

3. Ergebnisse

3.1 Krankheitssymptome der Versuchstiere über die Versuchsdauer

Alle Tiere der virusinfizierten Gruppen hatten während der gesamten Versuchsdauer eine ähnliche Krankheitssymptomatik. Vier bis fünf Tage nach Infektion zeigten sich bei den Tieren erste Symptome in Form von abgeschwächtem Bewegungsdrang. Sie fraßen weniger, kletterten kaum mehr herum und lagen die meiste Zeit zusammengekauert in ihren Käfigen. 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 Kapitel 3.3). Diese Symptomatik stellte sich spätestens zum achten Tag bei allen infizierten Mäusen ein.

Dabei war die Ausprägung in den früh und durchgehend mit IL-4 behandelten Gruppen etwas geringer, trat aber zeitlich ähnlich auf. Die IL-4-Gabe in der Spätphase führte zu keinem erkennbaren Einfluss in der Klinik.

Bei den Tieren der Kontrollgruppen traten dagegen keine klinischen Veränderungen auf.

3.2 Mortalität

Bis zum 10. Tag p.i. starb in den Versuchsgruppen keines der insgesamt 32 Tiere, von denen 20 infiziert waren. Ein Versuchstier der unbehandelten Kontrollgruppe *K* starb im Rahmen der Narkoseeinleitung, so dass von diesem Tier keine hämodynamischen Parameter erhoben werden konnten.

3.3 Körper- und Herzgewicht der Versuchstiere

Sowohl für das Körpergewicht der Mäuse als auch für deren Herzgewicht ergab der H-Test nach Kruskal-Wallis, dass die Wertegruppen aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammten. Daher konnten Einzelvergleiche durchgeführt werden.

Die beobachtete Abmagerung der Tiere in den virusinfizierten Gruppen bestätigte sich auch durch das Wiegen der Tiere. Trotz eines vergleichbaren Startgewichtes der Mäuse zu Versuchsbeginn kam es in der infizierten Gruppe *I* gegenüber der Kontrollgruppe *K* für Körper- und Herzgewicht zu einer signifikanten Reduktion ($p < 0,001$) von $29,0 \pm 1,9$ g bzw. 156 ± 18 mg auf $19,3 \pm 1,4$ g bzw. 107 ± 7 mg (siehe Abb. 3.1).

Das Mausgewicht veränderte sich unter IL-4-Behandlung nur geringfügig gegenüber den entsprechenden unbehandelten Gruppen. So reduzierte sich das Körpergewicht in der IL-4-Kontrollgruppe *K+IL-4* gegenüber der Gruppe *K* auf $26,9 \pm 2,7$ g. In den infizierten Behandlungsgruppen *AP*, *FAP* und *SAP* kam es zu einer geringen Gewichtszunahme auf $19,9 \pm 1,8$ g, $21,9 \pm 2,9$ g bzw. $21,9 \pm 3,2$ g.

Ähnlich zeigte sich bei den IL-4-behandelten Mäusen nur eine geringe Herzgewichtsvarianz gegenüber den Gruppen *K* und *I*. Das Gewicht in der Gruppe *K+IL-4* sank auf 126 ± 12 mg. In den infizierten Gruppen *AP*, *FAP* und *SAP* veränderte sich das Herzgewicht gegenüber der Gruppe *I* nur gering (103 ± 8 mg, 101 ± 8 mg bzw. 111 ± 12 mg).

Keine dieser Veränderungen der IL-4-behandelten Gruppen war für Körper- und Herzgewicht gegenüber der Versuchsgruppe *I* statistisch signifikant.

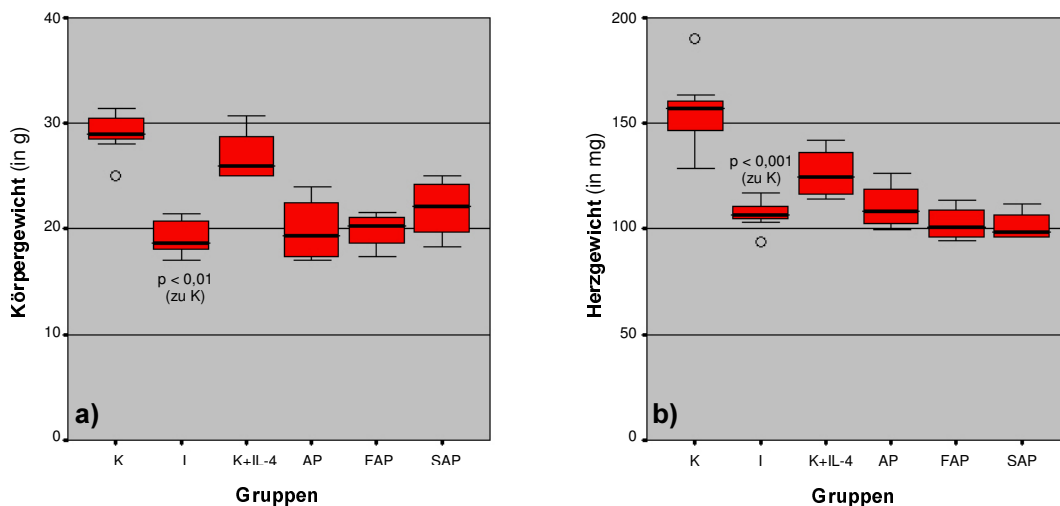


Abb. 3.1: Vergleich von Körper- (a) und Herzgewicht (b) in den einzelnen Versuchsgruppen.

3.4 Ergebnisse der hämodynamischen Untersuchung

Mit Ausnahme der kurz vor Versuchsende intraoperativ verstorbenen Maus der Gruppe *K* (siehe Kapitel 3.2) wurde bei allen Tieren eine hämodynamische Messung durchgeführt. Alle vier Wertegruppen der hämodynamischen Parameter konnten mittels H-Test unterschiedlichen Grundgesamtheiten zugeordnet werden (für LVsP $p < 0,01$, für dP/dt max und dP/dt min $p < 0,001$). Somit konnte eine signifikante Varianz zwischen den sechs Versuchsgruppen angenommen und Einzelvergleiche durchgeführt werden.

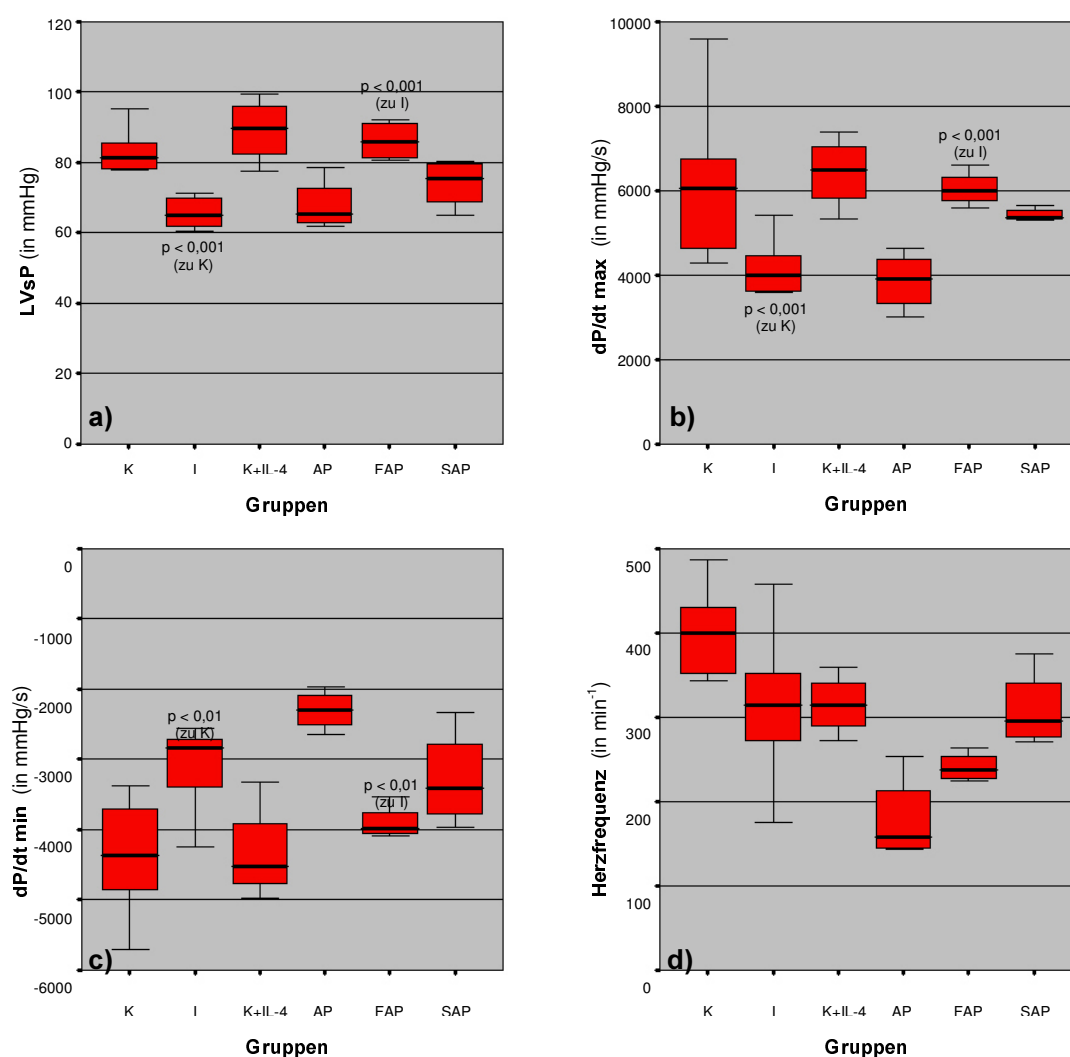


Abb. 3.2: Darstellung der linksventrikulären Funktionsparameter LVsP (a), dP/dt max (b) und dP/dt min (c) sowie der Herzfrequenz in den einzelnen Gruppen.

Die Funktionsparameter LVsP, dP/dt max und dP/dt min (vergleiche Abb. 3.2) zeigten übereinstimmende Veränderungen in allen Versuchsgruppen.

Am 10. Tag p.i. ergab sich in der unbehandelten infizierten Gruppe *I* gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme des LVsP ($65,7 \pm 4,3$ mmHg gegenüber $83,2 \pm 6,4$ mmHg, $p < 0,001$), des dP/dt max (4139 ± 637 gegen 6104 ± 1889 mmHg/s, $p < 0,01$) und des dP/dt min (-4367 ± 891 gegen -3082 ± 576 mmHg/s, $p < 0,01$).

Durch IL-4-Behandlung kam es bei den Kontrolltieren der Gruppe *K* gegenüber der Gruppe *I* zu keiner signifikanten Veränderung. In der frühbehandelten infizierten Gruppe waren LVsP ($86,3 \pm 5,7$ mmHg, $p < 0,001$) und dP/dt max (6049 ± 419 mmHg/s, $p < 0,001$) gegenüber den unbehandelten infizierten Mäusen deutlich und signifikant erhöht. Auch für dP/dt min zeigte sich in dieser Versuchsgruppe eine deutliche Erhöhung auf -3900 ± 252 mmHg/s, welche jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte. Auch für die vom 6.-10. Tag p.i. behandelten Tiere zeigte sich in allen Parametern eine zum Teil deutliche Erhöhung gegenüber der infizierten und unbehandelten Gruppe, die jedoch in keinem Parameter signifikant war (LVsP: $74,2 \pm 6,9$ mmHg; dP/dt max: 5427 ± 158 mmHg/s; dP/dt min: -3281 ± 703 mmHg/s). Unter durchgehender Behandlung zeigte der Relaxationsparameter dP/dt min eine signifikante Abnahme gegenüber der infizierten Gruppe ohne Behandlung (-2297 ± 286 mmHg/s, $p < 0,01$). Veränderungen des LVsP als Maß für die linksventrikuläre Wandspannung ($67,8 \pm 7,5$ mmHg) und des Kontraktilitätsparameters dP/dt max (3857 ± 866 mmHg/s) waren in dieser Gruppe nicht signifikant.

Die Herzfrequenz (vergleiche Abb. 3.2 d) war in der unbehandelten Versuchsreihe bei infizierten Tiere deutlich gegenüber den Kontrolltieren reduziert ($399 / \text{min} \pm 50$ bzw. $314 / \text{min} \pm 77$), ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen.

In der behandelten Versuchsreihe war die Herzfrequenz in allen Gruppen gegenüber den jeweiligen Vergleichstieren teilweise deutlich erniedrigt, aber ohne statistisch signifikant zu sein. Die IL-4 behandelten Kontrolltiere waren mit $315 / \text{min} \pm 36$ auf dem Niveau der unbehandelten infizierten Tiere. Die durchgehend behandelte Gruppe zeigte den niedrigsten Wert ($179 / \text{min} \pm 52$), gefolgt von den früh behandelten ($241 / \text{min} \pm 17$) und spät behandelten Gruppen ($309 / \text{min} \pm 46$).

3.5 Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR

3.5.1 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 (Abb. 3.3).

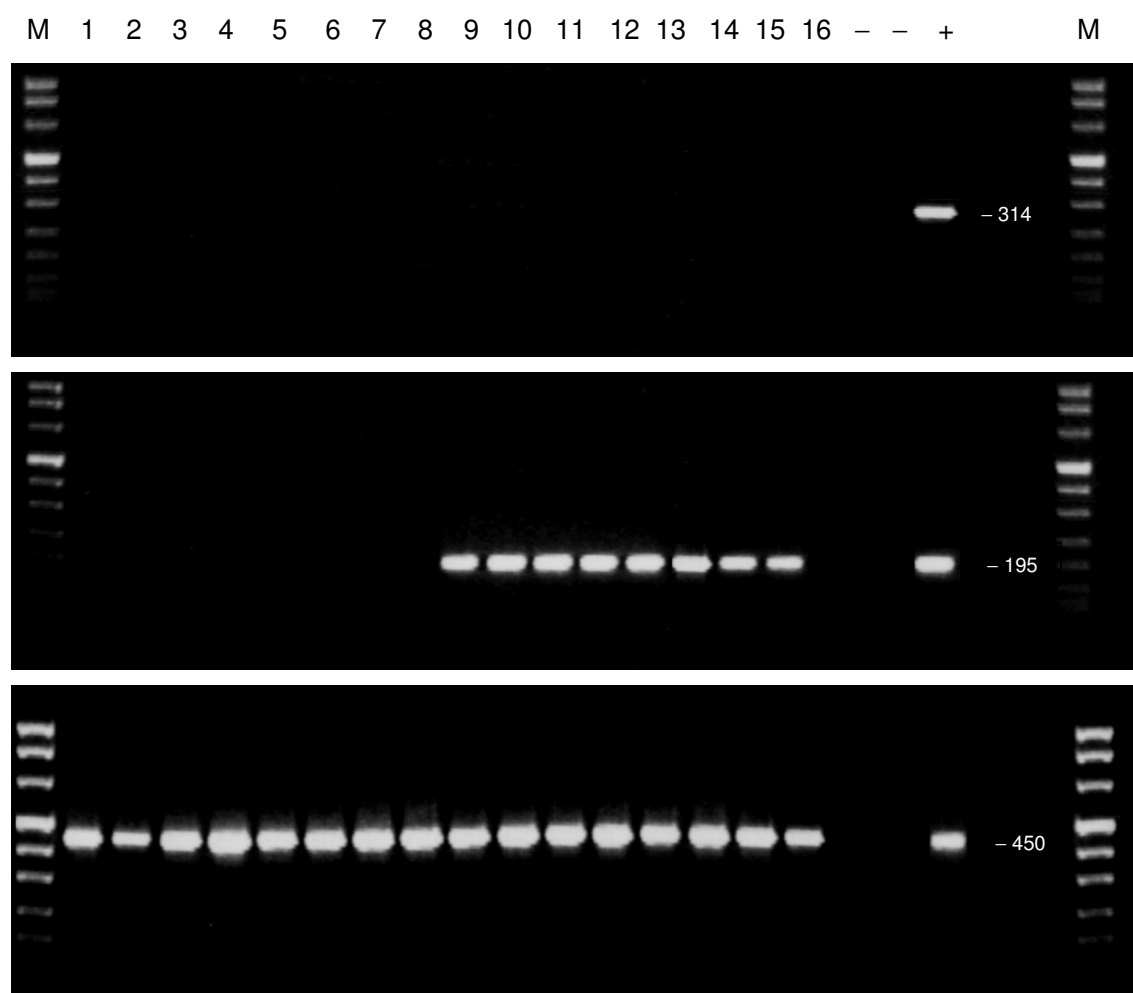


Abb. 3.3: Nachweis enteroviraler RNA mittels seminested RT-PCR.

Darstellung im 2%igen Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel.

Oben: RT-PCR von CVB3, Mitte: nested PCR, Unten: interne Kontrolle durch RT-PCR von β -Aktin.

(M = DNA-Längenstandard (Marker VIII), Spur 1 - 8: nichtinfizierte Tiere der Gruppe K; Spur 9 - 16: infizierte Tiere der Gruppe I; – = Negativkontrolle; + = Positivkontrolle)

3.5.2 Analyse der mRNA-Expression

Nur für TIMP-2 ergab der H-Test keine Signifikanz, so dass die Nullhypothese (Gleichheit zwischen den beobachteten Gruppen für diese Variable) nicht verworfen werden durfte. Für alle anderen Wertegruppen ergab der H-Test eine signifikante Varianz zwischen den sechs Versuchsgruppen für den jeweiligen Parameter und Einzelvergleiche konnten durchgeführt werden. Ein Vergleich der Genexpression in den einzelnen Gruppen sind anhand repräsentativer PCR-Analysen in Abb. 3.4 dargestellt.

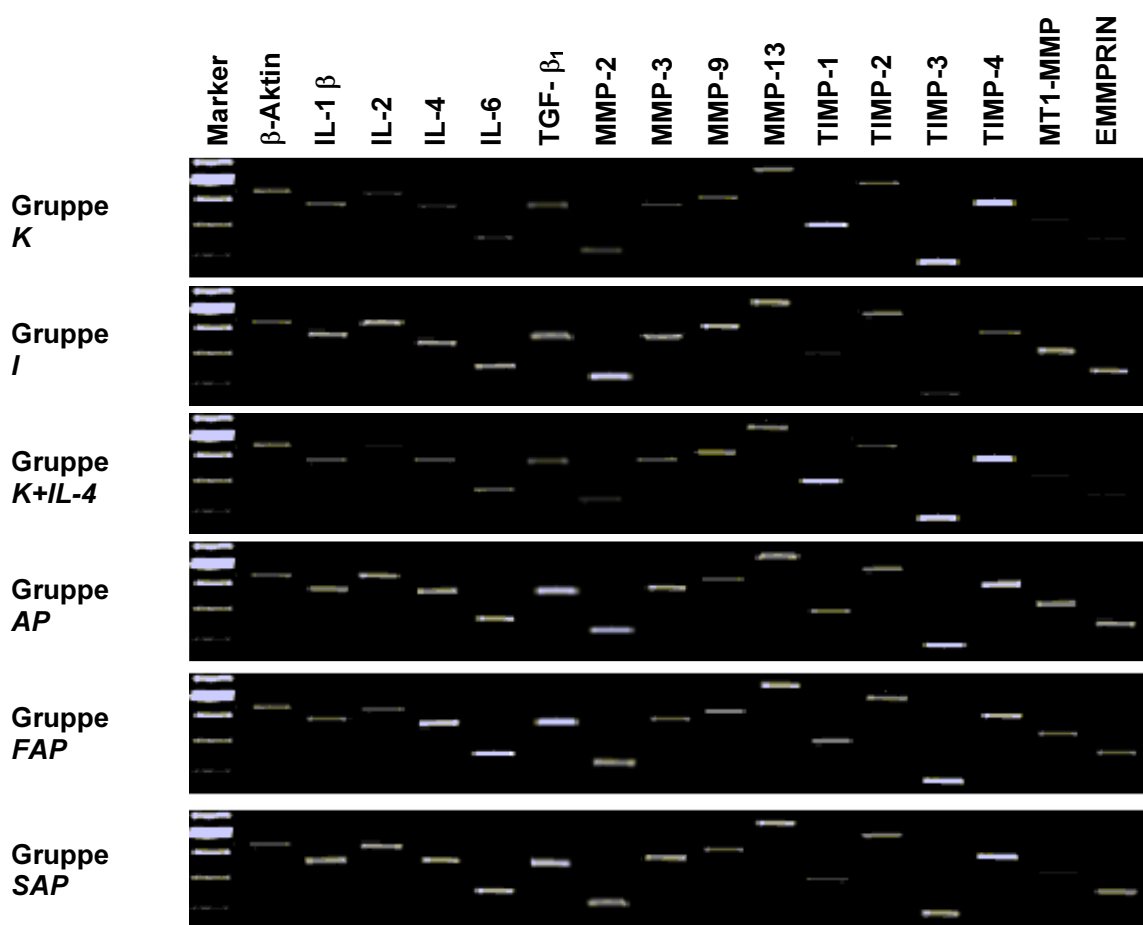


Abb. 3.4: Vergleich der Genexpression in den einzelnen Gruppen.

Aus jeder Gruppe wurde für jedes Template eine repräsentative Probe ausgewählt und auf einem 2%igen ethidiumbromidgefärbten Agarosegel dargestellt (Marker = 100 bp ladder).

3.5.2.1 mRNA-Expressionsanalyse pro- und antiinflammatorischer Zytokine

Bei allen untersuchten Zytokinen kam es in der infizierten Gruppe gegenüber der nicht-infizierten Kontrolle zu einer deutlichen und hochsignifikanten Erhöhung der mRNA-Expression (IL-1 β : $0,70 \pm 0,23$ auf $0,97 \pm 0,17$, $p < 0,001$; IL-2: $0,51 \pm 0,10$ auf $6,30 \pm 0,42$, $p < 0,001$; IL-4: $0,52 \pm 0,10$ auf $0,91 \pm 0,15$, $p < 0,001$; IL-6: $0,48 \pm 0,08$ auf $1,14 \pm 0,15$, $p < 0,01$; TGF- β_1 : $0,74 \pm 0,26$ auf $1,29 \pm 0,32$; $p < 0,001$).

Unter IL-4 Behandlung kam es für die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-2 (siehe Abb. 3.5 a-b) in den infizierten Gruppen zu einer mRNA-Expressionsminderung. Während diese Veränderungen bei IL-1 β teilweise deutlich, aber nicht signifikant waren (Behandlung 0.-10. Tag p.i.: $0,89 \pm 0,04$; 0.-5. Tag p.i.: $0,84 \pm 0,04$; 6.-10.Tag p.i.: $0,95 \pm 0,05$), zeigte sich bei IL-2 vor allem in der früh- ($3,57 \pm 0,12$, $p < 0,001$) und spätbehandelten Gruppe ($5,12 \pm 0,11$) eine deutliche und signifikante Reduktion der mRNA-Expression. Bei durchgehender IL-4-Gabe war die Verminderung der myokardialen IL-2-mRNA weniger deutlich und nicht-signifikant ($6,08 \pm 0,16$).

Die mRNA-Level von IL-4, IL-6 und TGF- β_1 (siehe Abb. 3.5 c-e) waren im Gegensatz zu den vorgenannten Zytokinen in den behandelten gegenüber den nicht-behandelten Gruppen erhöht. Dieser Effekt war am deutlichsten unter IL-4-Behandlung in den ersten fünf Tagen der Infektion (IL-4: $1,41 \pm 0,07$; IL-6: $1,31 \pm 0,07$; TGF- β_1 : $1,64 \pm 0,04$; alle $p < 0,01$). Bei Behandlung mit anderem Zeitschema war der Effekt weniger deutlich, erreichte jedoch für IL-4 bei später ($1,23 \pm 0,07$, $p < 0,01$), IL-6 bei durchgehender Behandlung ($1,26 \pm 0,08$, $p < 0,01$) und TGF- β_1 sowohl unter später als auch durchgehender IL-4-Gabe ($1,35 \pm 0,05$ bzw. $1,52 \pm 0,09$; beide $p < 0,01$) das Signifikanzniveau. Auch in der nicht-infizierten Behandlungsgruppe zeigte sich bei den drei Zytokinen eine Expressionssteigerung gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe, ohne jedoch statistisch signifikant zu sein.

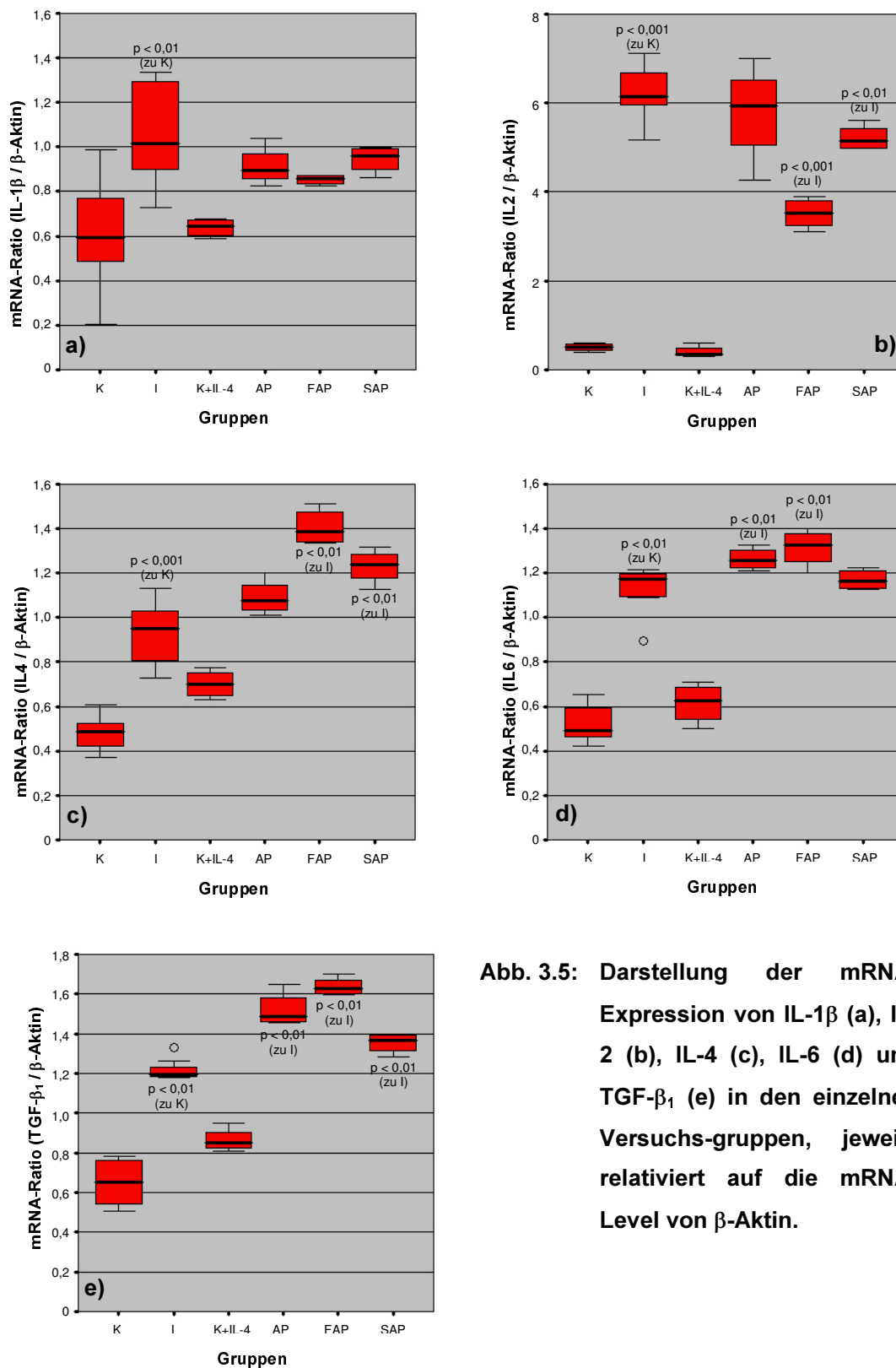


Abb. 3.5: Darstellung der mRNA-Expression von IL-1 β (a), IL-2 (b), IL-4 (c), IL-6 (d) und TGF- β_1 (e) in den einzelnen Versuchs-gruppen, jeweils relativiert auf die mRNA-Level von β -Aktin.

3.5.2.2 mRNA-Expressionsanalyse von MMP

Bei den infizierten Tieren in der unbehandelten Versuchsreihe kam es bei allen hier untersuchten MMP zu einer signifikanten Anhebung der mRNA-Expression (MMP-2: $0,63 \pm 0,07$ auf $1,64 \pm 0,08$, $p < 0,001$; MMP-3: $0,76 \pm 0,17$ auf $1,12 \pm 0,16$, $p < 0,001$; MMP-9: $0,59 \pm 0,12$ auf $1,19 \pm 0,12$, $p < 0,001$; MMP-13: $0,81 \pm 0,12$ auf $1,11 \pm 0,05$, $p < 0,001$; vergleiche Abb. 3.6).

Unter IL-4 Behandlung wurden diese infektionsbedingten Auswirkungen bei allen MMP in den infizierten Gruppen reduziert.

Dabei kam es bei MMP-2 und MMP-13 unter IL-4-Behandlung in den ersten fünf Tagen p.i. zur stärksten Nivellierung des infektionsbedingten Expressionsanstieg (MMP-2: $0,79 \pm 0,07$, $p < 0,001$; MMP-13: $0,83 \pm 0,04$, $p < 0,01$). Für MMP-2 zeigte sich auch in den Gruppen *SAP* ($1,20 \pm 0,07$, $p < 0,01$) und *AP* ($1,47 \pm 0,07$, $p < 0,01$) eine signifikant erniedrigte mRNA-Expression gegenüber der Gruppe *I*, während andere Zeitschemata bei MMP-13 keinen signifikanten Effekt gegenüber dem Kontrollniveau infizierter Tiere zeigten.

Bei MMP-9 war demgegenüber bei durchgehender (*AP*: $0,75 \pm 0,31$, $p < 0,01$) oder später Behandlung (*SAP*: $0,68 \pm 0,22$, $p < 0,01$) eine deutliche Annäherung an den Kontrollwert zu beobachten, wohingegen das Resultat in der frühbehandelten Gruppe *FAP* geringer und nicht signifikant ausfiel (*FAP*: $0,99 \pm 0,23$). Die IL-4-behandelte Kontrollgruppe 2.1 hatte mit $0,87 \pm 0,29$ eine höhere Expression als die unbehandelte Kontrollgruppe, die jedoch nicht signifikant war.

Bei MMP-3 führte eine Behandlung mit IL-4 in den ersten fünf Tagen nach Infektion zu einer deutlicheren Reduktion gegenüber der infizierten Kontrollgruppe *I* auf $0,93 \pm 0,06$, $p < 0,01$, wohingegen das Resultat in den durchgehend und spät behandelten Gruppen 2.2 und 2.4 geringer und nicht signifikant war ($1,00 \pm 0,09$ bzw. $1,17 \pm 0,09$). Auch bei der mit IL-4 behandelten Kontrolle kam es zu einer leichten Reduktion der MMP-3-Expression gegenüber der unbehandelten Kontrolle ($0,60 \pm 0,06$). Auch dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant.

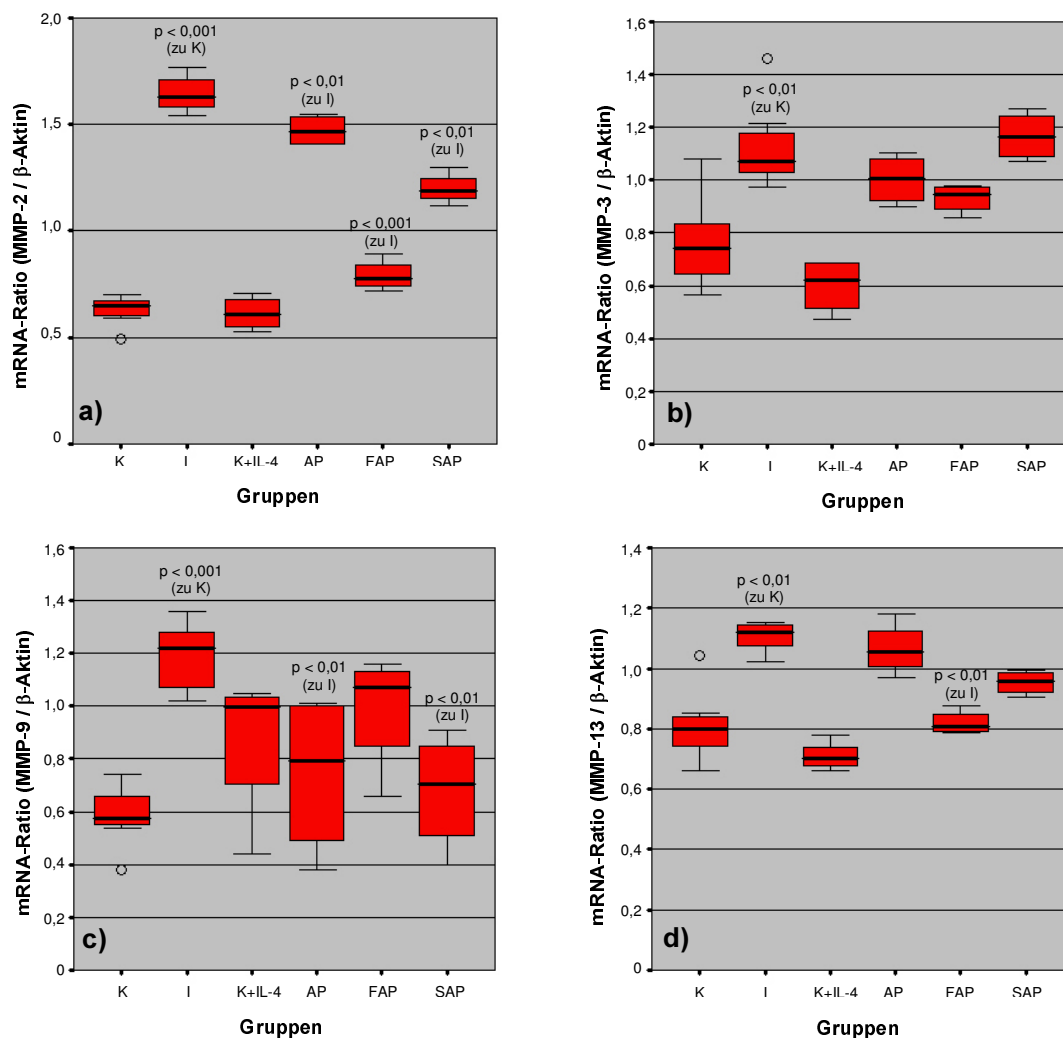


Abb. 3.6: Darstellung der mRNA-Expression von MMP-2 (a), MMP-3 (b), MMP-9 (c) und MMP-13 (d) in den einzelnen Gruppen, jeweils relativ auf die mRNA-Expression von β -Aktin.

3.5.2.3 mRNA-Expressionsanalyse von TIMP

In der ersten Versuchsreihe waren die mRNA-Expression von TIMP-1, TIMP-3 und TIMP-4 (vergleiche Abb. 3.7 a, c und d) in den infizierten Tieren signifikant auf etwa ein Viertel bis ein Drittel des Niveaus der Kontrolltiere herabgesetzt (TIMP-1: $0,33 \pm 0,11$ gegenüber $1,24 \pm 0,16$; TIMP-3: $0,37 \pm 0,05$ gegenüber $1,25 \pm 0,12$; TIMP-4: $0,45 \pm 0,08$ gegenüber $1,17 \pm 0,07$, alle $p < 0,001$).

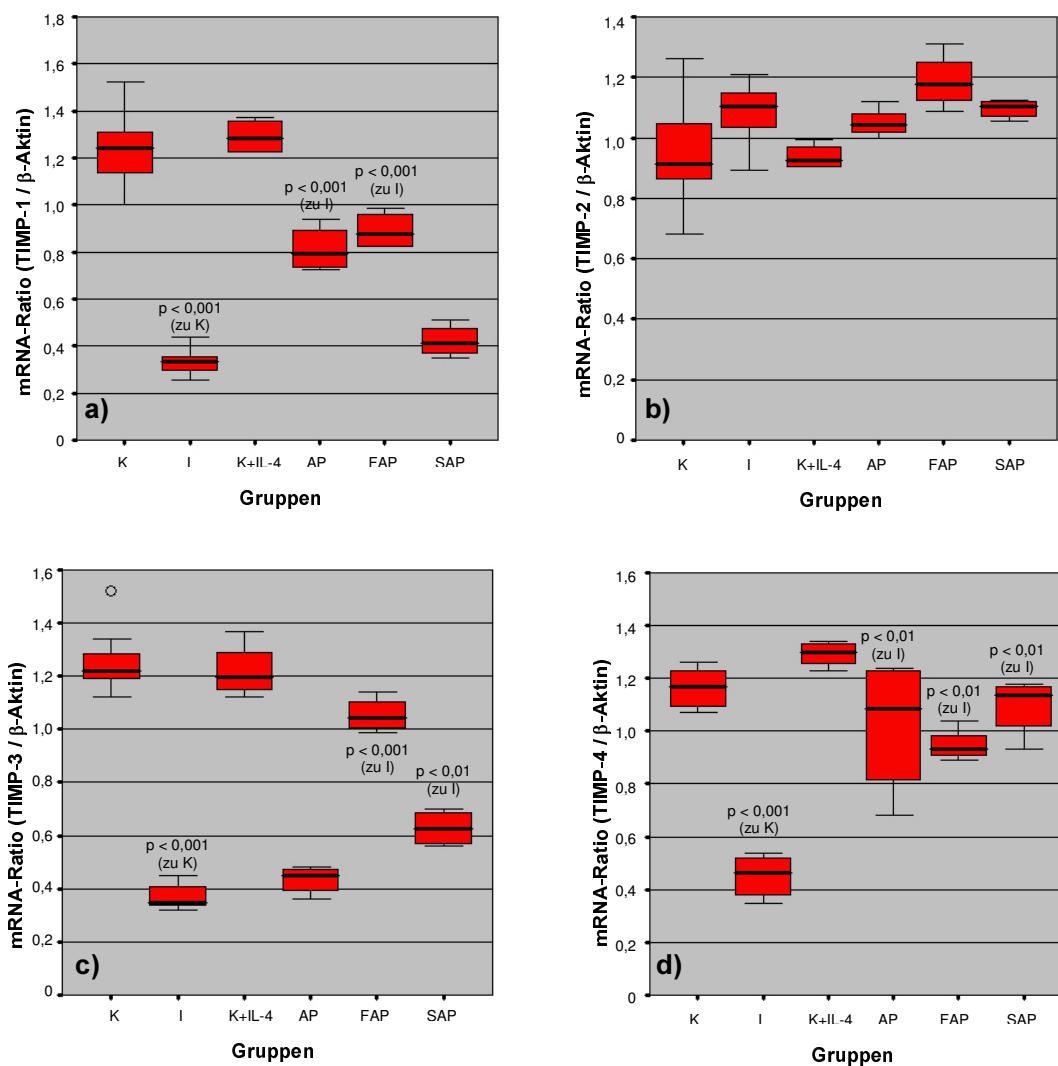


Abb. 3.7: Darstellung der mRNA-Expression von TIMP-1 (a), TIMP-2 (b), TIMP-3 (c) und TIMP-4 (d) in den einzelnen Gruppen, jeweils relativiert auf die mRNA-Expression von β -Aktin.

Unter IL-4-Gabe kam es bei allen drei TIMP zu einem drastischen Anstieg der Expression in den infizierten Gruppen. Dieser Effekt war für TIMP-1 und TIMP-3 am deutlichsten in der frühbehandelten Gruppe *FAP* (TIMP-1: $0,89 \pm 0,08$; TIMP-3: $1,02 \pm 0,08$, beide $p < 0,001$). Andere Zeitschema zeigten für TIMP-1 (*AP*: $0,81 \pm 0,10$, $p < 0,001$; *SAP*: $0,42 \pm 0,07$, nicht-signifikant) und TIMP-3 (*AP*: $0,42 \pm 0,07$, nicht-signifikant; *SAP*: $0,63 \pm 0,07$, $p < 0,01$) eine weniger starke Anhebung der Expression gegenüber den unbehandelten Gruppe *I*.

Auch für TIMP-4 zeigte sich unter IL-4-Gabe eine Reduktion der infektionsbedingten mRNA-Suppression. Hier war der Effekt unter späteinsetzender Therapie am stärksten ($1,10 \pm 0,11$), gefolgt von der durchgehenden ($1,02 \pm 0,26$) und frühen Intervention ($0,95 \pm 0,06$). Alle Ergebnisse der infizierten IL-4-behandelten Gruppen waren statistisch signifikant (alle $p < 0,01$) gegenüber der unbehandelten Gruppe / verschieden.

Der Grad der Expression von TIMP-2 (vergleiche Abb. 3.7 b) verhielt sich in den infizierten bzw. nicht-infizierten Gruppen ungefähr gleichermaßen. Da die Versuchsgruppen statistisch gemäß dem H-Test nach Kruskal-Wallis nicht aus verschiedenen Grundgesamtheiten stammen, waren Einzelvergleiche nicht zulässig.

3.5.2.4 mRNA-Expressionsanalyse von MT1-MMP und EMMPRIN

Durch semiquantitative RT-PCR konnte in infizierten Myokardproben eine hochsignifikant erhöhte mRNA-Expression von MT1-MMP und EMMPRIN gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden (MT1-MMP: $1,19 \pm 0,12$ zu $0,35 \pm 0,09$; EMMPRIN: $1,11 \pm 0,08$ zu $0,47 \pm 0,10$; beide $p < 0,001$; vergleiche Abb. 3.8).

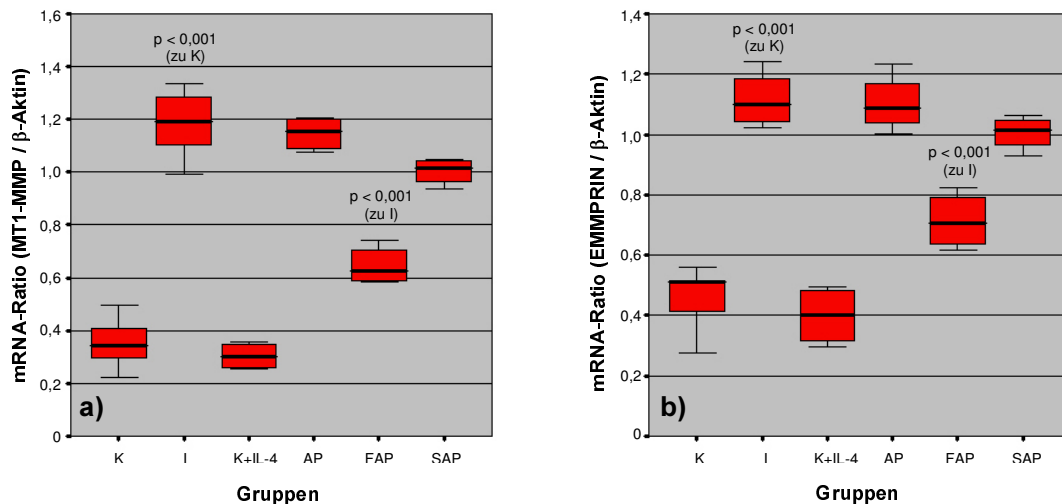


Abb. 3.8: Vergleich der mRNA-Expression von MT1-MMP (a) und EMMPRIN (b) in den einzelnen Gruppen bezogen auf die mRNA-Expression von β -Aktin.

Unter IL-4-Behandlung wurde diese infektionsbedingte Expressionserhöhung reduziert. Während eine durchgehende (MT1-MMP: $1,15 \pm 0,07$; EMMPRIN: $1,10 \pm 0,10$) oder späte Behandlung mit IL-4 (MT1-MMP: $1,01 \pm 0,05$; EMMPRIN: $1,01 \pm 0,06$) nur wenig Einfluss hatten, wurde durch IL-4-Gabe vom 0.-5. Tag p.i. die Expression hochsignifikant reduziert (MT1-MMP: $0,71 \pm 0,10$; EMMPRIN: $0,71 \pm 0,11$; beide $p < 0,001$).

3.6 In-situ Hybridisierung

Die RNA:RNA-in-situ Hybridisierung ist eine sehr sensitive Methode zum Nachweis spezifischer mRNA-Sequenzen direkt im Myokardgewebe, sie ist aufgrund ihrer Komplexität allerdings auch sehr fehleranfällig. Daher erfolgte in dieser Arbeit die mRNA-Expressionsanalyse semiquantitativ mittels RT-PCR, während die in-situ Hybridisierung nur zur Untersuchung des Verteilungsmusters der Expression im Herzquerschnitt für IL-6, TGF- β_1 , MMP-3 und TIMP-1 exemplarisch an 4 Kontrollmäusen der Gruppe K und an 4 infizierten Mäusen (Gruppe I) analysiert wurde.

Hierbei unterschieden sich die Signalverteilungen und -stärken in den Proben einer Gruppe nur tendentiell voneinander. Auch ließ sich keine Bevorzugung des links- oder rechtsventrikulären Myokards feststellen.

Für IL-6 (siehe Abb. 3.9) und TGF- β_1 (siehe Abb. 3.10) zeigte sich vorwiegend ein perivaskulär lokalisiertes Expressionsmuster, sowie fokal im Bereich größerer Infiltration. Bei beiden Sonden war entsprechend den RT-PCR-Ergebnissen die Signaldichte im infizierten Gewebe tendentiell stärker. Bei MMP-3 (siehe Abb. 3.11) und TIMP-1 (siehe Abb. 3.12) zeigten sich dagegen sowohl im Bereich vaskulärer Strukturen als auch diffus im Myokardgewebe verteilte Expressionszentren. Auch hier zeigte sich analog den mRNA-Expressionsanalysen mittels RT-PCR tendentiell bei den infizierten Versuchstieren eine stärkere Expression von MMP-3 bzw. eine reduzierte Signalstärke für TIMP-1.

In den behandelten Gruppen wurde das Expressionsmuster nicht untersucht. Ob sich unter Behandlung neben der quantitativen mRNA-Expression auch das Expressionsmuster verändert, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

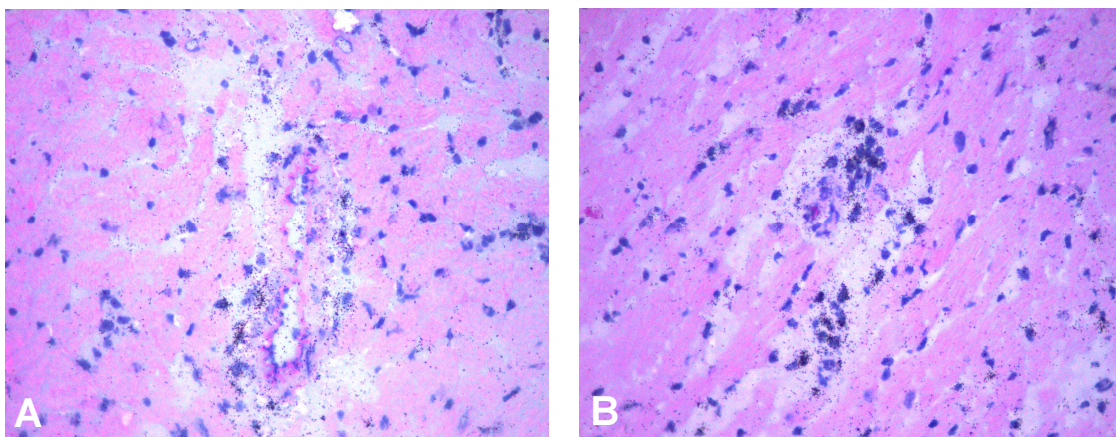


Abb. 3.9: Antisense-konfigurierte Sonde von IL-6 im Myokard einer Kontrollmaus der Gruppe K (A) bzw. einer infizierten Maus der Gruppe I (B). Vergrößerung 200 x.

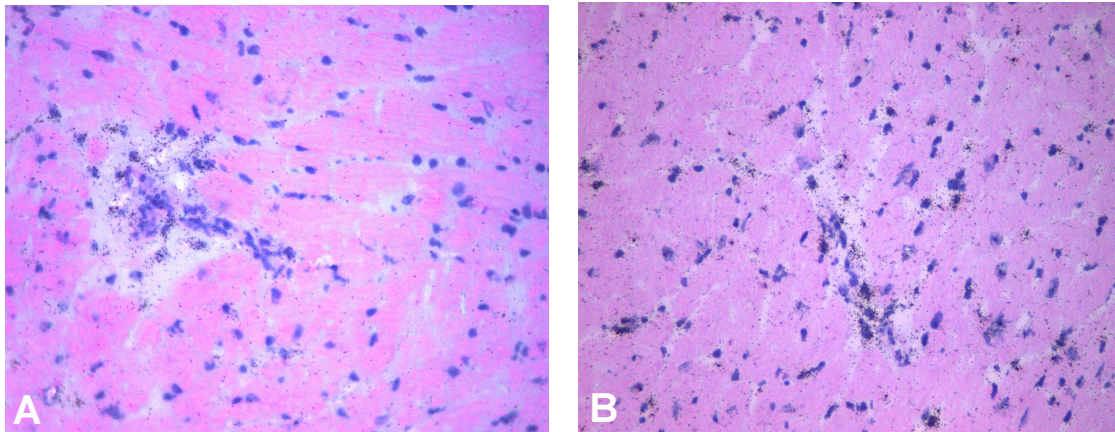


Abb. 3.10: Antisense-konfigurierte Sonde von TGF- β_1 im Myokard einer Kontrollmaus der Gruppe K (A) bzw. einer infizierten Maus der Gruppe I (B). Vergrößerung 200 x.

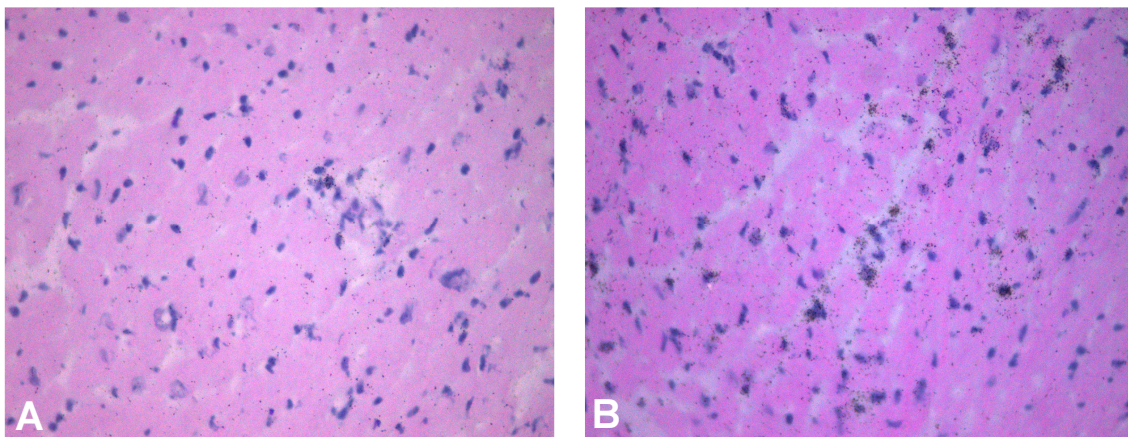


Abb. 3.11: Antisense-konfigurierte Sonde von MMP-3 im Myokard einer Kontrollmaus der Gruppe K (A) bzw. einer infizierten Maus der Gruppe I (B). Vergrößerung 200 x.

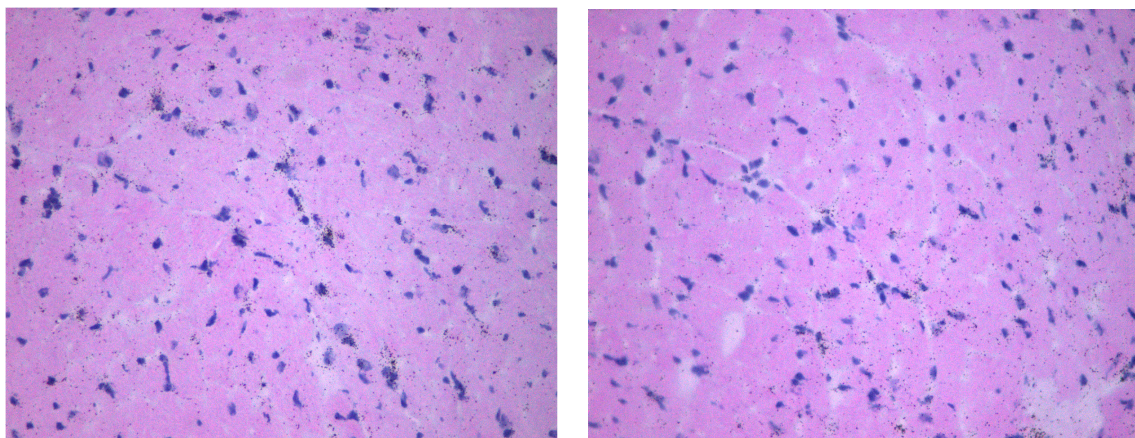


Abb. 3.12: Antisense-konfigurierte Sonde von TIMP-1 im Myokard einer Kontrollmaus der Gruppe K (A) bzw. einer infizierten Maus der Gruppe I (B). Vergrößerung 200 x.

3.7 Ergebnisse der histomorphologischen und immunhistochemischen Analyse

3.7.1 Verteilungsanalyse myokardialer Läsionen

Die Luxol Fast Blue-Färbung von myokardialen Schnitten beider nicht-infizierter Mausgruppen zeigte einzelne, diffus im Myokard verteilte myofibrilläre Degenerationen, deren Fläche unter 1% der analysierten Myokardgesamtfläche lag ($K: 0,96\% \pm 0,83$, $K+IL-4: 0,93\% \pm 0,73$; siehe Abb. 3.13). In der Gruppe I zeigte sich ein signifikanter Anstieg des gefärbten Areals auf $8,55\% \pm 1,18$ ($p < 0,001$). Qualitativ zeigten sich Kardiomyozytolyse bevorzugt im inneren Drittel der Ventrikelwand und im Bereich zellulärer Infiltrate.

Eine durchgehende Behandlung mit IL-4 führte zu einem geringen, nicht signifikanten Rückgang der Läsionen auf $6,00\% \pm 1,44$. Dagegen verursachte eine Applikation während der frühen ($11,15\% \pm 2,43$) und späten akuten Phase ($11,93\% \pm 1,28$) eine Zunahme myokardialer Schäden, welche für die Gruppe SAP das Signifikanzniveau erreichte.

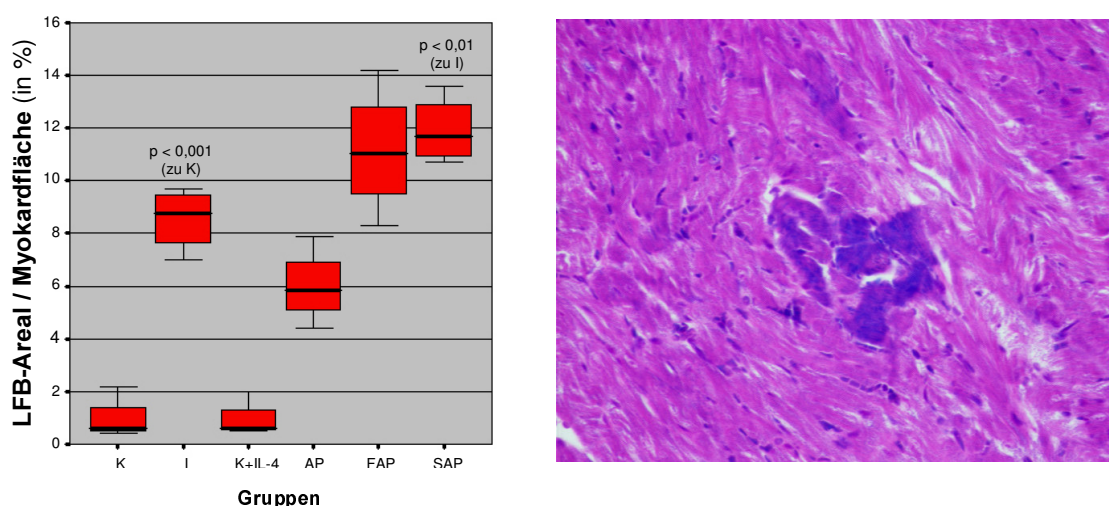


Abb. 3.13: Links: Auswertung der Luxol Fast Blue-Färbung. Rechts: Nachweis von myokardialen Läsionen mittels Luxol Fast Blue (Vergrößerung 100x).

3.7.2 Analyse des zellulären Infiltrates

Durch immunhistochemische Färbung wurde die Zusammensetzung des zellulären Infiltrates im Myokardgewebe genauer untersucht. Die Gesamtzahl von T-Lymphozyten wurde durch spezifische Antikörper gegen den Oberflächenmarker CD3 bestimmt. Als weitere

Unterscheidungshilfe dienten CD4-Antikörper, welche vorwiegend T-Helferzellen detektieren, und CD8a-Antikörper, welche hauptsächlich zytotoxische T-Lymphozyten erkennen. Der Makrophagennachweis erfolgte durch Antikörper gegen MAC-3 (siehe Abb. 3.14 und 3.15). In den unbehandelten Kontrolltieren fanden sich in allen untersuchten Oberflächenmarkern nur vereinzelte Signale (CD3: $1,2 \pm 1,8$ Zellen pro mm^2 , CD4: $1,5 \pm 1,2$ Zellen pro mm^2 , CD8a: $4,5 \pm 1,8$ Zellen pro mm^2 , MAC-3: $0,2 \pm 0,1$ Zellen pro mm^2). Infolge der viralen Infektion kam es zu einer signifikanten Zunahme ($p < 0,001$ für CD3, CD8a und MAC-3, $p < 0,01$ für CD4) der zellulären Infiltration, welche sich überwiegend fokal im Myokardgewebe und perivaskulär manifestierte. Dabei hatten T-Lymphozyten den größten Anteil an den infiltrierenden Zellen (CD3: $72,1 \pm 13,7$ Zellen pro mm^2), mit einer Prädominanz von zytotoxischen Lymphozyten (CD8a: $64,2 \pm 7,7$ Zellen pro mm^2) gegenüber den T-Helferzellen (CD4: $16,0 \pm 2,1$ Zellen pro mm^2); Makrophagen fanden sich in einem Anteil von $13,2 \pm 2,5$ Zellen pro mm^2 Myokardfläche.

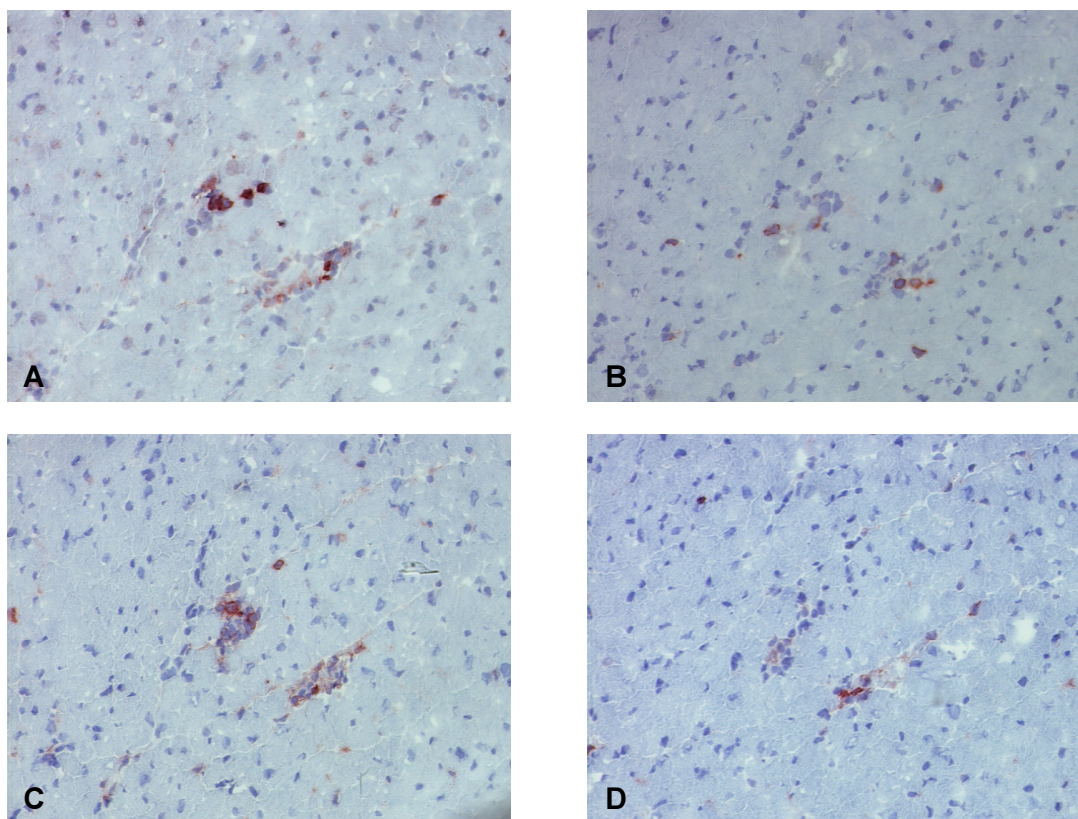


Abb. 3.14: Immunhistochemische Färbung serieller Schnitte des Myokardgewebes einer Maus der Gruppe I: Detektion von CD3 (A), CD4 (B), CD8a (C) und MAC-3 (D). Vergrößerung jeweils 200x.

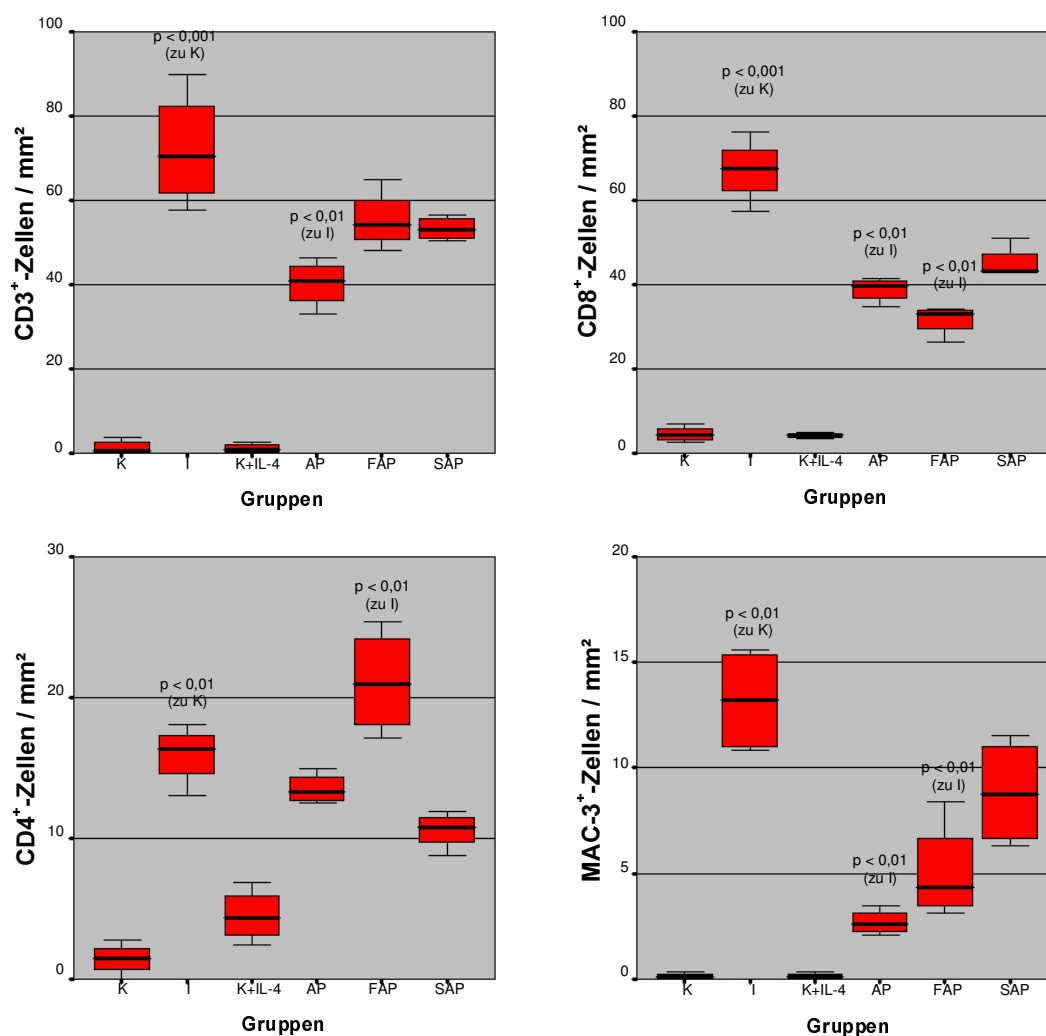


Abb. 3.15: Auswertung der immunhistochemischen Färbung zur Detektion von CD3 (A), CD4 (B), CD8a (C) und MAC-3 (D).

Die Applikation von exogenem IL-4 führte in allen infizierten Gruppen zu einer Veränderung der Infiltratzusammensetzung mit einer Abnahme des CD8a-Anteils. Eine durchgehende Behandlung führte zu einer Verminderung aller Immunzelltypen (CD3: $41,3 \pm 9,1$ Zellen pro mm^2 , CD4: $13,5 \pm 1,1$ Zellen pro mm^2 , CD8a: $38,9 \pm 2,9$ Zellen pro mm^2 , MAC-3: $2,7 \pm 0,6$ Zellen pro mm^2), wobei die Verminderung von CD3, CD8a und MAC-3 statistisch signifikant war (jeweils $p < 0,01$). Auch in den Gruppen FAP und SAP kam es zu einem Abfall der CD3⁺-Lymphozyten (FAP: $55,3 \pm 7,0$ Zellen pro mm^2 ; SAP: $53,3 \pm 4,9$ Zellen pro mm^2 ; beide nicht-signifikant). Dabei verschob sich in der Gruppe FAP das Verhältnis zwischen CD4⁺- und

CD8⁺-Zellen signifikant ($p < 0,01$) zugunsten der CD4⁺-Lymphozyten (CD4: $21,1 \pm 3,8$ Zellen pro mm²; CD8: $31,7 \pm 3,6$ Zellen pro mm²). Unter später Behandlung nahm sowohl die Gesamtlymphozytenzahl, als auch die Anzahl an CD4⁺- ($10,6 \pm 1,3$ Zellen pro mm²) und CD8⁺-Lymphozyten ($45,1 \pm 3,8$ Zellen pro mm²) ab, ohne das sich das Verhältnis der Lymphozytensubgruppen zueinander wesentlich änderte. Die makrophagozytäre Infiltration war sowohl bei Behandlung in der frühen ($5,1 \pm 2,3$ Zellen pro mm²) als auch in der späten akuten Phase ($8,8 \pm 2,6$ Zellen pro mm²) vermindert, wobei der Rückgang nur in der Gruppe *FAP* signifikant war ($p < 0,01$).

Die Gruppe *K+IL-4* unterschied sich in keinem Parameter signifikant von der unbehandelten Kontrolle.

3.8 Aktivitätsbestimmung von MMP-2 und MMP-9

Die gelatinolytische Aktivität von MMP-2 und MMP-9 wurde mit Hilfe der Gelatin-Zymographie quantifiziert und eine ungefärbte Bande bei 92 kDa als MMP-9 und bei 62 kDa als MMP-2 identifiziert (vergleiche Abb. 3.16 und 3.17). Nach Zugabe von EDTA in den Enzympuffer zeigte sich bei keiner Probe eine gelatinolytische Aktivität und bestätigte die Spezifität der Methode zum Nachweis der MMP.

Bei den infizierten Tieren in der unbehandelten Versuchsreihe kam es zu einer hochsignifikanten Zunahme der MMP-2- und MMP-9-Aktivität bezogen auf die unbehandelte Kontrollgruppe (MMP-2: $383\% \pm 30$; MMP-9: auf $1550\% \pm 96$, beide $p < 0,001$). Durch L-4 wurde die gelatinolytische Aktivität in der durchgehend (MMP-2: $275\% \pm 25$; MMP-9: $1278\% \pm 211$, beide nicht-signifikant) und spät behandelten Gruppe (MMP-2: $219\% \pm 17$; MMP-9: $863\% \pm 138$, beide $p < 0,01$) reduziert, und war in der frühzeitig behandelten Gruppe *FAP* nur noch gering gegenüber dem Kontrollniveau erhöht (MMP-2: $173\% \pm 21$; MMP-9: $335\% \pm 154$, beide $p < 0,001$). Auf die Kontrollgruppe hatte die IL-4-Gabe keinen signifikanten Einfluss (MMP-2: $125\% \pm 18$; MMP-9: $111\% \pm 37$).

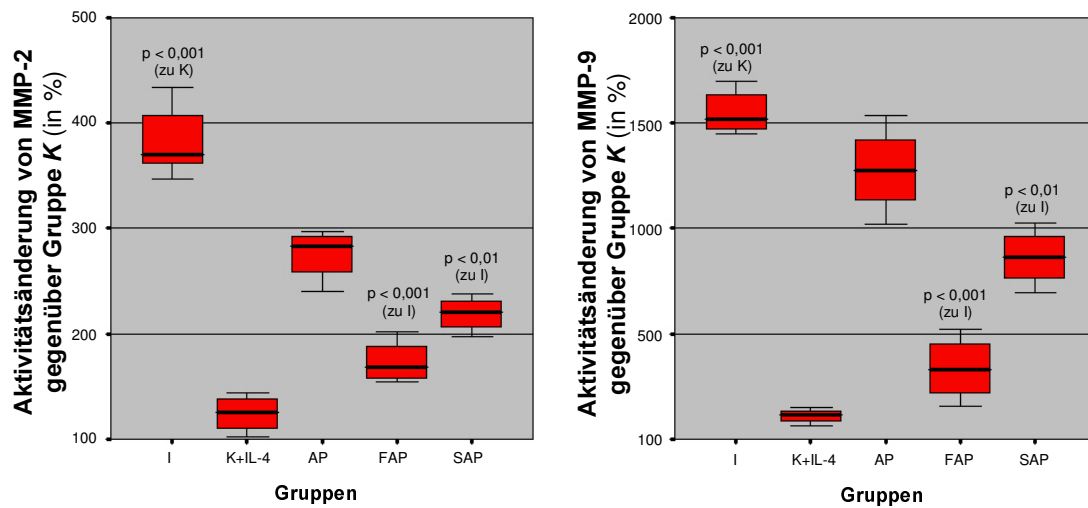


Abb. 3.16: Auswertung der gelatinolytischen Aktivität von MMP-2 (links) und MMP-9 (rechts).

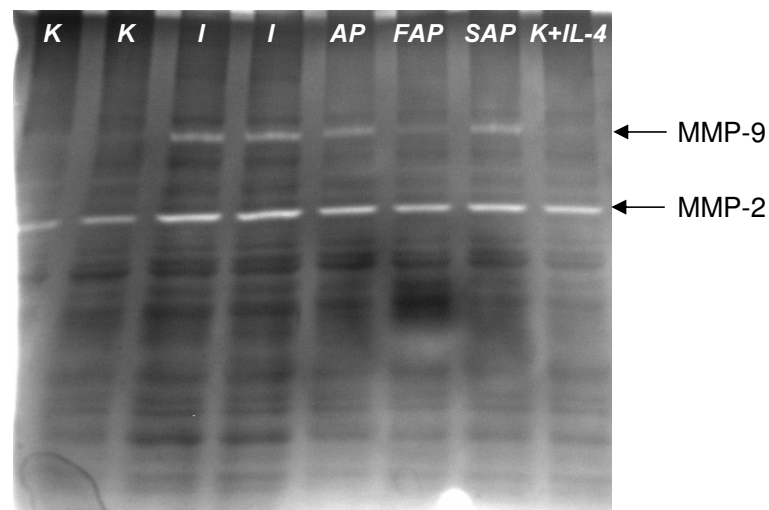


Abb. 3.17: Darstellung repräsentativer Proben aus den einzelnen Gruppen in einem Coomassie-gefärbten Gelatin-Polyacrylamidgel. Banden bei 92 kDa entsprechen MMP-9 und Banden bei 62 kDa MMP-2.