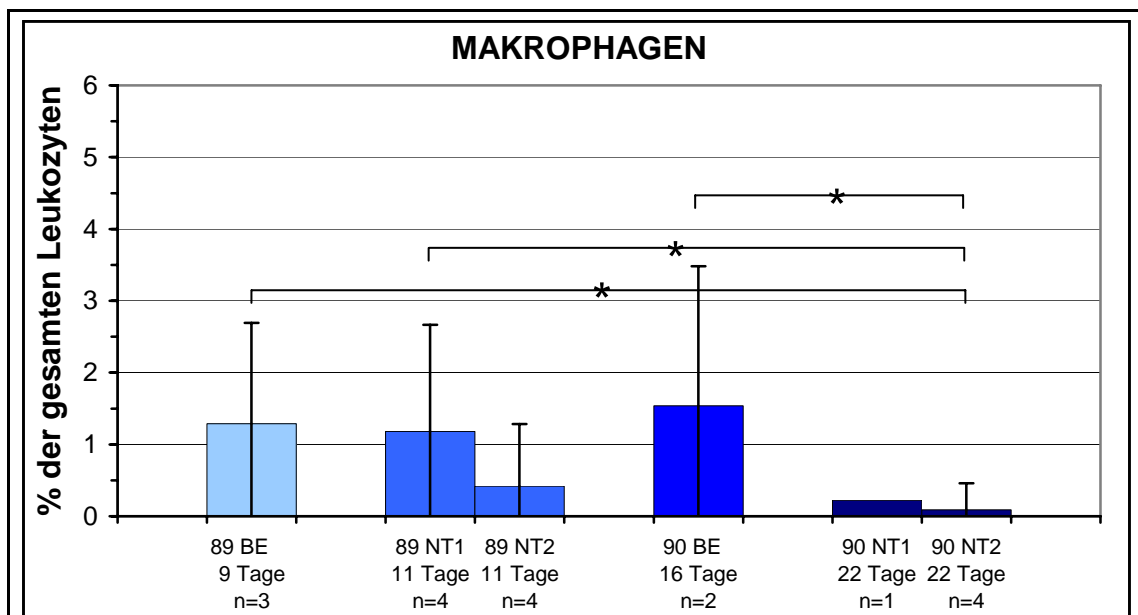
\*\*\* =  $0,001 \geq p$  sehr stark signifikant

Es kam in fünf Fällen zu Signifikanzen und zwar ausschließlich bei Versuchen mit deutlich unterschiedlicher Dauer (Differenz mindestens fünf Tage). Zwischen Experimenten gleicher Dauer traten keine signifikanten Unterschiede auf. Zwischen den terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten unterschiedlicher Dauer kam es sowohl zwischen einem 9- und 16-tägigen als auch zwischen einem 11- und 16-tägigen Experiment zu einer signifikanten Zunahme des Monozytenanteils im Nierengewebe.

Dagegen zeigte das am längsten dauernde Experiment (90NT2: 22-tägig) mit vier überlebenden Tieren gegenüber einem 16-, 11- und 9-tägigen Experiment eine signifikante Abnahme dieses Zelltyps. Dabei zeigten die beiden überlebenden Tiere des 16-tägigen 90BE (13,48 %) Experimentes den mit Abstand höchsten, die des 22-tägigen 90NT2(6,47 %) Experimentes den niedrigsten Monozytenanteil.

### 5.5.2.2 Anteil der Makrophagen

Der Anteil der Makrophagen an den Leukozyten im Nierengewebe von *X. helleri* zeigte bei drei Experimenten unterschiedlicher Dauer signifikante Differenzen (Diagramm 42).



**Diagramm 42:**

Prozentualer Anteil der Makrophagen an den Leukozyten im Nierengewebe von *X. helleri*. Um den Einfluss der Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf die Makrophagenpopulation beurteilen zu können, sind Daten von *X. helleri* dargestellt, die sich zwischen 9 und 22 Tagen im C.E.B.A.S. befanden. Die Experimente sind von links nach rechts nach zunehmender Dauer geordnet.

89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 0,59 %

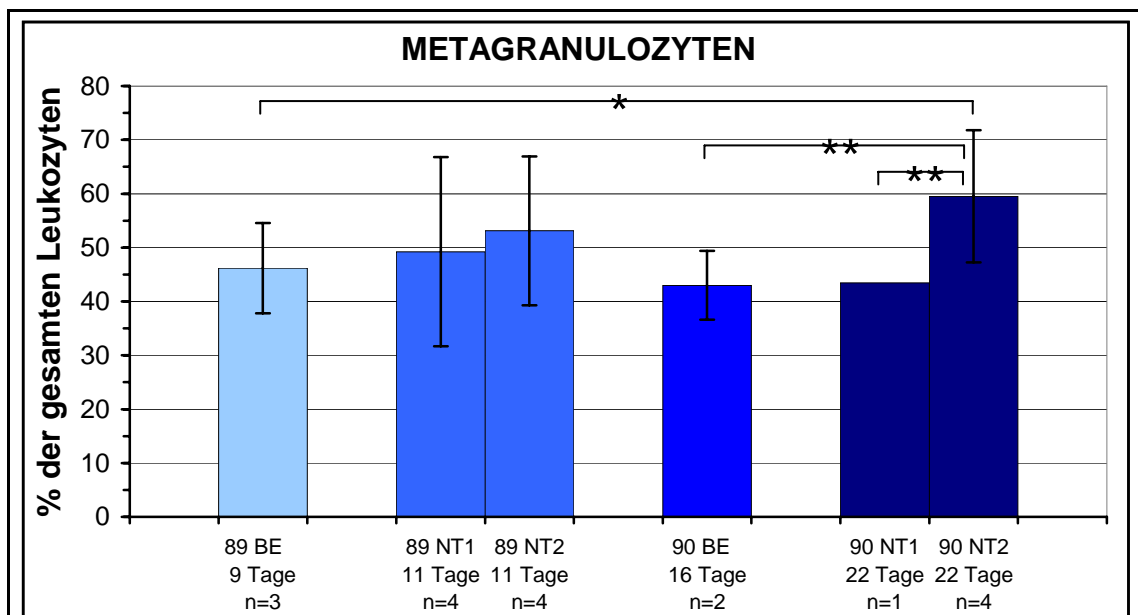
Signifikanzniveau: \* = 0,05  $\geq$  p > 0,01 schwach signifikant

Die Schwerträger des 90NT2-Versuchs (0,09 %/22 Tage) besaßen einen signifikant niedrigeren Makrophagenanteil gegenüber den Tieren aus 9-, 11- und 16-tägigen Experimenten. Zwischen C.E.B.A.S.-Läufen gleicher Dauer kam es zu keinen

signifikanten Differenzen. Die beiden am längsten andauernden Experimente (90NT1: 0,22 %/22 Tage und 90NT2: 0,09 %/22 Tage) besaßen den niedrigsten, die Schwerträger des 16-tägigen 90BE (1,54 %) Experimentes den höchsten Makrophagenanteil.

### 5.5.2.3 Anteil der Metagranulozyten

Die Metagranulozyten zeigten, wie bei den zuvor beschriebenen Monozyten und Makrophagen, signifikante Differenzen zwischen Experimenten unterschiedlicher Dauer (Diagramm 43).



**Diagramm 43:**

Prozentualer Anteil der Metagranulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe von *X. helleri*. Um den Einfluss der Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf die Metagranulozytenpopulation beurteilen zu können, sind Daten von *X. helleri* dargestellt, die sich zwischen 9 und 22 Tagen im C.E.B.A.S. befanden. Die Experimente sind von links nach rechts nach zunehmender Dauer geordnet.

89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 48,16 %

Signifikanzniveau:

\* =  $0,05 \geq p > 0,01$  schwach signifikant

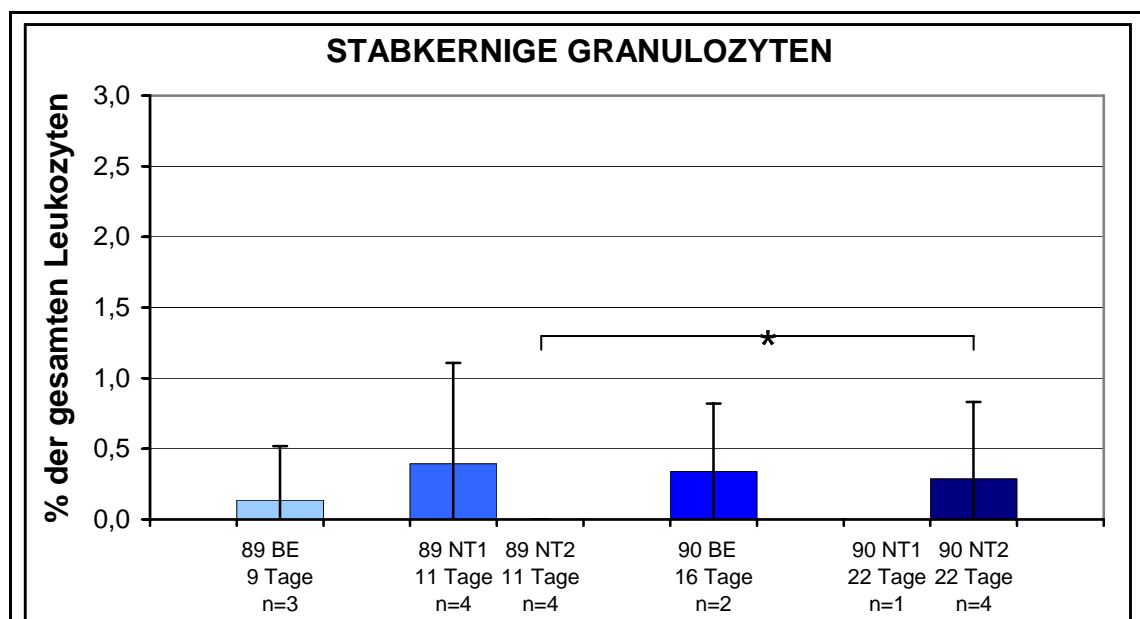
\*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$  stark signifikant

Ihr Anteil lag nach 90NT2 (59,51 %/22 Tage) signifikant höher als nach 89BE und 90BE (46,17 %/16Tage bzw. 42,98 %/9 Tage). Allerdings kam es bei den

Metagranulozyten auch zwischen Experimenten gleicher Dauer (90NT1: 43,43 %/22 Tage und 90NT2: 59,51 %/22 Tage) zu einem signifikanten Unterschied.

### 5.5.2.4 Anteil der stabkernigen Granulozyten

In Diagramm 44 ist der prozentuale Anteil der stabkernigen Granulozyten an den Leukozyten des Nierengewebes von *X. helleri* nach unterschiedlicher Experimentdauer geordnet dargestellt.



**Diagramm 44:**

Prozentualer Anteil der stabkernigen Granulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe von *X. helleri*. Um den Einfluss der Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf die Population der stabkernigen Granulozyten beurteilen zu können, sind Daten von *X. helleri* dargestellt, die sich zwischen 9 und 22 Tagen im C.E.B.A.S. befanden. Die Experimente sind von links nach rechts nach zunehmender Dauer geordnet.

89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 0,59 %

Signifikanzniveau:

\* =  $0,05 \geq p > 0,01$  schwach signifikant

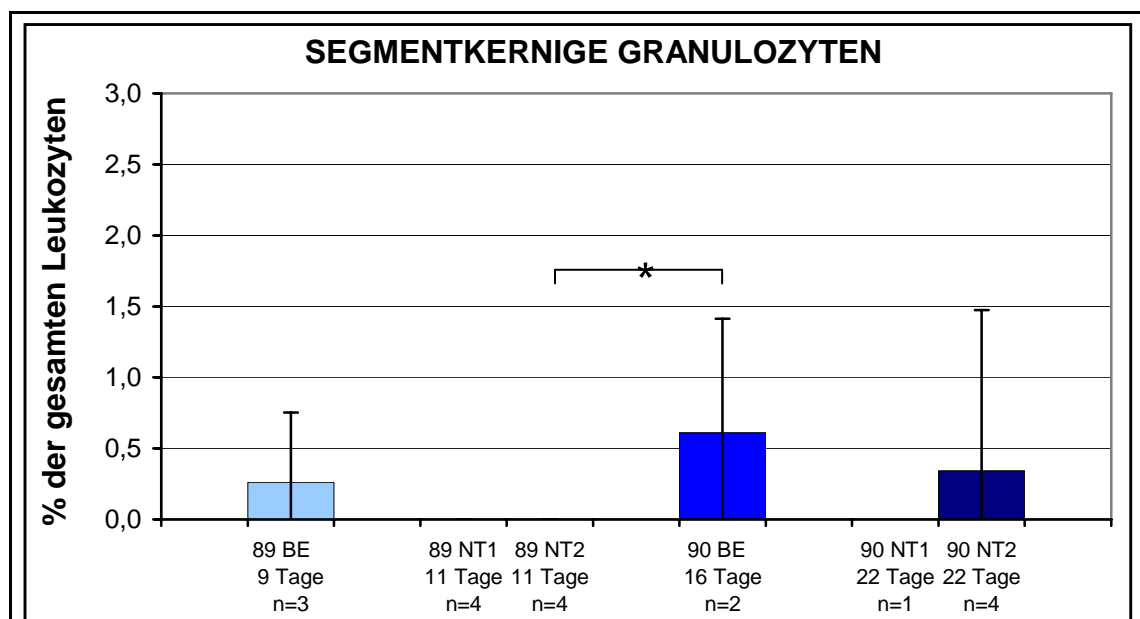
Nur in einem Fall kam es zu einer signifikanten Differenz: Der Anteil der stabkernigen Granulozyten war nach 90NT2 (0,29 %/22 Tage) gegenüber 89NT2 (0,00 %/11 Tage) signifikant erhöht. Bei den Schwerträgern aus 89NT2 (0,00 %/11 Tage) und 90NT1 (0,00 %/22 Tage) konnten keine stabkernigen Granulozyten gezählt werden; jedoch



handelte es sich dabei gegenüber den anderen Experimenten um keine signifikante Abnahme.

### 5.5.2.5 Anteil der segmentkernigen Granulozyten

Bei den segmentkernigen Granulozyten (Diagramm 45) kam es, wie bei den stabkernigen Granulozyten, nur in einem Fall zu einer signifikanten Differenz zwischen C.E.B.A.S.-Experimenten unterschiedlicher Dauer.



**Diagramm 45:**

Prozentualer Anteil der segmentkernigen Granulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe von *X. helleri*. Um den Einfluss der Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf die Population der segmentkernigen Granulozyten beurteilen zu können, sind Daten von *X. helleri* dargestellt, die sich zwischen 9 und 22 Tagen im C.E.B.A.S. befanden. Die Experimente sind von links nach rechts nach zunehmender Dauer geordnet.

89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 0,57 %

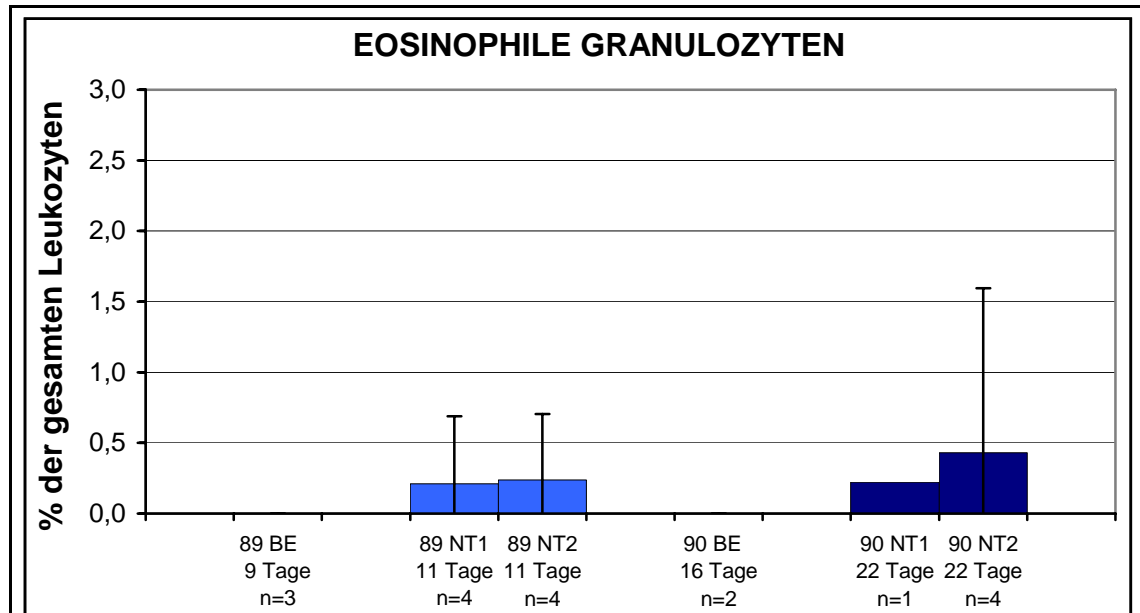
Signifikanzniveau:

\* =  $0,05 \geq p > 0,01$  schwach signifikant

Die *X. helleri* aus 90BE (0,61 %/16 Tage) besaßen gegenüber 89NT2 (0,00 %/11 Tage) eine signifikant erhöhte Anzahl dieses Zelltyps. Nach drei C.E.B.A.S.-Läufen wurden keine segmentkernigen Granulozyten gezählt; es handelte sich dabei um den 22-tägigen 90NT1-, den 11-tägigen 89NT1- und den 89NT2-Versuch.

### 5.5.2.6 Anteil der eosinophilen Granulozyten

Die Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimente hatte auf die Population der eosinophilen Granulozyten im Nierengewebe der Schwerträger keinen signifikanten Einfluss (Diagramm 46).



**Diagramm 46:**

Prozentualer Anteil der eosinophilen Granulozyten an den Leukozyten im Nierengewebe von *X. helleri*. Um den Einfluss der Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf die Population der eosinophilen Granulozyten beurteilen zu können, sind Daten von *X. helleri* dargestellt, die sich zwischen 9 und 22 Tagen im C.E.B.A.S. befanden. Die Experimente sind von links nach rechts nach zunehmender Dauer geordnet.

89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

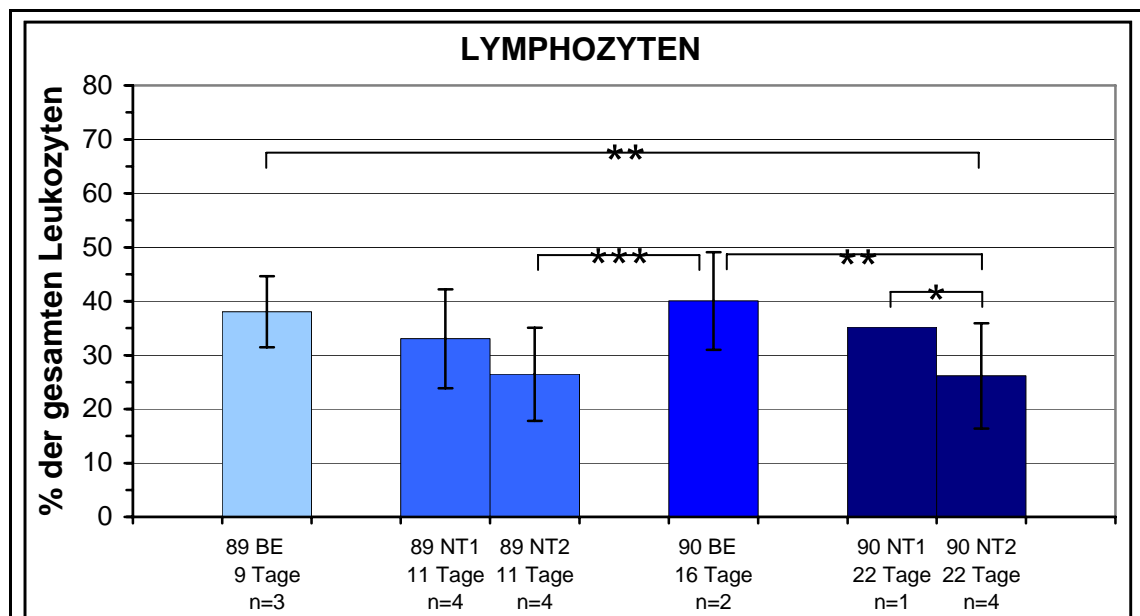
Standardwert: 0,05 %

Bei einem der beiden 22-tägigen und damit längsten Versuchen (90NT2: 0,43 %/22 Tage) war der Anteil dieses Zelltyps am größten. Nach dem 9-tägigen 89BE- und dem 16-tägigen 90BE-Experiment konnten keine eosinophilen Granulozyten gefunden werden.

### 5.5.2.7 Anteil der Lymphozyten

Bei den Lymphozyten-Werten kam es in drei Fällen zu signifikanten Differenzen zwischen Experimenten unterschiedlicher Dauer (Diagramm 47). Die Experimente

89NT2 (26,46 %/11 Tage) und 90NT2 (26,17 %/22 Tage) wiesen gegenüber 90BE (40,05 %/16 Tage) einen signifikant niedrigeren Lymphozytenanteil aus.



**Diagramm 47:**

Prozentualer Anteil der Lymphozyten an den Leukozyten im Nierengewebe von *X. helleri*. Um den Einfluss der Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf die Lymphozytenpopulation beurteilen zu können, sind Daten von *X. helleri* dargestellt, die sich zwischen 9 und 22 Tagen im C.E.B.A.S. befanden. Die Experimente sind von links nach rechts nach zunehmender Dauer geordnet.

89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 37,57 %

Signifikanzniveau:

\* =  $0,05 \geq p > 0,01$  schwach signifikant

\*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$  stark signifikant

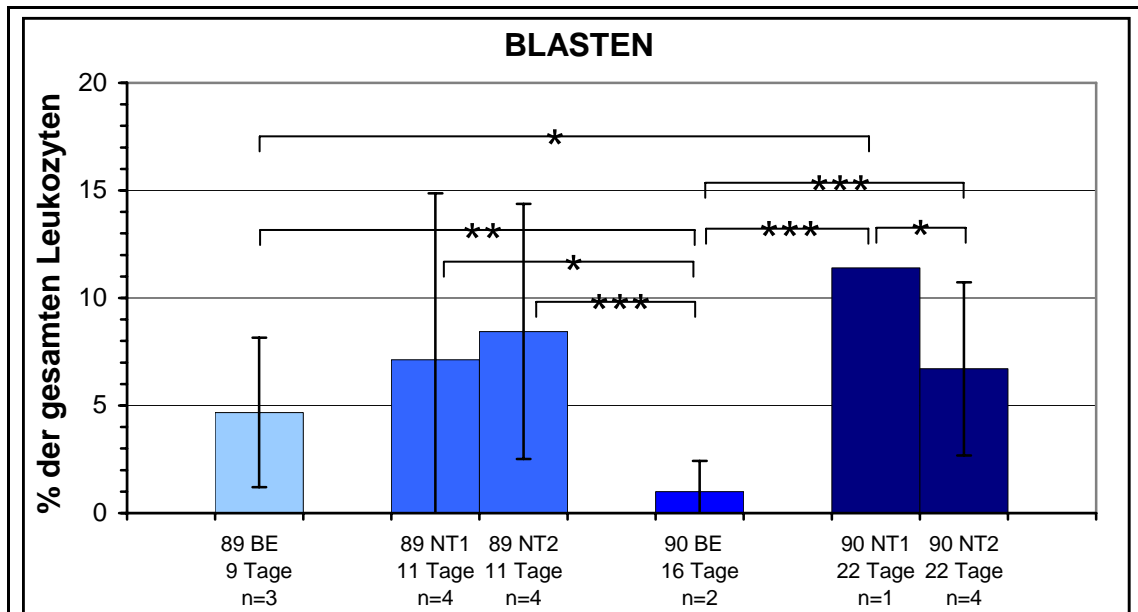
\*\*\* =  $0,001 \geq p$  sehr stark signifikant

90NT2 zeigte im Vergleich mit dem Bodenkontrollexperiment der STS-89 Mission (89BE: 38,05 %/9 Tage) ebenfalls einen signifikant niedrigeren Lymphozytenanteil. Auch zwischen zwei Experimenten gleicher Dauer kam es zu schwach signifikanten Differenzen der Lymphozytenwerte. Die Schwertträger aus 90NT2 (22 Tage) zeigten signifikant weniger Lymphozyten als das einzige überlebende Tier aus 90NT1 (35,22 %/22 Tage).

### 5.5.2.8 Anteil der blastären Zellen

Diagramm 48 zeigt das Verhalten der Blastenpopulation nach C.E.B.A.S.-Experimenten

unterschiedlicher Dauer. Gegenüber den Tieren aus 90BE (1,00 %/16 Tage) zeigten alle anderen Experimente einen signifikant erhöhten Anteil blastärer Blutzellen, unabhängig davon, ob die Versuche länger oder kürzer als 90BE waren.



**Diagramm 48:**

Prozentualer Anteil der blastären Zellen an den Leukozyten im Nierengewebe von *X. helleri*. Um den Einfluss der Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf die Population der blastären Zellen beurteilen zu können, sind Daten von *X. helleri* dargestellt, die sich zwischen 9 und 22 Tagen im C.E.B.A.S. befanden. Die Experimente sind von links nach rechts nach zunehmender Dauer geordnet.

89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 3,26 %

Signifikanzniveau:

\* =  $0,05 \geq p > 0,01$  schwach signifikant

\*\* =  $0,01 \geq p > 0,001$  stark signifikant

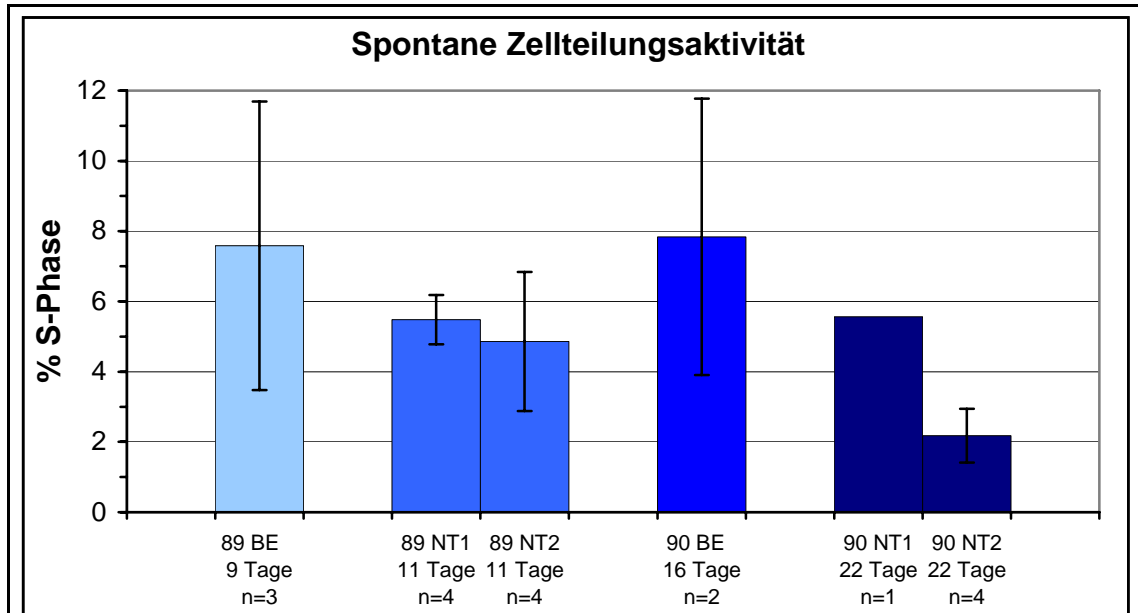
\*\*\* =  $0,001 \geq p$  sehr stark signifikant

Außerdem war die Blastenpopulation des überlebenden Schwerträgers aus 90NT1 (11,40 %/22 Tage) gegenüber den Tieren aus 89BE (4,68 %/9 Tage) signifikant erhöht. Nach 90NT1 und 90NT2 (6,70 %/22 Tage), zwei Experimenten mit gleicher Dauer, zeigte der einzelne Schwerträger aus 90NT1 gegenüber denen aus 90NT2 signifikant erhöhte Blastenwerte.

### 5.5.3 Spontane Zellteilungsaktivität

Die Zellteilungsaktivität im Nierengewebe der Schwerträger zeigte zwischen

Experimenten verschiedener Dauer keine signifikanten Unterschiede (Diagramm 49). Die C.E.B.A.S.-Läufe 89NT1 (5,48 %), 89NT2 (4,86 %) (beide 11 Tage ) und 90NT1 (5,56 %/22 Tage) führten zu ähnlichen Ergebnissen, hatten aber eine deutlich unterschiedliche Dauer.



**Diagramm 49:**

Spontane Zellteilungsaktivität im Nierengewebe von *X. helleri*. Um den Einfluss der Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf die Teilungsaktivität beurteilen zu können, sind Daten von *X. helleri* dargestellt, die sich zwischen 9 und 22 Tagen im C.E.B.A.S. befanden. Die Experimente sind von links nach rechts nach zunehmender Dauer geordnet.

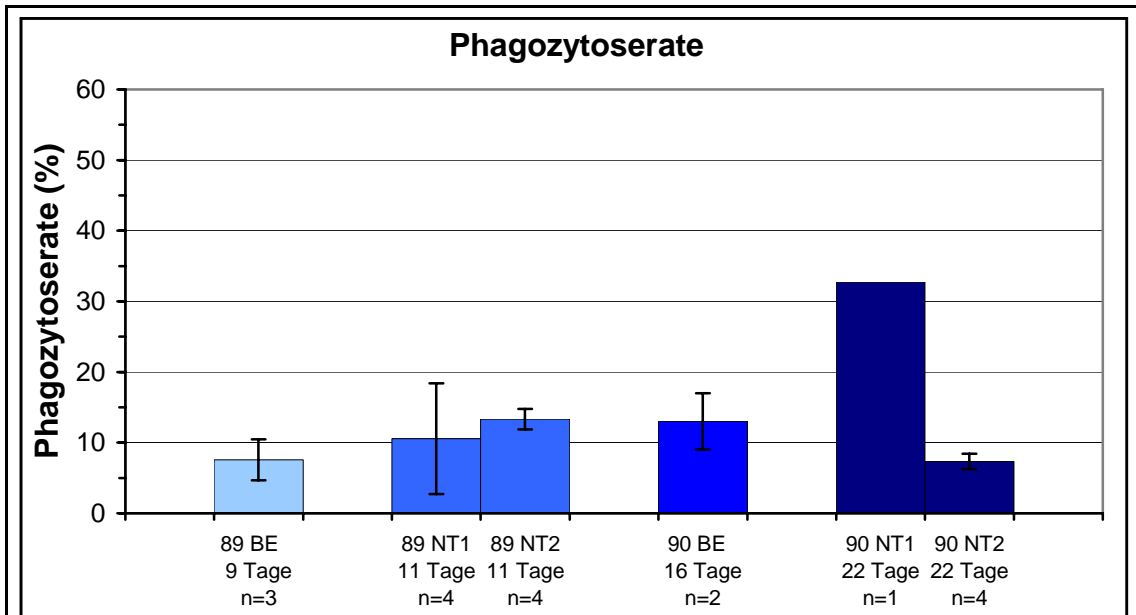
89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 6,13 %

Gleiches gilt für 89BE (7,58 %/9 Tage) und 90BE (7,84 %/16 Tage). Die Schwerträger mit der geringsten Zellteilungsaktivität stammten aus 90NT2 (2,18 %/22 Tage), welches eines der beiden Experimente mit der längsten Dauer war.

### 5.5.4 Phagozytoserate

Diagramm 50 zeigt die Phagozytoserate isolierter Nierenzellen nach C.E.B.A.S.-Experimenten mit unterschiedlicher Dauer. Es traten keine signifikanten Differenzen auf. Auffällig ist lediglich die gegenüber allen anderen Experimenten hohe Phagozytoserate bei dem einzigen überlebenden Tier aus 90NT1 (32,70 %/22 Tage).

**Diagramm 50:**

Phagozytoserate isolierter Nierenzellen von *X. helleri*. Um den Einfluss der Dauer der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf die Phagozytoserate beurteilen zu können, sind Daten von *X. helleri* dargestellt, die sich zwischen 9 und 22 Tagen im C.E.B.A.S. befanden. Die Experimente sind von links nach rechts nach zunehmender Dauer geordnet.

89BE = Bodenkontrollexperiment der STS-89-Mission, 89NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-89-Mission, 89NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-89-Mission, 90BE = Bodenkontrollexperiment der STS-90-Mission, 90NT1 = Nutzlasttest-1 der STS-90-Mission, 90NT2 = Nutzlasttest-2 der STS-90-Mission, n = Stichprobenumfang

Standardwert: 29,53 %

## 6 Diskussion

In welcher Weise die Schwerelosigkeit das Immun- und Abwehrsystem von Menschen und Nagetieren beeinflusst, wurde seit den Anfängen der Weltraumfahrt erforscht. Welche Wirkung die Mikrogravitation auf hämatologische und immunologische Parameter von Teleostern ausübt, ist dagegen bisher nicht überprüft worden. Die Untersuchungen an *X. helleri*, die sich an Bord der STS-89 und STS-90 Space Shuttle-Missionen im C.E.B.A.S.-MINI MODUL befanden, sollten im direkten Vergleich zwischen Flug- und Bodenkontrollexperimenten zeigen, ob und wie sich die Schwerelosigkeit auf das Abwehrsystem der Schwerträger auswirkte.

Bevor es möglich war, den Einfluss der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem zu beurteilen, musste jedoch zunächst festgestellt werden, ob die Umweltbedingungen im C.E.B.A.S. das Abwehrsystem von *X. helleri* beeinflussen konnten. Zu diesem Zweck wurden die Daten von *X. helleri* aus der Standardhaltung mit Daten von Tieren aus terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten verglichen.

Die unterschiedliche Dauer der orbitalen und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimente ermöglichten es zudem, die Wirkung der Haltungsdauer im C.E.B.A.S. auf das Abwehrsystem von *X. helleri* zu untersuchen.

Somit sollte der Einfluss folgender Faktoren auf das Abwehrsystem von *X. helleri* untersucht werden:

1. Der Einfluss der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung.
2. Der Einfluss der Mikrogravitation.
3. Der Einfluss der Dauer der Weltraumflüge.
4. Der Einfluss der Dauer der Haltung im C.E.B.A.S. unter terrestrischen Gravitationsbedingungen.

Da es sich beim C.E.B.A.S. um ein aquatisches Ökosystem mit wenigen Eingriffsmöglichkeiten zur Verbesserung der Wasserqualität handelte, waren die Haltungsbedingungen im C.E.B.A.S. während der Experimente nicht konstant. Die Tabellen 8 und 9 und die Abbildungen 10-17 dokumentieren, dass die Umweltbedingungen zeitweise so weit von den Standardhaltungsbedingungen abwichen, dass sie für die Haltung von *X. helleri* problematisch waren. Somit muss

davon ausgegangen werden, dass neben der Mikrogravitation und der Dauer der Experimente weitere Umweltfaktoren auf die Schwerträger einwirkten, die dazu in der Lage waren, die untersuchten Abwehrparameter zu beeinflussen. Daraus folgt, dass es anhand der gewonnenen Daten nur sehr begrenzt möglich war, den Einfluss der Parameter „Mikrogravitation“ und „Dauer der orbitalen/terrestrischen Experimente“ auf das Abwehrsystem zu beurteilen.

Im Folgenden soll diskutiert werden, in welcher Weise sich die Umweltbedingungen, die während der C.E.B.A.S.-Experimente herrschten, auf die untersuchten Abwehrparameter ausgewirkt haben. Selbstverständlich wird dabei auch auf die Faktoren „Mikrogravitation“ und „Dauer der orbitalen/terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimente“ eingegangen werden.

Die Untersuchung des Einflusses von Umweltfaktoren auf das Immun- bzw. Abwehrsystem ist eine komplexe Aufgabe, insbesondere dann, wenn unter dem Begriff Umweltfaktoren sowohl interne als auch externe Faktoren verstanden werden. Unter internen Umweltfaktoren versteht man die Interaktion zwischen Immun-, Nerven-, und endokrinem System, um die Homöostase des Organismus aufrecht zu erhalten. Externe Umweltfaktoren sind beispielsweise physikalische (z. B. Gravitation, Temperatur), chemische (z. B. pH-Wert, O<sub>2</sub>-Konzentration, Schadstoffgehalt) oder biotische (z. B. innerartliche Konkurrenz, Populationsdichten) Bedingungen der äußeren Umwelt des Organismus, die Einfluss auf die internen Faktoren und somit auf die Homöostase nehmen können (Cooper und Parrinello, 1996). Somit besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Immun- /Abwehrsystem, Gesundheitszustand und den Umweltbedingungen, unter denen Vertebraten leben.

Niedere Vertebraten aus natürlichen bzw. naturähnlichen Ökosystemen (wie z. B. Teleosteer) als Modell für die Wirkung von Umwelteinflüssen auf höhere Vertebraten zu nutzen, hat mehrere Vorteile. Zum Beispiel sind derartige Tiermodelle kostengünstig und ihre Ergebnisse lassen sich leichter auf den Menschen übertragen, da sich die Versuchstiere in einer ähnlich komplexen Umwelt bewegen wie der Mensch. Labormodelle entsprechen aufgrund der kontrollierten Bedingungen in wesentlichen Punkten nicht den Gegebenheiten in einem natürlichen oder naturähnlichen Ökosystem. Der Nachteil eines solchen natürlichen bzw. naturnahen Modells wie dem C.E.B.A.S. muss jedoch ebenfalls berücksichtigt werden. Aufgrund der komplexen Regelkreise, die



der Homöostase eines Vertebratenorganismus, insbesondere der eines Säugetierorganismus zugrunde liegen, ist es schwierig, den Einfluss eines einzelnen externen Umweltfaktors (z. B. Gravitationsbedingungen) auf das Abwehrsystem zu bestimmen. Dies ist um so problematischer, je mehr andere externe physikalische, chemische oder soziale Parameter (z. B. pH-Wert, Ammonium-, Nitrat-, Nitritkonzentration, Temperatur, Stress), die in einem natürlichen oder naturähnlichem Ökosystem nicht kontrollierbar sind, soweit vom Toleranzbereich eines Organismus abweichen, dass sie seine Homöostase negativ beeinflussen können. Ist dies der Fall, ist es nicht möglich, einen monokausalen Zusammenhang zwischen der Veränderung eines untersuchten Abwehrparameters und einem bestimmten Umweltfaktor herzustellen.

Für diese Arbeit ergibt sich daraus das Problem, dass es nicht möglich **ist**, die Veränderungen der Abwehrparameter während der C.E.B.A.S.-Experimente allein auf die Gravitationsbedingungen zurückzuführen. Diese Problematik ist auch aus der bemannten Weltraumfahrt bekannt. So stellen Taylor und Dardano (1983) fest, dass die bei Astronauten auftretende Veränderung der Leukozytenzahl eher auf deren subjektiv empfundenen Stress als auf die Schwerelosigkeit zurückzuführen ist. Was als Stressor empfunden wird, ist individuell. Die Veränderung immunologischer Parameter nach Weltraumaufenthalt von Astronauten und Kosmonauten darf somit nicht allein vor dem Hintergrund veränderter Gravitationsbedingungen gesehen werden. Jeder bei einem Weltraumaufenthalt auftretende Stressor kann das Immunsystem beeinflussen.

Da es ein wichtiges Ziel der C.E.B.A.S.-Weltraumexperimente war, die Wirkung eines Weltraumfluges auf ein autonom funktionierendes, geschlossenes ökologisches System zu untersuchen, waren die technischen Einflussmöglichkeiten von vorneherein auf die wichtigsten Parameter eines aquatischen Lebensraumes beschränkt. Außerdem wurden diese nur genutzt, wenn das Ökosystem „umzukippen“ drohte. Die Lebensbedingungen der Fische betreffend, beschränkten sich die Eingriffsmöglichkeiten ins Ökosystem C.E.B.A.S. auf folgende Punkte:

1. Die Dauer und der Zeitpunkt der Beleuchtung des Pflanzenkompartimentes (O<sub>2</sub>-Versorgung) konnte nach Bedarf gesteuert werden.
2. Ein Gasaustauscher konnte den Sauerstoffgehalt künstlich anheben, falls die Pflanzen nicht dazu in der Lage waren, die Sauerstoffversorgung zu gewährleisten.

3. Mit Hilfe einer Peltier-Wärmepumpe konnte die Wassertemperatur kontrolliert werden.

Nach Verschluss des C.E.B.A.S. waren keine weiteren Möglichkeiten vorhanden, die Umweltbedingungen künstlich zu optimieren. Wie oben erwähnt blieben die Umweltparameter nicht immer über den gesamten Zeitraum der Versuche konstant bzw. optimal (siehe Tabelle 8, 9 und Abbildungen 10-17). Daher muss in Bezug auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Abwehrparameter von *X. helleri* davon ausgegangen werden, dass ihr Zustand die Summe aller Umweltbedingungen im C.E.B.A.S. widerspiegelt und nicht allein die Wirkung der jeweils vorherrschenden Gravitationsbedingungen. Bei der Diskussion der vorliegenden Ergebnisse müssen somit alle relevanten und dokumentierten Umweltfaktoren berücksichtigt werden. Während der C.E.B.A.S.-Experimente wurden pH-Wert, Temperatur und Sauerstoffgehalt des Wassers dokumentiert, so dass Veränderungen sehr gut nachvollzogen werden können (vergleiche Abbildung 10-17).

Aufgrund der Größe des C.E.B.A.S. war der Probenumfang aus den Experimenten bezüglich der adulten Schwerträger nur sehr begrenzt (vier adulte, weibliche Tiere). Zusätzlich erschwerten die innerhalb einer Teleostpopulation naturgemäß großen individuellen Schwankungen von Abwehrparametern die Bestimmung von repräsentativen Werten. Bei Teleostern definieren Lehmann und Stürenberg (1976) den physiologischen Normbereich eines hämatologischen Parameters, d.h. dessen natürlichen Schwankungsbereich innerhalb einer „Standardpopulation“, als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (vergleiche Diagramm 1-20).

Die C.E.B.A.S.-Versuche, die im Rahmen der STS-89 (89FE) und STS-90 (90FE) Weltraummissionen durchgeführt wurden, waren sich verhältnismäßig ähnlich. Dennoch war es aufgrund von Unterschieden zwischen beiden Weltraumexperimenten nicht möglich, den Probenumfang durch Zusammenfassen der Ergebnisse beider Versuche von vier auf acht Tiere zu erhöhen. Die wichtigste Abweichung zwischen den Experimenten war deren unterschiedliche Dauer. Zusätzlich kam es zu Abweichungen zwischen den Wasserwerten. Wegen der Erfahrungen aus der ersten Mission wurden außerdem Änderungen am Experimentaufbau vorgenommen, die dazu dienten, das empfindliche ökologische Gleichgewicht des C.E.B.A.S. zu stabilisieren und die Überlebensrate der eingesetzten Tiere zu verbessern.

Bei den Teleostern ist der Zusammenhang zwischen chemischen und physikalischen Umwelteinflüssen, Stress und dem Immunsystem gut untersucht (Weeks und Warinner, 1986; Zeeman, 1986; Sinderman, 1990; Cooper, 1990; Bly et al., 1997; Köllner et al., 2002). Es wurde der Einfluss von Aggressionen (Cooper et al., 1988; Ghoneum et al., 1988; Faisal et al., 1990; Kurogi und Iida, 1999), Stress (Pickering, 1981; Ortuno et al., 2001), Ernährung (Blazer et al., 1989), Temperatur (Bly und Clem, 1992; Alcorn et al., 2002), Transport (Bly et al., 1990), Jahreszeit (Nakanishi, 1986; Bly et al., 1997), Tag/Nacht-Rhythmus (Nevid und Meier, 1993) und vieles andere mehr untersucht. Jedoch war die Wirkung der Mikrogravitation auf Abwehrparameter von Teleostern bisher nie Gegenstand der Forschung.

### **6.1 Wirkung der Mikrogravitation**

Zunächst soll die Wirkung der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von *X. helleri* diskutiert werden. Zu diesem Zweck werden Veränderungen zwischen C.E.B.A.S.-Flug- und Bodenkontrollexperimenten (89FE/89BE und 90FE/90BE, vergleiche Diagramm 21-30) betrachtet und mit Literaturdaten verglichen, die von Mikrogravitationsexperimenten mit höheren Vertebraten (Ratte, Maus, Mensch) stammen. Ein Überblick über die Literaturdaten ist in den Tabellen 10 und 11 gegeben. Die Ergebnisse des Vergleichs zwischen den Flug- und Bodenkontrollexperimenten der STS-89- und STS-90-Mission sind ebenfalls in die Tabellen aufgenommen worden.

Immunologische Untersuchungen, die nach Weltraumflügen an Kosmonauten und Astronauten durchgeführt wurden, zeigten sowohl Veränderungen der absoluten und relativen Zahl der Leukozyten im peripheren Blut als auch Veränderungen funktioneller Parameter (Kimzey et al., 1976; Taylor und Dardano, 1983; Taylor et al., 1986; Leach, 1992; Meehan et al., 1992; Allebban et al., 1994; Ichiki et al., 1996; Stowe et al., 1999). Besonders häufig wurde die Proliferation bzw. Aktivierung von Lymphozyten untersucht, die unter Einfluss der Mikrogravitation standen (Tabelle 10).

**Tabelle 10:** Veränderung funktioneller Parameter bei Leukozytenpopulationen von Vertebraten nach Einwirkung von Mikrogravitation.

Autoren, Spezies	Phagozytose	Respiratory-Burst	IL-1-Produktion von Monozyten/Makrophagen	Spontane Proliferation	Lymphozytenaktivierung/-proliferation durch Con A-Stimulation
Cogoli et al. (1984), Mensch	-	-	-	-	↓ (Lymphozyten in Suspension)
Cogoli und Tschopp (1985), Mensch	-	-	-	-	↓ (Lymphozyten in Suspension)
Bechler et al. (1986), Mensch	-	-	-	-	↓ (Lymphozyten in Suspension)
Cogoli et al. (1988), Mensch	-	-	-	-	↓ (Lymphozyten in Suspension)
Fleming et al. (1991), Maus	-	↑	-	-	-
Limouse et al. (1991), Mensch	-	-	↓	-	-
Bechler et al. (1992), Mensch	-	-	↓	-	↑ (Lymphozyten und Monozyten adherent)
Chapes et al. (1992), Maus	-	-	↑ (Aktivierung mit Lipopolysacchariden)	-	-
Cogoli et al. (1993), Mensch	-	-	-	-	↑ (Lymphozyten und Monozyten adherent)
89FE <i>X. helleri</i> , n=4, 9 D	↑	-	-	↓	-
90FE <i>X. helleri</i> , n=4, 16 D	↑	-	-	↓	-

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind grau hinterlegt.

89FE/90FE = Flugmodell der STS-89- bzw. STS-90-Mission, - = nicht bestimmt, ↓ = Abnahme gegenüber der Kontrolle/ dem Bodenexperiment (89BE, 90BE), ↑ = Zunahme gegenüber der Kontrolle/ dem Bodenexperiment (89BE, 90BE), D = Dauer der Weltraumflüge in Tagen, n = Stichprobenumfang

In Abhängigkeit davon, ob Lymphozyten in Suspension oder an Microcarrier-Beads gebunden der Mikrogravitation ausgesetzt wurden, kam es zu einer deutlichen Unterdrückung der mitogeninduzierten T-Zell-Aktivierung/-Proliferation (Cogoli und Tschopp, 1985; Bechler et al., 1986; Taylor et al., 1986; Cogoli et al., 1988; Konstantinova et al., 1993) oder zu einer deutlichen Steigerung derselben (Bechler et al., 1992; Cogoli et al., 1993).

Die im Rahmen dieser Arbeit an *X. helleri* durchgeführten Messungen zeigen, dass die spontane Zellteilungsaktivität nach den C.E.B.A.S.-Weltraumexperimenten 89FE und 90FE gegenüber den Werten der Bodenkontrollexperimente (89FE: 6,23 %, 89BE: 7,58 %; 90FE: 4,44 %, 90BE: 7,84 %) abnahm (Diagramm 29). Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Teilungsaktivität aller im Nierengewebe auftretenden Blutzellen gemessen wurde und nicht die einer bestimmten Zellpopulation (z. B. Lymphozyten). Außerdem erfolgte aus arbeitstechnischen Gründen weder eine Kultur der Leukozyten noch eine Stimulation ihrer Teilungsaktivität durch Zugabe eines Mitogens (z. B. Con A). Eine Vorgehensweise, die bei den oben genannten Experimenten mit Lymphozyten höherer Vertebraten Anwendung fand.

Obwohl der Einfluss von Weltraumflügen auf Lymphozyten höherer Vertebraten häufig untersucht wurde, ist nur wenig über die Effekte bekannt, die Weltraumflüge auf die Reifung, Morphologie und Funktion (z. B. Phagozytose) von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen haben (Stowe et al. 1999). Zur Wirkung von Weltraumflügen auf die Phagozytoseaktivität von Phagozyten höherer Vertebraten liegen bisher keine Literaturangaben vor.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Weltraumexperimente 89FE und 90FE zeigten, dass die Phagozytoserate der Nierenphagozyten von *X. helleri* gegenüber den Bodenkontrollexperimenten 89BE und 90BE (89FE: 30,08 %, 89BE: 7,56 %; 90FE: 18,50 %, 90BE: 13,00 %) zunahm (Diagramm 30). Somit zeigten die Phagozyten gegenüber den Werten aus den Bodenkontrollexperimenten nach beiden Weltraumflügen eine Aktivierung. Dabei ist zu berücksichtigen, dass die Phagozytoseraten von beiden Bodenkontrollexperimenten und dem Flugexperiment 90FE weit unterhalb des Standardwertes (29,53 %) lagen (Diagramm 19, 20). Die starke Abweichung zwischen dem Phagozytosewert der Tiere aus der Standardhaltung und dem der Tiere aus den Bodenkontrollexperimenten macht es fraglich, ob die terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimente (89BE und 90BE) als „vollwertige“

Kontrollexperimente angesehen werden können.

Stowe et al. (1999) setzten sich mit der Funktion neutrophiler Granulozyten nach Weltraumaufenthalten von Astronauten auseinander. Neutrophile Granulozyten stellen einen wichtigen Teil der Phagozytenpopulation des Immunsystems dar. Die Autoren konnten einen Anstieg der chemotaktischen Aktivität und eine gesteigerte Adhäsion der neutrophilen Granulozyten an endotheliale Zellen zeigen. Zugleich wurde im Urin der Astronauten ein erhöhter Spiegel des Stresshormons Cortisol festgestellt. Nach Ansicht der Autoren wies diese Beobachtung auf einen hypermetabolen (aktivierten) Zustand der neutrophilen Granulozyten hin. Dieser wiederum stand ihrer Ansicht nach im Zusammenhang mit den Stresshormonen, die während und nach Weltraumflügen ausgeschüttet wurden.

Armstrong et al. (1995) untersuchten die Funktion und Poesse von murinen B6MP102-Makrophagen nach Weltraum- bzw. Parabolflügen. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass bei Einwirkung von Hypogravitation die zelluläre Proliferation der Makrophagen beschleunigt, ihre Differenzierung jedoch gehemmt ist. Außerdem beobachteten sie, dass sich die einzelne Zelle bei Hypogravitation verstärkt ausbreitet (Spreading). Das „Spreading“ von Makrophagen ist laut Armstrong et al. (1995) ein Maß für ihren Aktivierungszustand.

Fleming et al. (1991) konnten bei Parabolflügen zeigen, dass der Respiratory-Burst (Respiratory-Burst = gesteigerte Sauerstoffaufnahme der Phagozyten und Bildung reaktiver und gegenüber Erregern aggressiver Sauerstoffspezies (z. B.  $H_2O_2$ ) von murinen neutrophilen Granulozyten bei Hypogravitation erhöht war. Dies würde ebenfalls für eine Aktivierung dieser Zellen unter Hypogravitationsbedingungen sprechen.

Limouse et al. (1991) und Bechler et al. (1992) untersuchten die Interleukin 1 (IL-1)-Produktion von humanen Monozyten nach Weltraumflügen. IL-1 ist ein interzellulärer Botenstoff der notwendig für die T-Zell-Aktivierung ist. Die Autoren konnten eine deutliche Hemmung der IL-1-Produktion unter Mikrogravitationsbedingungen feststellen. Zu einem anderen Ergebnis kamen Chapes et al. (1992). Sie beobachteten bei B6MP102-Makrophagen des Knochenmarks, die unter Weltraumbedingungen kultiviert wurden, eine 100 %ige Steigerung der IL-1-Produktion.

**Tabelle 11:** Nach Weltraumflügen auftretende Veränderungen innerhalb der Leukozytenpopulationen bei verschiedenen Vertebratenspezies.

Autoren, Spezies	Leukozyten	Monozyten	Makrophagen	Lymphozyten	Eosinophile Granulozyten	Neutroph.- / Metagranuloz.	Stabkernige Granuloz.	Segmentk. Granuloz.	Blasten
Kimzey et al. (1976) M, n=3, PB, 59 D	↑	-	-	↓	-	↑	-	-	-
Taylor & Dardano (1983) M, n=8, PB, 2,25 – 8 D	-	-	-	↓	↓	↑	-	-	-
Taylor et al. (1986) M, n=11-41, PB, 2,5 – 10,2 D	-	↓	-	↓	↓	↑	-	-	-
Meehan et al. (1992) M, n=30, PB, 4 – 5 D	↑	↑	-	↓	-	↑	-	-	-
Allebban et al. (1994) R, n=29, PB, 9 D	↓	↓	-	↓	↓	↑	-	-	-
Ichiki et al. (1996) R, n=15, PB, 14 D	↑	↓	-	↓	-	↑	-	-	-
Stowe et al. (1999) M, n=6, PB, 8 D	↓	↓	-	=	↓	↑	-	-	-
Stowe et al. (1999) M, n=5, PB, 9 D	↑	↑	-	=	↓	↑	-	-	-
Stowe et al. (1999) M, n=5, PB, 14 D	↑	↑	-	=	↓	↑	-	-	-
89FE <i>X. helleri</i> n=4, N, 9 D	-	↑	↑	=	=	=	=	↓	=
90FE <i>X. helleri</i> n=4, N, 16 D	-	↓	↓	=	=	=	=	↓	↑

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind grau hinterlegt.

89FE/90FE = Flugmodell der STS-89- bzw. STS-90-Mission, - = nicht bestimmt, = = keine Änderung, ↓ = Abnahme gegenüber der Kontrolle, ↑ = Zunahme gegenüber der Kontrolle, D = Dauer der Weltraumflüge in Tagen, M = Mensch, N = Nierenmaterial, n = Stichprobenumfang, PB = peripheres Blut, R = Ratte

In Tabelle 11 sind die Veränderungen des Differentialblutbildes aufgeführt, die bei den *X. helleri* aus den Weltraumexperimenten auftraten. Die Daten sind vergleichbaren Ergebnissen aus der Literatur gegenübergestellt. Es ist zu beachten, dass bei Astronauten und Ratten mit Zellen aus peripherem Blut und nicht, wie bei den Fischen, aus blutbildendem (hämatopoetischem) Gewebe gearbeitet wurde. Außerdem ist die Menge der Blutzelltypen in der Regel in Zellen/ $\mu\text{l}$  angegeben worden. Somit wurde ihr Anteil an den gesamten Leukozyten absolut und nicht, wie in dieser Arbeit, prozentual bestimmt.

Wie Tabelle 11 zeigt, waren die Ergebnisse der Blutzelldifferenzierung bei Astronauten und Ratten, die von einem Weltraumflug zurückkehrten, verhältnismäßig einheitlich.

1. Die Zahl der Leukozyten war erhöht (bei fünf von sieben Untersuchungen).
2. Die Zahl der neutrophilen Granulozyten war erhöht (bei neun von neun Untersuchungen).
3. Die Zahl der Lymphozyten hatte abgenommen (bei sechs von neun Untersuchungen).
4. Die Zahl der eosinophilen Granulozyten hatte abgenommen (bei sechs von sechs Untersuchungen).
5. Die Monozyten zeigten ein uneinheitliches Bild. Sie nahmen nach Weltraumaufenthalten in drei Fällen zu und in vier Fällen ab.

Das Bild, welches sich nach den Flugexperimenten der STS-89- und STS-90-Mission im Vergleich mit den Bodenkontrollexperimenten zeigte, stimmte in den seltensten Fällen mit vergleichbaren Daten von Astronauten und Ratten überein, deren peripheres Blut untersucht wurde. Lediglich bei den Monozyten und Lymphozyten zeigten sich, je nach Experiment (vergleiche Tabelle 11), ähnliche Tendenzen. Die Zunahmen der Monozyten nach dem Flugexperiment der STS-89-Mission (89FE, Diagramm 21) stimmen mit den Beobachtungen, die Meehan et al. (1992) und Stowe et al. (1999) gemacht haben, überein. Dagegen zeigte die Abnahme der Monozyten nach dem Flugexperiment der STS-90-Mission (Diagramm 21) Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Taylor et al. (1986), Allebban et al. (1994), Ichiki et al. (1996) und Stowe et al. (1999).

Die Konstanz des Anteils der Lymphozyten an den Leukozyten des Nierengewebes, die



nach den Flugexperimenten 89- und 90FE zu beobachten war (Diagramm 27), wurde auch von Stowe et al. (1999) beschrieben.

Die Heterogenität der Resultate kann verschiedene Ursachen haben:

1. Die unterschiedlichen Spezies, die untersucht wurden.
2. Die unterschiedliche Dauer der Experimente.
3. Die unterschiedlichen Kompartimente, die untersucht wurden (Blut, Niere/hämatopoetisches Gewebe).
4. Die unterschiedlichen Untersuchungs- bzw. Messmethoden, die genutzt wurden.

Diese Unterschiede machen deutlich, dass es schwierig ist, die Ergebnisse der bisher durchgeführten Experimente zur Auswirkung von Weltraumflügen auf das Immun- bzw. Abwehrsystem von Vertebraten mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit zu vergleichen.

Taylor und Dardano (1983) und Stowe et al. (1999) vermuten, dass die verschiedensten Stressoren, denen Astronauten ausgesetzt sind, eine viel bedeutendere Rolle bei immunologischen Veränderungen als die Mikrogravitation spielen. Das Auftreten von Adrenalin- und Corticosteroid-Rezeptoren auf Lymphozyten und polymorphkernigen Granulozyten unterstützt die Hypothese, dass diese Hormone, die in Stresssituationen freigesetzt werden, eine wichtige Rolle bei der Entstehung des immunologischen Bildes spielen, welches sich nach Weltraumflügen bei Raumfahrern zeigte (Neutrophilie, Lymphopenie, reduzierte T-Zell-Blastogenese) (Christou et al., 1980; Besedovski et al., 1983). Aufgrund der Umweltbedingungen in den C.E.B.A.S.-Experimenten ist es sehr gut möglich, dass auch auf die Schwerträger im C.E.B.A.S. Stressoren einwirkten.

## **6.2 Wirkung von Stress auf den Gesundheitszustand und das Abwehrsystem von Teleostern**

Im Folgenden soll diskutiert werden, welchen Einfluss Stressoren, die während der C.E.B.A.S.-Experimente auftraten, auf das Abwehrsystem von *X. helleri* gehabt haben könnten. Beim Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Resultaten anderer Autoren muss berücksichtigt werden, dass Umweltbedingungen, die bei einer

Fischspezies Stresssymptome verursachen können, speziesabhängig sind. So werden Arten, die sich im Laufe ihrer phylogenetischen Entwicklung an sauerstoffarme Gewässer angepasst haben, wesentlich niedrigere Sauerstoffkonzentrationen tolerieren, ohne Stresssymptome zu zeigen. Der Normwert des Killifisches (*Fundulus heteroclitus*) liegt beispielsweise bei ca. 2,45 mg/l O<sub>2</sub>, der Normwert der Bachforelle (*Salmo trutta f. fario*), deren Physiologie an sauerstoffreiche Gewässer angepasst ist, liegt dagegen bei einem Wert von ca. 11 mg/l O<sub>2</sub>. Gleiches gilt für andere Umweltparameter. Ein konkreter quantitativer Vergleich stressauslösender Parameter zwischen unterschiedlichen Teleostarten ist daher meist nicht sinnvoll. In Tabelle 8 sind Normwerte für die Haltung von *X. helleri* angegeben. Leider liegen nicht für alle Wasserparameter Normbereiche vor.

### **6.2.1 Wasserchemische und wasserphysikalische Bedingungen und Stress**

Während der C.E.B.A.S.-Experimente kam es zu kritischen Veränderungen der wasserphysikalischen und wasserchemischen Werte. Diese haben mit großer Wahrscheinlichkeit als Stressoren auf die Schwertträger eingewirkt und die untersuchten Abwehrparameter beeinflusst. Hier sind insbesondere die starke Abnahme der Sauerstoffkonzentration und der starke Anstieg von pH-Wert, Temperatur und Wasserhärte während einiger C.E.B.A.S.-Experimente zu nennen (vergleiche Tabelle 8, 9 und Abbildungen 10-17).

Der Vergleich zwischen Tieren aus der Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten zeigt, dass bei den Tieren aus den C.E.B.A.S.-Experimenten Veränderungen auftreten, die Stresssymptomen ähnlich sind. Zum Beispiel geben Ellsaesser und Clem (1986) an, dass verschiedene Arten von akutem Stress (hervorgerufen durch Sauerstoffmangel, hohe Ammoniakkonzentrationen und Transportbedingungen) Veränderungen hämatologischer Parameter von Fischen verursachen können. Dabei sind die am häufigsten genannten Effekte: Leukopenien, Lymphopenien und Neutrophilien (Ellsaesser und Clem, 1986). Ortuno et al. (2001) beschreibt einen Rückgang der Monozyten im haematopoetischen Gewebe der Niere von Goldbrassen (*Sparus aurata*) und einen Rückgang der Phagozytoseaktivität von Nierenphagozyten nach Stresseinwirkung.

Einige hämatologische Ergebnisse der C.E.B.A.S.-Experimente sind diesen Stresssymptomen sehr ähnlich. Besonders hervorzuheben sind dabei der gegenüber dem Standard signifikante Rückgang der Monozyten nach 90NT2 (Diagramm 2), die Zunahme der Metagranulozyten nach 90NT2 (Diagramm 6), der Rückgang der Lymphozyten nach 89NT2 und 90NT2 (Diagramm 13 und 14) und der Rückgang der Phagozytoseaktivität nach 89NT1, 89BE und 90NT2 (Diagramm 19 und 20).

Viele Stressoren, die während einiger C.E.B.A.S.-Experimente auftraten, sind dazu in der Lage, bei der Entstehung von Fischkrankheiten eine bedeutende Rolle zu spielen. Sie beeinflussen die Immunantwort oder nehmen direkten Einfluss auf Zellen des Immunsystems (Griffin, 1989; Ainsworth et al., 1991a; Bly et al., 1997; Köllner et al., 2002). Bei Teleostern können Umweltvariablen, wie der Sauerstoffgehalt, die Temperatur, der pH-Wert, die Konzentration von Abbauprodukten des Stickstoffkreislaufes, soziale Faktoren und Xenobiotika eine Stressreaktion hervorrufen. Wasserverschmutzungen (Walters und Plumb, 1980; Weeks und Wariner, 1986; Anderson, 1996), Temperaturveränderungen (Meyer, 1970; Kindle und Witmore, 1986; Magnadottir et al., 1999), Hypoxie (Sauerstoffmangel) (Plumb et al., 1976; Boleza et al., 2001) und saisonale Rhythmen (Zapata et al., 1992; Köllner et al., 2002) gelten als Faktoren, die Einfluss auf den Verlauf von Fischkrankheiten nehmen können. Nach Cooper und Parrinello (1996) ist es möglich, die Stressreaktion eines Organismus in direkte Verbindung mit Schadstoffen und Umweltgiften zu bringen.

Wie oben erwähnt, kam es während einiger C.E.B.A.S.-Experimente zu einem starken Rückgang der Sauerstoffkonzentration (bis 1,5 mg/l, vergleiche Tabelle 9 und Abbildung 10-17) und einer Zunahme der Ammoniakkonzentration (0,0864 mg/l, vergleiche Tabelle 8) im System.

Laut Durborow et al. (1997) können sich chronische Ammoniakkonzentrationen von 0,06 mg/l negativ auf die Gesundheit von Teleostern auswirken. Swift (1981) untersuchte die Wirkung von Sauerstoffmangel (Hypoxie) (1,7, 2,3 und 3,0 mg/l O<sub>2</sub>) und subletalen Ammoniakkonzentrationen (0,24, 0,26 und 0,33 mg/l NH<sub>3</sub>) auf Stressindikatoren von Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), wie die Blutglucosekonzentration, die Plasmacortisolkonzentration oder den Hämatokrit. Diese Parameter wurden von verschiedenen Autoren erfolgreich als Stressindikatoren bei Teleostern genutzt (Silbergeld, 1974; Donaldson und Dye, 1975; Casillas und Smith, 1977; McLeay, 1977). Gegenüber den Kontrolltieren kam es bei einer

Ammoniakkonzentration von 0,33 mg/l sowohl nach vier als auch nach 24 Stunden Expositionszeit zu einer signifikanten Zunahme des Hämatokritwertes. Die Blutglucosekonzentration war nach 24 Stunden Exposition bei 0,24, 0,26 und 0,33 mg/l NH<sub>3</sub> signifikant erhöht. Die Plasmacortisolkonzentration zeigte ein ähnliches Bild. Bei NH<sub>3</sub>-Konzentrationen von 0,24, 0,26 und 0,33 mg/l, denen eine Versuchstiergruppe vier Stunden, die andere 24 Stunden ausgesetzt war, kam es in beiden Gruppen zu einer signifikant erhöhten Cortisolkonzentration im Blut.

Auch niedrige Sauerstoffkonzentrationen führten bei den Untersuchungen von Swift (1981) an Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) zu typischen Stresssymptomen. Da bei Schwertträgern die Sauerstoffkonzentration über 3,0 mg/l liegen sollte (vergleiche z. B. Tamaru et al., 2001), haben die sehr niedrigen O<sub>2</sub>-Werte während einiger C.E.B.A.S.-Experimente (90NT1: 1,5 mg/l; 90NT2 1,5 mg/l; 90BE: 2,5 mg/l; 90FE 2,5 mg/l) mit Sicherheit als Stressoren gewirkt (vergleiche Abbildung 10-17 und Tabelle 9.). Swift (1981) fand bei Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), die einer Sauerstoffkonzentration von 1,7 bzw. 2,3 mg/l für länger als drei bzw. sechs Stunden ausgesetzt waren, signifikant erhöhte Hämatokritwerte. Die Blutglucosekonzentration, welche ein weiterer Stressindikator ist, war bei einer O<sub>2</sub>-Konzentration von 1,7 mg/l über drei Stunden und 2,3 mg/l über vier Stunden ebenfalls signifikant erhöht. Gleiches gilt für den Plasmacortisolspiegel. Dieser zeigte bei einer Sauerstoffkonzentration von 3,0 mg/l (oder weniger) und einer Expositionszeit von einer Stunde ebenfalls einen signifikanten Anstieg. Swift (1981) gibt zu bedenken, dass der Anstieg des Hämokrits nicht allein auf die Wirkung von Stress zurückzuführen sein muss, sondern auch auf ein Anschwellen der Erythrozyten bei Sauerstoffmangel beruhen kann. Außerdem kann es bei Fischen bei niedrigen O<sub>2</sub>-Werten zu einer Flüssigkeitsverlagerung vom Plasma ins Gewebe kommen, was zu einer Verminderung des Plasmavolumens und somit zu einem erhöhten Hämatokrit führen kann.

Individuelle Verhaltensstrategien in Stresssituationen können eine Erklärung dafür sein, warum einige Versuchstiere die C.E.B.A.S.-Experimente mit schwierigen Umweltbedingungen nicht überlebten und andere diese mit verhältnismäßig unauffälligen Werten überstanden (vergleiche dazu Tabelle 8, 9 und Abbildungen 10-17). Beispielhaft seien hier die überlebenden Tiere aus 90NT1 (ein Weibchen) und 90BE (zwei Weibchen) angeführt (vergleiche Diagramm 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 und 20). Diese zeigten nur bei den blastären Zellen (Diagramm 16) einen signifikanten

Unterschied zu den Tieren aus der Standardhaltung.

Van Raaij (1996) vermutet, dass individuelle Verhaltensweisen in engem Zusammenhang mit dem Überleben in Stresssituationen stehen. Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*), die in der Erholungsphase nach einer Hypoxie verstarben, zeigten ein intensives, kräftezehrendes Vermeidungs- und Fluchtverhalten, wobei überlebende Tiere nicht in Panik gerieten und ruhig blieben. Diese Verhaltensunterschiede standen in enger Verbindung mit deutlichen Unterschieden bei einigen neuroendokrinen Blutwerten. Die Catecholaminmenge im Plasma lag bei den Tieren, die nicht überlebten, ca. 4- bis 5-mal höher als bei denen, die überlebten. Ihre Cortisolantwort war dagegen vermindert. Außerdem besaßen die Tiere, die nicht überlebten, Lactatwerte die ca. 4- bis 5-mal höher lagen als bei den überlebenden Tieren. Zudem sprach bei ihnen eine starke Hyperkaliämie (erhöhte Kaliumwerte im Blut) für eine Störung der intrazellulären Homöostase. Ursache für eine Hyperkaliämie können Hämolyse, Thrombozytose, Azidose oder andere katabole Prozesse sein (van Raaij, 1996).

Die Ergebnisse der genannten Autoren zeigen, dass Umweltfaktoren, wie der Sauerstoff- oder der Schadstoffgehalt des Wassers, dazu in der Lage sind, bei Teleostern Stressreaktionen hervorzurufen.

### **6.2.2 Soziale Bedingungen und Stress**

Aufgrund des engen Lebensraumes, der den adulten Schwertträgerweibchen im C.E.B.A.S. zur Verfügung stand, ist es sehr gut möglich, dass die Tiere während der Versuche sozialem Stress ausgesetzt waren, der sich auf die untersuchten Abwehrparameter auswirkte. Videoaufnahmen dokumentieren Rangordnungskämpfe zwischen den eingesetzten Weibchen.

Der Aspekt des aggressiven Verhaltens und der daraus resultierende Stress für die Tiere im Experiment kann eine bedeutende Ursache für die Ausbildung von Stresssymptomen sein. Das einzige überlebende Weibchen des terrestrischen 90NT1 Experimentes zeigte ein deutlich aggressives Verhalten gegenüber den übrigen *X. helleri*, die sich im Experiment befanden. Keines der unterlegenen Tiere überlebte diesen C.E.B.A.S.-Lauf. Eine Ursache für ihren Exodus könnte der Übergang von der Adaptations- in die

Erschöpfungsphase des allgemeinen Anpassungssyndroms sein, hervorgerufen durch die über das gesamte Experiment anhaltende Aggression des dominanten Tieres gegenüber den unterlegenen Weibchen. Klinger et al. (1983) geben an, dass es bei Fischen, die sich in der Erschöpfungsphase des allgemeinen Anpassungssyndroms befinden, zu hohen Verlusten kommen kann. Es muss eingeräumt werden, dass der Zustand des Abwehrsystems der unterlegenen/verstorbenen *X. helleri*-Weibchen (in Hinblick auf die Beurteilung der Lebensbedingungen im C.E.B.A.S.) interessanter gewesen wäre als der des dominanten Weibchens, welches bei fast allen untersuchten Parametern unauffällig blieb (Diagramm 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 18 und 20). Einzige signifikante Ausnahme bildet die gegenüber dem Standard erhöhte Zahl der blastären Zellen im Nierengewebe (Diagramm 16). Außerdem konnten bei diesem Tier im Rahmen der Auszählung von insgesamt sechshundert Leukozyten keine segment- und stabkernigen neutrophilen Granulozyten im Nierengewebe gefunden werden.

Ghoneum et al. (1988) untersuchte bei Tilapien (*Oreochromis niloticus*) die Auswirkung von sozialem Stress auf die Aktivität von Natürlichen-zytotoxischen-Zellen (Natural-cytotoxic-Cells, NCC). Zehn Stunden nach Beginn der Stresssituation konnten die Tiere anhand verminderter zytotoxischer Reaktivität in drei Klassen eingeteilt werden: dominante Tiere ( $\alpha$ -Tiere), untergeordnete Tiere ( $\beta$ -Tiere) und Tiere, die keiner der beiden Klassen angehörten. Die verminderte Aktivität der NCC-Zellen bei Fischen, die sozialem Stress ausgesetzt waren, ist laut Ghoneum et al. (1988) ein Hinweis darauf, dass Veränderungen der zellvermittelten Immunität auf soziale Aggressivität zurückgeführt werden können.

Bei Untersuchungen von Kurogi und Iida (1999), bei denen Tilapien (*Oreochromis niloticus*) sozialem Stress (Rangordnungskämpfe) durch überlegene Artgenossen ausgesetzt waren, zeigte sich bei den unterlegenen Tieren ein erhöhter Cortisolspiegel im peripheren Blut. Außerdem war bei diesen Tieren sowohl die Fähigkeit der neutrophilen Granulozyten unterdrückt, in Entzündungsherde einzuwandern, als auch die Phagozytosefähigkeit und der Respiratory-Burst vermindert.

Ein signifikanter Rückgang der Phagozytosefähigkeit gegenüber dem Standardwert konnte auch bei den *X. helleri* aus den C.E.B.A.S.-Bodenexperimenten 89NT1, 89BE und 90NT2 festgestellt werden (Diagramm 19, 20). Jedoch dokumentierten die Videoaufzeichnungen, dass die Schwertträger während dieser Experimente kein besonders aggressives Verhalten zeigten.

Die Untersuchungen von Kurogi und Iida (1999) an Tilapien (*Oreochromis niloticus*) zeigten außerdem, dass die neutrophilen Granulozyten der dominanten Tiere gegenüber denen der Kontrolltiere einen signifikant erhöhten Respiratory-Burst besaßen. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass leichter Stress die Abwehraktivität dieses Zelltyps erhöhen kann.

Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, dass in Fischkulturen soziale Stresssituationen zu einer Beeinträchtigung des Immunsystems und so zu gesundheitlichen Schäden führen.

### 6.2.3 Dauer einer Stresssituation

Der Aspekt der zeitlichen Ausdehnung der Stresseinwirkung ist im Zusammenhang mit den Daten dieser Arbeit von Bedeutung, da die C.E.B.A.S.-Experimente von unterschiedlicher Dauer waren (vergleiche Tabelle 3). In den Diagrammen 31-40 und 41-50 sind die Ergebnisse der orbitalen (89FE und 90FE) und terrestrischen (89BE, 89NT1, 89NT2, 90BE, 90NT1, 90NT2) C.E.B.A.S.-Experimente nach zunehmender Versuchsdauer geordnet dargestellt.

Beim Vergleich der Flugexperimente der STS-89- und STS-90-Mission zeigte sich bei dem um sieben Tage längeren 90FE-Experiment ein signifikanter Rückgang des Makrophagen- und Blastenanteils (Diagramm 32 bzw. 38). Der Rückgang des Makrophagenanteils im Nierengewebe könnte für eine Beeinträchtigung der Phagozytoseleistung sprechen, was sich im gleichzeitigen, jedoch nicht signifikanten Rückgang der Phagozytoserate widerspiegelt (Diagramm 40). Die gegenüber 89FE signifikante Abnahme der Blasten (Diagramm 38) und der Rückgang der spontanen Zellteilungsaktivität (Diagramm 39) sprechen für eine Hemmung der Blutzellneubildung beim längeren 90FE-Experiment. Sowohl die verminderte Phagozytoserate als auch die Hemmung der Zellteilungsaktivität deuten auf eine Beeinträchtigung des Abwehrsystems von *X. helleri* bei zunehmender Dauer der orbitalen C.E.B.A.S.-Versuche hin.

Auch zwischen den terrestrischen Experimenten mit unterschiedlicher Dauer kam es zu signifikanten Differenzen. Innerhalb der Gruppe der Phagozyten traten dabei folgende Veränderungen auf. Das 16-tägige Experiment 90BE zeigte gegenüber den beiden 9-

und 11-tägigen Versuchen 89BE und 89NT1 eine signifikante Zunahme der Monozyten (Diagramm 41). Dagegen kam es beim 22-tägigen Experiment 90NT2 im Vergleich mit den 16-, 11- und 9-tägigen Versuchen 90BE, 89NT2, 89BE zu einer signifikanten Abnahme des Monozytenanteils. Der Anteil der Makrophagen (Diagramm 42) an den Leukozyten des Nierengewebes war beim 22-tägigen 90NT2-Experiment gegenüber den 16-, 11- und 9-tägigen (90BE, 89NT1 89BE) Experimenten ebenfalls signifikant vermindert. Die Metagranulozyten (Diagramm 43) nahmen dagegen bei den Tieren aus 90NT2 (22-tägig) gegenüber einem 9- und einem 16-tägigen C.E.B.A.S.-Lauf (89BE, 90BE) signifikant zu. Die Phagozytoserate der Nierengewebsphagozyten (Diagramm 50) aus den terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten zeigte keinerlei signifikanten Unterschiede zwischen Versuchen unterschiedlicher Dauer.

Yin et al. (1995) konnte dagegen beim Karpfen (*Cyprinus carpio*) eine signifikante Abnahme der Phagozytoseaktivität zwischen dem siebten und vierzehnten Tag einer Stresseinwirkung (hohe Bestandsdichte) feststellen.

Bisher liegen keine Literaturdaten vor, die sich umfassend mit der prozentualen oder absoluten Verteilung von Blutzellen im Nierengewebe bzw. Blut von Teleostern in Abhängigkeit von der Dauer einer Stresssituation auseinandersetzen (Diagramm 41-48). Gleiches gilt für Daten, welche die spontane Zellteilungsaktivität des Nierengewebes betreffen (Diagramm 49). Aus diesem Grund fällt es schwer, die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich dieser Parameter zu interpretieren. Es bleibt festzuhalten, dass es bzgl. des prozentualen Anteils der Leukozyten im Nierengewebe bei den terrestrischen Experimenten unterschiedlicher Dauer häufig zu signifikanten Unterschieden kam (Diagramm 41-48). Dies spricht für einen bedeutenden Einfluss, den die Dauer der C.E.B.A.S.-Experimente auf das Auftreten der Leukozyten im Nierengewebe hat.

Andere Autoren bestätigen einen Zusammenhang zwischen der Dauer einer Stresssituation und ihrer Auswirkung auf den Organismus. Zum Beispiel sehen Mosconi et al. (1998) und Pickering (1998) eine Abhängigkeit zwischen Dauer und Intensität eines Stressors und seinem physiologischen Effekt. Auch Ainsworth et al. (1991a) vermuten einen Zusammenhang zwischen der Dauer einer Stresssituation und der immunsuppressiven Wirkung. So kann bei Fischen zwischen einer akuten Stressreaktion, die durch leichte, kurzfristige Stressoren hervorgerufen wird („handling and transport“) (Demers und Bayne, 1997; Rottlant und Tort, 1997; Ruis und Bayne,



1997), und einer chronischen Stressreaktion, die durch lang anhaltende, starke Stressoren hervorgerufen wird, unterschieden werden (Pickering, 1998). Dabei verstärkt akuter Stress das Immunsystem eher, als dass er es schwächt (Demers und Bayne, 1997; Ruis und Bayne, 1997). Chronische Stresseinwirkung führt dagegen nach den Beobachtungen vieler Autoren zu einer Schwächung der humoralen und zellulären Immunparameter (Yin et al., 1995; Tort et al., 1996; Bly et al., 1997; Clearwater und Pankhurst, 1997).

Widersprüchlich zu der Äußerung, dass akuter (kurzzeitiger) Stress das Immunsystem stärken kann, sind die Ergebnisse von Ortuno et al. (2001). Sie konnten bei Goldbrassen (*Sparus aurata*), die kurzfristigem (zwei Stunden), intensivem sozialem Stress (Populationsdichte 100 kg/m<sup>3</sup>, „crowding stress“) ausgesetzt waren, einen schnellen, signifikanten Anstieg der Plasmacortisolkonzentration, eine Verminderung des Complementtiters und eine signifikante Abnahme der Phagozytosefähigkeit und Phagozytosekapazität feststellen. Sie schließen aus ihren Ergebnissen, dass es Stressformen gibt, die auch bei nur kurzfristiger Einwirkung auf den Fischorganismus sowohl zur Ausprägung von akuten als auch von chronischen Stresssymptomen führen. Um zu überprüfen, auf welche Weise sich die Dauer einer Stresssituation, hervorgerufen durch räumliche Enge, auf unspezifische Immunfunktionen des Karpfens (*Cyprinus carpio*) auswirkt, haben Yin et al. (1995) entsprechende Parameter nach 1, 7, 14 und 30 Tag/en untersucht. Die Lysozymaktivität lag vom ersten Tag an signifikant unter dem Wert der Kontrolltiere. Gleiches gilt für die bakterizide Wirkung des Komplementsystems. Lediglich die Phagozytoseaktivität von Phagozyten aus dem Pronephros war nach eintägiger Stresseinwirkung nicht verändert. Am 7., 14. und 30. Versuchstag lag auch diese signifikant unter dem Kontrollwert, wobei es zwischen dem 7. und 14. Tag, nicht aber zwischen dem 14. und 30. Tag erneut zu einer signifikanten Abnahme der Phagozytoseaktivität kam. Die Erwartung der Autoren, dass sich die Anfälligkeit für Krankheitserreger mit der Dauer der stressinduzierenden Situation immer weiter erhöhen würde, wurde nicht bestätigt. Zwischen dem 7. und 30. Tag lag sie zwar signifikant höher als bei den Kontrolltieren und den Tieren, die einen Tag unter Stresseinwirkung verbrachten, doch verschlechterte sich die Anfälligkeit für den Krankheitserreger zwischen dem 7. und 30. Tag nicht weiter.

Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass Fische, die chronischem Stress ausgesetzt sind, die Fähigkeit besitzen, sich an die gegebene Situation zu adaptieren,

was ihnen auch mit einem geschwächten unspezifischen Immunsystem erlaubt, eine stabile Stresssituation über einen längeren Zeitraum (30 Tage) zu überleben. Die chronisch gestressten Tiere sind anfälliger für Infektionskrankheiten, wenn sich die Stressintensität rasch erhöht oder ein zusätzlicher Stressor auftritt (Yin et al., 1995). Dies kann erklären, warum in der intensiven Fischhaltung Infektionskrankheiten häufig dann ausbrechen, wenn es zu einer drastischen Änderung der Temperatur oder Wasserqualität kommt (Angka et al., 1995).

#### **6.2.4 Wirkung von Stress auf Phagozyten**

Nach fünf von sechs terrestrischen (Diagramm 19 und 20) und einem orbitalen (Diagramm 30) C.E.B.A.S.-Experiment kam es gegenüber dem Standardwert zu einer Abnahme der Phagozytoserate der Nierengewebsphagozyten. Lediglich das überlebende Tier aus 90NT1 (Diagramm 20) und die überlebenden Tiere aus 89FE (Diagramm 30) zeigten eine Phagozytoseaktivität, die in etwa auf dem Niveau des Kontrollwertes lag. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen aus der Literatur, so ist es durchaus möglich, dass der gegenüber dem Standardwert nahezu nach jedem Experiment auftretende Rückgang der Phagozytoseaktivität auf eine Stressreaktion der Tiere zurückzuführen ist, die durch die Haltungsbedingungen im C.E.B.A.S. hervorgerufen wurde und zwar unabhängig davon, ob es sich um terrestrische oder orbitale Experimente handelte.

Yin et al. (1995) beschrieben, dass Karpfen (*Cyprinus carpio*), die durch ungeeignete Populationsdichten gestresst wurden, eine Verminderung der Chemilumineszenzantwort von Phagozyten des Pronephros zeigten. Scott und Klessius (1981) stellten eine Schwächung der Opsonisierungsaktivität und der Phagozytosefunktion bei Phagozyten gestresster Fische fest. Narnaware und Baker (1996) wiesen bei gestressten Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) eine verminderte Phagozytoseaktivität der Makrophagen aus Milz und Pronephros nach. Auch Ortuno et al. (2001) wiesen nach, dass die Phagozytoseaktivität von Leukozyten des Pronephros von Goldbrassen (*Sparus aurata*), die durch eine ungeeignete Populationsdichte gestresst waren, stark geschwächt war.

Ainsworth et al. (1991a) beschäftigten sich mit der Funktion neutrophiler Granulozyten

des peripheren Blutes transportgestresster Getüpfelter Gabelwelse (*Ictalurus punctatus*). Ihre Versuchstiere zeigten eine starke Zunahme der neutrophilen Granulozyten. Gegenüber den Kontrollen veränderte sich der Anteil der phagozytierenden neutrophilen Granulozyten jedoch nur unwesentlich. Dagegen folgte auf die intraperitoneale Applikation von Cortisol, einem Stresshormon, ein signifikanter Rückgang des Anteils der phagozytierenden neutrophilen Granulozyten. Die verminderte Phagozytoseaktivität trägt nach Ansicht von Ainsworth et al. (1991a) möglicherweise dazu bei, dass sich Infektionen leichter etablieren können. Auch Kurogi und Iida (1999) beschäftigten sich mit den Auswirkungen von Stress auf die neutrophilen Granulozyten des peripheren Blutes. Die Zellen gestresster Tilapien (*Oreochromis niloticus*) zeigten eine verminderte Fähigkeit zur Phagozytose pathogener Erreger bzw. zu deren intrazellulären Abtötung.

Auch der Anteil der Phagozyten im hämatopoetischen Gewebe ist dem Einfluss von Stressoren unterworfen. Bei Untersuchungen von Ortuno et al. (2001) nahm die Phagozytenpopulation, die zu einem beträchtlichen Teil aus neutrophilen Granulozyten besteht, im Nierengewebe ab, im Blut nahm sie dagegen zu. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Ellsaesser und Clem (1986). Nach ihren Experimenten mit durch Transport gestressten Getüpfelten Gabelwelsen (*Ictalurus punctatus*) kam es zu einer starken Zunahme der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut. Eine starke Neutrophilie des peripheren Blutes wurde auch schon früher von verschiedenen Autoren als Folge einer Stresssituation beschrieben, z. B. Anderson et al. (1982), Chilmonczyk (1982), Klinger et al. (1983) und Pickering (1984).

Der Vergleich zwischen Standardhaltung und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten bzw. zwischen Bodenkontroll- und Flugexperimenten der STS-89- und STS-90-Mission zeigt, dass der Anteil der Metagranulozyten an den Leukozyten des Nierengewebes weitestgehend stabil blieb, bzw. nach 90NT2 signifikant zunahm (vergleiche Diagramm 5, 6 und 23). Eine Erklärung hierfür könnte die gegenüber dem Standardwert meist rückgängige Zahl der stab- und segmentkernigen Granulozyten sein (siehe Diagramm 7, 8, 9, 10, 24 und 25). Wie von Narnaware und Baker (1996) und Ortuno et al. (2001) beschrieben, erhöht Stress die Zahl der im Blut zirkulierenden neutrophilen Granulozyten (Neutrophilie) bzw. Phagozyten. Gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme dieser Zellpopulationen im Nierengewebe. Der gegenüber dem Standard zurückgehende Anteil der segment- und stabkernigen neutrophilen Granulozyten (nach

fünf von sechs terrestrischen (Diagramm 7-10) und beiden orbitalen C.E.B.A.S.-Experimenten (89FE, 90FE, Diagramm 24 und 25)) könnte ein Hinweis darauf sein, dass es bei den Schwerträgern ebenfalls zu einer stressbedingten Emigration dieser Zellen vom Nierengewebe ins periphere Blut kam (signifikante Abnahme der stabkernigen Granulozyten nach 89NT2 (Diagramm 7) und signifikante Abnahme der segmentkernigen Granulozyten nach 89NT1 und 89NT2 (Diagramm 9)). Um die aus der Niere emigrierten Zellen zu ersetzen, ist eine stabile bzw. verstärkte Neubildung der neutrophilen Granulozyten notwendig. Diese Notwendigkeit könnte die Konstanz bzw. signifikante Zunahme der Metagranulozytenzahl im Nierengewebe erklären (Diagramm 5 und 6).

Die Ergebnisse der orbitalen und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimente sind bezüglich der Monozyten-/Makrophagenzahl, die laut Secombes und Fletcher (1992) bei den Teleostern meist den größten Teil der Phagozytoseleistung trägt, nicht einheitlich (siehe Diagramm 1, 2, 3, 4, 21 und 22). Sie zeigen jedoch dort, wo die Resultate signifikant verändert sind, einen Rückgang der Monozyten-/Makrophagenpopulation gegenüber dem Standardwert (Diagramm 2 und 4), so wie er bei Ortuno et al. (2001) für Phagozyten beschrieben wurde.

Die angeführten Daten weisen darauf hin, dass es während der C.E.B.A.S.-Experimente zu einer stressbedingten Emigration der Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten aus dem Nierengewebe ins periphere Blut kam. Die im hämatopoetischen Gewebe verbleibenden Zellen waren möglicherweise, wie von Ortuno et al. (2001) beschrieben, entweder unreife oder inaktive Zellen, die nur eine schwache Phagozytoseaktivität zeigten.

Neben funktionellen und quantitativen Auswirkungen von Stresssituationen untersuchten Peters et al. (1991) auch strukturelle Veränderungen der Phagozyten des Nierengewebes am Beispiel der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*). Zu den potentiellen Phagozyten des Pronephros dieser Fischart zählten sie Histiocyten (gewebetypische Makrophagen (Pschyrembel, 1994)), Retikulumzellen, Endothelzellen und neutrophile Granulozyten. Nachdem die Versuchstiere für zwölf Stunden Rangordnungskämpfen ausgesetzt waren, stellten die Autoren eine Aktivierung der im Nierengewebe vorhandenen Phagozytenpopulationen fest. Die Zellen zeigten verstärkte Proliferation, Hypertrophie, verstärkte Pseudopodienbildung und eine verstärkte Autophagozytose. Eine zunehmende Erythrophagozytose wies ihrer Ansicht nach auf

eine verschlechterte Vitalität der roten Blutzellen hin. Die *in vivo* (Blutphagozyten) und *in vitro* (Pronephrosphagozyten) untersuchte Phagozytoseleistung war bei den unterlegenen Tieren gegenüber den dominanten erhöht, obwohl die Autoren die Degeneration eines beträchtlichen Teils der Nierengewebsphagozyten feststellten. Die Ergebnisse von Peters et al. (1991) bezüglich der Phagozytoseleistung der Phagozyten aus Nierengewebe widersprechen den Resultaten von Narnaware und Baker (1996) und Ortuno (2001).

Die von Peters et al. (1991) gemachte Beobachtung einer verstärkten, durch Stress verursachten Proliferation von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und retikulären Zellen des hämatopoetischen Gewebes wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit bedingt unterstützt. So war der Anteil der blastären Zellen gegenüber den Tieren aus der Standardhaltung nach fünf von sechs terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten (Diagramm 15 und 16) erhöht (in drei Fällen signifikant), was für eine verstärkte Proliferation spricht. Einzig bei 90BE war der Anteil der blastären Zellen signifikant niedriger (Diagramm 16). Dagegen ging die spontane Zellteilungsaktivität bei den Tieren aus 90NT2 signifikant zurück (Diagramm 17 und 18). Ansonsten waren die Unterschiede zwischen Standardwert und den Ergebnissen der C.E.B.A.S.-Läufe bzgl. der Zellteilungsaktivität gering, oder es kam zu einer nicht signifikanten Zunahme der Teilungsaktivität (89BE und 90BE).

### **6.2.5 Wirkung von Stress auf Lymphozyten**

Im Rahmen der C.E.B.A.S.-Experimente zeigt ein Vergleich zwischen Standardwert und Werten terrestrischer C.E.B.A.S.-Experimente (nach zwei C.E.B.A.S.-Läufen) eine hochsignifikante Abnahme des Anteils der Lymphozyten im Nierengewebe der Versuchsfische (Diagramm 13 und 14). Möglicherweise ist dies ein Hinweis darauf, dass es bei den Tieren aus diesen Experimenten aufgrund von problematischen Umweltbedingungen zur Ausprägung von Stresssymptomen kam. Ein Rückgang der Lymphozytenbildung im Nierengewebe könnte eine verminderte Migration der Lymphozyten ins periphere Blut zur Folge haben, was dort zu einer Lymphopenie führen könnte. Leuko- und Lymphopenien des peripheren Blutes sind bei gestressten Teleostern von vielen Autoren beschrieben worden (McLeay, 1975; Johannson-

Sjöbeck et al., 1978; Peters et al., 1980; Anderson et al., 1982; Chilmonczyk, 1982; Pickering, 1984; Elsaesser und Clem, 1986) und können somit als typisches Stresssymptom bezeichnet werden. Die Versuchstiere aus den Flugexperimenten 89FE und 90FE zeigten keine relevanten Veränderungen des Lymphozytenanteils an den Leukozyten des Nierengewebes gegenüber den Bodenkонтроlexperimenten (Diagramm 27).

Eine Erklärung dafür, warum es nach einigen C.E.B.A.S.-Experimenten bei manchen Parametern zu gegensätzlichen Ergebnissen kam, könnte ein Resultat von Ortuno et al. (2001) sein. Die Autoren stellten am 3. Tag nach Beendigung einer Stresssituation beim Komplementsystem von Goldbrassen (*Sparus aurata*) eine Hyperkompensation von Stresseffekten fest. Falls Hyperkompensationseffekte auch bei anderen Abwehrparametern auftreten, erklären diese möglicherweise auch die gegensätzlichen Ergebnisse der untersuchten *X. helleri*. Eventuell befanden sich die Tiere bei Beendigung der C.E.B.A.S.-Experimente in unterschiedlichen Phasen der physiologischen Reaktion auf auftretende Stressoren (Alarmphase, Adaptationsphase, Erschöpfungsphase und eventuell Hyperkompensationsphase (Selye, 1956; Berczi, 1997). In welcher Phase sich die Versuchstiere befanden, war abhängig davon, zu welchem Zeitpunkt die stressauslösenden Bedingungen einsetzten bzw. endeten. Werte, die höher als der Standardwert lagen, könnten somit als Hyperkompensation der Stresseffekte interpretiert werden.

Eine weitere Erklärung dafür, warum nicht alle Symptome, die bei den Versuchstieren festgestellt wurden, in das typische Bild des allgemeinen Anpassungssyndrom passten, könnte die Feststellung von Klinger et al. (1983) sein, dass typische Merkmale des allgemeinen Anpassungssyndroms durch spezifische Symptome (z. B. Entzündungen) überlagert werden können, die sich aufgrund anderer Umwelteinflüsse (wie z. B. pathogenen Erregern, Wasserqualität, Bissverletzungen bei Rangordnungskämpfen) ausbilden. Sie können als Teil des lokalen Anpassungssyndroms (Selye, 1956) betrachtet werden. Dieses Syndrom kann im Gegensatz zum allgemeinen Anpassungssyndrom spezifische Effekte hervorrufen. Allgemeines und lokales Anpassungssyndrom sind jedoch untrennbar miteinander verknüpft und überlagern sich. So ist es möglich, dass das lokale Anpassungssyndrom, welches spezifische Symptome hervorruft, das allgemeine Anpassungssyndrom so verstärkt, dass der Fischorganismus nicht mehr dazu in der Lage ist, den Zustand der Adaptationsphase aufrecht zu erhalten

und in die Erschöpfungsphase übergeht, welche durch hohe Verlustraten gekennzeichnet ist (Klinger et al., 1983).

### **6.3 Direkte Wirkung von Umweltbedingungen auf den Gesundheitszustand und das Abwehrsystem von Teleostern**

Neben der Möglichkeit, dass sich die Veränderungen der untersuchten Abwehrparameter auf die Wirkung des allgemeinen Anpassungssyndroms zurückführen lassen, könnte es sich um direkte Auswirkungen handeln, die wasserphysikalische und wasserchemische Bedingungen oder pathogene Erreger auf den Fischorganismus haben. Schon seit langer Zeit werden hämatologische Untersuchungen als Indikatoren für den Gesundheitsstatus von Teleostern herangezogen (Blaxhall, 1972; Bell und Margolis, 1976; Hickey, 1976). Außerdem dienen sie dazu, die Wirkungsweise von Umweltverschmutzungen auf den Fischorganismus besser zu verstehen (McKim et al., 1970; Swift und Lloyd, 1974; Bills und Hunn, 1976; Iwama et al., 1976; Soivio und Oikari, 1976; Bly et al., 1997; Köllner et al., 2002).

Daher soll im Folgenden diskutiert werden, inwieweit sich die Umweltbedingungen, die während der C.E.B.A.S.-Experimente herrschten, direkt auf das Abwehrsystem der Schwertträger ausgewirkt haben könnten.

#### **6.3.1 Wirkung von Ammonium und Ammoniak auf den Gesundheitszustand**

Ammoniak kann bei intensiver Aquakultur ein erhebliches Wasserqualitätsproblem verursachen (Boyd, 1979; Stickney, 1979). In Aquakulturen, in denen Fische bei sehr hoher Besatzdichte gehalten werden, kann ein starker Anstieg des Ammoniakgehaltes im Wasser toxisch wirken und ein reduziertes Wachstum oder den Tod von Tieren zur Folge haben (Weirich et al., 1993).

Nach den C.E.B.A.S.-Läufen wurde nur der Ammonium-, nicht aber der Ammoniakgehalt des Wassers bestimmt. Dieser lässt sich jedoch auch nachträglich ermitteln, wenn pH-Wert und Wassertemperatur vorliegen (Emerson et al., 1975; vergleiche Tabelle 8 und 9). Die maximal möglichen Ammoniakkonzentrationen, die in

Tabelle 8 angegeben sind, wurden nach Emmerson et al. (1975) berechnet und lagen bei den C.E.B.A.S.-Experimenten zwischen 0,0119 mg/l NH<sub>3</sub> und 0,0864 mg/l NH<sub>3</sub>.

Den Werten zur Folge wies kein C.E.B.A.S.-Experiment Ammoniakkonzentrationen auf, die eine akute Gefährdung der *X. helleri* darstellten. Dennoch ist es möglich, dass die Gesundheit der Schwertträger beeinträchtigt war. Durborow et al. (1997) zeigten, dass bei Teleostern die Möglichkeit von Gesundheitsschäden besteht, wenn über einen längeren Zeitraum (chronisch) eine Ammoniakkonzentration von 0,06 mg/l vorhanden ist. Insbesondere nach den Experimenten 90BE (0,0864 mg/l NH<sub>3</sub>), 90FE (0,0558 mg/l NH<sub>3</sub>) und 89FE (0,0540 mg/l NH<sub>3</sub>) kam es zu ähnlich hohen bzw. sogar höheren Ammoniakwerten (Tabelle 8).

Duborow et al. (1997) geben an, dass langfristige, chronisch auftretende Konzentrationen über 0,06 mg/l zu Kiemen- und Nierenschäden, Wachstumsstörungen, Fehlfunktionen des Hirns und einer verminderten Sauerstofftransportkapazität des Blutes führen können. Kurzfristige Ammoniakkonzentrationen über 0,6 mg/l sind dazu in der Lage, Fische zu töten.

Beim Gestreiften Seebarsch (*Morone saxatilis*) kam es bei Ammoniakkonzentrationen, die höher als 0,6 mg/l lagen, zu einer verminderten Futteraufnahme, einem geringeren Wachstum, histologischen Veränderungen der Kiemenfilamente und einer verminderten Resistenz gegen Krankheitserreger (Nicholson et al., 1990).

Ruffier et al. (1981) beschreibt verschiedene Möglichkeiten, in welcher Weise Ammoniak bei Fischen toxisch wirken kann. Zunächst kommt es zu einem osmoregulatorischen Ungleichgewicht, welches zu Nierenversagen, der Zerstörung von Kiemengewebe und damit einhergehendem Sauerstoffmangel und verminderter Exkretion von endogenem Ammoniak führen kann. Dabei kann zuletzt Genanntes Ursache für neurologische und zytologische Fehlfunktionen sein.

Der Grad der schädigenden Wirkung der Ammoniakkonzentration kann im Zusammenhang mit der Gabe von „Weekendfutter“ während der Experimente 90BE und 90FE stehen. Bei „Weekendfutter“ handelt es sich um Futter, welches in einem Kalziumsulfatblock eingepresst ist und im Verlauf der Auflösung des Blockes freigesetzt wird. Durch die Lösung des Kalziums kam es zu einer extremen Zunahme der Wasserhärte (90BE Start: 10°dH, Ende: 25°dH; 90FE Start: 10°dH, Ende: 38,5°dH; °dH = Grad deutscher Härte) (vergleiche Tabelle 8). Obwohl *X. helleri* sehr gut mittelhartes bis hartes Wasser verträgt (mündliche Mitteilung Dr. R. Hamers,



Fischereiforschungsstelle des Landes Baden-Württemberg, Langenargen), wird sich ein so plötzlicher und zugleich starker Anstieg der Wasserhärte negativ auf die Gesundheit der Versuchstiere ausgewirkt haben. Die hohe Kalziumkonzentration trug aber möglicherweise auch dazu bei, die schädigende Wirkung des Ammoniaks zu begrenzen. So konnten Tomasso et al. (1980) beim Getüpfelten Gabelwels (*Ictalurus punctatus*) eine Abschwächung der Ammoniaktoxizität durch eine hohe Kalziumkonzentration feststellen. Es besteht die Möglichkeit, dass es aus diesem Grund während 90FE (kein toter Schwerträger) und 90BE (zwei tote Schwerträger) nicht zu größeren Ausfällen kam. Interessanterweise besaß 90FE, bei dem alle Tiere überlebten, gegenüber 90BE, bei dem zwei Tiere verstarben, eine nochmals deutlich gesteigerte Wasserhärte (90BE: 25°dH; 90FE: 38,5°dH) (vergleiche Tabelle 8). Der „Kalziumeffekt“ ist wahrscheinlich auf die Fähigkeit des Kalziums zurückzuführen, die Permeabilität der Kiemenmembran zu vermindern (Potts und Flemming, 1970; Ogawa, 1974; Wendelaar Bonga et al., 1983; Ogasawara und Hirano, 1984). So ist es möglich, dass auch das Eindringen des fettlöslichen Ammoniaks (NH<sub>3</sub>) über die Kiemen gehemmt wird (Weirich et al., 1993).

### 6.3.2 Wirkung von Nitrit auf den Gesundheitszustand

Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) kann bei intensiver Fischhaltung in toxischen Konzentrationen vorliegen, insbesondere dann, wenn der Abbau von Nitrit zu Nitrat gestört ist (Weirich et al., 1993).

Nach Abschluss der C.E.B.A.S.-Experimente lag die Nitritkonzentration zwischen 0,023 und 1,473 mg/ml, wobei die Nitritkonzentration für *X. helleri* ab 1,0 mg/l einen kritischen Wert erreicht (mündliche Mitteilung Dr. D. Seibt, Medical User Support Center (MUSC), Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR), Köln, vergleiche Tabelle 8). Bowser et al. (1983) zeigten, dass für den Getüpfelten Gabelwels (*Ictalurus punctatus*) eine Sauerstoffkonzentration von 5 mg/l in Gegenwart von Nitrit nicht ausreichte, obwohl diese Spezies normalerweise niedrigere O<sub>2</sub>-Konzentrationen toleriert. Vor diesem Hintergrund könnte der verhältnismäßig hohe Nitritwert am Ende von 89NT1 (1,473 mg/l NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, Tabelle 8) in Verbindung mit der Sauerstoffkonzentration, die während dieses Versuches häufig bis auf 3 mg/l absank (vergleiche Abbildung 10), zu einer Hypoxie bei den Schwerträgern geführt haben.

Auch die Wassertemperatur kann einen negativen Einfluss auf die Nitrittoxizität besitzen. Huey et al. (1984) zeigten, dass die Methämoglobinkonzentration bei Getüpfelten Gabelwelsen (*Ictalurus punctatus*), die 24 Stunden bei 30 °C und einer Nitritkonzentration von 0,91 mg/l gehalten wurden, fast doppelt so hoch lag wie bei Tieren, die bei einer Temperatur von 10 °C gehalten wurden. So ist es möglich, dass sich sehr hohe Temperaturen, wie sie gegen Ende von 90FE auftraten (bis 30 °C, vergleiche Abbildung 17), negativ auf die Methämoglobinmenge im Blut der Versuchstiere ausgewirkt haben. Der bei 90FE gemessene Nitritwert von 0,027 mg/l erscheint aber als zu gering, als dass er sich trotz der hohen Temperatur negativ auf die Gesundheit der Schwerträger ausgewirkt haben könnte.

Die Frage, wie sich nur leicht erhöhte, aber chronisch auftretende Nitritwerte auf *X. helleri* auswirken, wenn sich gleichzeitig andere Umweltfaktoren außerhalb des Optimalbereiches befinden, ist offen. Entsprechende Versuche über die Auswirkung von subletalen und letalen Nitritkonzentrationen auf die Gesundheit von *X. helleri* liegen derzeit nicht vor.

Mori (1994) geht in Verbindung mit Weltraumexperimenten auf die Folgen erhöhter Nitrit- und Nitratwerte für Teleostee in einem aquatischen Lebensraum ein. Zwei Karpfen (*Cyprinus carpio*), denen die Otoliten entfernt wurden, befanden sich im September 1992 für acht Tage auf einem Weltraumflug. Während dieses Experimentes verloren die Karpfen deutlich an Gewicht. Gleichzeitig waren die Nitrit- und Nitratwerte des Wassers erhöht. Laut Mori (1994) legt dies die Vermutung nahe, dass der Metabolismus der Karpfen während des Weltraumfluges gesteigert gewesen sein könnte.

Die C.E.B.A.S.-Versuche zeigten, dass sieben von acht *X. helleri*-Weibchen, die sich im Orbit befanden, eine Gewichtsabnahme aufwiesen; nur bei einem blieb das Gewicht konstant (vergleiche Tabelle 5). Bei den sechs überlebenden Tieren aus den Bodenkontrollexperimenten kam es dagegen in drei Fällen zu einer Gewichtszunahme. Bei zweien blieb das Gewicht konstant und bei weiteren zwei nahm es ab. Es ist nicht klar, was die Ursache für diese Gewichtsabnahme war. Falls sich der Verdacht von Mori (1994) bestätigen würde, dass die Gewichtsreduktion aufgrund eines verstärkten Metabolismus der Versuchstiere auftrat, müsste dies erhebliche Konsequenzen für die Futtermittelversorgung von Fischen bei Weltraumaufenthalten haben (größere Futtermenge erforderlich). Dies wiederum hätte Auswirkungen auf den gesamten Stoffkreislauf und

die Ökologie des geschlossenen aquatischen Ökosystems C.E.B.A.S. (z. B. größere Mengen an giftigen Abbauprodukten des Stickstoffkreislaufes).

### **6.3.3 Wirkung von Ammonium, Ammoniak, Nitrit und Nitrat auf das Abwehrsystem**

Nur wenige Autoren (wie z. B. Hrubec et al., 1997a und Carballo und Munoz, 1991) haben die Wirkung von Ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ), Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) auf die Abwehrzellen, die lymphatischen Organe und andere immunabwehrrelevante Parameter der Teleostee untersucht. Die nachfolgend aufgeführten Konzentrationen wurden am Ende der C.E.B.A.S.-Experimente gemessen. Die als obere Grenzwerte angegebenen Konzentrationen sind mündliche Mitteilungen von Herrn Dr. D. Seibt, Medical User Support Centre (MUSC), Deutsches Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR), Köln. Die Ammoniumwerte lagen zwischen 0,039 und 0,176 mg/l (oberer Grenzwert *X. helleri*: 0,2-0,3 mg/l), die berechneten Ammoniakwerte zwischen 0,0119 und 0,0864 mg/l (oberer Grenzwert *X. helleri*: 0,02 mg/l), die Nitritwerte zwischen 0,023 und 1,473 mg/l (oberer Grenzwert *X. helleri*: 1 mg/l) und die Nitratwerte zwischen 12 und 38 mg/l (oberer Grenzwert *X. helleri*: 100 mg/l) (vergleiche Tabelle 8).

Weil die Nitratwerte während aller C.E.B.A.S.-Experimente unauffällig blieben, muss davon ausgegangen werden, dass sie keinen Einfluss auf die untersuchten Abwehrparameter hatten. Dagegen ist es möglich, dass die erhöhten Ammoniakwerte eine Wirkung auf die Schwertträger besaßen, da sie bei einigen Experimenten (89FE: 0,0540 mg/l, 90BE: 0,0864 mg/l und 90FE: 0,0588 mg/l) nahe an oder sogar über der Konzentration von 0,06 mg/l  $\text{NH}_3$  lagen, bei denen Durborow et al. (1997) bei chronischer Exposition die Möglichkeit von Schädigungen sahen.

Hrubec et al. (1997a) zeigten an Seebarschhybriden (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) bei einer Ammoniakkonzentration von 0,150 mg/l einen Anstieg der Monozytenkonzentration (Kontrolle:  $3,81 \times 10^3/\mu\text{l}$ ; Ammoniak:  $6,13 \times 10^3/\mu\text{l}$ ).

Eine Zunahme des Monozytenanteils konnte auch in C.E.B.A.S.-Experimenten mit erhöhter Ammoniakkonzentration beobachtet werden (Diagramm 21). Der Anteil der Monozyten lag bei 90BE (0,0864 mg/l  $\text{NH}_3$ , Monozytenanteil 13,48 %) und 89FE

(0,0540 mg/l NH<sub>3</sub>, Monozytenanteil 11,19 %), zwei Versuchen mit hoher Ammoniakkonzentration, höher als bei 89BE (0,0209 mg/l NH<sub>3</sub>, Monozytenanteil 9,41 %), einem Versuch mit niedriger Ammoniakkonzentration. Experiment 90FE (0,0588 mg/l NH<sub>3</sub>, Monozytenanteil 10,16 %) zeigt einen Monozytenanteil auf dem Niveau von 89BE, obwohl auch bei Experiment 90FE die Ammoniakkonzentration hoch lag. Bei Experiment 90BE kam es anders als bei den anderen Experimenten mit erhöhter Ammoniakkonzentration zu einem deutlichen Anstieg gegenüber dem Standardwert (9,2 %) (Diagramm 21). Experiment 89BE zeigte nur einen geringfügigen Unterschied gegenüber dem Standardwert, hier lag jedoch auch nur eine niedrige Ammoniakkonzentration vor.

Der Anteil der Makrophagen, welche sich aus Monozyten entwickeln, zeigte in den C.E.B.A.S.-Experimenten mit einer hohen Ammoniakkonzentration (89FE: 0,0540 mg/l NH<sub>3</sub>, 90FE: 0,0588 mg/l NH<sub>3</sub> und 90BE: 0,0864 mg/l NH<sub>3</sub>) keine eindeutige Abhängigkeit vom Ammoniakgehalt, so wie von Hrubec et al. (1997a) für Monozyten beschrieben (Diagramm 22). Nach ihnen ist bei einem hohen Ammoniakgehalt mit einer Zunahme der Monozyten zu rechnen. Gegenüber 89BE (0,0209 mg/l NH<sub>3</sub>, Makrophagenanteil 1,29 %), einem Experiment mit niedriger Ammoniakkonzentration, kam es bei 90FE (Makrophagenanteil 0,35 %) zu einer Abnahme des Makrophagenanteils. Bei Versuch 90BE (Makrophagenanteil 1,54 %) verblieb der Makrophagenanteil auf dem gleichen Niveau wie bei 89BE und bei 89FE (Makrophagenanteil 2,62 %) lag er deutlich höher. Gegenüber dem Standardwert (Makrophagenanteil 0,59 %) hatte der Makrophagenanteil bei 89FE, 89BE und 90BE zugenommen, bei 90FE abgenommen.

Wie Hrubec et al. (1997a) an Seebarschhybriden (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*) zeigten, kam es bei einer Ammoniakkonzentration von 0,150 mg/l zu einem Anstieg der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut. Anders verhält es sich bei Metagranulozyten (eine frühe Reifestufe der neutrophilen Granulozyten) der in dieser Arbeit untersuchten *X. helleri*. Trotz hoher NH<sub>3</sub>-Konzentration lag der prozentuale Anteil der Metagranulozyten in den Versuchen 90FE (0,0588 mg/l NH<sub>3</sub>, Anteil der Metagranulozyten 46,60 %), 90BE (0,0864 mg/l NH<sub>3</sub>, Anteil der Metagranulozyten 42,98 %) und 89FE (0,0540 mg/l NH<sub>3</sub>, Anteil der Metagranulozyten 38,90 %) auf gleichem Niveau oder niedriger als bei Versuch 89BE (0,0209 mg/l NH<sub>3</sub>, Anteil der Metagranulozyten 46,20 %), in dem eine geringe Ammoniakkonzentration herrschte

(Diagramm 23). Bei den Tieren aus den Experimenten 90FE, 90BE und 89FE, die einer hohen Ammoniakkonzentration ausgesetzt waren, lag der Anteil der Metagranulozyten auf dem Niveau des Standardwertes (Anteil der Metagranulozyten 48,16 %) bzw. geringfügig unterhalb desselben. Auch bei Experiment 89BE mit niedriger Ammoniakkonzentration verblieb der Metagranulozytenanteil auf Höhe des Standardwertes.

Der Anteil der stab- und segmentkernigen Granulozyten, welche fortgeschrittene Reifestufen der neutrophilen Granulozyten darstellen, zeigte in den C.E.B.A.S.-Experimenten mit einer hohen Ammoniakkonzentration (89FE: 0,0540 mg/l NH<sub>3</sub>, 90FE: 0,0588 mg/l NH<sub>3</sub> und 90BE: 0,0864 mg/l NH<sub>3</sub>) keine eindeutige Abhängigkeit vom Ammoniakgehalt, so wie von Hrubec et al. (1997a) für neutrophile Granulozyten beschrieben (Diagramm 24 und 25). Die Autoren beobachteten bei einer erhöhten Ammoniakkonzentration eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten.

Bei den Tieren aus 89FE (Anteil der stabkernigen Granulozyten 0,11 %) verblieb der Anteil der stabkernigen Granulozyten auf gleichem Niveau wie bei 89BE (Anteil der stabkernigen Granulozyten 0,14 %), einem Experiment mit niedriger Ammoniakkonzentration (Diagramm 24). Der Anteil der stabkernigen Granulozyten der Versuchstiere aus den Experimenten 90FE (Anteil der stabkernigen Granulozyten 0,23 %) und 90BE (Anteil der stabkernigen Granulozyten 0,34 %) befand sich dagegen auf einem höheren Niveau. Gegenüber dem Standardwert (Anteil stabkernige Granulozyten 0,59 %) hatte der prozentuale Anteil der stabkernigen Granulozyten sowohl bei den Tieren aus den Experimenten mit hoher Ammoniakkonzentration (89FE, 90FE und 90BE) als auch bei den Tieren aus Experiment 89BE, welches eine geringe Ammoniakkonzentration aufwies, abgenommen.

Der prozentuale Anteil segmentkerniger Granulozyten variierte deutlich bei Tieren aus Experimenten mit hoher Ammoniakkonzentration (90BE: 0,61 %, 90FE: 0,04 % und 89FE: 0,00 %) (Diagramm 25). Im Vergleich zu Experiment 89BE (0,26 %), welches eine niedrige Ammoniakkonzentration aufwies, zeigten die Experimente 89FE und 90FE einen deutlich niedrigeren prozentualen Anteil der segmentkernigen Granulozyten, nach 90BE jedoch einen deutlich erhöhten Anteil. Lediglich nach 90BE kamen die Werte der segmentkernigen Granulozyten auf das Niveau der Tiere aus der Standardhaltung (Standard: 0,57 %).

Ein weiterer in dieser Arbeit untersuchter Abwehrparameter ist die Phagozytoserate

isolierter Nierenzellen. In den Experimenten 90FE, 90BE und 89FE mit erhöhter Ammoniakkonzentration (s.o. oder Tabelle 8), (Phagozytoserate 90FE: 18,50 %, 90BE: 13,00 % und 89FE: 30,08 %) kam es gegenüber dem Versuch 89BE (Phagozytoserate 7,56 %), welcher eine niedrige Ammoniakkonzentration aufwies, zu einer Zunahme der Phagozytoserate (Diagramm 30). Gegenüber dem Standardwert nahm die Phagozytoseleistung jedoch nach zwei von drei Experimenten mit erhöhter Ammoniakkonzentration deutlich ab, bei einem weiteren Experiment verblieb sie auf dem Niveau des Standardwertes. Beim Experiment 89BE, welches eine niedrige Ammoniakkonzentration aufwies, kam es gegenüber dem Standardwert zu einem deutlichen Rückgang der Phagozytoserate.

Möglicherweise hatte auch die erhöhte Nitritkonzentration in den Experimenten 90BE (0,181mg/l) und 89NT1 (1,473 mg/l) einen Einfluss auf die Phagozytoserate der Nierengewebspagozyten und damit auf das Abwehrsystem der Schwertträger. Bei den Versuchstieren aus 89NT1 (Phagozytoserate: 10,55 %, Diagramm 19) und 90BE (Phagozytoserate: 13,00 %, Diagramm 30) kam es im Vergleich zu den Tieren aus der Standardhaltung (Phagozytoserate: 29,53 %) zu einem deutlichen Rückgang der Phagozytoseleistung. Bei 89NT1 war der Rückgang signifikant.

Auch Carballo und Munoz (1991) stellten einen Einfluss von erhöhten Ammoniak- und Nitritkonzentrationen auf das Abwehrsystem von Teleostern fest. Bei einer subletal erhöhten Ammoniak- bzw. Nitritkonzentration (0,05 mg/l NH<sub>3</sub> bzw. 0,12 mg/l NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) beobachteten sie bei juvenilen Regenbogenforellen (*Oncorhynchus mykiss*) eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber dem Erreger *Saprolegnia parasitica*. Die Empfindlichkeit für den Krankheitserreger nahm nach zehn Tagen Haltung bei erhöhter Ammoniak- bzw. Nitritkonzentration deutlich zu. Dabei war die Anfälligkeit bei einer erhöhten Ammoniakkonzentration größer als bei einer erhöhten Nitritkonzentration.

#### **6.3.4 Wirkung der Umgebungstemperatur auf das Abwehrsystem**

Ein weiterer wichtiger Umweltfaktor, der Einfluss auf das Abwehrsystem der Teleostere haben kann, ist die Wassertemperatur. Dieser Parameter ist besonders im Hinblick auf das C.E.B.A.S.-Experiment 90FE von Bedeutung, da sich die Wassertemperatur innerhalb des C.E.B.A.S.-Moduls im Verlauf dieses Weltraumexperimentes deutlich

von 24-25 °C auf ca. 30 °C erhöhte (vergleiche Tabelle 9 und Abbildung 17).

Die Bedeutung der Wassertemperatur für die Immunfunktionen wird von vielen Autoren betont (Groberg et al., 1983; Hayman et al., 1992; Carlson et al., 1995; Hrubec et al., 1996; Le Morvan et al., 1996; Eggset et al., 1997; Alcorn et al., 2002, Köllner und Kotterba, 2002).

Im Folgenden wird auf die Wirkung der Temperatur auf die Phagozytose, das Differentialblutbild und die spontane Zellteilungsaktivität eingegangen.

#### **6.3.4.1 Wirkung der Umgebungstemperatur auf Phagozyten**

Um die Wirkung der Umgebungstemperatur auf das unspezifische Immunsystem der Teleosteer zu untersuchen, ist meist die Phagozytoseaktivität der Phagozyten bei niedrigen Temperaturen untersucht worden. Seltener wurden Versuche durchgeführt, bei denen sich die Wassertemperatur im supraoptimalen, d.h. im Temperaturbereich oberhalb des Optimums befand. Im Hinblick auf die C.E.B.A.S.-Experimente, die im Rahmen der STS-89- und STS-90-Mission stattfanden, sind diese von größerem Interesse, da es während des Weltraumexperimentes der STS-90-Mission (90FE) zu einem Anstieg der Wassertemperatur von ca. 24 °C auf 30 °C kam (vergleiche Tabelle 9 und Abbildung 17). Für *X. helleri* werden Wassertemperaturen zwischen 22 °C und 28 °C empfohlen.

Le Morvan et al. (1997) konnten beim Karpfen einen Rückgang des Phagozytoseindex bei einer erhöhten Wassertemperatur (28 °C; Standardtemperatur Karpfen: 20 °C) feststellen. Auch bei den Tiere aus 90FE (Phagozytoserate 18,50 %) kam es sowohl gegenüber dem Flugexperiment 89FE (Phagozytoserate 30,08 %), bei dem die Temperatur konstant bei 25 °C blieb, als auch gegenüber dem Standardwert (Phagozytoserate 29,53 %) zu einem Rückgang der Phagozytoserate (Diagramm 30). Dagegen war die Phagozytoserate bei 90FE gegenüber den beiden Bodenkontrollexperimenten 89BE und 90BE (89BE Phagozytoserate 7,56 %; 90BE Phagozytoserate 13,0 %) erhöht (Diagramm 30).

Hamers und Goerlich (1995) zeigten in ihren Versuchen mit Phagozyten von *X. helleri* eine vergleichbare Abhängigkeit der Phagozytoserate von der Wassertemperatur. Sie untersuchten die temperatur- und zeitabhängige *In-vitro*-Phagozytoseaktivität

(prozentualer Anteil der phagozytierenden Zellen). In den Versuchen ist eine Wassertemperatur von 25 °C als optimale Haltungstemperatur für *X. helleri* angenommen worden. Nach Herstellung einer Einzelzellsuspension von Nierengewebszellen wurden die darin enthaltenen Phagozyten für 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 180 Minuten bei Temperaturen von 4, 25, 30 und 37 °C mit *Escherichia coli* inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten lag die Phagozytoserate bei einer Assay-Temperatur von 4 °C bei ca. 5 %, bei 25 °C bei ca. 25 % und bei einer Assay-Temperatur von 30 °C bzw. 37 °C bei ca. 55 %. Somit war die *In-vitro*-Phagozytoseleistung der Phagozyten am höchsten bei den Temperaturen, die sich über der optimalen Haltungstemperatur von *X. helleri* befanden.

Ob die nicht signifikante Veränderung der Phagozytoserate bei 90FE tatsächlich auf den Temperaturanstieg in diesem Experiment zurückzuführen ist, bleibt fraglich. Die gegenüber der Standardhaltung in vieler Hinsicht besonderen Bedingungen der Haltung im C.E.B.A.S.-Modul und die gegenüber dem 89FE Experiment fast doppelt so lange Dauer des 90FE Experimentes könnten ebenfalls Einfluss auf die Phagozytoserate gehabt haben. Außerdem ist zu bedenken, dass die Untersuchungen von Le Morvan et al. (1997) ausschließlich mit isolierten Makrophagen durchgeführt worden sind. Die Experimente dieser Arbeit wurden dagegen, wie bei Hamers und Goerlich (1995), mit Zellsuspensionen ausgeführt, in denen alle in der Niere vertretenen Leukozyten/Phagozyten vorhanden waren.

#### **6.3.4.2 Wirkung der Umgebungstemperatur auf das Differentialblutbild**

Bei Versuchen von Dunn et al. (1989) und Dheer (1988), die am Blut von Goldfischen (*Carassius auratus*; Temperaturanstieg von 25 auf 35 °C) bzw. Punktierten Schlangenköpfen (*Channa punctatus*; Temperaturanstieg von 14 °C auf 30 °C bzw. 35 °C) durchgeführt wurden, zeigte sich, dass die Zahl der Monozyten bei erhöhter Wassertemperatur konstant blieb. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass sich die Zahl der Monozyten in Experiment 90FE (Temperaturanstieg von ca. 24 °C auf 30 °C, Monozytenanteil 10,16 %) gegenüber dem Standardwert (Monozytenanteil 9,2 %) und 89BE (Monozytenanteil 9,41 %) ebenfalls nur wenig verändert hatte (Diagramm 21). Auch nach 89FE (Monozytenanteil 11,19 %) lag der



Anteil der Monozyten nur auf einem unwesentlich höheren Niveau (Diagramm 31). Dagegen besaßen die Tiere aus 90FE (10,16 %) gegenüber 90BE (13,48 %) einen deutlich geringeren Monozytenanteil.

Kurata et al. (1997) konnten bei der Bestimmung des prozentualen Anteils von Makrophagen an den Leukozyten des Nierengewebes vom Karpfen (*Cyprinus carpio*; Temperaturanstieg von 20 °C auf 25 °C) feststellen, dass dieser Zelltyp häufiger bei Wassertemperaturen auftrat, die über dem Optimum lagen, als bei Temperaturen unter dem Optimalwert. Nach 90FE zeigte der Anteil der Makrophagen ein anderes Bild (Diagramm 22). Ihr Anteil an den Leukozyten des Nierengewebes war nach 90FE (0,35 %), dem Flugexperiment mit Temperaturen mit bis zu 30 °C, deutlich geringer als nach dem Bodenexperiment 90BE (1,54 %), welches während des gesamten Experimentes eine Temperatur von ca. 26 °C zeigte. Zudem lag der Anteil der Makrophagen nach 90FE auch unterhalb des Standardwertes (0,59 %) und signifikant unter dem Wert des Flugexperimentes der STS-89-Mission 89FE (2,62 %), bei dem die Temperatur während des gesamten Versuches im Optimalbereich lag, das aber sieben Tage kürzer war (Diagramm 32).

Die Zahl der Metagranulozyten war nach Flugexperiment 90FE (Temperaturanstieg von ca. 24 °C auf 30 °C, Metagranulozytenanteil 46,60 %) gegenüber dem Bodenkontrollexperiment 90BE (Temperatur ca. 26 °C, Metagranulozytenanteil 42,98 %) und dem Wert der Tiere aus der Standardhaltung (Metagranulozytenanteil 48,16 %) nur wenig verändert (Diagramm 23). Lediglich gegenüber dem sieben Tage kürzeren Flugexperiment der STS-89-Mission, 89FE (Temperatur ca. 25 °C, Metagranulozytenanteil 38,90 %), war die Metagranulozytenzahl nach 90FE erhöht (Diagramm 33). Aber auch diese Differenz war nicht signifikant.

Anders sah es bei der Zahl der segmentkernigen Granulozyten aus (Diagramm 25). Es kam nach 90FE (Temperaturanstieg von ca. 24 °C auf 30 °C, Anteil segmentkerniger Granulozyten 0,04 %) zwar nicht zu signifikanten Differenzen gegenüber dem Standardwert (Anteil segmentkerniger Granulozyten 0,57 %) und 90BE (Temperatur ca. 26 °C, Anteil segmentkerniger Granulozyten 0,61 %), aber der prozentuale Anteil der segmentkernigen Granulozyten war nach 90FE deutlich zurückgegangen. Die Abnahme der segmentkernigen Granulozyten im Nierengewebe von *X. helleri* nach 90FE ist den Beobachtungen von Kurata et al. (1997) bei Karpfen (*Cyprinus carpio*) ähnlich, die bei erhöhten Temperaturen ebenfalls eine Abnahme der neutrophilen Granulozyten (alle

Reifestadien) im Nierengewebe beobachten konnten (prozentualer Anteil der neutrophilen Granulozyten im Nierengewebe bei 10 °C: 50,4 %, bei 25 °C: 30,8 %). Möglicherweise könnte dies auf einen verstärkten Übertritt dieser ausgereiften Granulozyten vom Nierengewebe ins periphere Blut zurückzuführen sein, denn Langston et al. (2002) konnten beim Heilbutt (*Hippoglossus hippoglossus*; Temperaturanstieg von 12 °C auf 18 °C) und Dunn et al. (1989) beim Goldfisch (*Carassius auratus*; Temperaturanstieg von 25 °C auf 35 °C) eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut bei einer Temperaturerhöhung über das Optimum beobachten.

Die Untersuchungen von Dunn et al. (1989) an Goldfischen (*Carassius auratus*; Temperaturanstieg von 25 °C auf 30 °C) zeigten bei einem Anstieg der Wassertemperatur eine Zunahme des prozentualen Anteils der eosinophilen Granulozyten an den Leukozyten des peripheren Blutes. Nach 90FE, dem Experiment mit deutlichem Temperaturanstieg (von ca. 24 °C auf 30 °C), konnte gleichfalls eine Zunahme der eosinophilen Granulozyten (Anteil eosinophiler Granulozyten 0,08 %) beobachtet werden, sowohl gegenüber dem Bodenkontrollexperiment 90BE als auch gegenüber dem Flug- und Bodenkontrollexperiment 89FE und 89BE (Anteil eosinophiler Granulozyten 90BE: 0,00 %, 89FE: 0,00 %; 89BE: 0,00 %; Temperatur 90BE: ca. 26 °C, 89FE: ca. 25 °C, 89BE: ca. 25 °C) (Diagramm 26). Bei den in diesen Versuchen eingesetzten Tieren konnten im Rahmen der Auszählung von insgesamt 600 Zellen keine eosinophilen Granulozyten gefunden werden. Die Zunahme der eosinophilen Granulozyten nach 90FE lag jedoch zugleich in etwa auf dem Niveau der Tiere aus der Standardhaltung (Anteil eosinophiler Granulozyten 0,05 %). Der Verbleib der eosinophilen Granulozyten auf dem Niveau des Standardwertes entspricht den Beobachtungen von Dheer (1988) am peripheren Blut von Punktierten Schlangenköpfen (*Channa punctatus*). Dieser konnte bei einem Temperaturanstieg von 14 °C auf 35 °C keine signifikante Veränderung der absoluten Zahl der eosinophilen Granulozyten feststellen.

Der Anstieg der Wassertemperatur von ca. 24 °C auf 30 °C (vergleiche Abbildung 17 und Tabelle 9) gegen Ende des Flugexperiments 90FE wirkte sich bei *X. helleri*, anders als von anderen Autoren bei Teleostern beschrieben, nur unwesentlich auf den prozentualen Anteil der Lymphozyten im Nierengewebe aus. Bei Untersuchungen von Kurata et al. (1997) kam es zu eine Zunahme der Lymphozyten im Nierengewebe von

Karpfen (*Cyprinus carpio*) (Lymphozyten 10 °C: 46,2 %; 25 °C: 63,8 %). Dheer (1988) zeigte ebenfalls eine Zunahme der Lymphozyten im peripheren Blut von Punktierten Schlangenköpfen (*Channa punctatus*; Temperaturanstieg von 14 °C auf 30 °C bzw. 35 °C). Im Gegensatz dazu stellten Dunn et al. (1989) eine Abnahme der Lymphozyten im peripheren Blut von Goldfischen (*Carassius auratus*; Temperaturanstieg von 25 °C auf 30 °C) fest.

Lediglich bei Hrubec et al. (1997b) blieb die Zahl der Lymphozyten bei supraoptimalen Temperaturen im Blut von Seebarschhybriden (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*; Temperaturanstieg von 21 °C auf 29 °C) konstant.

Die Lymphozytenwerte des Bodenkontrollexperimentes 90BE (Temperatur ca. 26 °C; Lymphozytenanteil 40,05 %), des sieben Tage kürzeren Flugexperimentes 89FE (Temperatur ca. 25 °C; Lymphozytenanteil 42,48 %) und des Standardwertes (Lymphozytenanteil 37,57 %) zeigten gegenüber 90FE (Temperaturanstieg von ca. 24 °C auf 30 °C; Lymphozytenanteil 40,83 %) nur geringe, nicht signifikante Unterschiede (Diagramm 27).

Die Untersuchungen von Dunn et al. (1989) an Goldfischen (*Carassius auratus*) schlossen die Bestimmung des prozentualen Anteils der blastären Zellen an den Leukozyten des Blutes ein. Bei einem Temperaturanstieg von 10 °C über dem Optimalwert von 25 °C nahm ihr Anteil leicht zu (25 °C: 2,8 %; 35 °C: 3,4 %). Dheer (1988) untersuchte bei Punktierten Schlangenköpfen (*Channa punctatus*) die „großen lymphoiden Hämoblasten“, Promyelozyten, Mesomyelozyten und Metamyelozyten (Letztere entsprechen den Metagranulozyten) des peripheren Blutes. Die frühen Entwicklungsstadien, die lymphoiden Hämoblasten und Promyelozyten, zeigten bei 30 °C und 35 °C gegenüber der Standardtemperatur von 14 °C eine deutliche Zunahme. Dagegen nahmen die beiden fortgeschritteneren Reifestadien, die Mesomyelozyten und Metamyelozyten, bei einer Wassertemperatur von 30 °C bzw. 35 °C deutlich ab. Nach Meinung des Autors könnte dies an einer verlangsamten Entwicklung von Promyelozyten zu Meso- und Metamyelozyten bei supraoptimalen Temperaturen liegen.

Wie oben beschrieben, kam es bei Dunn et al. (1989) und Dheer (1988) bei einer erhöhten Wassertemperatur zu einer Zunahme der blastären Zellen im peripheren Blut. Im Nierengewebe der Schwertträger aus 90FE (Anteil blastärer Zellen 1,70 %), in dem die Temperatur auf 30 °C anstieg, kam es im Vergleich mit den Tieren aus 90BE

(Anteil blastärer Zellen 1,00 %), in dem die Temperatur im Optimalbereich von *X. helleri* verblieb, ebenfalls zu einer leichten, aber nicht signifikanten Zunahme der blastären Zellen (Diagramm 28). Dagegen waren die blastären Zellen bei 90FE gegenüber dem Standard (Anteil blastärer Zellen 3,26 %) und dem Wert aus dem anderen, sieben Tage kürzeren Flugexperiment 89FE (Temperatur ca. 25 °C, Anteil blastärer Zellen 4,67 %) und dem Bodenkontrollexperiment 89BE (Temperatur ca. 25 °C; Anteil blastärer Zellen 4,68 %) deutlich zurückgegangen.

Aus welchem Grund die blastären Zellen nach 90FE und 90BE gegenüber dem Standard und den Experimenten 89FE und 89BE deutlich abgenommen haben (Diagramm 28), bleibt fraglich. Eine wichtige Rolle könnte die gegenüber 89FE und 89BE fast doppelt so lange Dauer der Experimente 90FE und 90BE gespielt haben (9-tägig gegenüber 16-tägig).

Sowohl der Vergleich zwischen den Flugexperimenten unterschiedlicher Dauer (89FE und 90FE) (Diagramm 38) als auch zwischen den Bodenexperimenten unterschiedlicher Dauer (89BE und 90BE) (Diagramm 48) zeigte, dass es bei den Tieren, die den Versuchsbedingungen im C.E.B.A.S. länger ausgesetzt waren, zu einer signifikanten Abnahme der blastären Zellen kam (Anteil der blastären Zellen 89FE: 4,67 %, 90FE: 1,70 % und 89BE: 4,68 %, 90BE: 1,90 %).

#### **6.3.4.3 Wirkung der Umgebungstemperatur auf die spontane Zellteilungsaktivität**

Nach Beendigung des Flugexperimentes 90FE, gegen dessen Ende es zu einer Temperaturerhöhung von ca. 24 °C auf 30 °C kam (vergleiche Tabelle 9 und Abbildung 17), war die spontane Zellteilungsaktivität der Nierenzellen (90FE: 4,44 %) sowohl gegenüber dem Standard (6,13 %) als auch gegenüber dem Bodenkontrollexperiment 90BE (7,84 %) und dem Flugexperiment 89FE (6,23 %) vermindert (Diagramm 29). Experiment 90FE zeigte somit gegenüber diesen Experimenten eine Hemmung der Proliferationsaktivität.

Der im Versuch 90FE dokumentierte Rückgang der spontanen Zellteilungsaktivität und der im vorangegangenen Abschnitt beschriebene Rückgang des prozentualen Anteils der blastären Zellen als Folge einer erhöhten Wassertemperatur zeigt Ähnlichkeiten mit den Ergebnissen der Arbeit von Dunn et al. (1989). Zu ihren umfangreichen

hämatologischen Untersuchungen am Goldfisch (*Carassius auratus*) gehörte die Überprüfung der leukopoetischen Kapazität bei unterschiedlichen Wassertemperaturen (5 °C = suboptimale Temperatur, 25 °C = optimale Temperatur, 35 °C = supraoptimale Temperatur). Unter leukopoetischer Kapazität verstehen die Autoren die Wirkung der Temperatur auf die Proliferation von Leukozyten nach peritonealer *In-vivo*-PHA-(Phythämagglutinin-)Stimulation. Bei ihren Versuchen zeigte sich, dass die Temperatur die Antwort auf das Mitogen beeinflusste, und zwar in der Weise, dass bei niedrigen Temperaturen (5 °C) die Reaktion auf den Proliferationsstimulus vermindert und verzögert war. Außerdem schlossen die Autoren aus einer sowohl bei 5 °C als auch bei 35 °C reduzierten Zahl an Blasten (bei Dunn et al. (1989) gemessen in Zellen/ $\mu$ l) im peripheren Blut, dass die Proliferation bei sub- und supraoptimalen Temperaturen vermindert ist.

Bei der Beurteilung und dem Vergleich der Daten der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen anderer Autoren, die Teleostee untersuchten, muss berücksichtigt werden, dass die Bestimmung des prozentualen Anteils der Leukozytentypen an den Gesamtleukozyten unter Umständen an unterschiedlichen Kompartimenten (Nierengewebe oder peripheres Blut) durchgeführt wurde. Der Einfluss, den eine erhöhte Umgebungstemperatur oder ein anderer Umweltparameter auf das Differentialblutbild der Niere bzw. des peripheren Blutes von Teleosteen hat, muss nicht gleich sein.

### **6.3.5 Wirkung von Sauerstoffmangel auf den Gesundheitszustand und das Abwehrsystem**

Im Folgenden soll die Wirkung von nicht letalem, chronischem Sauerstoffmangel auf das Abwehrsystem und die Gesundheit der Schwertträger im C.E.B.A.S. diskutiert werden. Dabei soll aufgezeigt werden, welche unmittelbaren Wirkungen Sauerstoffmangel auf das Abwehrsystem von *X. helleri* haben kann. Dies ist notwendig, da der Sauerstoffgehalt des Wassers während der C.E.B.A.S.-Experimente 90NT1, 90NT2, 90BE und 90FE dramatisch abgefallen ist und somit Einfluss auf das Abwehrsystem der Versuchstiere gehabt haben könnte (vergleiche Tabelle 9 und Abbildungen 14-17). Die O<sub>2</sub>-Konzentration fiel bei den oben genannten C.E.B.A.S-

Läufen von einem Mittelwert von ca. 5,5 mg/l zu Beginn der Experimente zeitweise auf Werte von 2,5 bzw. 1,5 mg/ml (vergleiche Abbildung 14-17).

Akuter Sauerstoffmangel kann der Grund für massive Verluste in Fischpopulationen sein. Andriske et al. (2000) geben an, dass Fische bereits bei Sauerstoffkonzentrationen von weniger als 4 mg/l O<sub>2</sub> ein verändertes Fressverhalten zeigen und es im Bereich unter 3 mg/l O<sub>2</sub> zu drastischen Veränderungen des Schwimm- und Reproduktionsverhaltens kommen kann. Für *X. helleri* wird ein Mindestsauerstoffgehalt von 3,0 mg/l empfohlen (Tamaru et al., 2001). Bisher ist nur selten untersucht worden, welche Auswirkungen eine subletale Hypoxie auf das Abwehrsystem von Teleostern hat. Außerdem liegt derzeit keine Literatur vor, die auf die direkte Wirkung von chronischem Sauerstoffmangel auf die abwehrrelevanten Blutzellen eingeht.

Boleza et al. (2001) beschäftigten sich mit der Wirkung von Sauerstoffmangel auf die bakterizide Aktivität von Vordernierenphagozyten (Macrophagen; Granulozyten) von Killifischen (*Fundulus heteroclitus*) gegen opportunistische Pathogene (*Vibrio parahaemolyticus*). Viele Killifischarten kommen mit sehr niedrigen Sauerstoffkonzentrationen aus. Daher legten die Autoren einen Sauerstoffgehalt von 2,45 mg/l als Normwert für die Haltung dieser Art zugrunde. Die Autoren konnten bei Sauerstoffmangel (0,82 mg/l O<sub>2</sub>) einen deutlichen, signifikanten Rückgang der bakteriziden Aktivität um 26,3 % feststellen. Sie schließen aus diesem Ergebnis, dass der Sauerstoffgehalt des Wassers einen erheblichen Einfluss auf die bakterizide Aktivität der Vordernierenphagozyten hatte. Dies wiederum legt nach Ansicht der Autoren nahe, dass periodisch oder chronisch auftretende, subletale Hypoxien einen negativen Einfluss auf die Resistenz von Teleostern gegen Krankheitserreger haben.

Die für *X. helleri* zeitweise hypoxischen Bedingungen (O<sub>2</sub>-Gehalt < 3,0 mg/l) in den Experimenten 90NT1, 90NT2, 90BE und 90FE (vergleiche Tabelle 9 und Abbildungen 14-17) werden demnach einen Einfluss auf den Gesundheitszustand der *X. helleri* gehabt und zu der hohen Mortalität in den Experimenten 90NT1 (ein überlebendes Tier) und 90BE (zwei überlebende Tiere) (vergleiche Tabelle 9) beigetragen haben.

Die Experimente von Boleza et al. (2001) zeigten, dass es zwischen den einzelnen Individuen extreme Schwankungen der bakteriziden Aktivität der Phagozyten gab. Diese Schwankungen könnten im Altersunterschied, Geschlecht und dem individuellem Stressniveau der Tiere begründet sein. Die individuelle Toleranz gegenüber hypoxischen Bedingungen ist möglicherweise eine Erklärung dafür, warum in einigen

Experimenten mit sehr niedrigem Sauerstoffgehalt alle Tiere überlebten (90NT2 und 90FE) und in anderen nicht (90NT1 und 90BE) (vergleiche Tabelle 9).

Die unterschiedliche Mortalität in den hypoxischen Experimenten könnte auch eine andere Ursache haben. Rees et al. (2001) stellten fest, dass eine Akklimation von Zebraquärlingen (*Danio rerio*) an subletale Bedingungen zu einer Verlängerung der Überlebenszeit bei letalem Sauerstoffmangel führt. Interessanterweise erhöhte die Akklimationsphase die Überlebenszeit der männlichen Tiere um das Neunfache, die der weiblichen Tiere nur um das Dreifache.

Während des Experiments 90NT2 fiel der Sauerstoffgehalt im System über einen langen Zeitraum (ca. 15 Tage) langsam ab (vergleiche Tabelle 9 und Abbildung 15), was einer langen Akklimationsphase entspricht. Der Organismus der Versuchstiere konnte sich somit an die hypoxischen Bedingungen gewöhnen. Dieses Experiment überlebten alle Tiere. Beim Experiment 90NT1 war das Gegenteil der Fall. Der Sauerstoffgehalt fiel innerhalb eines wesentlich kürzeren Zeitraums (ca. vier Tage) auf einen Wert von 1,5 mg/l ab (vergleiche Tabelle 9 und Abbildung 14), was nur ein Tier überlebte. Experiment 90BE zeigte ein ähnliches Bild. Hier kam es zu einem Rückgang der Sauerstoffkonzentration auf 2,5 mg/l innerhalb von ca. sechs Tagen (vergleiche Tabelle 9 und Abbildung 16). Es überlebten nur zwei *X. helleri*. Zu einem gegensätzlichen Ergebnis kam es bei Experiment 90FE. Hier sank der O<sub>2</sub>-Gehalt des Wassers sehr schnell auf sehr niedrige Werte (2,5 mg/l) und dennoch überlebten alle vier eingesetzten *X. helleri* (vergleiche Tabelle 9 und Abbildung 17). Das lässt vermuten, dass die Mortalität der *X. helleri* nicht allein auf den Sauerstoffgehalt des Wassers und/oder auf die zeitliche Ausdehnung des Sauerstoffabfalls im System (Länge der Akklimationsphase) zurückzuführen sein kann.

## 7 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von Fischen (Schwertträgerfisch, *Xiphophorus helleri*, Heckel 1848) zu untersuchen. Zu diesem Zweck befanden sich jeweils vier adulte *X. helleri*-Weibchen an Bord der STS-89 und STS-90 Space Shuttle-Missionen. Während der Weltraumflüge wurden die Versuchstiere im geschlossenen, aquatischen Ökosystem C.E.B.A.S. (Closed Equilibrated Biological Aquatic System) gehalten.

Im Rahmen der STS-89 und STS-90 Space Shuttle-Missionen wurden insgesamt acht C.E.B.A.S.-Experimente durchgeführt. Die Kurzbezeichnung der Experimente, die Gravitationsbedingungen und die Dauer der verschiedenen Experimente sind in Tabelle 12 aufgeführt.

**Tabelle 12:** C.E.B.A.S.-Experimente der STS-89- und STS-90-Mission.

Mission	Experiment	Interne Bezeichnung	Kurz	Gravitation	Dauer (Tage)
-	Aquarium KSC	Standard- bzw. Aquarienhaltung	-	1g	-
STS-89	Nutzlasttest	STS-89-Nutzlasttest 1	89NT1	1g	11
		STS-89-Nutzlasttest 2	89NT2	1g	11
	Weltraumexperiment	STS-89-Bodenkontrollexperiment	89BE	1g	9
		<b>STS-89-Flugexperiment</b>	<b>89FE</b>	<b>&lt;10<sup>-3</sup>g</b>	<b>9</b>
STS-90	Nutzlasttest	STS-90-Nutzlasttest 1	90NT1	1g	22
		STS-90-Nutzlasttest 2	90NT2	1g	22
	Weltraumexperiment	STS-90-Bodenkontrollexperiment	90BE	1g	16
		<b>STS-90-Flugexperiment</b>	<b>90FE</b>	<b>&lt;10<sup>-3</sup>g</b>	<b>16</b>

Die Weltraumexperimente der STS-89- und STS-90-Mission bestanden aus einem Flug- und einem Bodenkontrollexperiment. Zur Vorbereitung der Weltraumexperimente wurden so genannter Nutzlasttests durchgeführt, die ebenfalls aus zwei parallel verlaufenden C.E.B.A.S.-Versuchen bestanden. Als Standard- bzw. Aquarienhaltung ist die Haltung der Schwertträger in den Aquarien am Kennedy Space Center (KSC) bezeichnet worden.

Die Dauer der Experimente ist in Tagen angegeben. BE = Bodenkontrollexperiment, FE = Flugexperiment, NT = Nutzlasttest, 1g = Gravitation auf der Erdoberfläche; Gravitation <10<sup>-3</sup> g = Gravitation, die auf ein Space Shuttle in der Erdumlaufbahn wirkt.

Neben den beiden Weltraumexperimenten (89FE und 90FE) und den dazu parallel laufenden Bodenkontrollexperimenten (89BE und 90BE) wurden im Vorfeld vier terrestrische Nutzlasttests mit dem C.E.B.A.S.-MINI MODUL durchgeführt (89NT1, 89NT2, 90NT1 und 90NT2). Außerdem wurden die Daten von 39



Schwerträgerweibchen erfasst, die aus der Standard- bzw. Aquarienhaltung am KSC stammten und dort unter optimalen Bedingungen gehalten wurden. Ihr Mittelwert repräsentiert den Standardwert. Aus ihrer Population wurden die Versuchstiere für die C.E.B.A.S.-Experimente entnommen.

Die Dauer der Experimente betrug 9, 11, 16 bzw. 22 Tage. Die Gravitation, die auf die terrestrischen Experimente einwirkte, betrug 1g. Auf die Space Shuttles in der Erdumlaufbahn wirkte eine Gravitation von weniger als  $10^{-3}g$ .

Folgende Parameter, die Aufschluss über die Funktion des Abwehrsystems von *X. helleri* geben können, wurden untersucht:

1. Differentialblutbild der Leukozytenpopulationen des hämatopoetischen Nierengewebes (Monozyten, Makrophagen, Metagranulozyten, stabkernige Granulozyten, segmentkernige Granulozyten, eosinophile Granulozyten, Lymphozyten und blastäre Zellen).
2. Durchflusszytofluorometrische Erfassung der spontanen Zellteilungsaktivität von Nierengewebszellen.
3. Phagozytoserate von Nierengewebspagozyten.

Die aufgeführten Abwehrparameter wurden ausgewählt, da sie empfindlich gegenüber Änderungen von Umweltfaktoren wie der Wasserqualität, soziale Faktoren und möglicherweise auch gegenüber der Mikrogravitation sind.

Während der Weltraumexperimente kam es zum Teil zu erheblichen Abweichungen zwischen den Haltungsbedingungen im C.E.B.A.S. und der Standardhaltung. Problematische Werte erreichten z.B. die Sauerstoffkonzentration, die Temperatur, die Wasserhärte, der pH-Wert, der Ammoniumgehalt und die Populationsdichte. Aus diesem Grund musste zunächst festgestellt werden, ob die Lebensbedingungen im C.E.B.A.S. die untersuchten Abwehrparameter, unabhängig von der Gravitation, beeinflusst haben. Zu diesem Zweck wurden die Werte der Schwerträger aus der Standardhaltung mit den Werten der Tiere aus den terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten verglichen. Erst mit Rücksicht auf die Resultate dieser Untersuchungen war es durch die direkte Gegenüberstellung der Ergebnisse aus Flug- und Bodenkontrollexperimenten möglich zu beurteilen, ob die Mikrogravitation Einfluss auf das Abwehrsystem der Schwerträger hatte.

Die unterschiedliche Dauer der orbitalen (89FE, 9 Tage und 90FE, 16 Tage) und terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimente (89BE, 9 Tage, 89NT1 und 89NT2, 11 Tage, 90BE, 16 Tage und 90NT1 und 90NT2, 22 Tage) ermöglichte es zudem zu untersuchen, ob die Dauer der Versuche einen Einfluss auf das Abwehrsystem der Schwertträger nahm.

Aufgrund der im Rahmen der STS-89- und STS-90-Mission durchgeführten C.E.B.A.S.-Experimente konnte somit der Einfluss folgender Faktoren auf das Abwehrsystem von *X. helleri* untersucht werden:

1. Der Einfluss der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf das Abwehrsystem von *X. helleri*.
2. Der Einfluss der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von *X. helleri*.
3. Der Einfluss der Dauer der Weltraumflüge auf das Abwehrsystem von *X. helleri*.
4. Der Einfluss der Dauer der Haltung im C.E.B.A.S. unter terrestrischen Gravitationsbedingungen auf das Abwehrsystem von *X. helleri*.

### **Zu 1.: Einfluss der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf das Abwehrsystem von *X. helleri***

Um den Einfluss der terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung auf das Abwehrsystem von *X. helleri* beurteilen zu können, wurden die Daten der *X. helleri* aus der Standardhaltung mit denen der Tiere aus den terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten 89BE, 89NT1, 89NT2, 90BE, 90NT1 und 90NT2 verglichen.

Zwischen den Werten der Schwertträger aus den terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten und denen der Tiere aus der Standardhaltung kam es zu signifikanten Differenzen. Tabelle 13 fasst die Ergebnisse dieses Vergleiches zusammen.

**Tabelle 13:** Signifikante Veränderungen der Abwehrparameter von *X. helleri* aus terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten gegenüber Tieren aus der Standardhaltung.

Parameter	89NT1	89NT2	89BE	90NT1	90NT2	90BE
1.1 Monozytenanteil	-	-	-	-	↓	-
1.2 Makrophagenanteil	-	-	-	-	↓	-
1.3 Metagranulozytenanteil	-	-	-	-	↑	-
1.4 Anteil der stabkernigen Granulozyten	-	↓	-	-	-	-
1.5 Anteil der segmentkernigen Granulozyten	↓	↓	-	-	-	-
1.6 Anteil der eosinophilen Granulozyten	↑	↑	-	-	↑	-
1.7 Lymphozytenanteil	-	↓	-	-	↓	-
1.8 Anteil der blastären Zellen	-	↑	-	↑	↑	↓
2 Spontane Zellteilungsaktivität	-	-	-	-	↓	-
3 Phagozytoserate	↓	-	↓	-	↓	-

1.1-1.8 = Veränderung des prozentualen Anteils von Leukozytenpopulationen im Nierengewebe. 2 = Veränderung der spontanen Zellteilungsaktivität im Nierengewebe. 3 = Veränderung der Phagozytoserate von Nierengewebsphagozyten.

↓ = signifikanter Rückgang gegenüber dem Standardwert. ↑ = signifikanter Anstieg gegenüber dem Standardwert.

Wie die Ergebnisse der terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimente zeigen, wirkten sich die Umweltbedingungen im C.E.B.A.S.-Modul auf die untersuchten Abwehrparameter aus. Einige der in Tabelle 13 aufgeführten Veränderungen sind als typische Reaktionen des Abwehrsystems der Teleosteer auf Stresssituationen, hervorgerufen durch problematische Wasserwerte oder eine kritische Populationsdichte, beschrieben worden. Dies betrifft den signifikanten Rückgang der Phagozytoserate (89NT1, 89BE, 90NT2) sowie den signifikanten Rückgang des prozentualen Anteils der Lymphozyten (89NT2, 90NT2) und Monozyten (90NT2).

Aufgrund der häufig auftretenden signifikanten Unterschiede zwischen der Schwerträgerpopulation aus der Standardhaltung und den Tieren aus den terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten (Tabelle 13) muss davon ausgegangen werden, dass sich die Haltungsbedingungen im C.E.B.A.S. - unabhängig von den Gravitationsbedingungen - auf die untersuchten Abwehrparameter ausgewirkt haben. Einige der Veränderungen werden als typische Reaktionen des Abwehrsystems von Teleosteen auf Stresssituationen beschrieben.

### **Zu 2.: Einfluss der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von *X. helleri***

Um den Einfluss der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von *X. helleri* beurteilen zu können, wurden die Daten der Schwertträger aus den Flugexperimenten (89FE und 90FE) den Daten der Tieren aus den parallel laufenden Bodenkontrollexperimenten (89BE und 90BE) gegenübergestellt.

Zwischen den Schwertträgerpopulationen aus Boden- und Flugexperimenten der STS-89- und STS-90-Missionen kam es bei keinem der untersuchten Parameter zu einer signifikanten Differenz. Somit waren der Mikrogravitation anhand der vorliegenden Daten keine signifikanten Wirkungen auf die untersuchten Parameter nachzuweisen.

Deutliche aber nicht signifikante Differenzen, die zwischen Flug- und Bodenkontrollexperimenten auftraten, konnten nicht auf die Wirkung der Mikrogravitation zurückgeführt werden, da sich während der Weltraumflüge kritische Haltungsbedingungen einstellten.

### **Zu 3.: Einfluss der Dauer der Weltraumflüge auf das Abwehrsystem von *X. helleri***

Um den Einfluss der Dauer der Weltraumflüge beurteilen zu können, wurden die Daten der *X. helleri* aus dem 9-tägigen Weltraumexperiment 89FE mit denen aus dem 16-tägigen Weltraumexperiment 90FE verglichen.

Der Vergleich zeigte einen signifikant erhöhten Anteil der Makrophagen und blastären Zellen im Differentialblutbild der Schwertträger aus dem 9-tägigen Flugexperiment gegenüber den Tieren aus dem 16-tägigen Flugexperiment (Tabelle 14).

**Tabelle 14:** Signifikante Unterschiede des Differentialblutbildes zwischen *X. helleri*-Populationen aus Weltraumexperimenten mit unterschiedlicher Dauer.

<b>Parameter</b>	<b>Experiment</b>		
Anteil der Makrophagen	89FE (9 T)	>	90FE (16 T)
Anteil der blastären Zellen	89FE (9 T)	>	90FE (16 T)

Veränderung des prozentualen Anteils von Leukozytenpopulationen im Nierengewebe. Die Dauer des jeweiligen Experimentes ist in Klammern angegeben (z. B. 9 T = 9 Tage).

> = größer als

Bei keinem weiteren Parameter (Anteil anderer Leukozytentypen im Differentialblutbild, spontane Zellteilungsaktivität und Phagozytoserate) kam es zu signifikanten Differenzen zwischen den Daten der Schwerträgerpopulationen aus Weltraumexperimenten mit unterschiedlicher Dauer.

Zwar zeigte das 16-tägige Weltraumexperiment 90FE gegenüber dem 9-tägigen 89FE-Experiment eine signifikante Abnahme von Makrophagen und blastären Zellen (Tabelle 14), aber die Umweltbedingungen in beiden Experimenten waren zu unterschiedlich, um diese Ergebnisse allein auf die Wirkungsdauer der Mikrogravitation zurückführen zu können. Somit war es anhand der vorliegenden Daten nicht möglich, der Dauer der Schwerelosigkeit einen Einfluss auf die untersuchten Parameter nachzuweisen.

#### **Zu 4.: Einfluss der Dauer der Haltung im C.E.B.A.S. unter terrestrischen Gravitationsbedingungen auf das Abwehrsystem von *X. helleri***

Um den Einfluss der Dauer der Haltung im C.E.B.A.S. unter terrestrischen Gravitationsbedingungen auf das Abwehrsystem von *X. helleri* beurteilen zu können, wurden die Daten der Schwerträgerpopulationen aus den unterschiedlich langen terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten miteinander verglichen.

Die Dauer von 89BE betrug 9 Tage, die Dauer von 89NT1 und 89NT2 betrug 11 Tage, die Dauer von 90BE betrug 16 Tage und die Dauer von 90NT1 und 90NT2 betrug 22 Tage. Tabelle 15 zeigt, dass es bei den untersuchten Abwehrparametern zwischen Experimenten mit unterschiedlicher Dauer zu signifikanten Unterschieden kam.

**Tabelle 15:** Signifikante Unterschiede des Differentialblutbildes zwischen *X. helleri*-Populationen aus terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten mit unterschiedlicher Dauer.

<b>Parameter</b>	<b>Experimente</b>			
Anteil der Monozyten	89BE (9 T)	<	90BE (16 T)	
	89BE (9 T)	>	90NT2 (22 T)	
	89NT1 (11 T)	<	90BE (16 T)	
	89NT2 (11 T)	>	90NT2 (22 T)	
	90BE (16 T)	>	90NT2 (22 T)	

Fortsetzung Tabelle 15 siehe andere Seite

Fortsetzung Tabelle 15

<b>Parameter</b>	<b>Experimente</b>		
Anteil der Makrophagen	89BE (9 T)	>	90NT2 (22 T)
	89NT1 (11 T)	>	90NT2 (22 T)
	90BE (16 T)	>	90NT2 (22 T)
Anteil der Metagranulozyten	89BE (9 T)	<	90NT2 (22 T)
	90BE (16 T)	<	90NT2 (22 T)
	90NT1 (22 T)	<	90NT2 (22 T)
Anteil der stabkernigen Granulozyten	89NT2 (11 T)	<	90NT2 (22 T)
Anteil der segmentkernigen Granulozyten	89NT2 (11 T)	<	90BE (16 T)
Anteil der Lymphozyten	89BE (9 T)	>	90NT2 (22 T)
	89NT2 (11 T)	<	90BE (16 T)
	90BE (9 T)	>	90NT2 (22 T)
	90NT1 (22 T)	>	90NT2 (22 T)
Anteil der blastären Zellen	89BE (9 T)	>	90BE (16 T)
	89BE (9 T)	<	90NT1 (22 T)
	89NT1 (11 T)	>	90BE (16 T)
	89NT2 (11 T)	>	90BE (16 T)
	90BE (16 T)	<	90NT1 (22 T)
	90BE (16 T)	<	90NT2 (22 T)

Veränderung des prozentualen Anteils von Leukozytenpopulationen im Nierengewebe. Die Dauer des jeweiligen Experimentes ist in Klammern angegeben (z B. 9 T = 9 Tage).

> = größer als; < = kleiner als

Bezüglich des prozentualen Anteils der eosinophilen Granulozyten, der spontanen Zellteilungsaktivität und der Phagozytoserate kam es zwischen Schwerträgerpopulationen aus unterschiedlich lang andauernden terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten zu keinen signifikanten Differenzen.

Die Ergebnisse zeigen, dass es zwischen den Versuchstierpopulationen aus den terrestrischen C.E.B.A.S.-Experimenten mit unterschiedlicher Dauer bei sieben von zehn untersuchten Parametern zu signifikanten Unterschieden kam (Tabelle 15). Da die Umweltbedingungen auch in den terrestrischen Experimenten stark vom Optimum abwichen, geben die Ergebnisse einen deutlichen Hinweis darauf, dass es eine Wechselwirkung zwischen der Dauer der suboptimalen terrestrischen C.E.B.A.S.-Haltung und dem Zustand des Abwehrsystems gab.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass eine Aussage über die Wirkung der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von *X. helleri* erst dann möglich sein wird, wenn es bei zukünftigen Weltraumexperimenten gelingt, den Versuchstieren optimale

Haltungsbedingungen zu schaffen. Außerdem bestätigen die Ergebnisse, dass das Abwehrsystem der Teleosteer überaus empfindlich auf Veränderungen von Umweltparametern reagiert. Sie sind daher sehr gut für die Untersuchung der Wirkung der Schwerelosigkeit auf das Immunsystem von Vertebraten geeignet.

## 8 Literaturverzeichnis

Ainsworth AJ (1992): Fish granulocytes: Morphology, Distribution, and function. Annual Rev. of Fish Diseases 2, 123-148

Ainsworth AJ, Dexiang C (1990): Differences in the phagocytosis of four bacteria by channel catfish neutrophils. Dev. Comp. Immunol. 14, 201-209

Ainsworth AJ, Dexiang C, Waterstrat PR (1991a): Changes in Peripheral Blood Leukocyte Percentages and Function of Neutrophils in stressed Channel Catfish. Journal of Aquatic Animal Health 3, 41-47

Ainsworth AJ, Dexiang C, Waterstrat PR, Greenway T (1991b): Effect of temperature on the immune system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). I. Leucocyte distribution and phagocyte function in the anterior kidney at 10 °C. Comp. Biochem. Physiol. 100 A No. 4, 907-912

Al-Adhami MA, Kunz YW (1976): Hemopoietic centers in the developing angelfish *Pterophyllum scalare* (Curier and Valenciennes). Wilhelm Roux's Arch. 179, 393-401

Alcorn SW, Murray AL, Pascho RJ (2002): Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). Fish Shellfish Immunol. 12, 303-334

Allebban Z, Ichiki AT, Gibson LA, Jones JB, Congdon CC, Lange RD (1994): Effects of spaceflight on the number of rat peripheral blood leucocytes and lymphocytes subsets. J. Leukoc. Biol. 55, 209-213

Anderson DP (1996): Environmental factors in fish health: Immunological aspects. In: Iwama G and Nakanishi T (eds). The Fish Immune System. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 289-310

Anderson DP, Roberson BS, Dixon OW (1982): Immunosuppression induced by a corticosteroid or an alkylating agent in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) administered a *Yersinia ruckeri* bacterin. Dev. Comp. Immunol. 6 (Supplement 2), 197-204

Andriske M, Paris F, Voeste D, Blüm V (2000): Das CEBAS-Projekt: Erste Ergebnisse der Space Shuttle Missionen STS-89 und STS-90. In: Keller MH and Sahn PR (eds). Bilanzsymposium Forschung unter Weltraumbedingungen, 21.-23. September 1998 Norderney. Wissenschaftliche Projektführung RWTH Aachen, 394-402

Angka SL, Lam TL, Sin YM (1995): Some virulence characteristics of *Aeromonas hydrophila* in walking catfish (*Clarias gariepinus*). Aquaculture 130, 103-112

Arkoosh MR, Kaattari SL (1991): Development of immunological memory in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I. An immunochemical and cellular analysis of the B cell response. Dev. Comp. Immunol. 15, 279-293



- Armstrong JW, Gerren RA, Chapes SK (1995): The Effect of Space and Parabolic Flight on Macrophage Hematopoiesis and Function. *Experimental Cell Research* 216, 160-168
- Avtalion RR (1969): Temperature effect on antibody production and immunological memory in carp (*Cyprinus carpio*) immunized against bovine serum albumin (BSA). *Immunology* 17, 927-931
- Avtalion RR (1981): Environmental control of the immune response in fish. *CRC, Critical Review of Environmental Control* 11, 163-188
- Ball JN, Slicher AM (1962): Influence of hypophysectomy and of an adrenocortical inhibitor (SU-4885) on the stress response of the white blood cells in the teleost fish *Mollienesia latipinna* LeSeur. *Nature* 196, 1331-1332
- Banerjee S, Bhattacharya S (1994): Histopathology of kidney of *Channa punctatus* exposed to chronic nonlethal level of Elsan, Mercury, and Ammonia. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 29, 265-275
- Banerjee S, Bhattacharya S (1995): Histopathological changes iduced by chronic nonlethal levels of Elsan, Mercury and Ammonia in the small intestine of *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 31, 62-68
- Barnes AC, Guyot C, Hansen BG, Horn MT, Ellis AE (2002): Antibody increases phagocytosis and killing of *Lactococcus garvieae* by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, L.) macrophages. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 181-186
- Bayne CJ, Gerwick L (2001): The acute phase response and innate immunity of fish. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 725-743
- Bechler B, Cogoli A, Cogoli-Greuter M, Müller O, Hunzinger E, Chriswell SB (1992): Activation of microcarrier-attached lymphocytes in microgravity. *Biotechnology and Bioengineering* 40, 991-996
- Bechler B, Cogoli A, Mesland D (1986): Lymphozyten sind schwerkraftempfindlich. *Naturwissenschaften* 73, 400-403
- Bell GR, Margolis L (1976): The fish health program and the occurrence of fish disease in the Pacific region of Canada. *Fish Pathol.* 10, 115-122
- Bennett RO, Wolke RE (1987): The effect of sublethal endrin exposure on rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. I. Evaluation of serum cortisol concentrations and immune responsiveness. *J. Fish Biol.* 31, 375-385
- Bentley PJ (1976): *Comparative Vertebrate Endocrinology*. Cambridge: Cambridge University Press

- Berczi I (1997): The Stress Concept: An Historical Perspective of Hans Selye's Contributions. In: Buckingham JC, Gillies GE and Cowell A-M (eds). Stress, Stress Hormones and the Immune System. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, New York, London, 1-6
- Besedowsky HO, Ray AE, Sorkin E (1983): What do the immune system and the brain know about each other? *Immunol. Today* 4, 342-346
- Bills TD, Hunn JB (1976): Changes in the blood chemistry of coho salmon exposed to malachite green. *Prog. Fish Cult.* 38, 214-216
- Blaxhall PC (1972): The haematological assessment of the health of freshwater fish. A review of selected literature. *J. Fish Biol.* 4, 593-604
- Blazer VS, Ankley GT, Finco-Kent (1989): Dietary influences on disease resistance factors in channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.* 13, 43-48
- Blüm V (2000a): C.E.B.A.S.: Vom Shuttle zur internationalen Raumstation. In: Keller MH and Sahn PR (eds). Bilanzsymposium Forschung unter Weltraumbedingungen, 21.-23. September 1998 Norderney. Wissenschaftliche Projektführung RWTH Aachen, 381-393
- Blüm V (2000b): Bioregenerative Lebenserhaltungssysteme. In: Keller MH and Sahn PR (eds). Bilanzsymposium Forschung unter Weltraumbedingungen, 21.-23. September 1998 Norderney. Wissenschaftliche Projektführung RWTH Aachen, 367-380
- Blüm V, Andriske M, Eichhorn H, Kreuzberg K, Schreiberbmann MP (1995b): A controlled aquatic ecological life support system (CAELSS) for combined production of fish and higher plant biomass suitable for integration into a lunar or planetary base. *Acta Astronaut.* 37, 361-71
- Blüm V, Andriske M, Kreuzberg K, Schreiberbmann MP (1995a): Animal protein production module in biological life support systems: novel combined aquaculture techniques based on the Closed Equilibrated Biological Aquatic System (C.E.B.A.S.). *Acta Astronaut.* 36, 615-623
- Blüm V, Andriske M, Paris F, Voeste D (2000): Experimentbedingungen im C.E.B.A.S.-Minimodul bei der STS-89 und STS-90 Space-Shuttle-Mission. In: Keller MH and Sahn PR (eds). Bilanzsymposium Forschung unter Weltraumbedingungen, 21.-23. September 1998 Norderney. Wissenschaftliche Projektführung RWTH Aachen, 403-407
- Blüm V, Kreuzberg K, Stretzke E (1994b): C.E.B.A.S. MINI MODULE: test results of an artificial (man-made) aquatic ecosystem. *Adv. Space Res.* 14, 89-98
- Blüm V, Stretzke E, K K (1994a): C.E.B.A.S.-AQUARACK project: the Mini-Module as a tool in artificial ecosystem research. *Acta Astronaut.* 33, 167-77
- Bly JE, Clem LW (1992): Temperature and teleost immune function. *Fish Shellfish Immunol.* 2, 159-171

- Bly JE, Miller NW, Clem LW (1990): A monoclonal antibody specific for neutrophils in normal and stressed channel catfish. *Dev. Comp. Immunol.* 14, 211-221
- Bly JE, Quiniou SM, Clem LW (1997): Environmental effects on fish immune mechanisms. *Developments in Biological Standardisation* 90, 33-43
- Bodammer JE (1986): Ultrastructural observations on peritoneal exudate cells from the striped bass. *Vet. Immunol. Immunopath.* 12, 127-140
- Boleza KA, Burnett LE, Burnett KG (2001): Hypercapnic hypoxia compromises bactericidal activity of fish anterior kidney cells against opportunistic environmental pathogens. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 593-610
- Bowser PR, Falls WW, VanZandt J, Collier N, Phillips JD (1983): Methemoglobinemia in channel catfish: methods of prevention. *Prog. Fish Cult.* 45 (3), 154-158
- Boyd CE (1979): Water quality in warmwater fish ponds. Alabama Agricultural Experiment Station, Auburn University, Auburn, Alabama
- Bromage NR, Shepherd CJ, Roberts J (1988): Farming systems and husbandary practice. In: Shepherd CJ and Bromage NR (eds). *Intensive fish farming*. BSP Professional, Oxford, England, 94-95
- Burnett LE (1997): The challenges of living in hypoxic and hypercapnic aquatic environments. *American Zoologist* 37, 633-640
- Burnett LE, Stickle WB (2001): Physiological responses to Hypoxia. In: Rabalais NN and Turner RE (eds). *Coastal Hypoxia: Consequences for Living Resources and Ecosystems*. Coastal and Estuarine Studies 58. American Geophysical Union, Washington D.C., 101-114
- Cammarata M, Vazzana M (2000): Spontaneous cytotoxic activity of eosinophilic granule cells separated from the normal peritoneal cavity of *Dicentrarchus labrax*. *Fish Shellfish Immunol.* 10 (2), 143-154
- Campos M, Godson DL (2003): The effectiveness and limitations of immune memory: understanding protective immune response. *Int. J. Parasitol.* 33, 655-661
- Carballo M, Munoz MJ (1991): Effect of sublethal concentrations of four chemicals on susceptibility of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to saprolegniosis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (6), 1813-1816
- Carlson RE, Baker EP, Fuller RE (1995): Immunological assessment of hybrid striped bass at three culture temperatures. *Fish Shellfish Immunol.* 5, 359-373
- Casillas E, Smith LS (1977): Effect of stress on blood coagulation and haematology in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish Biol.* 10, 481-491
- Castillo A, Sanchez C, Dominguez J, Kaattari SL, Villena AJ (1993): Ontogeny of IgM and IgM-bearing cells in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 17, 419-424

- Chapes SK, Morrison DR, Guikema JA, Lewis ML, Spooner BS (1992): Cytokine secretion by immune cells in space. *J. Leukoc. Biol.* 52, 104-110
- Chen SC, Adams A, Thompson KD, Richards RH (1998): Electron microscope studies of the in vitro phagocytosis of *Mycobacterium* spp. by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) head kidney macrophages. *Dis. Aquat. Org.* 32, 99-110
- Chiappelli F, Franceschi C, Ottaviani E, Farne, Faisal M (1993): Phylogeny of the neuroendocrine-immune system: fish and shellfish as model systems for social interaction stress research in humans. *Annual Rev. of Fish Diseases* 3, 327-346
- Chilmonczyk S (1982): Rainbow trout lymphoid organs: cellular effects of corticosteroids and anti-thymocyte serum. *Dev. Comp. Immunol.* 6, 271-280
- Christou NV, McLean AP, Meakins JL (1980): Host defense in blunt trauma: Interrelationships of kinetics and anergy and depressed neutrophil function, nutritional status and sepsis. *J. Trauma* 20, 833-841
- Clearwater SJ, Pankhurst NW (1997): The response to capture and confinement stress of plasma cortisol, plasma sex steroids and vitellogenic oocytes in the marine teleost, red gurnard. *J. Fish Biol.* 50, 429-441
- Clem LW, Miller NW, Bly JE (1991): Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions and temperature sensitivities. In: Warr GW and Cohen N (eds). *Phylogenesis of Immune Functions*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 191-213
- Cogoli A, Bechler B, Cogoli-Greuter M, Criswell SB, Joller H, Joller P, Hunzinger E, Müller O (1993): Mitogenic signal transduction in t lymphocytes in microgravity. *J. Leukoc. Biol.* 53, 569-575
- Cogoli A, Bechler B, Müller O, Hunzinger E (1988): Effect of microgravity on lymphocyte activation. In: Longdon N and David V (eds). *Biorack on Spacelab D-1*. ESA Publications Division, ESTEC Noordwijk, 89-100
- Cogoli A, Tschopp A (1985): Lymphocyte reactivity during spaceflight. *Immunology Today* 6, 1-4
- Cogoli A, Tschopp A, Fuchs-Bislin P (1984): Cell sensitivity to gravity. *Science* 225, 228-230
- Collazos ME, Ortega E, Barriga C (1994): Effect of temperature on the immune system of a cyprinid fish (*Tinca tinca*, L). Blood phagocyte function at low temperatures. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 231-238
- Cone DK, Wiles M (1985): Trophozoid morphology and development site of two species of *Myxobolus* (Myxozoa) parasitizing *Catostomus commersoni* and *Notemigonus crysoleucas* in atlantic Canada. *Can. J. Zool.* 63, 123-128
- Cooper EL (1990): *Comparative Immunology*. Bioscience 40, 720-768

- Cooper EL, Parinello N (1996): Comparative immunologic models can enhance analyses of environmental immunotoxicity. *Annual Rev. of Fish Diseases* 6, 179-191
- Cooper EL, Peters G, Ahmed II, Faisal M, Ghoneum M (1988): Aggression in *Tilapia* affects immunocompetent leucocytes. *Aggres. Behav.* 15, 13-22
- Cuesta A, Angeles Esteban M (1999): Natural cytotoxic activity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes. Assessment of flow cytometry and microscopy. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 71, 3-4
- Dannevig BH, Lauve A, McL. Press C, Landsverk T (1994): Receptor mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 3-18
- Demers NE, Bayne CJ (1997): The immediate effects of stress on hormones and plasma lysozyme in rainbow trout. *Dev. Comp. Immunol.* 21, 363-373
- Dexiang C, Ainsworth AJ (1991): Effect of temperature on the immun system of channel catfish (*Ictalurus punctatus*). II. Adaption of anterior kidney phagocytes to 10 °C. *Comp. Biochem. Physiol.* 100A No. 4, 913-918
- Dheer JMS (1988): Haematological, haematopoietic and biochemical responses to thermal stress in an air-breathing freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch. *J. Fish Biol.* 32, 197-206
- Dijkstra JM, Fischer U, Sawamoto Y, Ototake M, Nakanishi T (2001): Exogenous antigens and the stimulation of MHC class I restricted cell-mediated cytotoxicity: possible strategies for fish vaccines. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 437-458
- Dixon B, Stet RJ (2001): The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 638-699
- Donaldson EM, Dye HM (1975): Corticosteroid concentrations in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) exposed to low concentrations of copper. *J. Fish. Res. Bd Can.* 32 (4), 533-539
- Dorin D, Sire M-F, Vernier J-M (1993): Endocytosis and intracellular degradation of heterologous protein by eosinophilic granulocytes isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) posterior intestine. *Biol. Cell* 79, 219-224
- Dumont AR, Kalfayan LH, Sekaly RP (2004): Modulation of immune responses - strategies for optimising vaccines. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 4, 627-630
- Dunn SE, Murad A, Houston AH (1989): Leucocytes and leucopoietic capacity in thermally acclimated goldfish, *Carassius auratus* L.. *J. Fish Biol.* 34, 901-911
- Durborow RM, Crosby DM, Brunson MW (1997): Ammonia in fish ponds. Southern Regional Aquaculture Center (USA) SRAC Publication No. 463

- Eggset G, Mikkelsen H, Killie J-EA (1997): Immunocompetence and duration of immunity against *Vibrio salmonicida* and *Aeromonas salmonicida* after vaccination of atlantic salmon (*Salmo salar* L.) at low and high temperatures. *Fish Shellfish Immunol.* 7, 247-260
- Ejike C, Schreck CB (1980): Stress and social hierarchy rank in coho salmon. *Trans Am. Fish Soc.* 104, 423-426
- Ellis AE (1986): The function of teleost fish lymphocytes in relation to inflammation. *J. Tiss. React.* 8, 263-270
- Ellis AE (2001): Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 827-39
- Ellsaesser CF, Clem LW (1986): Haematological and immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. *J. Fish Biol.* 28, 511-521
- Ellsaesser CF, Clem LW (1987): Cortisol-induced hematologic and immunologic changes in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 87A, 405-408
- Emerson K, Russo RC, Lund RE, Thurston RV (1975): Aqueous ammonia equilibrium calculations: effect of pH and temperature. *Journal of Fisheries Research Board of Canada* 32, 2379-2383
- Faisal M, Chiappelli F, Ahmed I, Cooper EL, Weiner H (1990): Social confrontation in aggressive fish is associated with an endogenous opioid-mediated suppression of proliferative responses to mitogens and non-specific cytotoxicity. *Brain Behav. Immunity* 3, 223-233
- Finco-Kent D, Thune RL (1987): Phagocytosis by catfish neutrophils. *J. Fish Biol.* 31 (Suppl. A), 41-49
- Fleming SD, Edelman LS, Chapes SK (1991): Effects of corticosterone and microgravity on inflammatory cell production of superoxide. *J. Leukoc. Biol.* 50, 69-76
- Gernhöfer M, Pawert M, Schramm M, Müller E, Triebkorn R (2001): Ultrastructural biomarkers as tools to characterize the health status of fish in contaminated streams. *Journal of Aquatic Ecosystem Stress and Recovery* 8, 241-260
- Gerwick L, Steinhauer R, Lapatra S, Sandell T, Ortuno J, Hajiseyedjavadi N, Bayne CJ (2002): The acute phase response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) plasma proteins to viral, bacterial and fungal inflammatory agents. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 229-242
- Ghoneum M, Faisal M, Peters G, Ahmed II, Cooper EL (1988): Suppression of natural cytotoxic cell activity by social aggressiveness in *Tilapia*. *Dev. Comp. Immunol.* 12, 595-602

- Goerlich R, Hamers R (1994): Immunological research of accessory and immunoreactive cells from head kidney and spleen of *Xiphophorus helleri* under space flight conditions. In: Bräucker R (ed). Proceedings of the C.E.B.A.S. Workshops. Bochum, Germany, 55-60
- Goerlich R, Hamers R (1996): The effect of water temperature to the immune system of *Xiphophorus helleri*: Results of the six test runs of the C.E.B.A.S. Minimodule. In: Bräucker R (ed). Proceedings of the C.E.B.A.S. Workshops. Bochum, Germany, 99-107
- Goerlich R, Piepenbreier K (2000): Immunologische Untersuchungen akzessorischer und immunkompetenter Zellen der Niere und hämatologische Untersuchungen von *Xiphophorus helleri* unter  $\mu$ g-Bedingungen. In: Keller MH and Sahm PR (eds). Bilanzsymposium Forschung unter Weltraumbedingungen, 21.-23. September 1998 Norderney. Wissenschaftliche Projektführung RWTH Aachen, 581-589
- Göhde W, Dittrich W (1969): Impulsfluorometrie - ein neuartiges Durchflußverfahren zur ultraschnellen Mengenbestimmung von Zellinhaltsstoffen. Gesellschaft für Histochemie XIII, Graz
- Göhde W, Schumann J, Zante J (1978): The use of DAPI in pulse cytophotometry. In: Lutz D (ed). Pulse Cytophotometry. European Press, Ghent, Belgium
- Graham S, Secombes CJ (1988): The production of a macrophage-activating factor from rainbow trout, *Salmo gairdneri*, leucocytes. *Immunology* 65, 293-297
- Graham S, Secombes CJ (1990): Cellular requirements for lymphokine secretion by rainbow trout *Salmo gairdneri* leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 14, 59-68
- Griffin BR (1984): Random and direct migration of trout (*Salmo gairdneri*) leukocytes: Activation by antibody, complement, and normal serum components. *Dev. Comp. Immunol.* 8, 589-597
- Griffin JFT (1989): Stress and Immunity: a unifying concept. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 20, 263-312
- Groberg WJ, Rohovec JS, Fryer JL (1983): The effects of water temperature on infection and antibody formation induced by *Vibrio anguillarum* in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of the World Mariculture Society* 14, 240-248
- Hallmann L (1980): *Klinische Chemie und Mikroskopie*. 11. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Hamers R (1994): Untersuchungen zur Hämatologie und Immunologie des Karpfens (*Cyprinus carpio* L.) bei Infektionen durch Blutflagellaten. Dissertation, Ruhr-University Bochum
- Hamers R, Goerlich R (1995): Accessory and immunoreactive cells in the kidney of *Xiphophorus helleri*: DNA-analysis and kinetics of phagocytotic ability of granulocytes and monocytes under *in vitro* conditions. In: Bräucker R (ed). Proceedings of the C.E.B.A.S. Workshops. Bochum, Germany, 123-132

- Hamers R, Lehmann J, Schütt D-A, Goerlich R (1997): Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. II: cellular composition and isolation of blood cells from kidney of *Xiphophorus helleri*. J. Appl. Ichthyol. 13, 91-96
- Hansen JD, La Patra S (2002): Induction of rainbow trout MHC class I pathway during acute IHNV infection. Immunogenetics 54, 654-661
- Hansen JD, Strassburger P (2000): Description of an ectothermic TCR coreceptor, CD8 alfa in rainbow trout. The journal of immunology 164, 3132-3139
- Hansen JD, Zapata AG (1998): Lymphocyte development in fish and amphibians. Immunol. Rev. 166, 199-220
- Hardie LJ, Fletcher TC, Secombes CJ (1994): Effect of temperature on macrophage activation and the production of macrophage activating factor by rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. Dev. Comp. Immunol. 18, 57-66
- Hart S, Wrathmell AB, Harris JE, Garyson TH (1988): Gut immunology in fish: a review. Dev. Comp. Immunol. 12, 453-480
- Hawkins WR, Ziegleschmid JF (1975): Clinical aspects of crew health. In: Jhonston L, Dietlein and Berry C (eds). Biomedical results of Apollo (NASA SP 368). Washington, DC: NASA, 43-81
- Hayman JR, Bly JE, Levine RP, Lobb CJ (1992): Complement deficiencies in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) associated with temperature and seasonal mortality. Fish Shellfish Immunol. 2, 183-192
- Hickey CR (1976): Fish hematology, its use and significance. N. Y. Fish Game J. 23 (2), 170-175
- Hirono I, Nam BH, Enomoto J, Uchino K, Aoki T (2003): Cloning and characterisation of a cDNA encoding Japanese flounder *Paralichthys*. Fish Shellfish Immunol. 15, 63-70
- Holland MC, Lambris JD (2002): The complement system in teleosts. Fish Shellfish Immunol. 12, 399-420
- Hrubec TC, Robertson JL, Smith SA (1997a): Effects of ammonia and nitrate concentration on hematologic and serum biochemical profiles of hybrid striped bass (*Morone chrysops* \* *Morone saxatilis*). AJVR 58, No. 2, 131-135
- Hrubec TC, Robertson JL, Smith SA (1997b): Effects of temperature on hematologic and serum biochemical profiles of hybrid striped bass (*Morone chrysops* x *Morone saxatilis*). AJVR 58, No. 2, 126-130
- Hrubec TC, Robertson JL, Smith SA, Tinker MK (1996): The effect of temperature and water quality on antibody response to *Aeromonas salmonicida* in sunshine bass (*Morone chrysops* \* *Morone saxatilis*). Veterinary Immunology and Immunopathology 50, 157-166



- Huey DW, Beitinger TL, Wooten MC (1984): Nitrite-induced methemoglobin formation and recovery in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) at three acclimation temperatures. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 32, 674-681
- Huizinga HW (1980): Antiparasitic mechanisms of the eosinophilic leucocyte of the goldfish. *Am. Zool.* 20, 795
- Hunt TC, Rowley AF (1986): Studies on the reticulo-endothelial system of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*. Endocytic activity of fixed cells in the gills and peripheral blood leucocytes. *Cell Tissue Res.* 244, 215-226
- Ichiki AT, Gibson LA, Jago KM, Strickland KM, Jhonson DL, Lange RD, Alleban Z (1996): Effects of spaceflight on rat peripheral blood leukocytes and bone marrow progenitor cells. *J. Leukoc. Biol.* 60, 37-43
- Ingram GA (1998): Nonspecific immunity. In: Pastoret P-P, Griebel P, Bazin H and Govaerts A (eds). *Handbook of vertebrate immunology*. Academic press, London, England, 31-35
- Ishimoto Y, Savan R, Endo M, Sakai M (2004): Non-specific cytotoxic cell receptor (NCCRP)-1 type gene in tilapia (*Oreochromis niloticus*): its cloning and analysis. *Fish Shellfish Immunol.* 16, 163-172
- Iwama GK, Greer GL, Larkin PA (1976): Changes in some hematological characteristics of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in response to acute exposure to dehydroabietic acide (DHAA) at different exercise levels. *J. Fish. Res. Bd Can.* 33, 285-289
- Johannson-Sjöbeck M-L, Dave G, Larsson A, Lewander K, Lidman U (1978): Hematological effects of cortisol in the European eel, *Anguilla anguilla* L.. *Com. Biochem. Physiol.* 60 A, 165-168
- Kaattari S, Piganelli JD (1996): The specific immune system: Humoral defenses. In: Iwama G and Nakanishi T (eds). *The Fish Immune System*. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 207-254
- Keller R (1994): *Immunologie und Immunpathologie*. 4. neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- Kelly D, Wolters WR, Jaynes JM (1990): Effect of lytic peptides on selected fish bacterial pathogens. *J. Fish Dis.* 13, 317-321
- Kimzey SL, Johnson PC, Ritzman SE, Mengel CE (1976): Hematology and Immunology Studies: The Second Manned Skylab Mission. *Aviat. Space Environ. Med.* 47 (4), 383-390
- Kindle KR, Whitmore DH (1986): Biochemical indicators of thermal stress in *Tilapia aurea* (Steindachner). *J. Fish Biol.* 29, 243-255

- Klinger H, Delventhal H, Hilge V (1983): Water quality and stocking density as stressors of channel catfish (*Ictalurus punctatus* Raf.). *Aquaculture* 30, 263-272
- Kodama H, Arimitzu H, Mukamoto M, Sugimoto C (1999): Enhancement of phagocytic and chemokinetic activities of rainbow trout head kidney cells by C-reactive protein. *Am. J. Vet. Res.* 60, 240-244
- Köllner B, Kotterba G (2002): Temperature dependent activation of leucocyte populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, after intraperitoneal immunisation with *Aeromonas salmonicida*. *Fish Shellfish Immunol.* 12, 35-48
- Köllner B, Wasserrab B, Kotterba G, Fischer U (2002): Evaluation of immune functions of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) - How can environmental influences be detected? *Toxicology Letters* 131, 83-95
- Konstantinova IV, Rykova MP, Lesnyak AT, Antropova EA (1993): Immune changes during long-duration missions. *J. Leukoc. Biol.* 54, 189-201
- Kurata O, Okamoto N, Ikeda Y (1995): Neutrophilic granulocytes in carp, *Cyprinus carpio*, possess a spontaneous cytotoxic activity. *Dev. Comp. Immunol.* 19, 315-325
- Kurata O, Okamoto N, Ikeda Y (1997): Adaptability of carp neutrophilic granulocytes to environmental temperatures: spontaneous cytotoxic activity and cell-adherent activity. *Fish Shellfish Immunol.* 7, 585-593
- Kurogi J, Iida T (1999): Social stress suppresses defense activities of neutrophils in tilapia. *Fish Pathology* 34 (1), 15-18
- Kusuda R, Ikeda Y (1987): Studies on classification of eel leucocytes. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 53, 205-209
- Lamas J, Bruno DW, Santos Y, Anadon R, Ellis AE (1991): Eosinophilic granular cell response to intraperitoneal injection with *Vibrio anguillarum* and its extracellular products in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Shellfish Immunol.* 1, 187-194
- Lamers CHJ, De Haas MJH (1985): Antigen localization in the lymphoid organs of carp (*Cyprinus carpio*). *Cell Tissue Res.* 242, 491-498
- Lange S, Bambir S, Dodds AW, Magnadottir B (2004): An immunohistochemical study on complement component C3 in juvenile Atlantic haddock (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 28, 593-601
- Langston AL, Hoare R, Stefansson M, Fitzgerald R, Wergeland H, Mulcahy M (2002): The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic haddock (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 12, 61-76
- Le Morvan C, Clerton P, Deschaux P, Troutaud D (1997): Effects of temperature on macrophage activities in carp. *Fish Shellfish Immunol.* 7, 209-212

- Le Morvan C, Deschaux P, Troutaud D (1996): Effects and mechanisms of environmental temperature on carp (*Cyprinus carpio*) anti-DNP antibody response and non-specific cytotoxic cell activity: a kinetic study. *Dev. Comp. Immunol.* 20, 331-340
- Leach CS (1992): Biochemical and hematological changes after short-term spaceflight. *Microgravity Q.* 2, 69-75
- Lehmann J, Stürenberg F-J (1974): Hämatologisch-serologische Substratuntersuchungen an der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Richardson), I. Methodik zur Blutuntersuchung bei Fischen. *Gewässer und Abwässer* 53/54, 114-132
- Lehmann J, Stürenberg F-J (1976): Haematologisch-serologische Substratuntersuchungen an der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri* Richardson), III. Normwerte des Haemogramms unter Berücksichtigung alters- und jahreszeitlich bedingter Schwankungen. *Gewässer und Abwässer* 59
- Lehmann J, Stürenberg F-J, Mock D (1987): The changes of the haemogramm of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) to an artificial and a natural infection with *Yersinia ruckeri*. *J. Appl. Ichthyol.* 3, 174-183
- Leiro J, Siso MIG, Ortega M, Santamarina MT, Sanmartin ML (1995): A factorial experimental design for investigation of the effects of temperature, incubation time and pathogen-to-phagocyte ratio on in vitro phagocytosis by turbot adherent cells. *Comp. Biochem. Physiol.* 112C, 215-220
- Leong JC, Anderson E, Bootland LM, Chiou PW, Jhonson M, Kim C, Mourich D, Trobridge G (1997): Fish vaccine antigens produced or delivered by recombinant DNA technologies. *Dev. Biol. Stand.* 90, 267-277
- Lester RJG, Budd J (1979): Some changes in the blood cells of diseased coho salmon. *Can. J. Zool.* 57, 1458-1464
- Limouse M, Manie S, Konstantinova I, Ferrua B, Schaffar L (1991): Inhibition of phorbol ester-induced cell activation in microgravity. *Exp. Cell Res.* 197, 82-86
- Magnadottir B, Jonsdottir H, Helgason S, Bjornsson B, Jorgensen TO, Pilström L (1999): Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) I. The effects of environmental temperature. *Com. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 122, 173-180
- Manning MJ, Nakanishi T (1996): The specific immune system: Cellular defenses. In: Iwama G and Nakanishi T (eds). *The Fish Immune System*. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 159-205
- Mathews ES, Warinner JE, Weeks BA (1990): Assays of immune functions in fish macrophages. In: Stolen JS, Fletcher TC, Anderson DP, Roberson BS and Van Muiswinkel WB (eds). *Techniques in Fish Immunology*. Fair Haven, Netherlands, 155-163

- Matsuyama T, Iida T (1999): Degranulation of eosinophilic granular cells with possible involvement in neutrophil migration to site of inflammation in tilapia. *Dev. Comp. Immunol.* 23, 451-457
- Matsuyama T, Kurogi J, Iida T (2000): Inhibitory effect of cortisol on the degranulation of eosinophilic granular cells in tilapia. *Fish Pathology* 35 (2), 61-65
- Maule AG, Tripp RA, Kaattari SL, Schreck CB (1989): Stress alters immune function and disease resistance in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Endocrinology* 120, 135-142
- McDowall RM (1990): New Zealand freshwater fishes. A natural history and guide. Hinemann Reed, Auckland
- McKim JM (1966): Stress hormone metabolites and their fluctuations in the urine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) under the influence of various sub-lethal stressors. Ph.D. Thesis, University of Michigan
- McKim JM, III, Cristensen GM, Hunt EP (1970): Changes in the blood of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) after short-term and long-term exposure to copper. *J. Fish. Res. Bd Can.* 27, 1883-1889
- McLeay DJ (1975): Variations in the pituitary-interrenal axis and the abundance of circulating blood-cell types in juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during stream residence. *Can. J. Zool.* 53, 1882-1891
- McLeay DJ (1977): Development of blood sugar bioassay for rapidly measuring stressful levels of pulpmill effluent to salmonid fish. *J. Fish. Res. Bd Can.* 34, 477-485
- Meehan RT, Neale LS, Kraus ET, Stuart CA, Smith ML, Cintron NM, Sams CF (1992): Alteration in human mononuclear leukocytes following spaceflight. *Immunology* 76, 491-497
- Meyer FP (1970): Seasonal fluctuations in the incidence of disease on fish farms. American Fisheries Society Special Publication 5, 21-29
- Miller NW, Rycyzyn MA, Stude TB, Luft JC, Wilson MR, Bly JE, Clem LW (1994): *In Vitro* culture approaches for studying immune cell function(s) in ectothermic vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 18, Suppl. 1, 132
- Mori SG, Mitarai G (1994): Space experiment using large-sized fish: in case of carp in Spacelab-J mission. *Acta Astronaut.* 33, 41-47
- Mosconi G, Polzonetti-Magni AM, Facchinetti F (1998): Acetyl salmon endorphin-like interrenal stress response in male gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Neuroendocrinology* 68, 129-134
- Nakanishi T (1986): Seasonal changes in the humoral immune response and the lymphoid tissues of the marine teleost, *Sebasticus marmoratus*. In: Stolon JS, Anderson DP and Van Muiswinkel WB (eds). *Fish immunology*. Elsevier, Amsterdam, 213-221

- Nakanishi T (1994): The graft-versus-host reaction in teleost. *Dev. Comp. Immunol.* 18, xvi-xvii
- Nakanishi T (2003): Immunological control of fish diseases <http://www.soi.wide.ad.jp/class/20030032/slides/05/1.html>
- Nakanishi T, Aoyagi K, Xia C, Dijkstra JM, Ototake M (1999): Specific cell-mediated immunity in fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 72, 101-109
- Nakanishi T, Fischer U, Dijkstra JM, Hasegawa S, Somamoto T, Okamoto N, Ototake M (2002): Cytotoxic T cell function in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 26, 131-139
- Nakanishi Y, Kodama H, Murai T, Mikami T, Izawa H (1991): Activation of rainbow trout complement by C-reactive protein. *Am. J. Vet. Res.* 52, 397-401
- Nakao M, Yano T (1998): Structural and functional identification of complement components of the bony fish, carp (*Cyprinus carpio*). *Immunol. Rev.* 166, 27-38
- Narnaware YK, Baker BI (1996): Evidence that cortisol may protect against the immediate effects of stress on circulating leukocytes in the trout. *Gen. Comp. Endocrinol.* 103 (3), 359-366
- Neumann NF, Stafford JL, Barreda D, Ainsworth AJ, Belosevic M (2001): Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Dev. Comp. Immunol.* 25, 807-825
- Nevid NJ, Meier AH (1993): A day-night rhythm of immune activity during scale allograft rejection in the gulf killifish, *Fundulus grandis*. *Dev. Comp. Immunol.* 17, 221-228
- Newton RA, Raftos DA, Raison RL, Geczy CL (1994): Chemotactic responses of hagfish (Vertebrata, Agnatha) leucocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 18, 295-303
- Nicholson LC, Woods LC, Woiwode JG (1990): Intensive culture techniques for the striped bass and its hybrids. In: Harrel RM, Kerby JH and Minton RV (eds). *Culture and propagation of striped bass and its hybrids*. American Fisheries Society, Bethesda, Md, 141-158
- Nieber F (1988): Unspezifische und spezifische Abwehrmechanismen der Fische im Vergleich zu Warmblütern Hannover: Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen und Fachbereich für Fischkrankheiten und Fischhaltung der Tierärztlichen Hochschule Hannover
- Nikinmaa M, Solvio A (1982): Blood oxygen transport of hypoxic *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.* 219, 173-178
- Nonaka M, Smith SL (2000): Complement system of bony and cartilaginous fish. *Fish Shellfish Immunol.* 10, 215-228

- Ogasawara T, Hirano T (1984): Effects of prolactin and environmental calcium on osmotic water permeability of the gills in the Eel, *Anguilla japonica*. *General and Comparative Endocrinology* 53, 315-324
- Ogawa M (1974): The effects of bovine prolactin, sea water and environmental calcium on water influx in isolated gills of the euryhaline teleosts *Anguilla japonica* and *Salmo gairdneri*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 49 A, 545-553
- Ortuno J, Esteban MA, Meseguer J (2001): Effect of short-term crowding stress on the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response. *Fish Shellfish Immunol.* 11, 187-197
- Otto FJ, Liedl TM (1994): Durchflußzytometrische DNA-Analyse. In: Schmitz G and Rothe G (eds). *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Schattauer, Stuttgart, New York, 259-268
- Partula S, de Guerra A, Fellah JS, Charlemagne J (1995a): Structure and diversity of the T-cell antigen receptor  $\beta$ -chain in a teleost fish. *J. Immunol.* 155, 699-706
- Partula S, de Guerra A, Fellah JS, Charlemagne J (1995b): Identification and analysis of genes encoding TcRa chains in the rainbow trout. *The Nordic Symposium on Fish Immunology*, Reykjavik, Iceland, p. 53
- Partula S, Fellah JS, de Guerra A, Charlemagne J (1994): Identification of cDNA clones encoding the t-cell receptor  $\beta$ -chain in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *C. R. Acad. Sci. Paris Life Sci.* 317, 765-770
- Peters G, Delventhal H, Klinger H (1980): Physiological and morphological effects of social stress in the eel (*Anguilla anguilla* L.). *Arch. Fisch. Wiss.* 30 (2/3), 157-180
- Peters G, Faisal M, Lang T, Ahmed II (1988): Stress caused by social interaction and its effect on susceptibility of *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Dis. Aquat. Org.* 4, 83-89
- Peters G, Nüßgen A, Raabe A, Möck A (1991): Social stress induces structural and functional alterations of phagocytes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol.* 1, 17-31
- Peters G, Schwarzer R (1985): Changes in the hemopoietic tissue of rainbow trout under influence of stress. *Dis. Aquat. Org.* 1, 1-10
- Pettitt TR, Rowley AF, Barrow SE, Mallet AI, Secombes CJ (1991): Synthesis of lipoxins and other lipoxigenase products by macrophages from the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Biol. Chem.* 266, 8720-8726
- Pettitt TR, Rowley AF, Secombes CJ (1989): Lipoxins are major lipoxigenase products of rainbow trout macrophages. *FEBS Letters* 259, 168-170
- Pickering AD (1981): *Stress in fish*. Academic Press, New York, NY

- Pickering AD (1984): Cortisol-induced lymphocytopenia in brown trout, *Salmo trutta* L.. General Compendium of Endocrinology 53, 252-259
- Pickering AD (1998): Stress responses of farmed fish. In: Black KD and Pickering AD (eds). Biology of farmed fish. Sheffield Academic Press, Sheffield, 222-255
- Pickering AD, Duston J (1983): Administration of cortisol to brown trout, *Salmo trutta* (L.), and its effect on the susceptibility to *Saprolegnia* infection and furunculosis. J. Fish Biol. 23, 163-175
- Pickford GE, Srivastava AK, Slicher AM, Pang PKT (1971a): The stress response in the abundance of circulating leucocytes in the killifish *Fundulus heteroclitus*. I. The cold-shock sequence and the effects of hypophysectomy. J. exp. Zool. 177, 89-96
- Pickford GE, Srivastava AK, Slicher AM, Pang PKT (1971b): The stress response in the abundance of circulating leucocytes in the killifish *Fundulus heteroclitus*. II. The role of catecholamines. J. exp. Zool. 177, 97-108
- Pickford GE, Srivastava AK, Slicher AM, Pang PKT (1971c): The stress response in the abundance of circulating leucocytes in the killifish *Fundulus heteroclitus*. III. The role of the adrenal cortex and a concluding discussion of the leucocyte-stress syndrome. J. exp. Zool. 177, 109-107
- Plumb JA, Grizzle JM, Defigueiredo J (1976): Necrosis and bacterial infection in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) following hypoxia. Journal of Wildlife Disease 12, 247-253
- Potts WTW, Flemming WR (1970): The effects of prolactin and divalent irons on the permeability to water of *fundulus kansae*. J. Exp. Biol. 53, 317-327
- Powell MD, Briand HA, Wright GM, Burka JF (1993): Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) intestinal eosinophilic granule cell (EGC) response to *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio anguillarum* extracellular products. Fish Shellfish Immunol. 3, 279-289
- Press CM, Evensen O (1999): The morphology of the immune system in teleost fishes. Fish Shellfish Immunol. 9, 309-318
- Pschyrembel W (1994): Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. 257. Auflage, de Gruyter, Berlin, New York
- Rees BB, Sudradjad FA, W LJ (2001): Acclimatisation to hypoxia increases survival time of zebrafish, *Danio rerio*, during lethal hypoxia. J. Exp. Zool. 289, 266-272
- Reite OB (1998): Mast cells/eosinophilic granule cells of teleostean fish: A review focusing on staining properties and functional responses. Fish Shellfish Immunol. 8, 489-513

- Rombout J, Taverne-Thiele A, Villena MI (1993): The gut-associated lymphoid tissue (GALT) of carp (*Cyprinus carpio* L.): an immunohistochemical analysis. *Dev. Comp. Immunol.* 17, 55-66
- Rombout JHWM, van den Berg AA (1989): Immunological importance of the second gut segment of carp. I. Uptake and processing of antigens by epithelial cells and macrophages. *J. Fish Biol.* 35, 13-22
- Rottlant J, Tort L (1997): Cortisol and glucose responses after acute stress by net handling in the sparid red porgy previously subjected to crowding stress. *J. Fish Biol.* 51, 21-28
- Rowley AF (1991): Eicosanoids: Aspect of their structure, function and evolution. In: Warr GW and Cohen N (eds). *Phylogenesis of Immune Function*. CRC Press, Boca Raton, FL, 269-294
- Rowley AF, Hunt TC, Page M, Mainwaring G (1988): Fish. In: Rowley AF and Ratcliffe NA (eds). *Vertebrate blood cells*. Cambridge University Press, Cambridge, 19-127
- Ruffier PJ, Boyle WC, Kleinschmidt J (1981): Short-term acute bioassays to evaluate ammonia toxicity and effluent standards. *J. Water Pollut. Conserv. Fed.* 53, 367-377
- Ruis MAW, Bayne CJ (1997): Effects of acute stress on blood clotting and yeast killing by Phagocytes of rainbow trout. *Journal of Aquatic Animal Health* 9, 190-195
- Sachs L (1999): *Angewandte Statistik, Anwendung statistischer Methoden*. Springer-Verlag, 3-540-65371-6, Berlin, Heidelberg, New York
- Schmitz G, Rothe G (1994): *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Schattauer, Stuttgart, New York
- Schreck CB (1996): Immunomodulation: Endogenous factors. In: Iwama G and Nakanishi T (eds). *The Fish Immune System*. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 311-337
- Schütt D-A (1994): *Blutzellen und hämatopoetisches Gewebe bei Xiphophorus helleri*. Diplomarbeit, Ruhr-Universität Bochum, Germany
- Schütt D-A, Lehmann J, Goerlich R, Hamers R (1997): Haematology of swordtail, *Xiphophorus helleri*. I: blood parameters and light microscopy of blood cells. *J. Appl. Ichthyol.* 13, 83-89
- Scott A, Klessius PH (1981): Chemiluminescence: a novel analysis of phagocytosis in fish. In: Anderson DP and Hennessen W (eds). *Developments in Biological Standardisation Vol. 49*. S. Karger, Basel, 243-256
- Secombes CJ (1991): The phylogeny of cytokines. In: Thomson AW (ed). *The Cytokine Handbook*. Academic Press, London, 387-412



- Secombes CJ (1996): The non specific immune system: Cellular defenses. In: Iwama G and Nakanishi T (eds). *The Fish Immune System*. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 63-103
- Secombes CJ, Fletcher TC (1992): The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Rev. of Fish Diseases* 2, 53-71
- Selye H (1950a): *The Physiology and Pathology of Exposure to Stress*. Medical Publishers, Inc., Montreal
- Selye H (1950b): Stress and the general adaptation syndrome. *Br. Med. J.* 1, 1383-1392
- Selye H (1956): *The Stress of Life*. McGraw-Hill 1956, New York
- Selye H (1976): *Stress in health and disease*. Butterworth, Boston, MA
- Sharp GJE, Pike AW, Secombes CJ (1991): Leucocyte migration in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum): Optimization of migration conditions and responses to host and pathogen (*Diphyllbothrium dendriticum* Nitzsch) derived chemoattractants. *Dev. Comp. Immunol.* 15, 295-305
- Silbergeld EK (1974): Blood glucose: a sensitive indicator of environmental stress in fish. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 11 (1), 20-25
- Sinderman CJ (1990): *Principle diseases of marine fish and shellfish*. Academic Press, Inc., San Diego, CA
- Siwicki A, Studnicka M, Ryka B (1985): Phagocytic ability of neutrophils in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bamidgeh.* 37, 123-128
- Slenzka K (1998): The Development of an Artificial Ecosystem 1st Step towards a "Biological Experimentation Facility-BEF". *Proceeding of the 1st Pan-Pacific-Basin Workshop on Microgravity Sciences*, Tokyo, Japan
- Slenzka K (1999): The C.E.B.A.S.-Minimodule-Development, Realisation and Perspectives. *SAE TECHNICAL PAPER SERIES 1999-01-1988*, 29th International Conference on Environmental Systems, Denver, Colorado
- Slicher AM (1961): Endocrinological and hematological studies in *Fundulus heteroclitus* (Linn.). *Bull. Bingham oceanogr. Coll.* 17, 3-54
- Soivio A, Oikari A (1976): Haematological effects of stress on a teleost *Esox lucius* L. *J. Fish Biol.* 8, 397-411
- Stahel WA (2000): *Statistische Datenanalyse, Eine einführung für Naturwissenschaftler*. Vieweg und Sohn Verlagsgesellschaft mbH, Braunschweig, Wiesbaden
- Steinhagen D, Jendrysek S (1994): Phagocytosis by carp granulocytes; *in vivo* and *in vitro* observations. *Fish Shellfish Immunol.* 4, 521-524

- Stenvik J, Schroder MB, Olsen K, Zapata AG, Jorgensen TO (2001): Expression of immunoglobulin heavy chain transcripts (VH-families, IgM and IgD in head kidney and spleen of the Atlantic Cod (*Gadus morhua* L.). *Dev. Comp. Immunol.* 25, 291-302
- Stickney RR (1979): Principles of warmwater aquaculture. Wiley, New York
- Stowe RP, Sams CF, Mehta SK, Kaur I, Jones ML, Feedback DL, Pierson DL (1999): Leucocyte subsets and neutrophil function after short-term spaceflight. *J. Leukoc. Biol.* 65, 179-186
- Strange RJ, Schreck CB (1980): Stress response to transportation and fitness for marine survival in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) smolts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 37, 765-769
- Strange RJ, Schreck CB, Golden JT (1977): Corticoid stress responses to handling and temperature in salmonids. *Transactions of the American Fisheries Society* 106, 213-218
- Suzuki K (1984): A light and electron microscope study on the phagocytosis of leucocytes in rockfish and rainbow trout (*Sebastes schlegeli*). *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 50, 1305-1315
- Swift DJ (1981): Changes in selected blood component concentrations of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, exposed to hypoxia or sublethal concentrations of phenol or ammonia. *J. Fish Biol.* 19, 45-61
- Swift DJ, Lloyd R (1974): Changes in the urine flow rate and Haematocrit value of rainbow trout *Salmo gairdneri* (Richardson) exposed of hypoxia. *J. Fish Biol.* 6, 379-387
- Tamaru CS, Cole B, Bailey R, Brown C, Ako H (December 2001): A manual for commercial production of the swordtail, *Xiphophorus helleri* Honolulu: University of Hawaii Sea Grant Extension Service, School of Ocean Earth Science and Technology, 2525 Correa Road, HIG 237, Honolulu HI 96822. CTSA Publication Number 128, 1-38
- Tatner MR (1986): The ontogeny of humoral immunity in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Vet. Immunol. Immunopath.* 12, 93-105
- Taylor GR, Dardano JR (1983): Human Cellular Immune Responsiveness Following Space Flight. *Aviat. Space Environ. Med. Supp.* 1 54 (12), 55-59
- Taylor GR, Graves R, Brockett RM, Ferguson JK, Miezuk BJ (1977): Skylab environmental and crew microbiology studies. In: Jhonson RS and Dietlein LF (eds). *Biomedical results from Skylab (NASA SP 377)*. Washington, DC: NASA, 53-62
- Taylor GR, Neale LS, Dardano JR (1986): Immunologic analysis of U.S. Space Shuttle crew members. *Aviat. Space Environ. Med.* 57, 213-217
- Taylor MJ, Hoole D (1993): *Ligula intestinalis* (L.) (Cestoda: Pseudophyllidae): Polarization of cyprinid leucocytes as an indicator of host- and parasite-derived chemoattractants. *Parasitology* 107, 433-440

- Tocher DR, Sargent JR (1987): The effect of calcium ionophore A 23187 on the metabolism of arachidonic and eicosapentaenoic acids in neutrophils from a marine teleost fish rich in (n-3) polyunsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol.* 87B, 733-739
- Tomasso JR, Davis KB, Parker NC (1981): Plasma corticosteroid dynamics in channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque), during and after oxygen depletion. *J. Fish Biol.* 18, 519-526
- Tomasso JR, Goudie CA, Simco BA, Davis KB (1980): Effects of environmental pH and calcium on ammonia toxicity in channel catfish. *Transactions of the American Fisheries Society* 109, 229-234
- Tort L, Sunyer JO, Gomez E, Molinero A (1996): Crowding stress induces changes in serum haemolytic and agglutinating activity in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 51
- Tripp RA, Maule AG, Schreck CB, Kaattari SL (1987): Cortisol-mediated suppression of salmonid lymphocyte responses in vitro. *Dev. Comp. Immunol.* 11, 565-576
- Vallejo AN, Miller NW, Clem LW (1992): Antigen processing and presentation in teleost immune response. *Annual Rev. of Fish Diseases* 2, 73-89
- Vallejo AN, Miller NW, Jorgensen T, Clem LW (1990): Phylogeny of immune recognition: Antigen processing/presentation in channel catfish immune responses to hemocyanins. *Cell. Immunol.* 130, 364-377
- Van Dilla MA, Trujillo TT, Mullaney PF, Coulter JR (1969): Cell fluorometrie: A method for rapid fluorescence measurements. *Science* 163, 1213-1214
- van Raaij MT, Pit DS (1996): Behavioral strategy and the physiological stress response in rainbow trout exposed to severe hypoxia. *Horm. Behav.* 30 (1), 85-92
- Walters GR, Plumb JA (1980): Environmental stress and bacterial infections in channel catfish, *Ictalurus punctatus* Rafinesque. *J. Fish Biol.* 17, 177-185
- Watts M, Munday BL, Burke CM (2001): Immune responses of teleost fish. *Aust. Vet. J.* 79, 570-574
- Weatherley AH (1963): Thermal stress and interrenal tissue in the perch *Perca fluviatilis* (L.). *Proc. zool. Soc. Lond.* 141, 527-555
- Wedemeyer GA (1976): Physiological response of juvenile coho salmon (*Salmo gairdneri*) to handling and crowding stress in intensive fish culture. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 33, 2699-2702
- Wedemeyer GA, Yasutake WT (1978): Prevention and treatment of nitrite in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 35, 822-827

- Weeks BA, Warinner JE (1986): Functional evaluation of macrophages in fish from a polluted estuary. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 12, 313-320
- Weeks BA, Warinner JE, Mason PL, McGinnis DS (1986): Influence of toxic chemicals on the chemotactic response of fish macrophages. *J. Fish Biol.* 28, 653-658
- Weinreb EL (1963): Studies on the fine structure of teleost blood cells. I. Peripheral blood. *Anat. Rec.* 147, 219-238
- Weirich CR, Tomasso JR, Smith TIJ (1993): Toxicity of ammonia and nitrite to sunshine bass in selected environments. *Journal of Aquatic Animal Health* 5, 64-72
- Wendelaar Bonga SE, Lowik CJM, Meij VD (1983): Effects of external  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  on brachial osmotic water permeability and prolactin secretion on the teleost fish *Sarotherodon mossambicus*. *General and Comparative Endocrinology* 52, 222-231
- Wilson M, Bengten E, Miller NW, Clem LW, Du Pasquier L, Warr GW (1997): A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94.9, 4593-4597
- Wilson MR, Warr GW (1992): Fish Immunoglobulins and the genes that encode them. *Annual Rev. of Fish Diseases* 2, 201-221
- Wise DJ, Schwedler TE, Otis DL (1993): Effects of Stress on Susceptibility of Naive Channel Catfish in Immersion Challenge with *Edwardsiella ictaluri*. *Journal of Aquatic Animal Health* 5, 92-97
- Woiwode JG, Adelman IR (1991): Effects of temperature, photoperiod, and ration size on growth of hybrid striped bass x white bass. *Trans. Am. Fish Soc.* 120, 217-229
- Wood BP, Matthews RA (1987): The immune response in the thick-lipped grey mullet, *Chelon labrosus* (Risso, 1826), to metacercarial infections of *Cryptocotyle lingua* (Creplin, 1825). *J. Fish Biol.* 31A, 175-183
- Wood SE, Willoughby LG, W BG (1986): Preliminary evidence for inhibition of *Saprolegnia* fungus in the mucus of brown trout, *Salmo trutta* L., following experimental challenge. *J. Fish Dis.* 9, 557-560
- Yano T (1996): The non specific immune system: Humoral Defense. In: Iwama G and Nakanishi T (eds). *The Fish Immune System*. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 105-157
- Yin Z, Lam TJ, Sin YM (1995): The effects of crowding stress on the non-specific immune response in fancy carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 5, 519-529
- Zapata AG (1979): Ultrastructural study of the teleost fish kidney. *Dev. Comp. Immunol.* 3, 55-65

Zapata AG, Chiba A, Varas A (1996): Cells and tissues of the immune System of fish. In: Iwama G and Nakanishi T (eds). The fish immune system. Academic Press, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto, 1-62

Zapata AG, Cooper EL (1990): The Immune System: Comparative Histophysiology. John Wiley and Sons, Chichester

Zapata AG, Varas A, Torroba M (1992): Seasonal variations in the immune system of lower vertebrates. Immunol. Today 13, 142-147

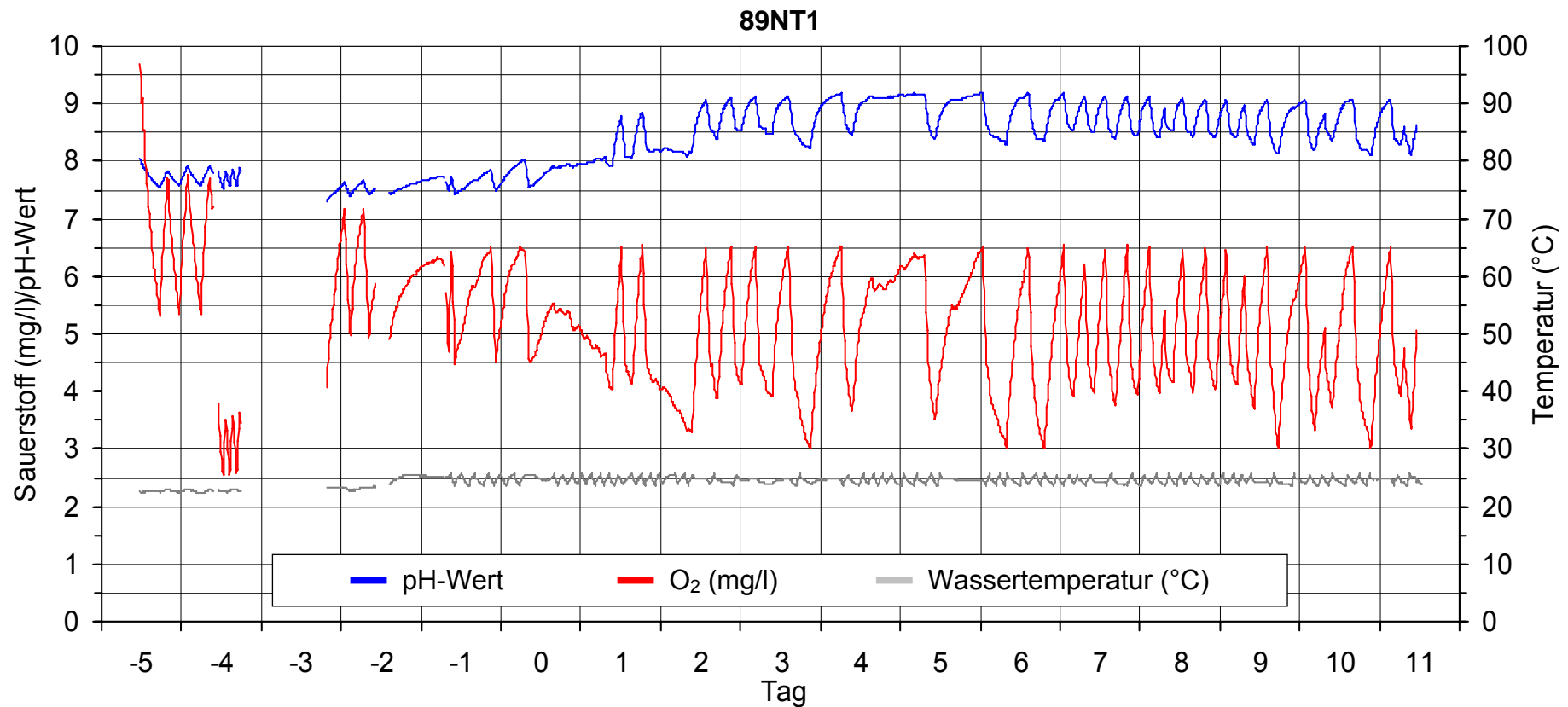
Zeeman M (1986): Modulation of the Immune response in fish. In: Stolton JS, Anderson DP and Muiswinkel WB (eds). Fish immunology. Elsevier Amsterdam, 235-241

Zelikoff JT, Enane NA, Bowser D, Sqibb KS (1990): Fish macrophage 1: Development of a system for detecting immunomodulating effects of environmental pollutants. Symposium at the Society of Environmental Toxicology and Chemistry, 11th Annual Meeting, Arlington VA, p. 86

Zhou H, Stuge TB, W MN, Bengten E, Naftel JP, Bernanke JM, Chinchar VG, Clem LW, Wilson M (2001): Heterogeneity of channel catfish CTL with respect to target recognition and cytotoxic mechanisms employed. Journal of Immunology 167

## **9 Anhang**

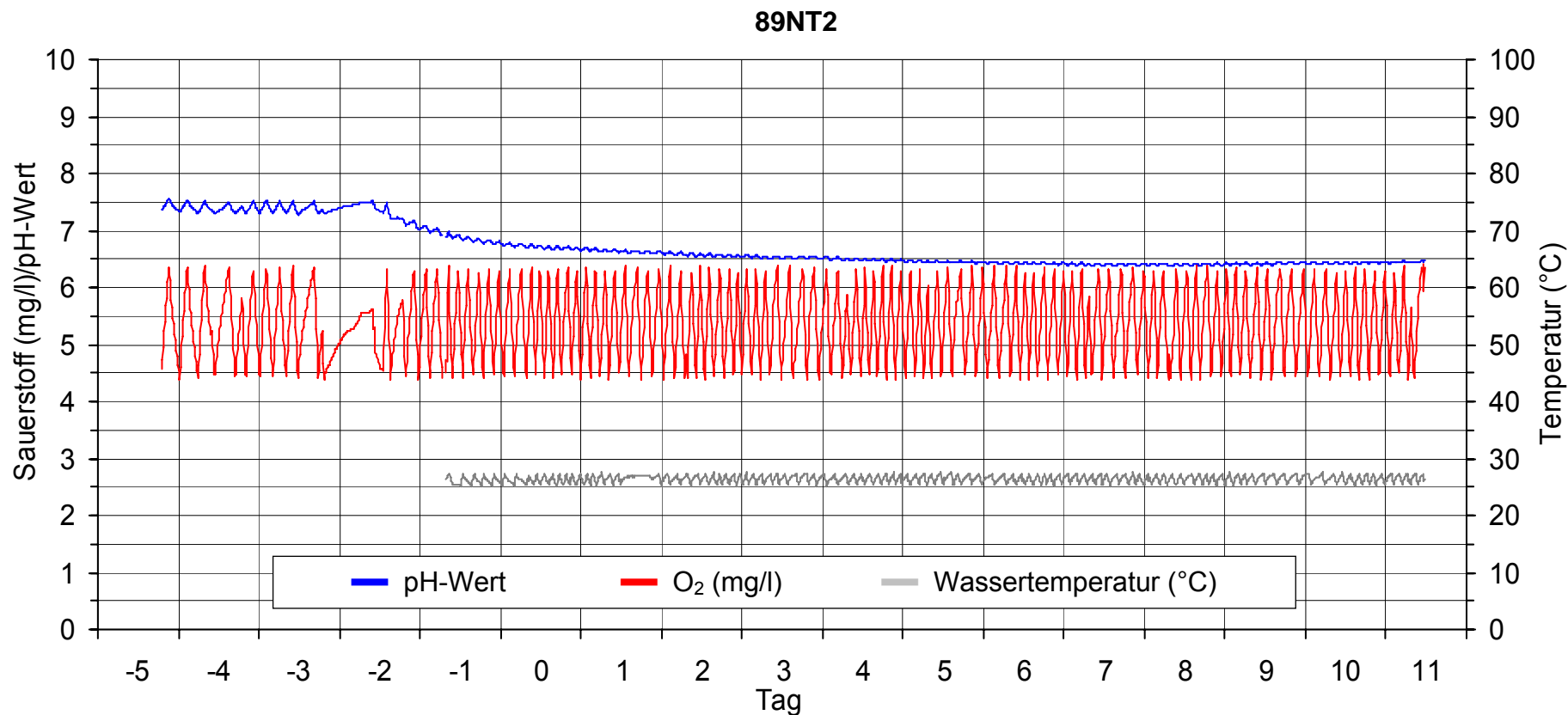
Nachfolgend sind die Housekeepingdaten der C.E.B.A.S.-Experimente wiedergegeben. Bei diesen Daten handelt es sich um die Werte der Parameter Sauerstoffkonzentration, pH-Wert und Wassertemperatur, die während der C.E.B.A.S.-Experimente in Intervallen von zehn Minuten aufgezeichnet wurden.



**Abbildung 10:** Housekeepingdaten Experiment 89NT1.

Dargestellt ist der Verlauf von pH-Wert, Sauerstoffkonzentration (O<sub>2</sub>) und Wassertemperatur über die Dauer des Experimentes. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte in Intervallen von 10 Minuten. Die x-Achse zeigt die Tage vor und nach dem eigentlichen Beginn des Experimentes (Tag 1). Die primäre y-Achse zeigt die Sauerstoffkonzentration und den pH-Wert des Wassers, die sekundäre y-Achse die Temperatur. Diesen Versuch haben vier *X. helleri* überlebt.

Tag -5 bis -1 = Teil der Adaptationsphase zur Stabilisierung des C.E.B.A.S. ausschließlich durch seine biologischen Komponenten (Bakterienfilter, Pflanzen, Schnecken, Fische), Tag 0 = Bei den Weltraumexperimenten Starttag des Space Shuttles. Bei den terrestrischen Experimenten Überbrückungstag zwischen Adaptationsphase und eigentlichem Versuchsbeginn. Tag 1 bis 11 = Dauer des Nutzlasttests (Abbildung: Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Biologie, Prof. Dr. V. Blüm; OHB-System GmbH).

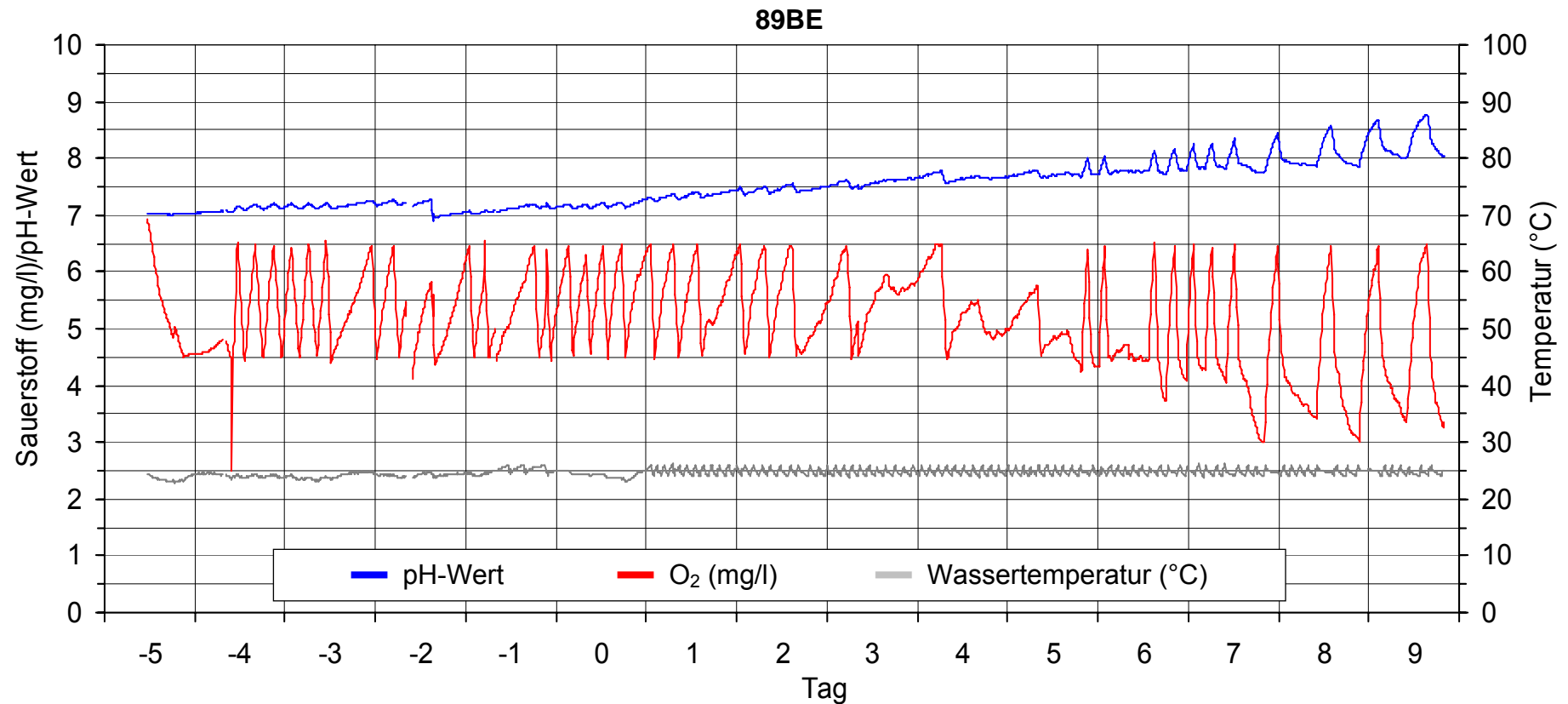


**Abbildung 11:** Housekeepingdaten Experiment 89NT2.

Dargestellt ist der Verlauf von pH-Wert, Sauerstoffkonzentration (O<sub>2</sub>) und Wassertemperatur über die Dauer des Experimentes. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte in Intervallen von 10 Minuten. Die x-Achse zeigt die Tage vor und nach dem eigentlichen Beginn des Experimentes (Tag 1). Die primäre y-Achse zeigt die Sauerstoffkonzentration und den pH-Wert des Wassers, die sekundäre y-Achse die Temperatur. Diesen Versuch haben vier *X. helleri* überlebt.

Tag -5 bis -1 = Teil der Adaptationsphase zur Stabilisierung des C.E.B.A.S. ausschließlich durch seine biologischen Komponenten (Bakterienfilter, Pflanzen, Schnecken, Fische), Tag 0 = Bei den Weltraumexperimenten Starttag des Space Shuttles. Bei den terrestrischen Experimenten Überbrückungstag zwischen Adaptationsphase und eigentlichem Versuchsbeginn. Tag 1 bis 11 = Dauer des Nutzlasttests (Abbildung: Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Biologie, Prof. Dr. V. Blüm; OHB-System GmbH).

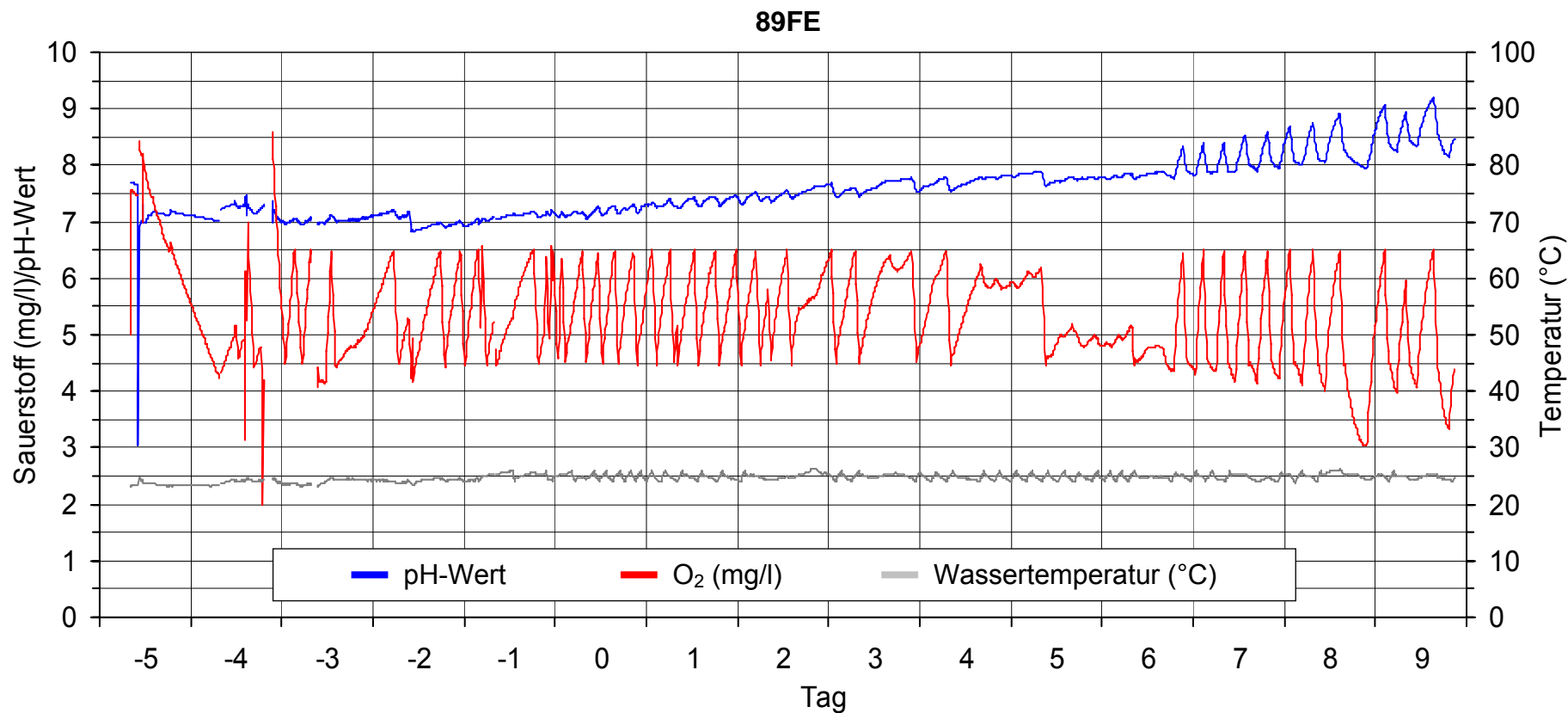




**Abbildung 12:** Housekeepingdaten Experiment 89BE.

Dargestellt ist der Verlauf von pH-Wert, Sauerstoffkonzentration (O<sub>2</sub>) und Wassertemperatur über die Dauer des Experimentes. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte in Intervallen von 10 Minuten. Die x-Achse zeigt die Tage vor und nach dem eigentlichen Beginn des Experimentes (Tag 1). Die primäre y-Achse zeigt die Sauerstoffkonzentration und den pH-Wert des Wassers, die sekundäre y-Achse die Temperatur. Diesen Versuch haben vier *X. helleri* überlebt.

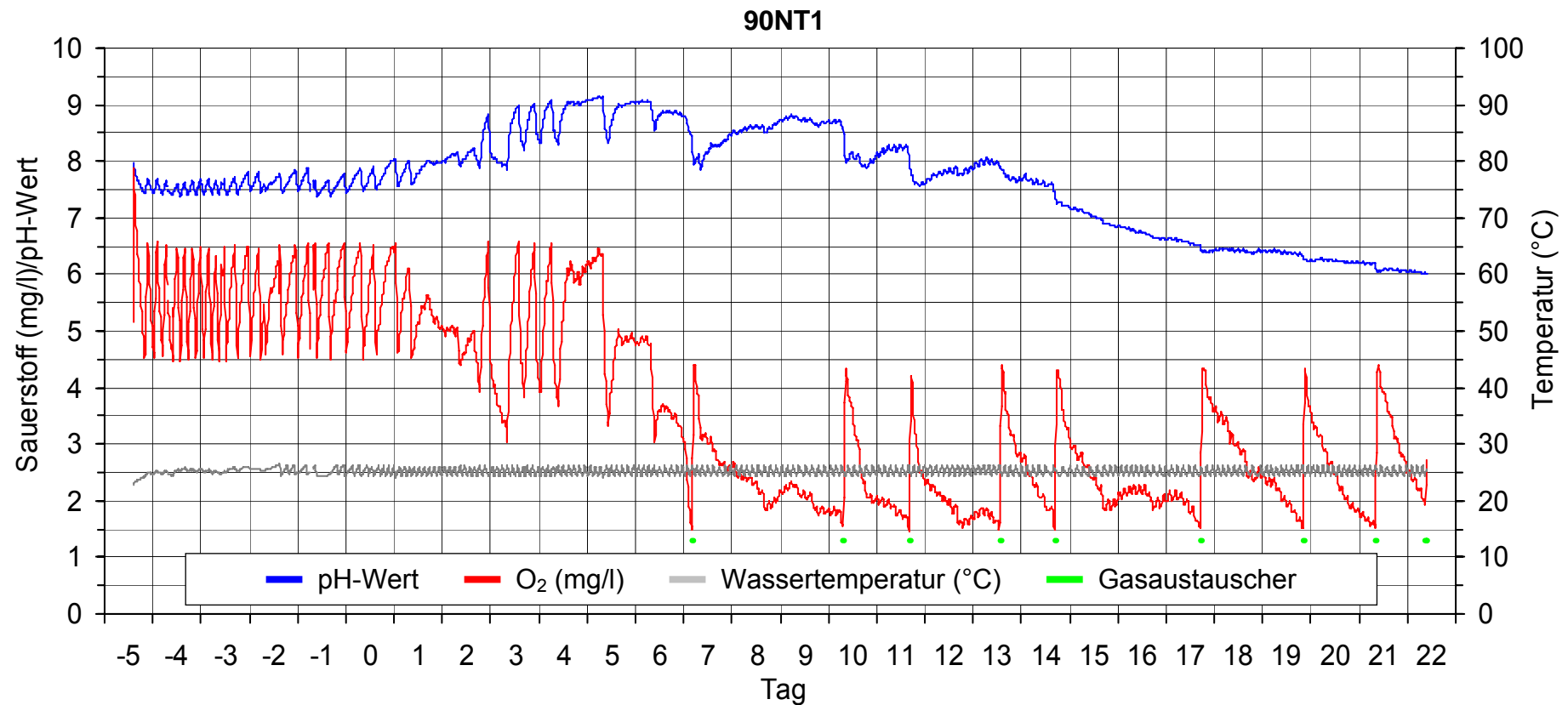
Tag -5 bis -1 = Teil der Adaptationsphase zur Stabilisierung des C.E.B.A.S. ausschließlich durch seine biologischen Komponenten (Bakterienfilter, Pflanzen, Schnecken, Fische), Tag 0 = Bei den Weltraumexperimenten Starttag des Space Shuttles. Bei den terrestrischen Experimenten Überbrückungstag zwischen Adaptationsphase und eigentlichem Versuchsbeginn. Tag 1 bis 9 = Dauer des Bodenkontrollexperimentes (Abbildung: Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Biologie, Prof. Dr. V. Blüm; OHB-System GmbH).



**Abbildung 13:** Housekeepingdaten Experiment 89FE.

Dargestellt ist der Verlauf von pH-Wert, Sauerstoffkonzentration (O<sub>2</sub>) und Wassertemperatur über die Dauer des Experimentes. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte in Intervallen von 10 Minuten. Die x-Achse zeigt die Tage vor und nach dem eigentlichen Beginn des Experimentes (Tag 1). Die primäre y-Achse zeigt die Sauerstoffkonzentration und den pH-Wert des Wassers, die sekundäre y-Achse die Temperatur. Diesen Versuch haben vier *X. helleri* überlebt.

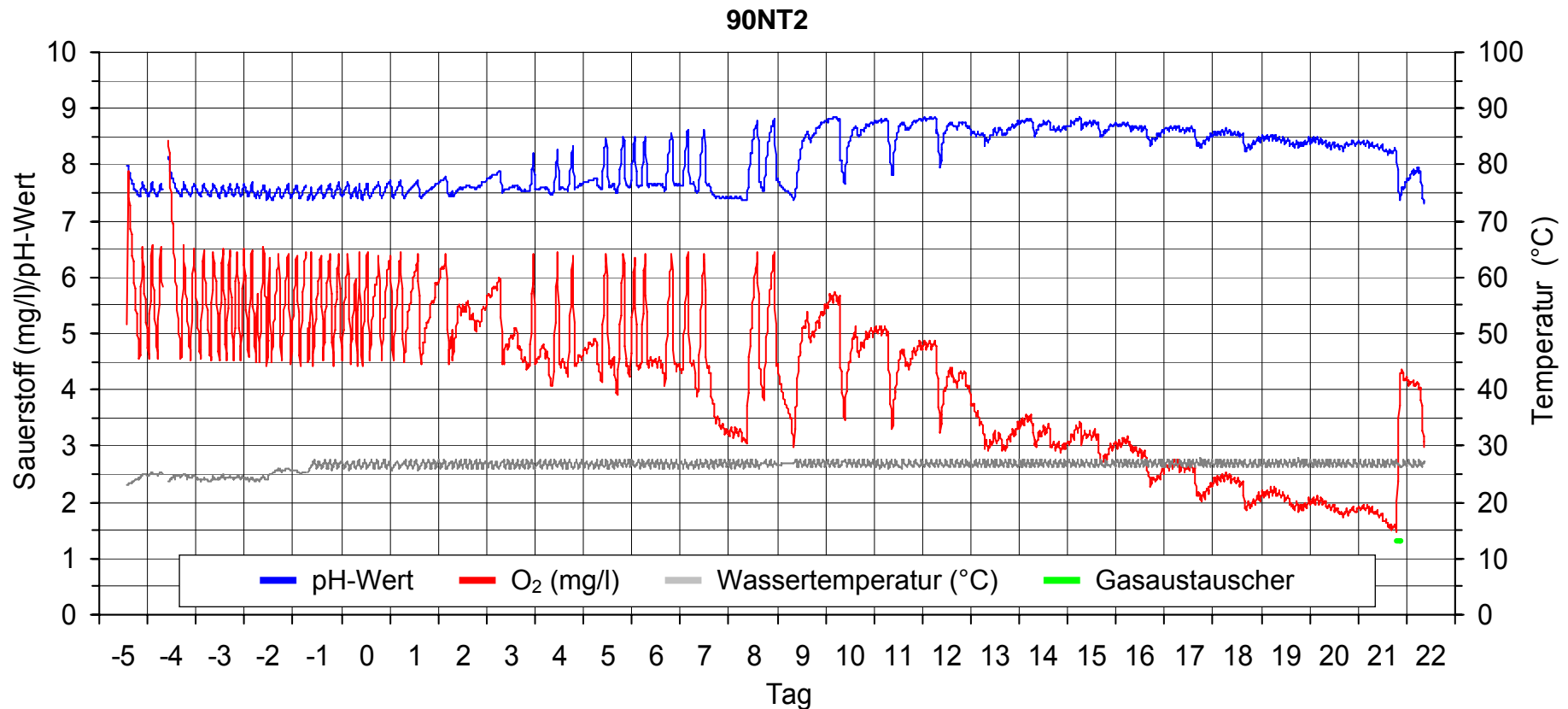
Tag -5 bis -1 = Teil der Adaptationsphase zur Stabilisierung des C.E.B.A.S. ausschließlich durch seine biologischen Komponenten (Bakterienfilter, Pflanzen, Schnecken, Fische), Tag 0 = Start des Space Shuttles, Tag 1 bis 9 = Dauer des Flugexperimentes (Abbildung: Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Biologie, Prof. Dr. V. Blüm; OHB-System GmbH).



**Abbildung 14:** Housekeepingdaten Experiment 90NT1.

Dargestellt ist der Verlauf von pH-Wert, Sauerstoffkonzentration (O<sub>2</sub>) und Wassertemperatur über die Dauer des Experimentes. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte in Intervallen von 10 Minuten. Die x-Achse zeigt die Tage vor und nach dem eigentlichen Beginn des Experimentes (Tag 1). Die primäre y-Achse zeigt die Sauerstoffkonzentration und den pH-Wert des Wassers, die sekundäre y-Achse die Temperatur. Diesen Versuch haben vier *X. helleri* überlebt.

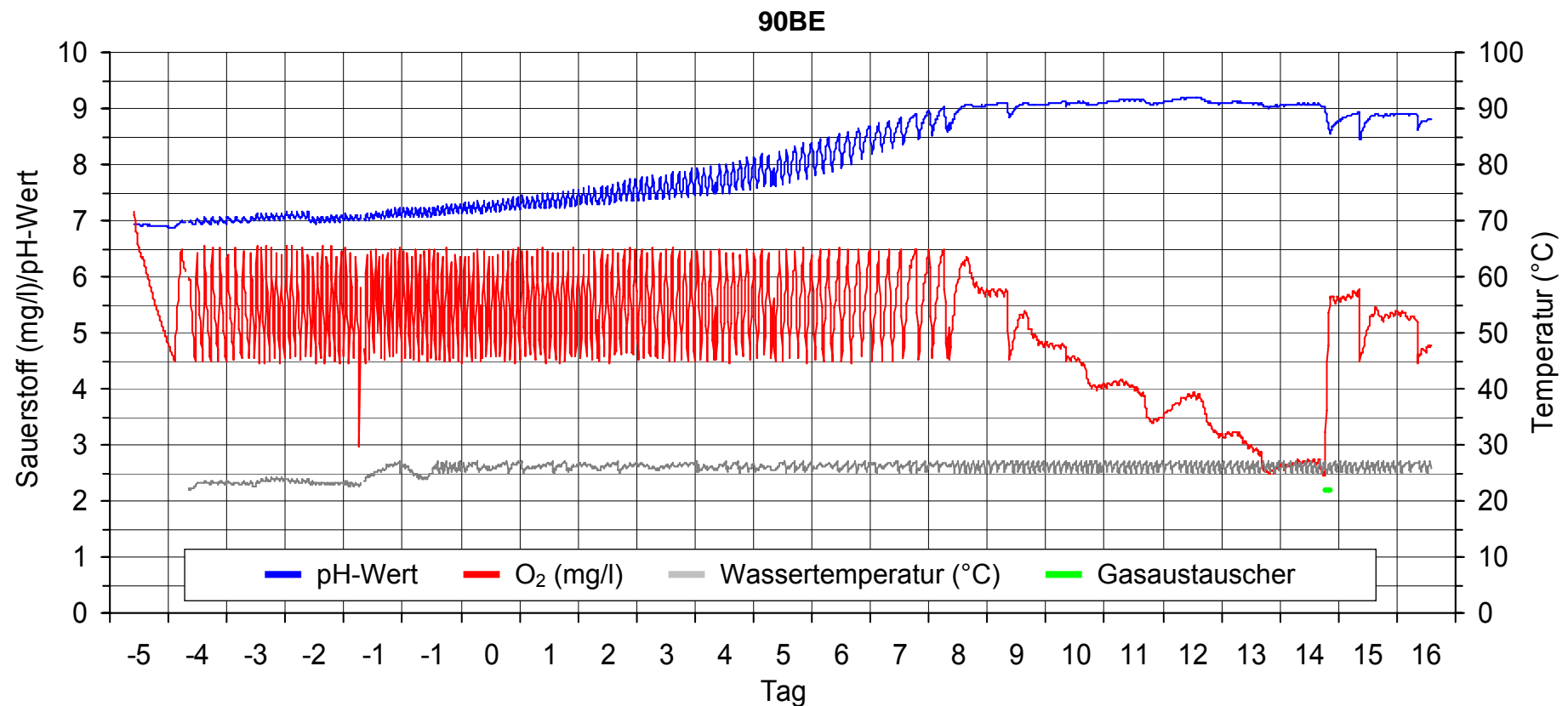
Tag -5 bis -1 = Teil der Adaptationsphase zur Stabilisierung des C.E.B.A.S. ausschließlich durch seine biologischen Komponenten (Bakterienfilter, Pflanzen, Schnecken, Fische), Tag 0 = Bei den Weltraumexperimenten Starttag des Space Shuttles. Bei den terrestrischen Experimenten Überbrückungstag zwischen Adaptationsphase und eigentlichem Versuchsbeginn. Tag 1 bis 22 = Dauer des Nutzlasttests (Abbildung: Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Biologie, Prof. Dr. V. Blüm; OHB-System GmbH).



**Abbildung 15:** Housekeepingdaten Experiment 90NT2.

Dargestellt ist der Verlauf von pH-Wert, Sauerstoffkonzentration (O<sub>2</sub>) und Wassertemperatur über die Dauer des Experimentes. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte in Intervallen von 10 Minuten. Die x-Achse zeigt die Tage vor und nach dem eigentlichen Beginn des Experimentes (Tag 1). Die primäre y-Achse zeigt die Sauerstoffkonzentration und den pH-Wert des Wassers, die sekundäre y-Achse die Temperatur. Diesen Versuch haben vier *X. helleri* überlebt.

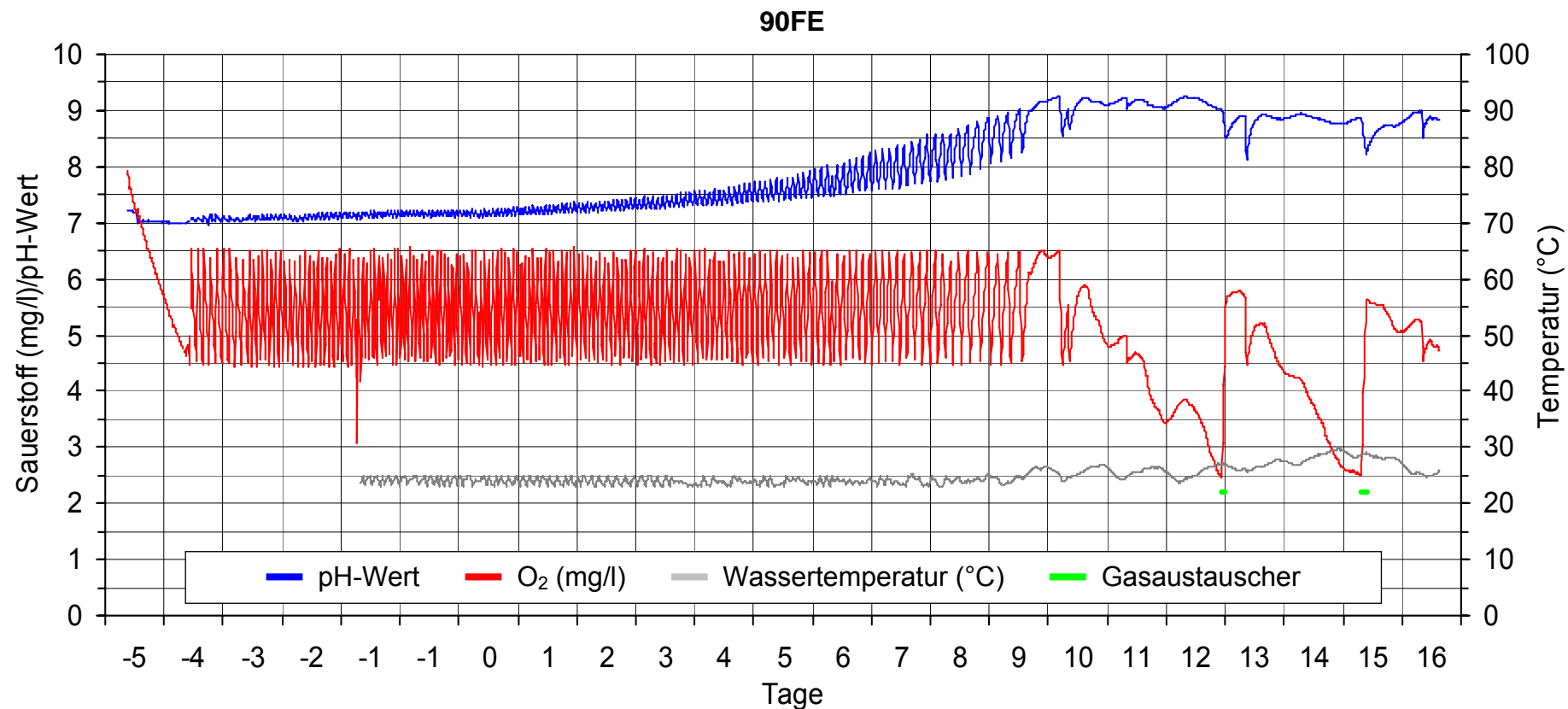
Tag -5 bis -1 = Teil der Adaptationsphase zur Stabilisierung des C.E.B.A.S. ausschließlich durch seine biologischen Komponenten (Bakterienfilter, Pflanzen, Schnecken, Fische), Tag 0 = Bei den Weltraumexperimenten Starttag des Space Shuttles. Bei den terrestrischen Experimenten Überbrückungstag zwischen Adaptationsphase und eigentlichem Versuchsbeginn. Tag 1 bis 22 = Dauer des Nutzlasttests (Abbildung: Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Biologie, Prof. Dr. V. Blüm; OHB-System GmbH).



**Abbildung 16:** Housekeepingdaten Experiment 90BE.

Dargestellt ist der Verlauf von pH-Wert, Sauerstoffkonzentration (O<sub>2</sub>) und Wassertemperatur über die Dauer des Experimentes. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte in Intervallen von 10 Minuten. Die x-Achse zeigt die Tage vor und nach dem eigentlichen Beginn des Experimentes (Tag 1). Die primäre y-Achse zeigt die Sauerstoffkonzentration und den pH-Wert des Wassers, die sekundäre y-Achse die Temperatur. Diesen Versuch haben vier *X. helleri* überlebt.

Tag -5 bis -1 = Teil der Adaptationsphase zur Stabilisierung des C.E.B.A.S. ausschließlich durch seine biologischen Komponenten (Bakterienfilter, Pflanzen, Schnecken, Fische), Tag 0 = Bei den Weltraumexperimenten Starttag des Space Shuttles. Bei den terrestrischen Experimenten Überbrückungstag zwischen Adaptationsphase und eigentlichem Versuchsbeginn. Tag 1 bis 16 = Dauer des Bodenkontrollexperimentes (Abbildung: Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Biologie, Prof. Dr. V. Blüm; OHB-System GmbH).



**Abbildung 17:** Housekeepingdaten Experiment 90FE.

Dargestellt ist der Verlauf von pH-Wert, Sauerstoffkonzentration (O<sub>2</sub>) und Wassertemperatur über die Dauer des Experimentes. Die Aufzeichnung der Daten erfolgte in Intervallen von 10 Minuten. Die x-Achse zeigt die Tage vor und nach dem eigentlichen Beginn des Experimentes (Tag 1). Die primäre y-Achse zeigt die Sauerstoffkonzentration und den pH-Wert des Wassers, die sekundäre y-Achse die Temperatur. Diesen Versuch haben vier *X. helleri* überlebt.

Tag -5 bis -1 = Teil der Adaptationsphase zur Stabilisierung des C.E.B.A.S. ausschließlich durch seine biologischen Komponenten (Bakterienfilter, Pflanzen, Schnecken, Fische), Tag 0 = Start des Space Shuttles, Tag 1 bis 16 = Dauer des Flugexperimentes (Abbildung: Ruhr-Universität Bochum, Fakultät für Biologie, Prof. Dr. V. Blüm; OHB-System GmbH).

## **Danksagung**

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei allen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben:

- ... Prof. Dr. Roland Goerlich, der als Doktorvater diese Arbeit betreute
  - ... Prof. Dr. Heinrich Enbergs, der die Arbeit als Zweitgutachter betreute
  - ... Prof. Dr. Volker Blüm, der das C.E.B.A.S.-Projekt initiiert und das C.E.B.A.S.-MINI MODUL zu drei Weltraumflügen an Bord der STS-89, STS-90 und STS-107 Space Shuttle-Missionen geführt hat
  - ... Dr. Karl-Peter Linscheid und den Kollegen aus der Arbeitsgruppe, die das ihre dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit entstehen konnte
  - ... Dr. Frank Paris, auf dessen Hilfsbereitschaft ich mich schon seit meinem Studium verlassen konnte
  - ... Dr. Michael Andriske, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand
  - ... Dr. Dirk Voeste, auf dessen Rat und Tat ich mich ebenfalls immer verlassen konnte
  - ... Dr. Klaus Slenzka, Ulrich Reinhard und allen Mitarbeitern der Firma OHB-System für die geduldige und zuverlässige Hilfe bei der Planung und Durchführung meiner experimentellen Arbeiten in Bremen und am Kennedy Space Center in Florida
  - ... den Mitarbeitern von NASA und Bionetics für die Betreuung, Hilfsbereitschaft und Gastfreundschaft während meines Aufenthaltes am Kennedy Space Center
  - ... dem Deutschen Zentrum für Luft- und Raumfahrt (DLR) für die finanzielle Unterstützung (Förderkennzeichen: 50 WB 9412, 50 WB 9996)
  - ... Herrn Dr. Rolf Hamers und den Mitarbeitern der Universitäten Bonn, Düsseldorf und Aachen, die meine Arbeit am C.E.B.A.S.-Projekt wohlwollend begleitet haben
- ... meinen Eltern und meinen Geschwistern für Alles!

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Angaben**

Klaus Piepenbreier

### **Ausbildung**

- 1973-1977 Grundschule: Eichendorffschule, Essen-Schönebeck
- 1977-1983 Realschule am Schloss Borbeck, Essen-Borbeck
- 1983-1986 Helmholtzgymnasium, Essen Rüttenscheid
- 1987-1988 Grundwehrdienst, Luftwaffe
- 1989-1996 Biologiestudium an der Ruhr-Universität Bochum
- 1995-1996 Diplomarbeit an der Landesanstalt für Ökologie Bodenordnung und Forsten/ Landesamt für Agrarordnung (LÖBF/LafAO) des Landes Nordrhein-Westfalen, Dezernat für Fischerei in Kirchhundem-Albaum  
*Hämatologische Untersuchungen an der Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) im Infektionsversuch mit dem Erreger der Hämorrhagischen Virusseptikämie (VHS)*
- 1997-2005 Dissertation an der Universität Bonn, AG Physiologische und Vergleichende Immunologie  
*Die Wirkung der Mikrogravitation auf das Abwehrsystem von Schwertträgerfischen (*Xiphophorus helleri*, Heckel) in einem geschlossenen, aquatischen Ökosystem: immunologische und hämatologische Untersuchungen*
- Im Rahmen der Anfertigung der Dissertation zwischen 1997 und 2003 fünf mehrwöchige Aufenthalte an Kennedy Space Center (Florida, USA) zur Probenentnahme aus den C.E.B.A.S.-Experimenten der STS-89, STS-90 und STS-107 Space Shuttle-Missionen

### **Berufstätigkeit**

- 1996-1997 Wissenschaftlicher Angestellter der Universität Bonn, Institut für Landwirtschaftliche Botanik



- 1997-2002 Wissenschaftlicher Angestellter der Universitätsklinik Düsseldorf, Institut für Haemostaseologie und Transfusionsmedizin (Arbeitsort: Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin des Deutschen Zentrums für Luft- und Raumfahrt, Köln-Porz)
- 2003 Wissenschaftlicher Angestellter der RWTH Aachen, Institut für molekulare Biotechnologie