

3. Ergebnisse

3.1 Krankheitssymptome der Versuchstiere

Alle Tiere der virusinfizierten Gruppen hatten während der gesamten Versuchsdauer eine ähnliche Krankheitssymptomatik und ein ähnliches zeitliches Auftreten der Symptome. Vier bis fünf Tage nach Infektion zeigten sich bei den Tieren erste Symptome in Form von abgeschwächtem Bewegungsdrang und abgeschwächtem Fress- und Spieltrieb. Außerdem wurde das Fell der infizierten Tiere struppig und stumpf.

Diese Befunde verschlechterten sich meist rasch fortschreitend innerhalb der nächsten ein bis zwei Tage. Die Mäuse wurden zunehmend apathisch, zeigten ausgeprägte Gangunsicherheiten und fraßen schließlich gar nicht mehr. Ferner fiel eine starke Gewichts- und Größenreduktion gegenüber den Kontrolltieren auf (siehe 3.3). Diese Symptomatik stellte sich spätestens zum achten Tag bei allen infizierten Mäusen ein.

Keine Veränderungen traten bei den Tieren der Kontrollgruppen auf.

3.2 Mortalität

Vor Erreichen des 10. Versuchstages starb keine von insgesamt 32 Mäusen, von denen 20 mit CVB3 infiziert waren. Jedoch starb im Rahmen der Narkoseeinleitung ein Tier der Gruppe 1.1, so dass eine Erhebung der hämodynamischen Parameter für dieses Tier nicht erfolgen konnte.

3.3 Körper- und Herzgewicht der Versuchstiere

Zur weiteren Charakterisierung der Versuchstiere und zur Beschreibung der Effekte der CB3-Infektion sowie der IL-4-Behandlung wurden die Werte für Maus- und Herzgewicht erhoben (siehe Abb.: 3.1 und Abb.: 3.2).

Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab sowohl für das Mausgewicht als auch für das Herzgewicht, dass beide Wertegruppen aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammen (für

beide Parameter $p < 0,001$). Somit konnte eine signifikante Varianz zwischen den 6 Versuchsgruppen mit unterschiedlichen Behandlungen für diese beiden Parameter angenommen werden, und Einzelvergleiche konnten vorgenommen werden.

Die infizierte Versuchsgruppe 1.2 zeigte eine Abnahme von Maus- und Herzgewicht gegenüber der Kontrollgruppe 1.1 (von $29,0 \pm 1,9$ g bzw. $155,9 \pm 17,7$ mg auf $19,3 \pm 1,4$ g bzw. $107,0 \pm 6,8$ mg), dabei ergab der U-Test nach Mann-Whitney in beiden Fällen $p < 0,001$.

Das Mausgewicht veränderte sich unter Behandlung mit IL-4 nur minimal. In der Kontrollgruppe 2.1 verringerte sich das Herzgewicht unter IL-4-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe 1.1 auf $26,9 \pm 2,7$ g. In den infizierten Versuchsgruppen 2.2, 2.3 und 2.4 stieg das Mausgewicht im Vergleich zur infizierten Gruppe 1.2 auf $19,9 \pm 1,8$ g, $21,9 \pm 2,9$ g bzw. $19,9 \pm 3,2$ g.

Auch das Gewicht der Mausherzen variierte unter IL-4-Behandlung nur geringfügig. Im Vergleich zur Kontrollgruppe sank das Herzgewicht der IL-4-behandelten Kontrollgruppe auf $126,4 \pm 12,3$ g. In den infizierten Versuchsgruppen 2.2 und 2.3 sank das Herzgewicht auf $102,6 \pm 8,3$ g bzw. $101,4 \pm 7,5$ g, bei durchgehender Behandlung mit IL-4 (Gruppe 2.4) stieg das Herzgewicht im Vergleich zur infizierten Gruppe 1.2 auf $110,8 \pm 11,5$ g.

Insgesamt konnte bei keinem der beschriebenen Vergleiche der IL-4-behandelten Versuchsgruppen mit den Versuchsgruppen 1.1 und 1.2 eine statistisch signifikante Veränderung in Bezug auf Maus- oder Herzgewicht gezeigt werden.

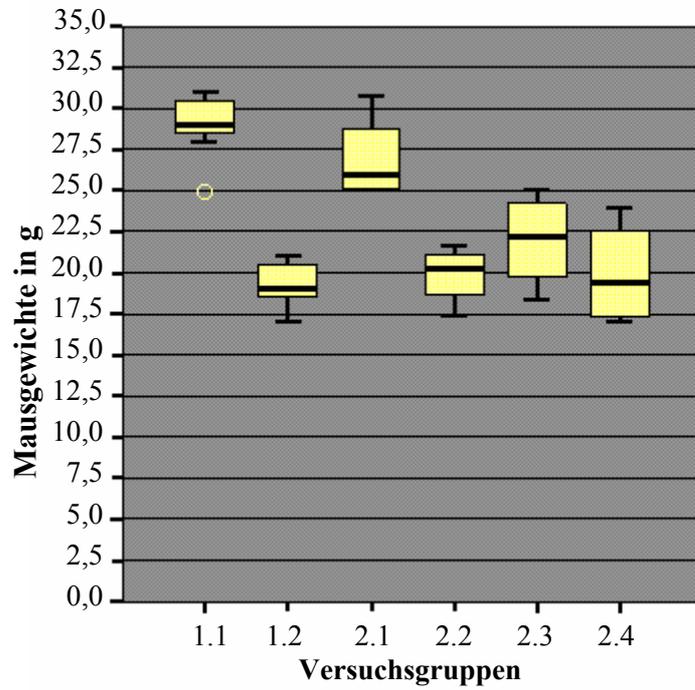


Abb. 3.1: Darstellung der Mausgewichte in g in den verschiedenen Versuchsgruppen.

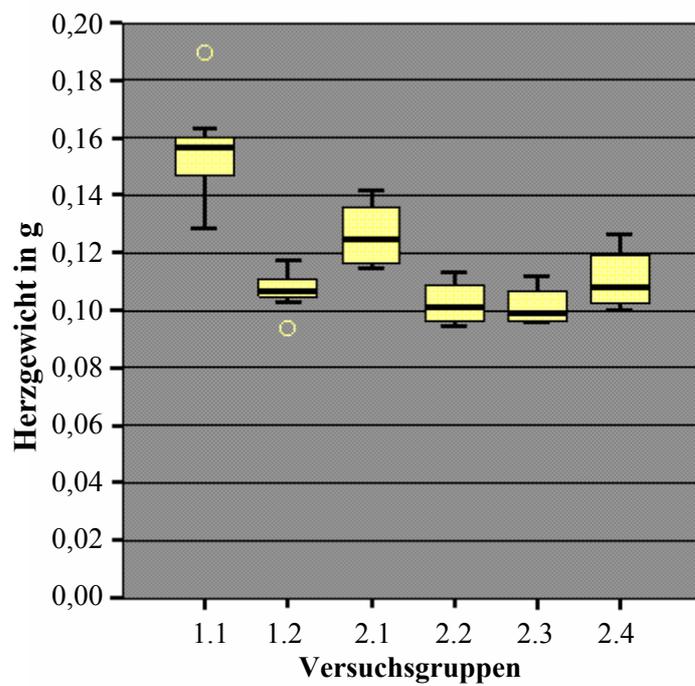


Abb. 3.2: Darstellung der Herzgewichte in g in den verschiedenen Versuchsgruppen

3.4 Ergebnisse der intrakardialen Druckmessung und der Herzfrequenz

Für alle erhobenen Parameter der intrakardialen Druckmessung ergab der H-Test, dass die vier Wertegruppen aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammen (für LVsP $p < 0,01$, für Herzfrequenz, dP/dt min und dP/dt max $p < 0,001$). Somit konnte eine signifikante Varianz zwischen den 6 Versuchsgruppen mit unterschiedlichen Behandlungen für diese vier Parameter angenommen werden, und Einzelvergleiche konnten vorgenommen werden.

3.4.1 Linksventrikulärer systolischer Druck (LVsP)

Die linksventrikuläre Wandspannung in der systolischen Phase der Herzaktion wurde ermittelt als linksventrikulärer systolischer Druck (LVsP) als Maß für die Nachlast des Herzens (siehe Abb.: 3.3).

In der virusinfizierten Versuchsgruppe 1.2 war der LVsP signifikant ($p < 0,001$) gegenüber der Kontrollgruppe 1.1 reduziert ($65,74 \pm 4,32$ gegen $83,15 \pm 6,35$ mmHg).

Unter IL-4-Behandlung lag der LVsP der Kontrollgruppe 2.1 mit $89,20 \pm 9,23$ mmHg über der unbehandelten Kontrollgruppe 1.1, jedoch nicht signifikant. Auch in den drei infizierten Gruppen mit früher, später und durchgehender IL-4-Behandlung (2.2, 2.3 und 2.4) stieg der LVsP gegenüber der unbehandelten infizierten Gruppe 1.2 ($86,25 \pm 5,68$, $74,18 \pm 6,90$ bzw. $67,75 \pm 7,50$ mmHg). Die Signifikanzprüfung nach Mann-Whitney ergab dabei nur für die früh behandelte Versuchsgruppe einen signifikanten Anstieg der LVsP ($p < 0,01$). Der p-Wert für die spät behandelte Versuchsgruppe 2.3 lag bei $p = 0,048$ und konnte aufgrund der vorgenommenen α -Adjustierung nach Bonferroni nicht als signifikant gewertet werden.

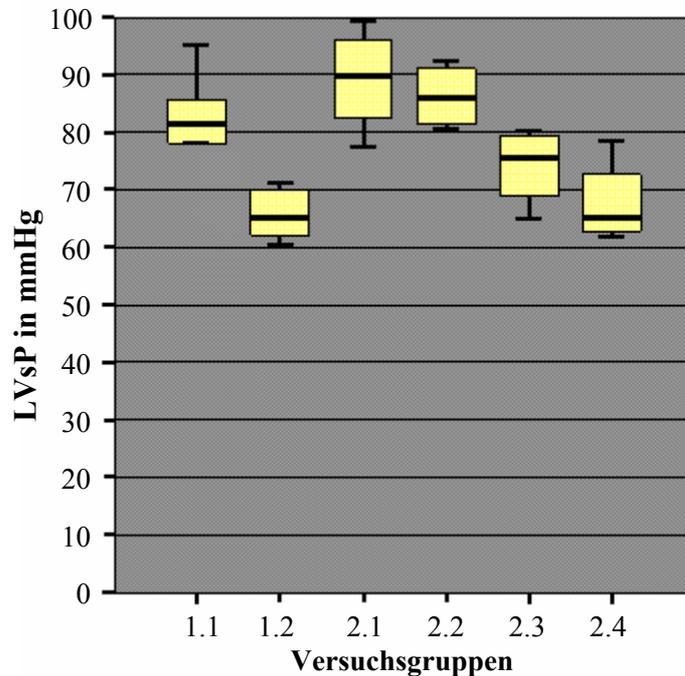


Abb. 3.3: Darstellung des linksventrikulären systolischen Drucks (LVsP) in mmHg in den verschiedenen Versuchsgruppen

3.4.2 Systolische Funktion (dP/dt max)

Die Kontraktilität des linksventrikulären Myokards wurde bestimmt als Verhältnis des Druckanstiegs zur Zeit (dP/dt max) (siehe Abb.: 3.4).

In der virusinfizierten Versuchsgruppe 1.2 war der dP/dt max signifikant ($p < 0,01$) reduziert gegenüber der Kontrollgruppe 1.1 (4139 ± 637 gegen 6104 ± 1889 mmHg/sec).

Unter IL-4-Behandlung war die Kontraktilität der Kontrollgruppe 2.1 nicht signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle 1.1 erhöht (6429 ± 861 mmHg/sec). Die Versuchstiere der früh und spät behandelten, infizierten Gruppen 2.2 und 2.3 zeigten eine Erhöhung der Kontraktilität (6049 ± 419 bzw. 5427 ± 158 mmHg/sec) gegenüber der infizierten Gruppe 1.2, dabei war der Anstieg der früh behandelten Gruppe mit $p < 0,01$ signifikant nach Mann-Whitney, hingegen konnte der Anstieg der spät behandelten Gruppe 2.3 mit $p = 0,048$ nicht als signifikant gewertet werden. In der durchgehend mit IL-4-behandelten, infizierten Gruppe 2.4

wurde eine geringfügige, nicht signifikante Abnahme der Kontraktilität auf 3857 ± 688 mmHg/sec beobachtet.

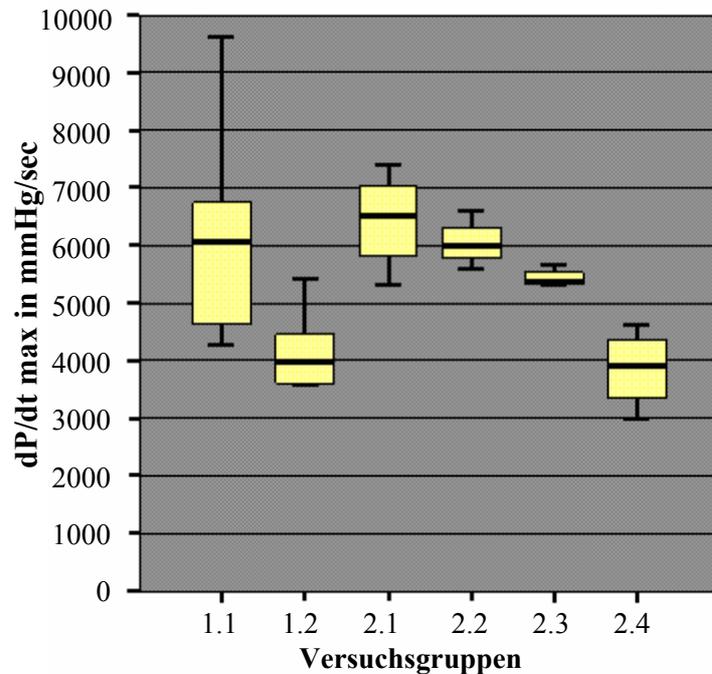


Abb. 3.4: Darstellung der systolischen Herzfunktion (dP/dt max) in mmHg/sec in den verschiedenen Versuchsgruppen

3.4.3 Diastolische Funktion (dP/dt min)

Als Maß für die Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels (dP/dt min), wurden Kraft und Geschwindigkeit der Entspannung der Muskelfasern des linken Ventrikels bestimmt als Verhältnis des negativen Druckanstiegs zur Zeit (siehe Abb.: 3.5).

Die diastolische Herzfunktion zeigte eine signifikante Verminderung ($p < 0,01$) des dP/dt min in der infizierten Versuchsgruppe 1.2 (3082 ± 576 mmHg/sec) gegenüber der Kontrollgruppe 1.1 (4367 ± 891 mmHg/sec).

Unter IL-4-Behandlung zeigte die Kontrollgruppe 2.1 einen nicht signifikanten Anstieg der linksventrikulären Relaxationsfähigkeit auf 4337 ± 707 mmHg/sec gegenüber der Kontrollgruppe 1.1. Eine Behandlung der infizierten Mäuse mit IL-4 in den ersten 5 Tagen

p.i. (Gruppe 2.2) führte zu einer deutlichen, jedoch nicht signifikanten Zunahme auf 3900 ± 252 mmHg/sec der Relaxationsfähigkeit gegenüber der infizierten Gruppe 1.2. Ein schwächerer, ebenfalls nicht signifikanter Anstieg wurde in der spät behandelten Gruppe 2.3 beobachtet (3281 ± 703 mmHg/sec). Die durchgehend behandelte Gruppe 2.4 zeigte wiederum eine signifikante Abnahme der linksventrikulären Relaxationsfähigkeit auf 2297 ± 286 mmHg/sec.

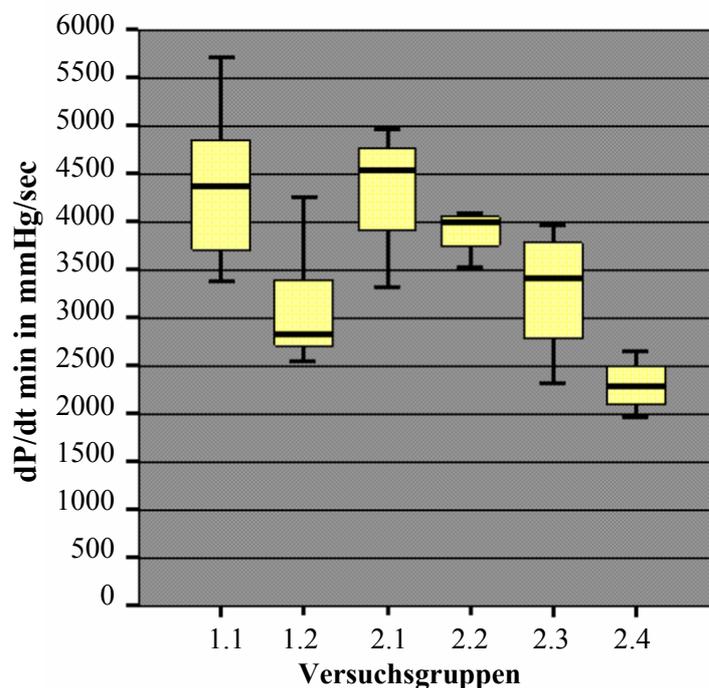


Abb. 3.5: Darstellung der diastolischen Herzfunktion (dP/dt min) in mmHg/sec in den verschiedenen Versuchsgruppen

3.4.4 Herzfrequenz

Die CB3 Virusinfektion in Versuchsgruppe 1.2 führte zu einer deutlichen, nicht signifikanten ($p=0,029$) Reduktion der Herzfrequenz gegenüber der Kontrollgruppe 1.1 ($314,0 \pm 82,6$ /min bzw. $399,3 \pm 54,2$ /min)(siehe Abb.: 3.6).

Unter IL-4-Behandlung war die Herzfrequenz der Kontrollgruppe 2.1 deutlich, jedoch abermals nicht signifikant ($p=0,024$) gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe 1.1

erniedrigt ($315,3 \pm 36,2/\text{min}$). Die Versuchstiere der früh, spät und durchgehend behandelten, infizierten Gruppen 2.2, 2.3 und 2.4 zeigten alle eine Reduktion der Herzfrequenz ($240,8 \pm 17,3/\text{min}$, $309,3 \pm 46,3/\text{min}$ bzw. $178,5 \pm 51,9/\text{min}$) gegenüber der infizierten Gruppe 1.2. Trotz zum Teil sehr starker Reduktion der Herzfrequenz in diesen drei Gruppen ergaben sich keine Signifikanzen im U-Test ($p=0,073$, $p=0,808$ bzw. $p=0,016$).

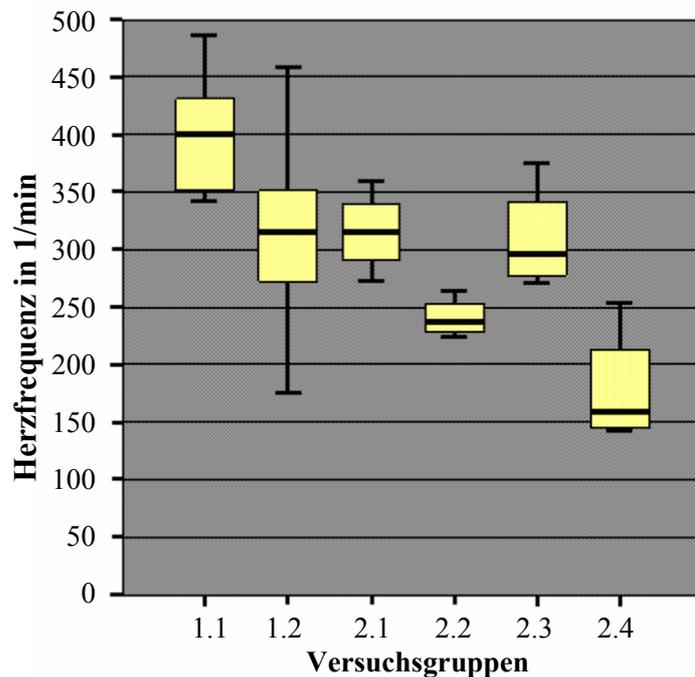


Abb. 3.6: Darstellung der Herzfrequenz in 1/min in den verschiedenen Versuchsgruppen

3.5 Nachweis enteroviraler RNA

Mittels RT-PCR in Kombination mit der nested-PCR konnte in allen 20 infizierten Tieren enterovirale RNA nachgewiesen werden. Dies gelang in keinem der Kontrolltiere (siehe Abb.: 3.7).

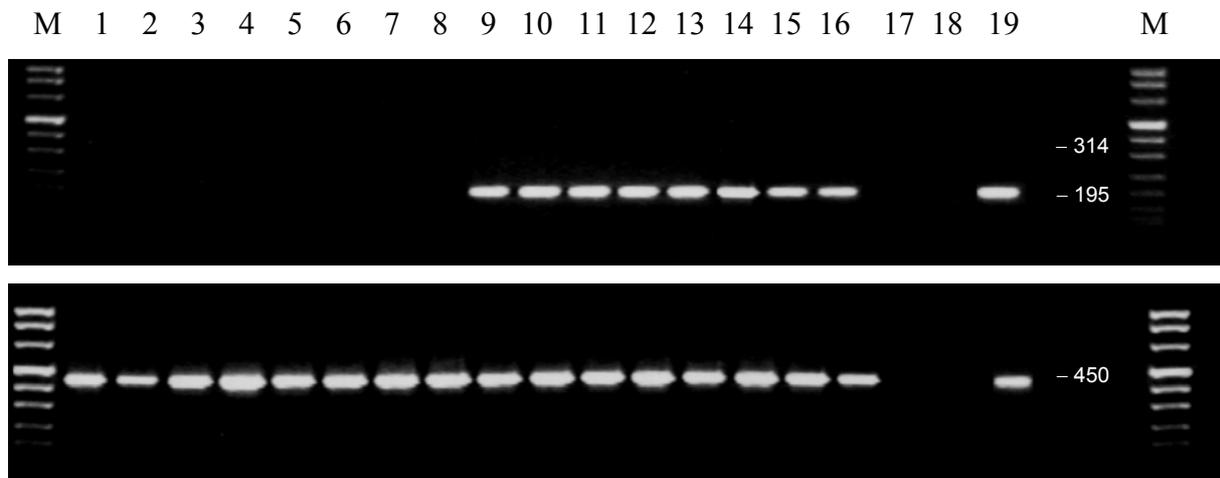


Abb. 3.7: Nachweis enteroviraler RNA mittels nested RT-PCR: Darstellung in einem 2%igen Agarosegel. Oben: Sekundäre nested RT-PCR zum Nachweis von CVB3. Unten: interne Kontrolle durch RT-PCR von β -Aktin
 Spur 1: DNA-Längenstandard, Spur 1 - 8: nicht infizierte Tiere der Gruppe 1.1
 Spur 9-16: infizierte Tiere der Gruppe 1.2; Spur 17,18 : Negativkontrolle; Spur 19: Positivkontrolle (PCV B3-Typ, 73,5ng/ μ l)

3.6 Veränderungen der mRNA-Expression

3.6.1 RT-PCR

Für die mit RT-PCR erhobenen Parameter für die mRNA-Expression ergab der H-Test, dass die drei Wertegruppen für Kollagen Typ III sowie für TNF- α und INF- γ aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammen (für Kol III $p < 0,01$, für TNF- α und INF- γ $p < 0,001$). Somit konnte eine signifikante Varianz zwischen den 6 Versuchsgruppen mit unterschiedlichen Behandlungen für diese drei Parameter angenommen werden, und Einzelvergleiche konnten vorgenommen werden. Für Kollagen Typ I ergab der H-Test keine Signifikanz, somit konnten keine Einzelvergleiche durchgeführt werden.

Eine statistische Auswertung für die erhobenen Werte von Kollagen Typ I und Typ III erfolgte nur für diese beiden Werte und nicht für deren Ratio, da ein Parameter nicht in mehrere Auswertungen der gleichen Art einfließen darf.

3.6.1.1 Kollagen Typ I

Mittels RT-PCR ließ sich bei Kollagen Typ I auf der Ebene der Genexpression nur ein minimaler Anstieg der mRNA-Expression von der Kontrollgruppe 1.1 ($0,98 \pm 0,15$) zu der infizierten Gruppe 1.2 zeigen ($1,02 \pm 0,17$) (siehe Abb.: 3.8 und Abb.: 3.13).

Unter IL-4-Behandlung zeigte die Kontrollgruppe 2.1 einen schwachen Anstieg der mRNA-Expression von Kol I gegenüber der Kontrollgruppe 1.1 auf $1,03 \pm 0,08$. Bei den infizierten Versuchsgruppen unter IL-4-Behandlung sank die mRNA-Expression in den Gruppen 2.2, 2.3 und 2.4 im Vergleich zur infizierten, unbehandelten Versuchsgruppe 1.2 auf $0,76 \pm 0,07$, $0,99 \pm 0,15$ bzw. $0,90 \pm 0,15$.

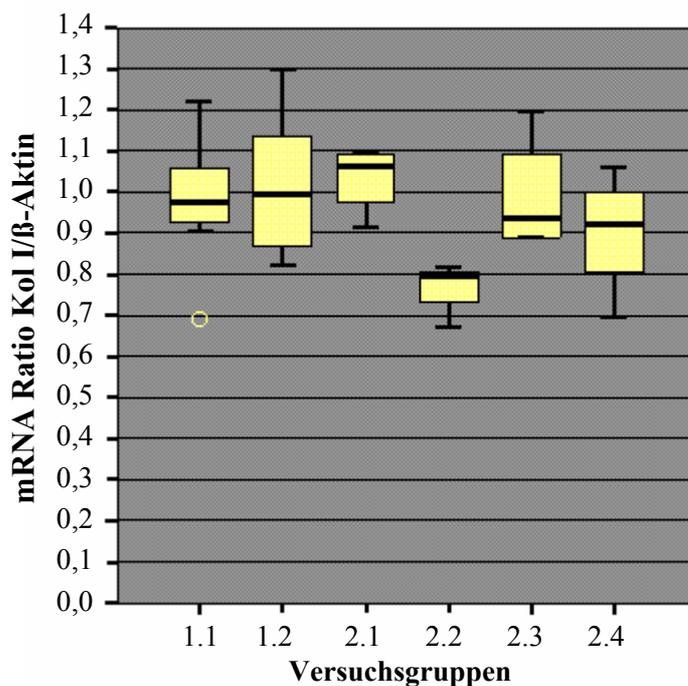


Abb. 3.8: Darstellung der mRNA-Expression von Kollagen Typ I als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

3.6.1.2 Kollagen Typ III

Die Kollagen Typ III mRNA-Expression sank nicht signifikant bei der Untersuchung mittels RT-PCR von $0,99 \pm 0,16$ in der Kontrollgruppe 1.1 auf $0,89 \pm 0,20$ in der infizierten Versuchsgruppe (siehe Abb.: 3.9 und Abb.: 3.13).

Unter IL-4-Behandlung zeigte die Kontrollgruppe 2.1 einen Anstieg der mRNA-Expression von Kollagen Typ III gegenüber der Kontrollgruppe 1.1 auf $1,32 \pm 0,13$. Auch bei den infizierten Versuchsgruppen unter IL-4-Behandlung stieg die mRNA-Expression in den Gruppen 2.2, 2.3 und 2.4 im Vergleich zur infizierten, unbehandelten Versuchsgruppe 1.2 auf $1,13 \pm 0,07$, $1,05 \pm 0,10$ bzw. $1,19 \pm 0,17$. Die Nullhypothese konnte nach der Signifikanzprüfung nach Mann-Whitney bei keiner der IL-4-behandelten Versuchsgruppen verworfen werden (Gruppe 2.1: $p=0,016$, 2.2: $p=0,073$, 2.3: $p=0,109$, 2.4: $p=0,048$).

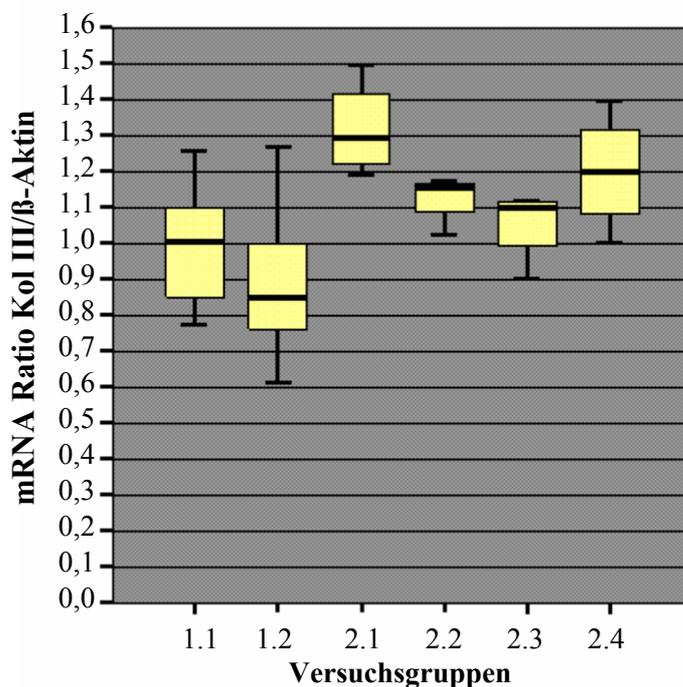


Abb. 3.9: Darstellung der mRNA-Expression von Kollagen Typ III als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

3.6.1.3 Ratio Kollagen Typ I / Kollagen Typ III

Die Veränderungen des Ratios der mRNA-Expression von Kol I/Kol III sind, aufgrund der unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften der beiden Kollagentypen, für die mechanischen Eigenschaften des Myokards von wesentlicher Bedeutung^{153,154}.

Der Ratio Kol I/III stieg in der infizierten Versuchsgruppe 1.2. gegenüber der Kontrollgruppe 1.1 ($1,17 \pm 0,18$ bzw. $0,99 \pm 0,14$) (siehe Abb.: 3.10). In der Kontrollgruppe 2.1 sank unter IL-4-Behandlung der Kol I/III Ratio gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe 1.1 auf $0,79 \pm 0,13$. Die früh, spät und durchgehend IL-4 behandelten Versuchsgruppen zeigten eine zum Teil deutliche Reduktion des Kollagenratios ($0,68 \pm 0,02$, $0,93 \pm 0,11$ bzw. $0,75 \pm 0,09$) im Vergleich zur unbehandelten, infizierten Versuchsgruppe 1.2.

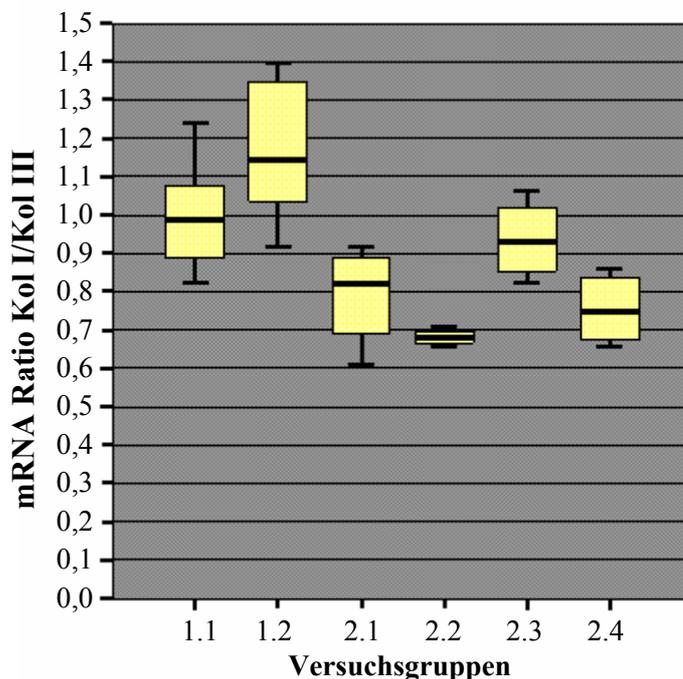


Abb. 3.10: Darstellung der mRNA-Ratios von Kollagen Typ I / Kollagen Typ III in den verschiedenen Versuchsgruppen.

3.6.1.4 TNF- α

Die CB3 Virusinfektion in Versuchsgruppe 1.2 führte zu einem deutlichen, signifikanten ($p < 0,01$) Anstieg der mRNA Expression von TNF- α gegenüber der Kontrollgruppe 1.1 ($1,12 \pm 0,26$ bzw. $0,72 \pm 0,17$) (siehe Abb.: 3.11 und Abb.: 3.13).

Unter IL-4-Behandlung war die mRNA-Expression von TNF- α der Kontrollgruppe 2.1 nicht signifikant gegenüber der unbehandelten Kontrolle 1.1 erniedrigt ($0,54 \pm 0,20$). Die Versuchstiere der früh, spät und durchgehend mit IL-4 behandelten, infizierten Gruppen 2.2, 2.3 und 2.4 zeigten alle eine Reduktion der mRNA-Expression ($0,82 \pm 0,04$, $0,72 \pm 0,17$ bzw. $0,98 \pm 0,08$) gegenüber der infizierten Gruppe 1.2. Trotz zum Teil sehr starker Reduktion in diesen drei Gruppen ergaben sich keine Signifikanzen im U-Test ($p = 0,073$, $p = 0,016$ bzw. $p = 0,386$).

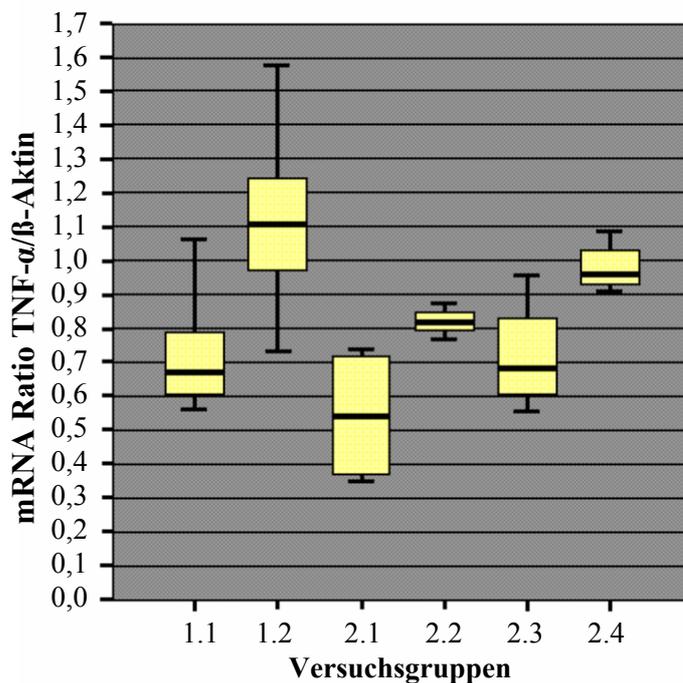


Abb. 3.11: Darstellung der mRNA-Expression von TNF- α als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

3.6.1.5 INF- γ

Die CB3 Virusinfektion in Versuchsgruppe 1.2 führte zu einem deutlichen, signifikanten ($p < 0,001$) Anstieg der mRNA Expression von INF- γ gegenüber der Kontrollgruppe 1.1 ($1,14 \pm 0,21$ bzw. $0,63 \pm 0,15$) (siehe Abb.: 3.12 und Abb.: 3.13).

Unter IL-4-Behandlung war die mRNA Expression von INF- γ der Kontrollgruppe 2.1 signifikant ($p < 0,01$) gegenüber der unbehandelten Kontrolle 1.1 erhöht ($1,00 \pm 0,12$). Die Versuchstiere der früh, spät und durchgehend mit IL-4-behandelten, infizierten Gruppen 2.2, 2.3 und 2.4 zeigten alle eine Reduktion der mRNA-Expression ($0,92 \pm 0,11$, $0,98 \pm 0,14$ bzw. $0,97 \pm 0,11$) gegenüber der infizierten Gruppe 1.2. Trotz zum Teil deutlicher Reduktion in diesen drei Gruppen ergaben sich keine Signifikanzen im U-Test ($p = 0,048$, $p = 0,283$ bzw. $p = 0,154$).

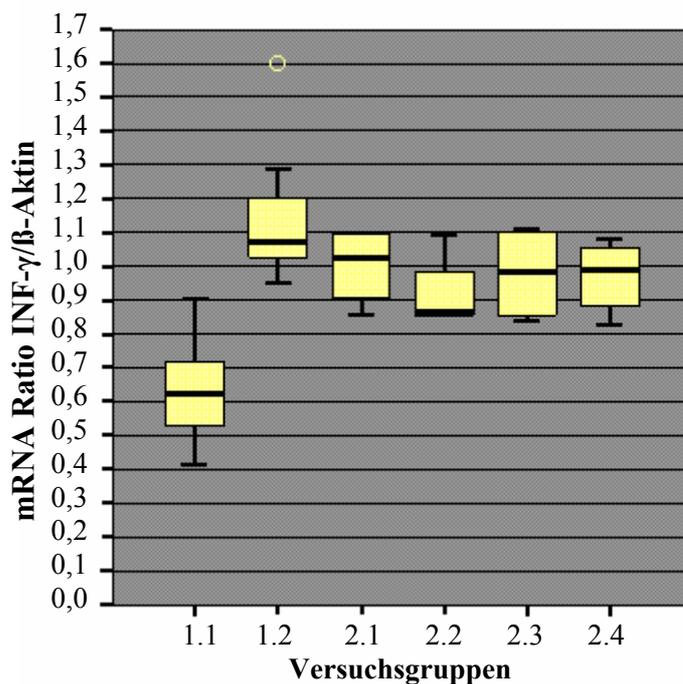


Abb. 3.12: Darstellung der mRNA-Expression von INF- γ als Ratio zur β -Aktin-Expression in den verschiedenen Versuchsgruppen.

	Kontrollgruppe 1.1	Infizierte Gruppe 1.2
β -Aktin		
KOL I		
KOL III		
INF- γ		
TNF- α		

	Infizierte Gruppe: IL-4-Behandlung Tag 1-10 (2.4)	Infizierte Gruppe: IL-4-Behandlung Tag 1-5 (2.2)	Infizierte Gruppe: IL-4-Behandlung Tag 6-10 (2.3)	Kontrollgruppe: IL-4-Behandlung Tag 1-10 (2.1)
β -Aktin				
KOL I				
KOL III				
INF- γ				
TNF- α				

Abb. 3.13: Darstellung der PCR-Ergebnisse aller untersuchten Transkripte in allen Versuchsgruppen

3.6.2 In-situ-Hybridisierung

Für Kollagen Typ I wurde die Genexpression exemplarisch an 3 Kontrollmäusen (Gruppe 1.1) und 3 infizierten Mäusen (Gruppe 1.2) mittels in-situ-Hybridisierung analysiert. Es zeigte sich, wie auch bei den Ergebnissen mittels RT-PCR (siehe 3.6.1.1), dass die Expression von Kollagen Typ I zwischen Kontrollgruppe und infizierter Gruppe sich nicht verändert (siehe Abb.: 3.14 und Abb.: 3.15). Es zeigte sich eine diffuse Ausbreitung über das gesamte Myokard ohne fokale Erhöhungen der Expression.

Die in-situ-Hybridisierungen für $\text{INF-}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$ und Kollagen Typ III zeigten keine positiven Signale. Trotz intensivster Bemühungen und der Herstellung verschiedener RNA-Sonden konnte der methodische Fehler aufgrund der Komplexität der Methode nicht gefunden werden.

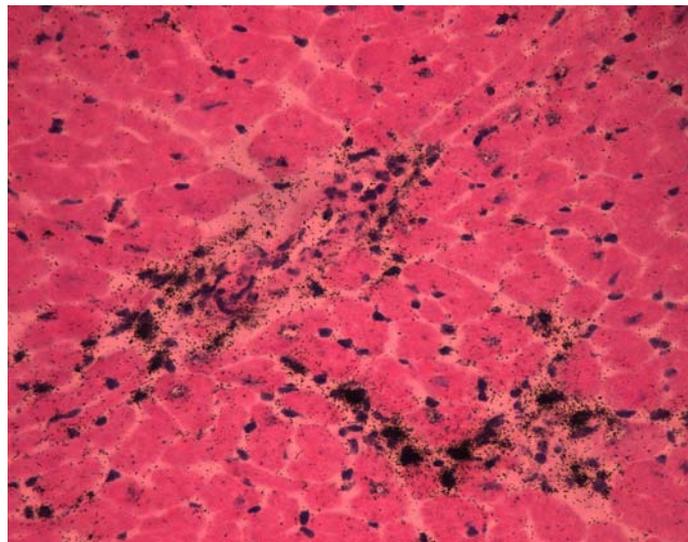


Abb. 3.14: In-situ-Hybridisierung für Kollagen Typ I mit einer antisense-konfigurierten RNA-Sonde bei einer Kontrollmaus der Versuchsgruppe 1.1 nach 4-wöchiger Exposition

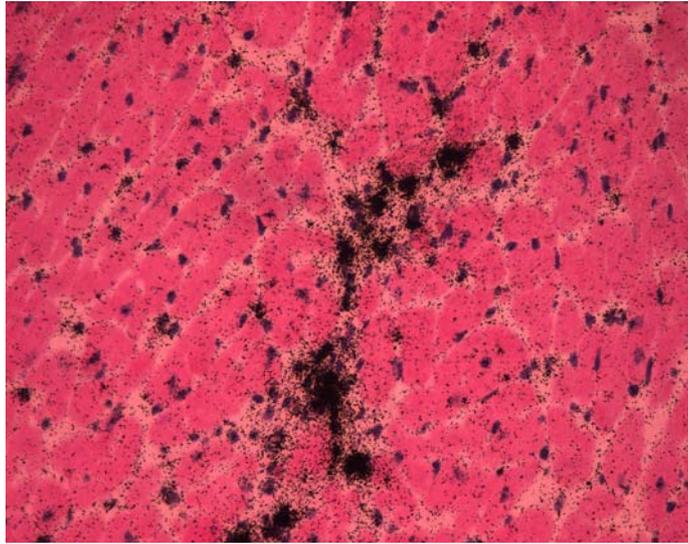


Abb. 3.15: In-situ-Hybridisierung für Kollagen Typ I mit einer antisense-konfigurierten RNA-Sonde bei einer CB3V-infizierten Maus der Versuchsgruppe 1.2 nach 4-wöchiger Exposition

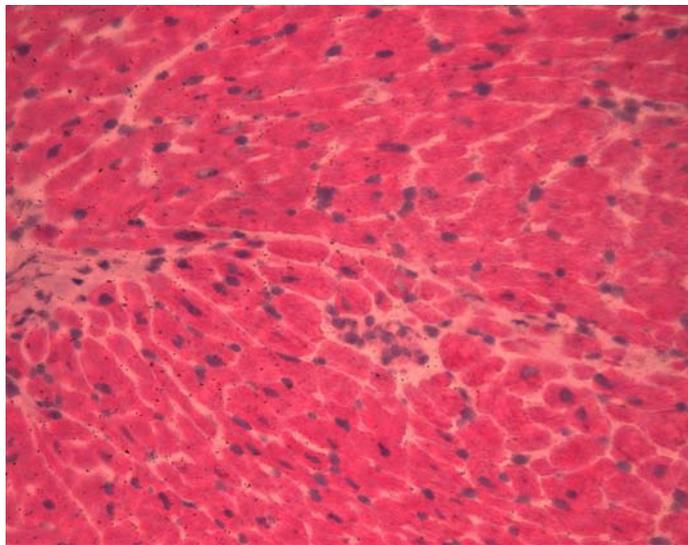


Abb. 3.16: In-situ-Hybridisierung für Kollagen Typ I mit einer sense-konfigurierten RNA-Sonde als Negativkontrolle bei einer CB3V-infizierten Maus der Versuchsgruppe 1.2 nach 4-wöchiger Exposition

3.7 Veränderungen des Proteingehalts

Auf Proteinebene wurde im Rahmen dieser Arbeit mittels Western Blot die Menge von Kollagen Typ I im Myokard an 8 Kontrollmäusen und 8 infizierten Mäusen untersucht. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg ($p < 0,005$) der löslichen Kollagen Typ I-Proteine von 6291 ± 1901 in der Kontrollgruppe auf 15097 ± 6163 (Angabe in OD-Werten) in der infizierten Gruppe (siehe Abb.: 3.17).

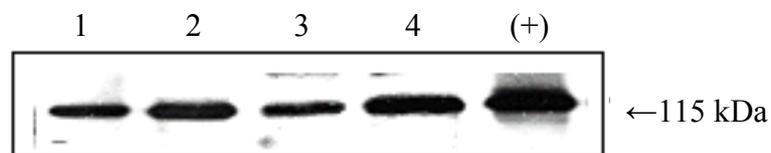


Abb. 3.17: Nachweis eines erhöhten Kollagen Typ I-Gehalts in CB3-infizierten Mäusen mittels Western Blot: Spur 1 und 3: repräsentative Proben der Kontrolltiere der Gruppe 1.1, Spur 2 und 4: repräsentative Proben der CB3-infizierten Tiere der Gruppe 1.2, (+): Positivkontrolle für Kollagen Typ I (Hs 68 WCL, Santa Cruz)