

3 Material und Methode

3.1 Untersuchte Fischarten

Anatomische Untersuchungen wurden an den Köpfen von 54 Lachsen (*Salmo salar*) mit einem Durchschnittskörpergewicht von 5 kg, an den Köpfen von 70 Forellen (*Oncorhynchus mykiss*) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 250 g und an 38 Schollen (*Pleuronectes platessa*) mit einem durchschnittlichen Gewicht von 500 g durchgeführt. Sowohl anatomische als auch physiologische Untersuchungen erfolgten an 22 Schwerträgern (*Xiphophorus helleri*) mit einem Körpergewicht von durchschnittlich 5 g und 21 Sumatra-Barben (*Barbus tetrazona*) mit einem Körpergewicht von 3 g.

Um möglichst viele unabhängige Einflußfaktoren wie Größe, Alter, Körperbau und züchterische Besonderheiten gleichzuhalten, wurde darauf geachtet, möglichst Fische jeweils einer Zuchtlinie zu untersuchen. Die Köpfe der Lachse und Forellen wurden deswegen über einen Fischgroßhandel von einem Züchter bezogen. Da es sich bei den Schollen um freilebende Fische handelt, war hier die Beschaffung einer Zuchtlinie nicht möglich. Die untersuchten Schwerträger und Sumatra-Barben wurden in unserem Labor für die Untersuchungen gezüchtet und stammten alle aus jeweils einer Zuchtlinie.

3.2 Aufsuchen und Darstellung der Otolithenorgane des Fisches

Die Präparation der Fische erfolgte unter dem Mikroskop mit mikrochirurgischen Instrumenten der Gefäß- und Mittelohrchirurgie.

Um die Vestibularorgane aufzusuchen wurde zuerst das Gehirn freigelegt, indem die Schädeldecke eröffnet wurde. Nach Absaugung des Gehirns stellte sich nun die Dura dar. Diese wurde vorsichtig abgehoben und entfernt. Jetzt konnten beiderseitig in der Schädelhöhle die Vestibularorgane mit Bogengangampullen und Utriculus und im basalen Schädel der Sacculus dargestellt werden. Nur Teile der vertikalen und

horizontalen Bogengänge waren von Knorpel ummauert, die sonstigen Anteile des Labyrinths waren frei einsehbar. Die Bogengänge wurden mit einer mikrochirurgischen Schere durchtrennt. Anschließend wurde das komplette Vestibularorgan aus dem Schädel entnommen und zur weiteren Bearbeitung auf ein Präpariertischchen plaziert.

Dieses präparatorische Vorgehen wurde prinzipiell bei allen Fischarten beibehalten. Nur bei der Präparation der Scholle mußte die Vorgehensweise an die differenten anatomischen Gegebenheiten angepaßt werden. Der Schädel der Scholle mit Inhalt ist um 90° nach links gedreht, der Zugang erfolgte deswegen über die Eröffnung der Schädeldecke von der linken Seite. Das weitere Vorgehen glich dem der anderen präparierten Fischarten, da innerhalb des Schädels die Anordnung gleich war.

3.3 Präparation der Otolithen

Die Präparation der aller Otolithen erfolgte unter dem Operationsmikroskop Wild M650.

Um die einzelnen Strukturen der entnommenen Vestibularorgane mit dem Auflichtmikroskop möglichst kontrastreich darzustellen, wurde die weitere Präparation auf einem schwarzen Präpariertischchen durchgeführt.

Nachdem der Sacculus und Utriculus eröffnet waren, wurde vorsichtig die Sagitta und der Lapillus entnommen. Dabei mußte auf ein möglichst berührungsfreies Präparieren der Otolithen geachtet werden, um sie nicht zu beschädigen. Der Otolith des Utriculus (Lapillus) konnte über die Kapillarkräfte durch Adhäsion am Instrumentarium transportiert werden.

3.3.1 Mechanische Reinigung

Alle Otolithen wurden auf dem Präpariertischchen unter dem Auflichtmikroskop vorsichtig von Organresten befreit. Die Entfernung von anhaftendem organischem Material erfolgte mit Hilfe von Zellstoff. Hierbei wurde der Effekt ausgenutzt, daß organisches Material eine viel höhere Adhäsionskraft an Zellstoff als an die minerale Struktur des Calciumcarbonats bewies. Außerdem erfolgte mehrmals eine Spülung

mit Aqua bidestillata, woraufhin die Otolithen nochmals auf Organreste und Beschädigungen abgesucht wurden.

3.3.2 Enzymatische Reinigung

Bei einigen exemplarischen Otolithen erfolgte zusätzlich eine enzymatische Reinigung, die im Anschluß an die mechanische Reinigung erfolgte.

Dazu wurden die getrockneten Otolithen mit einer 20 prozentigen Lösung aus Dispase und Kollagenase bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte wiederum eine mehrmalige Spülung mit Aqua bidestillata.

3.3.3 Trocknung und Lagerung

Die Trocknung der gereinigten Otolithen erfolgte im Trockenofen bei 50°C. über 4 Stunden. Anschließend wurden sie einzeln in beschrifteten verschlossenen Mikroreaktionsgefäßen (Eppendorf 1,5 ml) gelagert.

3.4 Gewichtsbestimmung

Das Gewicht der Otolithen wurde mit einer mechanischen Nanogrammwaage (Satorius, Modell 2405) bestimmt, deren unterer Wägebereich bei 10^{-7} g liegt. Der mittlere Fehler betrug im Bereich bis 10^{-6} g 0,1% und im Wägebereich bis 10^{-7} g 1%. Vor Durchführung der Messungen wurde die Waage vom Firmenkundendienst überholt und mit amtlichen Gewichtsätzen neu geeicht.

Zum Ausschluß von Störfaktoren erfolgte die Wiegung auf einem schwingungstablem Tisch in einer feuchtigkeits- und temperaturstabilisierten Kammer (25°C. Raumtemperatur, 60% relative Luftfeuchtigkeit). Zur Wiegung benutzten wir eigens dafür konstruierte Wiegeschälchen, um ein berührungsfreies Transportieren und sicheres Wiegen der Otolithen zu gewährleisten. Die Gewichtsbestimmung von Sagitta und Lapillus erfolgte einzeln und seitentrennt.

Bei allen Otolithen wurde im Anschluß an die mechanische Reinigung und Trocknung auf diese Weise die Gewichtsbestimmung durchgeführt. Bei den

Otolithen, die zusätzlich enzymatisch gereinigt wurden, erfolgte die erste Messung nach der mechanischen Reinigung, die zweite nach der enzymatischen Reinigung.

3.5 Mikroskopische Fotodokumentation

Otolithen von Sacculus und Utriculus beider Seiten von Lachs, Scholle, Forelle und Schwertträger und Sumatra-Barbe wurden zur Veranschaulichung von intra- und interspezieschen Übereinstimmungen und Differenzen der morphologischen Struktur mit mikroskopischen Bildern dokumentiert.

3.6 Elektronenmikroskopische Untersuchungen

Einige Otolithen wurden im Anschluß an die Gewichtsbestimmung einer rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung unterzogen. Von Interesse war dabei der Nachweis von mechanischen Beschädigungen durch die Präparation und eventuell durch eine enzymatische Reinigung bedingte Veränderung der Otolithen.

3.7 Röntgendarstellung der Otolithen

Zur Darstellung der Otolithen in ihrer natürlichen Position im Kopf erfolgte eine Röntgendarstellung.

Als Gerät wurde das Philips Mammodiagnost UM verwandt. In Mammographietechnik konnten mit 28 Kilovolt und 29 Milliampère die Otolithen zur Darstellung gebracht werden. Während der Sacculus in allen Ebenen gut erkennbar war, mußte zur Identifizierung des Utriculus zusätzlich eine Aufnahme in 45° gemacht werden, um Überlagerungen auszuschalten.

3.8 Lichtrückenreflex

Die Untersuchungen an den Fischen wurde am 8.1.1997 unter dem Aktenzeichen T 0107/97 gemeldet und unter Reg 0107/97 registriert.

Der Lichtrückenreflex der Schwertträger und Sumatra-Barben wurde mit einer speziellen Apparatur getestet.

Diese Apparatur bestand aus einem röhrenförmigem Glasgefäß, das aufgrund der Enge die zu untersuchenden Fische zwang, sich ständig in Kopfposition aufzuhalten ohne dabei Schwimmbewegungen unmöglich zu machen. Damit wurde erreicht, daß die Gravitation als Einflußfaktor bei der Ausrichtung der Körperposition der Fische ausgeschaltet wurde. Es folgte die Beleuchtung der Fische aus wechselnden Positionen in einem abgedunkelten Raum zuerst mit sichtbarem, danach allein mit infrarotem Licht (940 nm Wellenlänge). Das Verhalten der Fische wurde mit einer auch infrarotlichtempfindlichen Videokamera zur Beurteilung aufgezeichnet.

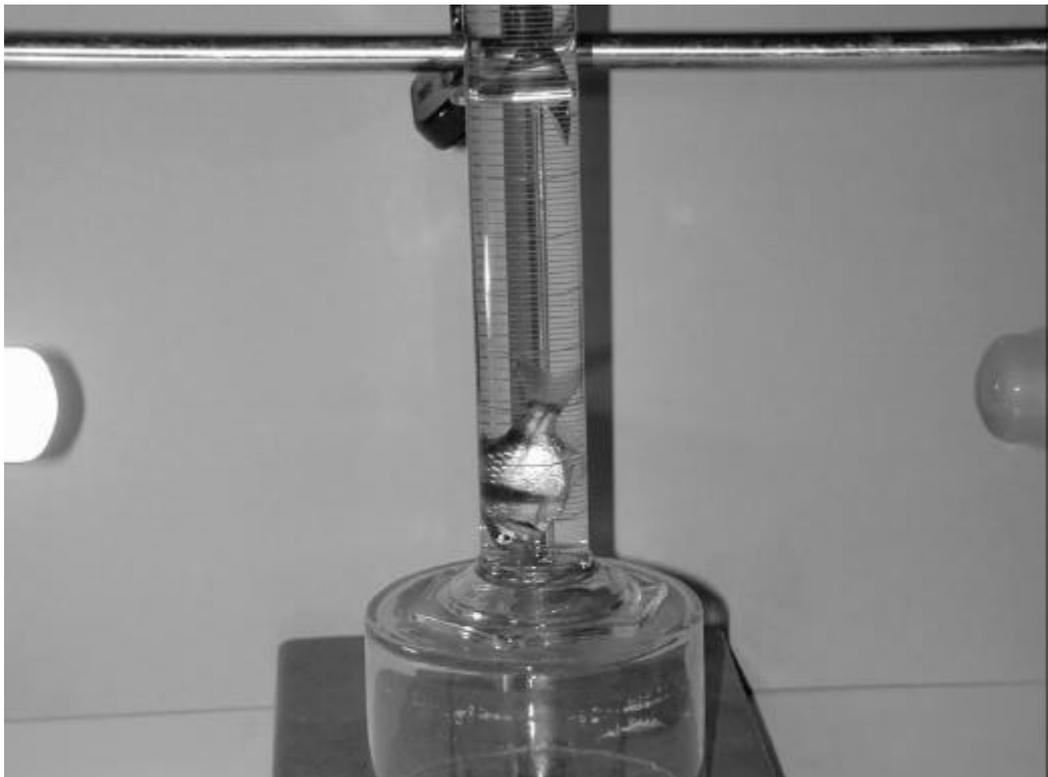


Abb. 5: Versuchsanordnung zum Test des Lichtrückenreflexes mit auf sichtbares Licht ausgerichteter Sumatra-Barbe

3.9 Experimentelle Kinetose

3.9.1 Apparativer Aufbau

Zur Provokation einer experimentellen Kinetose bei Fischen wurde ein Aquarium mit speziellen Anforderungen konstruiert.

Eine möglichst hohe Variabilität bei der Reizung der Vestibularorgane und des optischen Systems sollte bei gleichzeitiger Minimierung anderer Informationen für das vestibuläre System erreicht werden.

Um störende Reize für die Fische so weit wie möglich zu minimieren, wurde ein nach oben dicht abschließendes Aquarium konstruiert. Dadurch konnte das Aquarium luftblasenfrei befüllt werden. Die Befüllung erfolgte über einen langen Einfüllzylinder. Durch diese strömungsarme Konstruktion war eine Reduktion der Wasserbewegung während der Reizapplikation möglich.

Um eine freie Wahl der Beleuchtungsart und der Beleuchtungsebene zu haben, wurde das Aquarium an allen Seiten mit modular einschiebbaren Leuchtrahmen ausgestattet, die wahlweise entweder sichtbares Licht, Infrarotlicht oder eine Kombination aus Beiden emittierten.

Um eine lückenlose Dokumentation zu ermöglichen, erfolgte die Videodokumentation über eine infrarotlichtempfindliche Kamera, die an der Vorderseite des Aquariums angebracht war.

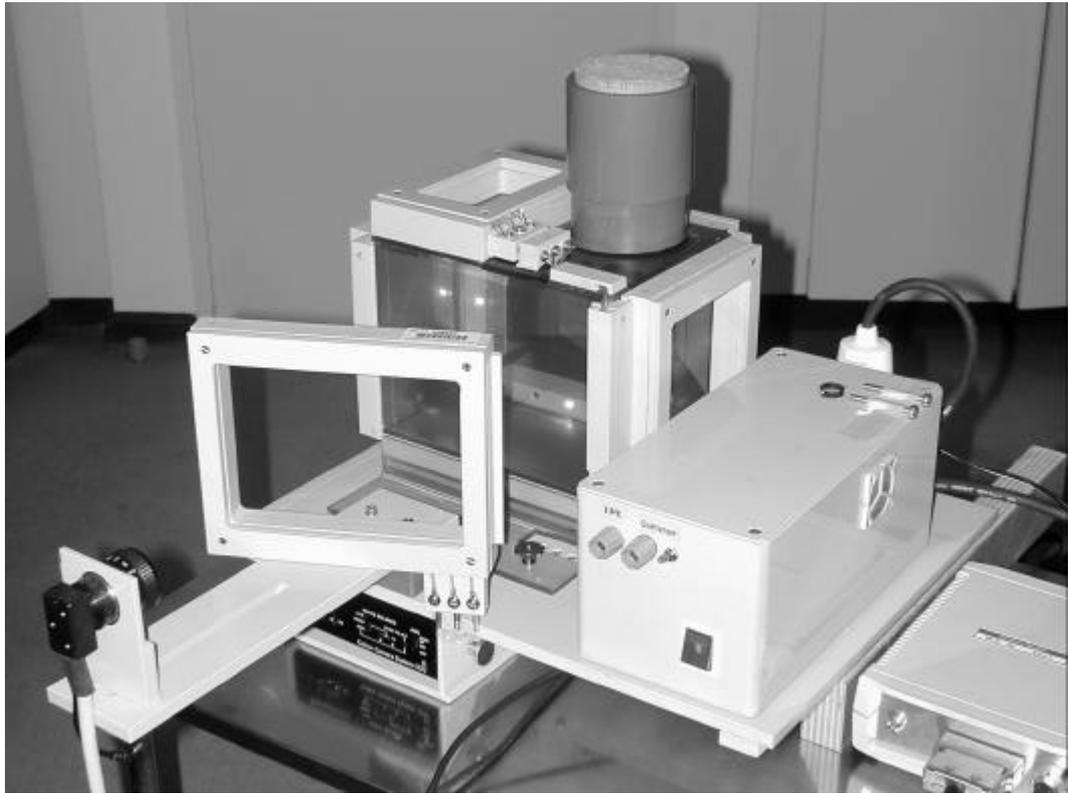


Abb. 6: Aquarium mit Einfüllzylinder zur luftfreien Bestückung mit Wasser und Fischen, den mit Leuchtdioden versehenen Rahmen an allen 6 Seiten und der an der Vorderseite angebrachten Kamera.

Um vestibuläre Beschleunigungsreize auf die Fische im Aquarium ausüben zu können, wurde das Aquarium auf eine Einschubplatte für den sich im Labor befindlichen Drehstuhl angebracht. Der experimentelle Drehstuhl verfügt über drei Freiheitsgrade, die über eine computergestützte Fernsteuerung reproduzierbare Reizapplikationen ermöglicht.

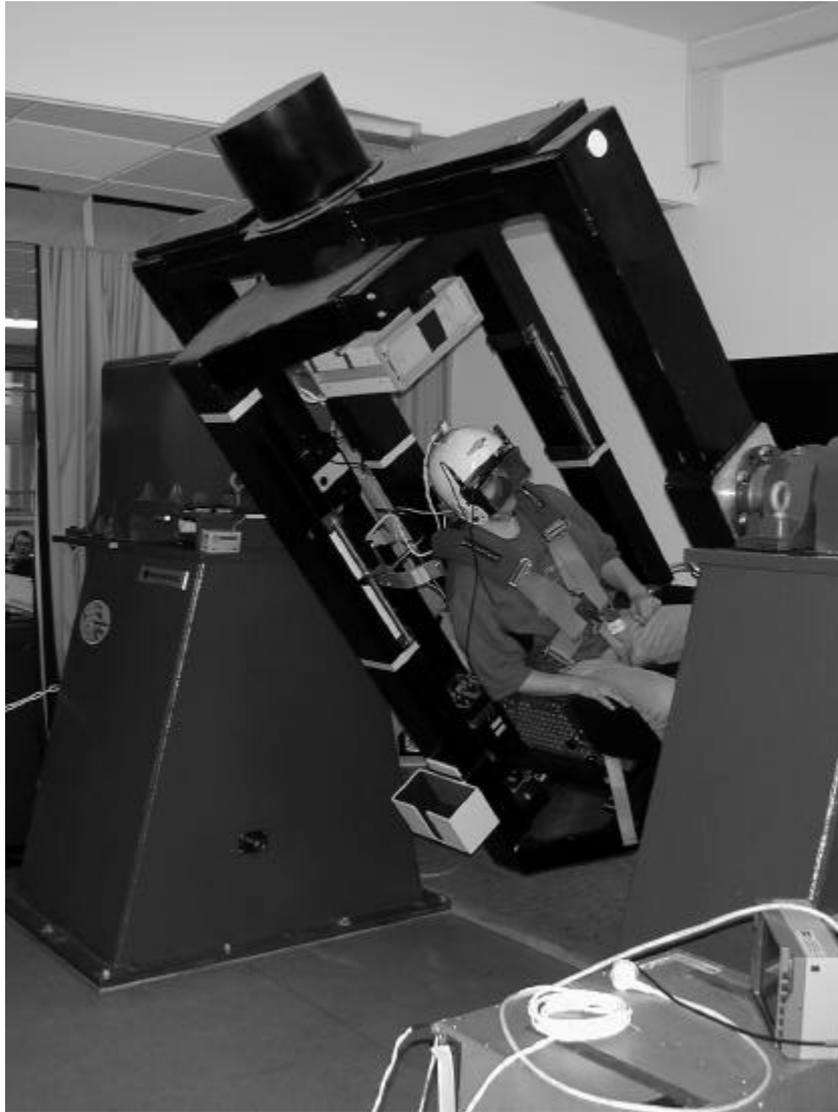


Abb. 7: Der experimentelle Drehstuhl mit 3 Freiheitsgraden, der Sitz für die Person kann ausgetauscht werden gegen das Aquarium

Während der Untersuchungen wurde der Raum abgedunkelt. Das Aquarium wurde jeweils mit 2 Schwerträgern bzw. 2 Sumatra-Barben bestückt, danach wurde gewartet, bis die Tiere sich an ihre neue Umgebung gewöhnt hatten und frei umherschwammen. Dies dauerte einige Minuten. Dann wurde das Aquarium auf Winkelgeschwindigkeiten von $60^\circ/\text{sec}$, $240^\circ/\text{sec}$ und $300^\circ/\text{sec}$. beschleunigt und bei gleichbleibender Geschwindigkeit um die Vertikalachse gedreht. Daraufhin wurde

ein zusätzlicher Reiz durch eine Pendelbewegung um die Horizontalachse mit einer Frequenz von 0,1 Hz, 0,2 und 0,33 Hz hinzugefügt.

Jede Reizapplikation erfolgte über mehrere Minuten, um eine sichere Beurteilung des Schwimmverhaltens zu ermöglichen.

3.9.2 Bewertung von physiologischen und pathologischen Schwimmverhalten

Die Auswertung des Schwimmverhaltens der Fische erfolgte anhand der Videoaufzeichnungen.

Als kinetosenegativ wurde gewertet, wenn die durch Corioliskräfte gereizten Fische ein regelrechtes Schwimmuster aufwiesen mit durch die Beschleunigungen hervorgerufenen kompensatorischen Ausgleichschwimmbewegungen. Sie richteten sich mit ihrem Körper gegen die Drehrichtung des Aquariums aus und machten Auf- und Abwärts- Schwimmbewegungen zum Ausgleich der vertikal auf sie einwirkenden Beschleunigungskräfte.

Als kinetosepositiv wurde gewertet, wenn reproduzierbar bei Coriolisreizen ein regelrechtes Schwimmverhalten verlassen wurde und nur noch ein passives Mitbewegen erfolgte. Kurze Zeit nach Beendigung der Coriolisreize mußte sich wieder ein normales Schwimmverhalten einstellen.

Alle Übergangsformen in Schwimmverhalten und Reproduzierbarkeit wurden als negativ für eine Kinetoseempfindlichkeit gewertet.

3.10 Datenverarbeitung und Statistik

Das bei der Bestimmung der Otolithenmassen erhobene Datenmaterial wurde computergestützt mit dem Programm StatView für Windows, Version 5.0 statistisch ausgewertet.

Mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov Tests wurden die Messreihen von Lachs, Forelle und Scholle Schwerträger und Sumatra-Barbe auf Normalverteilung überprüft. Im Kolmogorov-Smirnov Test werden die gemessenen Werte gegen Variablen einer idealen Normalverteilung verglichen. Wenn das Ergebnis des Kolmogorov-Smirnov

Tests signifikant ist ($p < 0,05$), dann haben die beiden Variablen nicht die gleiche Verteilung.

Anhand der Histogramme lässt sich dies auch visuell gut überprüfen und grafisch darstellen.

Danach wurde eine Korrelationsanalyse der Messreihen durchgeführt. Dies erfolgte durch die Fischer-z-Transformation, um eine Aussage über die statistische Signifikanz liefern zu können. Untersucht wurden dabei die Otolithenmassen im Utriculus und Sacculus im Seitenverhältnis rechts zu links und das Verhältnis der Otolithenmassen von Utriculus und Sacculus im seitengleichen Labyrinth.

Das Verhältnis der relativen Seitendifferenzen wurde in Prozent von Utriculus und Sacculus abgeschätzt.

Mit Hilfe des Mann Whitney Tests wurde die Seitenabweichung der Otolithenmassen der kinetosepositiven Fische mit der der kinetosenegativen Fische verglichen.