

## Beitrag zur allgemeinen Pathologie der Endokardreaktionen Toxisch bedingte Endokardveränderungen bei niederen Wirbeltieren (Karpfen)

Dorothea Schulz \*

Max von Pettenkofer-Institut des Bundesgesundheitsamtes  
(Abteilungsleiter: Prof. Dr. Dr. Bär)  
und Institut für Veterinär-Pathologie der Freien Universität Berlin  
(Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. W. Renk)

Eingegangen am 30. August 1972

### Contribution to the General Pathology of Endocardial Reactions

#### Toxic Endocardial Lesions in Lower Vertebrates (Carp)

*Summary.* When carp were exposed to the herbicide Karmex (active ingredient 80% diuron) in laboratory conditions or in a pond they showed changes in the endothelial cells of the cardiac valves with concentrations of 0,1 ppm diuron or more. The endocardial changes ranged from slight to marked with numerous granulomas. The severity of histo-pathological findings depended on the concentration and time of exposure. No bacteria were demonstrable.

*Zusammenfassung.* Werden Karpfen im Labor oder im Teich in einem Wasser 40 Tage gehalten, dem ein Unkrautbekämpfungsmittel gegen Wasserpflanzen zugefügt wurde (geringste Konzentration: 0,1 ppm Diuron), so kommt es zu Veränderungen an den Endothelzellen der Herzklappen, die von geringgradigen Veränderungen bis zu umfangreichen produktiven Endothelknötchen reichen. Der Grad der pathologischen Veränderungen war abhängig von Konzentration und Zeit. Bakterien waren nicht nachweisbar. Unsere Beobachtung zeigt, daß entzündliche Endokarderkrankungen sehr wahrscheinlich rein toxisch, also ohne Mitwirkung von Mikroben, entstehen können.

In der Erörterung der formalen Pathogenese entzündlicher Endokardveränderungen spielt die Frage eine Rolle, ob es auch ausschließlich toxisch bedingte, also nicht mikrobiell ausgelöste Fälle und Formen, sog. Endokarditis, gibt (Doerr, 1970). Obwohl Analogieschlüsse zwischen weit auseinanderstehenden Wirbeltierspecies gewagt sind, hat die nachstehend mitgeteilte Beobachtung ein besonderes Interesse: Sie zeigt erstmals, daß wahrscheinlich ausschließlich durch ein exogenes Gift Herzklappenveränderungen bei Fischen angegangen sind. Unsere Beobachtung besitzt den Wert einer wohl ausgewogenen Modellheuristik

Anläßlich einer Teichbehandlung mit Karmex<sup>1</sup>, einem Herbizid, das gegen Unterwasserpflanzen und Algen angewandt wird, wurden bei einer anschließenden pathologischen Untersuchung der Fische neben anderen Befunden (Schulz, 1972) Herzklappenveränderungen festgestellt. Dabei kam es zu umfangreichen polypenähnlichen Endothelreaktionen am Schließungs- und Klappenrand des Ostium atrioventriculare und des Ostium arteriosum. Da in der zugänglichen Literatur keine Beschreibung dieser Veränderung bei Fischen gefunden wurde, führte dieser Befund zu weiteren bakteriologischen Untersuchungen, deren Ziel es war, festzu-

\* Für die Unterstützung dieser Arbeit danke ich den Herren Prof. Dr. Dr. Bär, Prof. Dr. Künzel, Prof. Dr. Dr. h. c. Renk und Prof. Dr. Wellmann verbindlichst.

<sup>1</sup> Karmex enthält als Wirkstoff zu 80% Diuron, einen 3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1-dimethylharnstoff und wird von der Firma Du Pont hergestellt.

stellen, ob derartige Reaktionen des Endothels bei niedrigen Wirbeltieren durch mikrobielle Infektionen hervorgerufen werden.

### Methode

Zur Untersuchung gelangten 216 einsömmrige Spiegelkarpfen (*Cyprinus carpio* L.) mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 25 g. Die Fische stammten aus der Biologischen Versuchsanstalt in Wielenbach und den Aschauteichen in Eschede. Die Versuche wurden nach den in der Tabelle 1 gebrachten Versuchsbedingungen durchgeführt. Die Versuchsfische wurden zu je 4 Stück in 65 l-Becken 40 Tage gehalten. Das benutzte Leitungswasser wurde mit Hilfe von Elektro-Aquariengeräten mit Luft angereichert, die Versuchslösung durch einen mit Perlonwatte gefüllten Außenfilter filtriert und die Fische mit HaWeLin, Mückenlarven, Tubifex und Algen gefüttert. Als Kontrolle dienten 28 Karpfen, deren Haltung ebenfalls der der Versuchsfische entsprach, jedoch ohne Diuron-Zusatz. 48 Fische wurden nach einer Teichbehandlung mit 0,2 ppm Diuron 3 Monate in diesem Teich belassen und anschließend pathologisch untersucht. Das Verhalten der Fische während des Versuches ist ebenfalls der Tabelle 1 zu entnehmen. Nach Abschluß des Versuches wurden die Fische getötet, indem die Wirbelsäule unmittelbar hinter dem Schädel durchgeschnitten wurde. Das Herz wurde in der eröffneten Perikardhöhle mit Formalin fixiert und paraffiniert. Folgende Färbemethoden wurden angewandt: Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin, Dreifachfärbung nach van Gieson, Methylgrün-Pyronin nach Kurnick, Fettfärbung mit Scharlachrot, Eisenreaktion mit der Turnbullblaumethode, Kalknachweis nach Kossa, Amyloidnachweis mit Kongorot, PAS-Reaktion nach Hotchkiss und Manus, Versilberung nach Ranvier, Bakterienfärbung am Schnitt nach Brown und Brenn. Zur bakteriologischen Untersuchung wurden die unmittelbar zuvor getöteten Fische mit absolutem Alkohol übergossen und mit Filterpapier abgetrocknet, um eine Kontamination durch den Schleim der Körperoberfläche bei der nachfolgenden Sektion auszuschließen, dann wurde unter sterilen Bedingungen Herzblut aus dem geöffneten Ventrikel entnommen und Blutaussstriche angefertigt mit anschließender Färbung nach Giemsa und Züchtung auf Blutagarplatten. Einige Exemplare wurden dankenswerterweise von Herrn Prof. Wellmann<sup>2</sup> speziell auf Rotlauf untersucht, wobei das ganze Herz zur Untersuchung gelangte.

Bezüglich der Anatomie und Histologie des Fischherzens wurden die Veröffentlichungen von Fiebiger (1918), Nierstrasz (1927), Benninghoff (1933), Wunder (1936), Grodzinski (1938), Suworow (1959) und Harder (1964) zugrunde gelegt.

### Ergebnisse

Das Herz aller Versuchs- und Kontrollfische konnte *makroskopisch-pathologisch* nur oberflächlich beurteilt werden, weil es auf Grund seiner geringen Größe und um unnötige Zerrungen zu vermeiden in der eröffneten Perikardhöhle zur Fixation belassen worden war. Bei dieser geschilderten Betrachtungsweise ergaben sich äußerlich keine Veränderungen.

Bei der laufenden Untersuchung der *mikroskopischen* Schnitte gewann man schnell ein Maß dafür, in welchem Abstand und welcher Anzahl Endothelien die Klappenoberfläche bekleiden. Als erstes morphologisches Anzeichen einer Endothelreaktion war eine Vergrößerung von Zelle und Kern und eine Verringerung des Zellabstandes zu beobachten (Abb. 1). Ob die Teilung der Endothelien dabei auf direktem oder indirektem Wege vor sich ging, konnte nicht mit Sicherheit entschieden werden. Dagegen traten Einbuchtungen, Krümmungen und Lappungen der Kerne als mögliche oder vermutliche Vorstadien direkter Kernteilung auf. Dabei fiel eine einseitige Einbuchtung unter dem Bilde nieren- oder halbkreis-

<sup>2</sup> Leiter der Zentralen Versuchstieranlage des Bundesgesundheitsamtes.

Tabelle 1. Versuchsbedingungen und klinisches Verhalten der Karpfen im Versuch mit dem Präparat „Karmex“ (Wirkstoff: Diuron)

Gruppe	Anzahl der Versuchsfische (Laborversuche)	Konzentration des Wirkstoffs (ppm <sup>a</sup> )	Leitungswasser			pH-Wert	O <sub>2</sub> -Gehalt in mg/l (nach Winkler)	verendet (v) getötet (g) nach ... Tagen (T) Monaten (M)	Anzahl der Fische		Klinisches Verhalten
			Temperatur (°C)	Härte DH	histo- logisch untersucht				bakterio- logisch untersucht		
I	28	12	15—16	13	7,0—7,4	8—9	nach 15 T 40% v; nach 17 T Rest g	18	10	Unruhig, Futteraufnahme — <sup>b</sup> , Faeces —, Reizbeantwortung —, erschwerte Atmung, nach 3tägigem Versuch Seitenlage, Exophthalmus. Gewichtsabnahme: 15%	
II	28	6	15—16	13	7,0—7,4	8—9	nach 20 T 30% v; nach 24 T Rest g	18	10	Verhalten wie Gruppe I. Nach 20tägigem Versuch Seitenlage. Gewichtsabnahme 15%	
III	28	0,5	15—16	13	7,0—7,4	8—9	nach 40 T g	18	10	Unruhig, Futteraufnahme gering, Reizbeantwortung verlangsamt, später Verhalten durchschnittlich. Gewichtsabnahme: 6%	
IV	28	0,2	15—16	13	7,0—7,4	8—9	nach 40 T g	18	10	In den ersten Versuchstagen unruhig, Futteraufnahme gering, später Verhalten ohne Abweichung. Gewichtsabnahme: 6%	
V	28	0,1	15—16	13	7,0—7,4	8—9	nach 40 T g	18	10	In den ersten Versuchstagen unruhig, Futteraufnahme gering, später Verhalten ohne Abweichung. Gewichtsabnahme: 6%	
VI	28	Kontrolle	15—16	13	7,0—7,4	8—9	nach 40 T g	18	10	Verhalten ohne Abweichung, Gewichtsabnahme: 10%	
VII	48 (Teichversuch)	0,2	Teichwasser				nach 3 M g	48		Das Körpergewicht dieser Fische war um 25% geringer als in den vorangegangenen Jahren um dieselbe Zeit	

a Die Konzentrationsangabe der Wirkstoffe im Wasser erfolgt in ppm (1 ppm = 1 Millionstel Teil), englisch "parts per million". b — negativ.

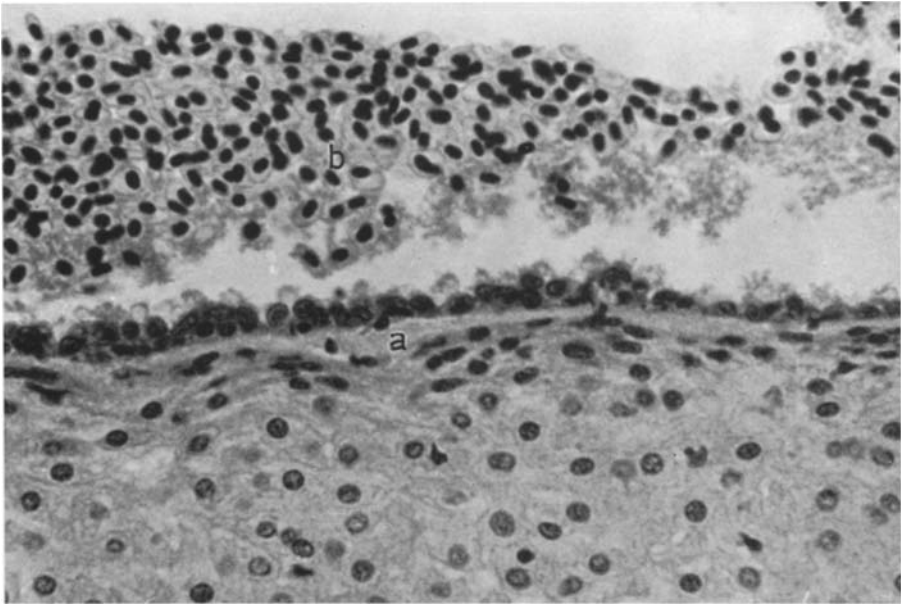


Abb. 1. Anfangsstadien der Endothelreaktion: Vergrößerung von Zelle und Kern und Verringerung des Zellabstandes. Verbreiterung der Basalmembran (a). Kernhaltige Erythrocyten (b). 0,1 ppm Diuron, Versuchszeitraum 40 Tage. (H.-E.-Färbg., Obj. 40, Ok. 10, Sekt.-Nr. 471)

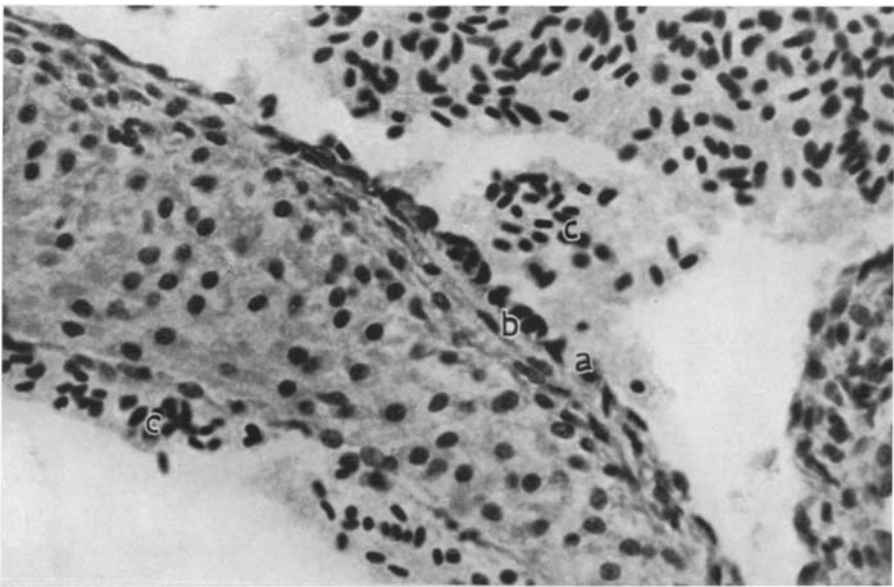


Abb. 2. „Aufrichten“ der hyperchromatischen Endothelzellen (a). Verbreiterung der Basalmembran (b). Kernhaltige Erythrocyten (c). 0,1 ppm Diuron, Versuchszeitraum 40 Tage. (H.-E.-Färbg., Obj. 40, Ok. 10, Sekt.-Nr. 471)

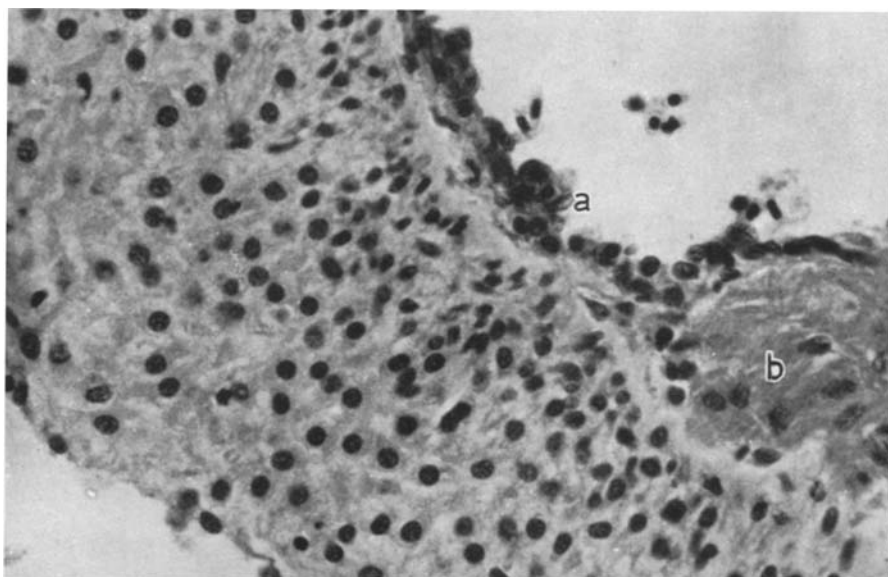


Abb. 3. Weiter fortgeschrittenes Stadium der Endothelreaktion „Mikrowarzen“ (a) bestehend aus übereinander gelagerten Endothelzellen. Polsterbildung an der Primärklappe des Ostium atrioventriculare (b) mit verblassender Kernstruktur. Verbreiterte Basalmembran. Freilandversuchsfisch. 0,2 ppm Diuron, Versuchszeitraum 3 Monate. (H.-E.-Färbg.; Obj. 40, Ok. 10, Sekt.-Nr. 185)

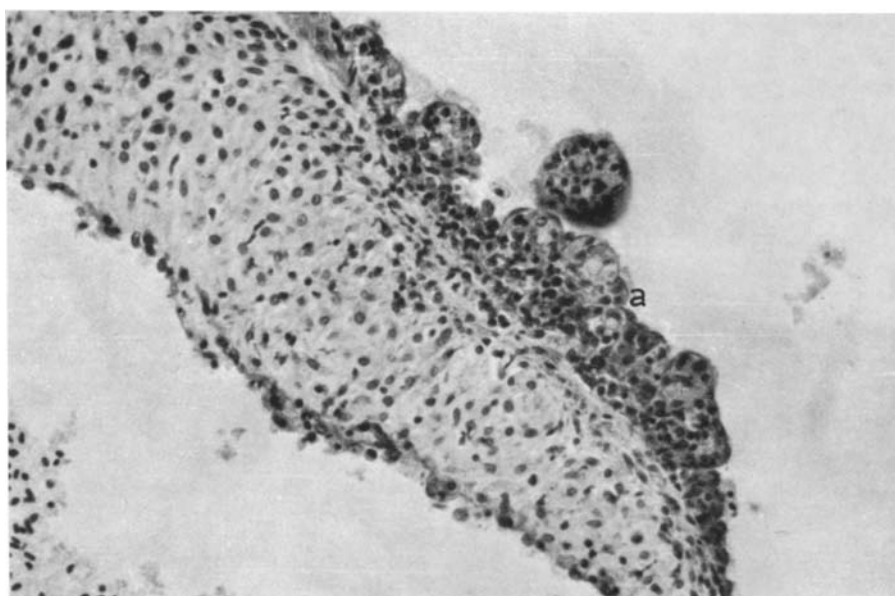


Abb. 4. Mehrschichtiges proliferierendes Endothel (a) auf der Primärklappe des Ostium atrioventriculare. Freilandversuchsfisch. 0,2 ppm Diuron, Versuchszeitraum 3 Monate. (H.-E.-Färbg.; Obj. 25, Ok. 10, Sekt.-Nr. 180)

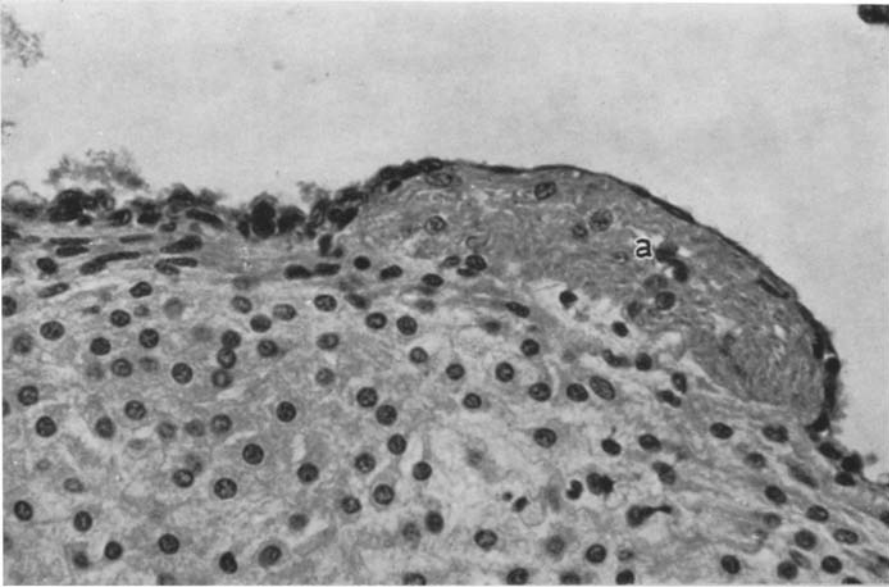


Abb. 5. Polsterbildung mit verblassender Kernstruktur (a) an der Segelklappe. Freilandversuchsfisch. 0,2 ppm Diuron, Versuchszeitraum 3 Monate. (H.-E.-Färbg.; Obj. 40, Ok. 10, Sekt.-Nr. 487)

förmiger Kerne auf (Abb. 1). Die Zunahme der Endothelzellen konnte so stark sein, daß sie mit einer Zellaufrichtung und Kernstellung senkrecht zur Klappenoberfläche einherging (Abb. 2). Hiervon konnten kleinere und größere Oberflächenabschnitte betroffen sein. Ferner wurden Mikrowarzen in Gestalt kleiner Erhebungen des Endothels an der Ober- und Unterfläche der Klappen beobachtet (Abb. 3). Das Endothel wurde dabei mehrreihig. Außerdem wurden Zellknospen des Endothels aus übereinander gelagerten Endothelien angetroffen, deren untere, der Basalmembran am nächsten gelegene Reihen, verschiedentlich pyknotische Kerne zeigten. Stellenweise konnten die Zellknospen so dicht nebeneinander liegen, daß das Endothel in breiter Fläche mehrschichtig aufzutreten schien (Abb. 3 und 4). Dabei war das darüberliegende Endothel intakt. Neben diesen Endothelknospen waren mit Endothel überzogene Polsterbildungen an den Klappen zu beobachten (Abb. 5). Die Kerne im Innern dieser Polster zeigten eine unregelmäßige Lagerung und ein Verblässen der Kernstruktur bis zum Übrigbleiben einfacher Kernschatten. Die Grundsubstanz färbte sich kräftiger mit Eosin an und zeigte eine Einlagerung von Fasern. Bei der Silberimprägnation wurde in diesen Polstern ein Farbunterschied zwischen verblässenden Silberfibrillen und einem Auftreten von kollagenem Braun in der vermehrten Grundsubstanz deutlich. Die Retikulinfasern der Endothelzellen rollten sich zusammen und es kam zu einer Verdichtung des Fasergerüsts, das sich in dem van Gieson-Gemisch leuchtend gelb färbte. In Bereichen, in denen eine Veränderung an den Endothelzellen zu beobachten war, war auch eine Veränderung der dazugehörigen *Basalmembran* zu beobachten. Sie reagierte mit Fältelung, Verbreiterung und

Lücken, die sowohl an der Seite, die dem Epithel zugewandt war, auftraten als auch an der den kollagenen Fasern zugewandten Seite. Hierbei konnten die kollagenen Fasern von verbreiterten Basalmembranabschnitten abgetrennt sein. Mitunter hatte man den Eindruck, daß solche Lückenbildung durch unmittelbare Verflüssigung der Grundsubstanz selbst auftrat. Bei der Hämatoxylin-Eosin-Färbung war das *Subendothel* bei den Kontrollfällen durch seine intensivere Rotfärbung deutlich von der *fibrösen Grundschicht* abgegrenzt. Bei den Versuchstieren konnte man in diesem Bereich neben einer Verbreiterung dieser Schicht auch Lückenbildungen erkennen. Je nach Schnittrichtung waren diese Lücken rundlich, länglich oder streifig. Es muß jedoch betont werden, daß diese Lücken nicht bei allen Fällen gemeinsam mit einer Endothelproliferation auftraten.

Bei allen angeführten Veränderungen wurden nie *Leukocyten* angetroffen.

Die Endothelproliferationen waren am Schließungs- und Klappenrand der Herzklappen *lokalisiert*, ebenso die polsterartigen Verquellungen. Ein Unterschied in der Häufigkeit des Betroffenseins von Vorhof- oder Ventrikelseite wurde nicht festgestellt. Ebenso war keine Bevorzugung der Primärklappen am Ostium atrioventriculare oder Klappen sowie Ansatzstellen am Ostium arteriosum festzustellen. Die interstielle Ödembildung war im Innern der Klappe und Subendothelial anzutreffen.

*Vorkommen* der Veränderungen bei den einzelnen Versuchsreihen: bei 80 % der Fische der Gruppe I—V waren nach 40tägigem Versuch Veränderungen an den Herzklappen des Ostium atrioventriculare und des Ostium arteriosum festzustellen, unter denen das Endothel am häufigsten betroffen war (bei 70 % der Fische der Gruppe I—V). Eine „Pallisadenstellung“ der Endothelzellen trat hauptsächlich in der Gruppe V auf, eine herdförmige Zellwucherung bei Gruppe IV und V. Größere Mikrowarzen und Zellknospen (Gruppe I—IV), die so dicht nebeneinander liegen konnten, daß das Endothel mehrschichtig aufzutreten schien (Gruppe VII). Bei 3 % der Fälle traten in der Gruppe VII die polsterartigen Verquellungen auf. Die Basalmembran war bei allen Gruppen mit Ausnahme der Kontrollen verändert bei den Fällen, bei denen sich Veränderungen am Endothel zeigten. Bei allen Gruppen mit Ausnahme der Kontrollen trat bei 10 % der Fälle eine seröse Entzündung auf.

Eine *Vascularisation* der Herzklappen konnte trotz intensiver Suche nicht festgestellt werden.

Die bakteriologischen Blut- und Gewebsuntersuchungen ergaben bei den Versuchsgruppen I—V und den Kontrollfischen einen negativen Befund.

### Besprechung der Befunde

Aus den zuvor beschriebenen Befunden darf man schließen, daß die bei Karpfen aufgetretenen Herzklappenveränderungen toxisch induziert waren. Die bakteriologische Herzblut- und Organuntersuchung verlief bei allen Gruppen einschließlich der Kontrollen negativ. Auch im histologischen Schnitt war mittels der Bakterien-Färbung nach Brown und Brenn der Befund negativ. Ebenso verliefen Spezialuntersuchungen auf Rotlauf negativ. An eine Rotlaufinfektion war gedacht worden, weil Rotlaufbakterien auf der Haut von Fischen saprophytisch vorkommen und einige Autoren (Wellmann, 1950; Schäperclaus, 1954) ver-

muteten, daß diese Bakterien bei Umweltverschlechterungen eventuell pathogen für den Fisch werden könnten. Die bakteriologischen und histologischen Befunde ergaben zusammenfassend, daß es gelungen war, proliferierende Veränderungen des Endothels zu erzeugen, bei denen keine Bakterien nachweisbar waren. Dagegen ist es wichtig herauszustellen, daß in allen histologischen Befunden die cellulären Reaktionen im Vordergrund standen und allein eine Bewertung und Deutung erfuhren. Dabei kam dem Endothel eine entscheidende Rolle zu. Die geweblichen Reaktionen setzten sich aus exsudativen und produktiven Prozessen zusammen, wobei die produktiven von größerer Bedeutung waren. Der Initialveränderung am Endothel folgten umfangreiche produktiv-celluläre Reaktionen, die als eine Antwort auf eine Zellschädigung zu deuten sind, zumal diese Reaktion progressiv war. Im weiteren Verlauf zeigte Versuchsgruppe VII, die sechs Wochen länger als die übrigen Fische im Teich der Einwirkung von Diuron ausgesetzt war, regressive Veränderungen an den produktiven Endothelknötchen, wie sie in Abb. 5 zu sehen sind. Die beschriebenen Veränderungen werden außer der gestörten Funktion der Herzklappen, vor allem die Permeabilitätsverhältnisse an der Herzklappe selbst beeinflussen und die Passage von notwendigen Nährstoffen verhindern, andererseits eine Passage von schädlichen Stoffen in das Innere der Klappe erlauben.

### Literatur

- Benninghoff, A.: Gefäßsystem, III. Herz. In: Bolk-Göppert-Kallius-Lubosch, Handbuch, Bd. IV, S. 467—556. Berlin-Wien: Urban & Schwarzenberg 1933.
- Doerr, W.: Allgemeine Pathologie der Organe des Kreislaufes. Handb. Allg. Path., S. 205. Bd. III, Teil 4. Berlin-Heidelberg-New York: Springer 1970.
- Fiebiger, J.: Über den Körperbau des Karpfen. Die Kreislauforgane. Österr. Fischerei-Ztg. **24**, 3—5 (1918).
- Grodzinski, Z.: Das Blutgefäßsystem. Bronn's Klassen u. Ordnungen, Bd. VI, Abt. I, Buch 2, Teil 2, Lief. 1 Leipzig: Geest & Portig (1938).
- Harder, W.: Anatomie der Fische. Handbuch Binnenfischerei Mitteleuropas Bd. IIA u. Bd. IIB. Stuttgart: Schweizerbarth'sche 1964.
- Nierstrasz, H.F.: Das Blutgefäßsystem. In: Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere, hrsg. v. J.E.W. Ihle u.a. Berlin: Springer 1927.
- Schäperclaus, W.: Fischkrankheiten, 3. Aufl. Berlin: Akademie-Verl. 1954.
- Schulz, D.: Proliferative Endokarditis am Herzen von Karpfen nach Einwirkung des Herbizids „Karmex“®. Zbl. Vet.-Med. A, **19**, 390—406, 1972.
- Suworow, J.K.: Allgemeine Fischkunde. Berlin: VEB Dtsch. Verl. Wiss. 1959.
- Wellmann, G.: Pathogenität und Wachstum der auf Fischen vorkommenden Rotlaufbakterien (Bact. murisepticus Robert Koch). Abhdl. Fischerei Lfg. **3**, 489—504 (1950).
- Wunder, W.: Physiologie der Süßwasserfische Mitteleuropas. In: Demoll, R., Maier, H.N., Handbuch Binnenfischerei Mitteleuropas, Bd. IIB. Stuttgart: Schweizerbarth'sche 1936.

Dr. Dorothea Schulz  
Max von Pettenkofer-Institut  
des Bundesgesundheitsamtes  
D-1000 Berlin 33, Unter den Eichen 82—84  
Deutschland