

## **4. Diskussion**

Die genaue Pathogenese der akuten CVB3-induzierten Myokarditis im Menschen wie auch in den verschiedenen Tiermodellen ist nach wie vor ungeklärt. Untersuchungen haben in den letzten Jahren einen bedeutenden Einfluss der Immunantwort auf den Schweregrad der viralen Myokarditis gezeigt [236]. Dabei beschleunigen einige Elemente der Immunantwort die virale Clearance und wirken protektiv auf das Myokard, während andere die kardiale Entzündungsreaktion und Nekrose fördern [236]. Es existieren zwar eine Reihe von Erklärungsansätzen, aber ein wirkungsvolles kausales Behandlungskonzept konnte daraus bislang nicht abgeleitet werden, so dass die klinische Therapie bislang nur symptomorientiert erfolgt. Es erscheint daher sinnvoll, die Immunmodulation als Therapie der akuten viralen Myokarditis einzusetzen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss einer exogenen IL-4-Administration auf die Infiltratzusammensetzung, das myokardiale Schädigungsmuster, die Expression von Zytokinen, das MMP/TIMP-System und die Herzfunktion untersucht.

Im folgenden Kapitel sollen die Ergebnisse dieser Arbeit mit der Literatur zu diesem Thema diskutiert werden.

### **4.1 Mortalität und Schwere der Erkrankung**

Der deutlichste Ausdruck für die Schwere einer Erkrankung ist sicherlich die Mortalität. Diese ist von einer Reihe unterschiedlicher Parameter abhängig. Ausschlaggebend sind hierbei insbesondere der verwendete Mausstamm [211], das Alter und Geschlecht [114,115] der Versuchstiere sowie das verwendete Coxsackievirus [11]. Zwischen den verschiedenen genetischen Varianten der Mausstämmen bestehen teilweise erhebliche Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber CVB3 [201,227,228]. Bei Untersuchungen mit fünf verschiedenen Mausstämmen lag die Mortalität zwischen 0 und 66,7% [211].

Insgesamt scheint aber ein Vergleich absoluter Mortalitätsraten nicht sinnvoll, da sich die einzelnen Versuchsanordnungen in den Untersuchungen zu stark unterscheiden, und einige Autoren gar keine Angaben zu diesem wichtigen Parameter machen.

In dieser Arbeit lag die infektionsbedingte Mortalität bei 0%. Nur ein Tier der unbehandelten Kontrollgruppe 1.1 starb bei Narkoseeinleitung. Dies soll aber nicht darüber hinwegtäuschen, dass der klinische Zustand der Tiere am 10. Tag p.i. in allen infizierten Gruppen außerordentlich schlecht war und es nicht zu erwarten war, dass die Tiere die Infektion überlebt hätten.

## **4.2 Körpergewicht und Herzgewicht der Versuchstiere**

Die Abnahme des Mausgewichts in dieser Arbeit deckt sich mit den Ergebnissen anderer Studien an anderen Mausmodellen bei viraler Myokarditis [239-241], und ist erklärbar mit dem beobachteten reduzierten Fressdrang der Versuchstiere ab dem 5. Tag p.i.

Aus ungeklärtem Grund nahm auch das Herzgewicht in der vorliegenden Arbeit bei infizierten Mäusen signifikant ab. Zu diesem Parameter liegen bislang bei akuter Myokarditis nur wenige Daten vor. Kanda et al. [242] beschrieben am 8. Tag nach der Infektion mit EMCV eine geringe Abnahme des Herzgewichts von virussensiblen Mausstämmen gegenüber virusresistenten Mäusen. In einem Autoimmunmyokarditis-Rattenmodell konnten von Watanabe et al. [207] eine deutliche Reduktion des Herz- und Körpergewichts drei Wochen nach Versuchsbeginn bei Erhöhung des Plasma-IL-10-Spiegels gezeigt werden. Diese Daten sind insofern interessant, als sich in unserer Studie unter IL-4-Behandlung das Herzgewicht der virusinfizierten Gruppen stärker verringerte als ohne Behandlung, und IL-10 ein Zytokin ist, dass von IL-4-induzierten Th2-Zellen verstärkt gebildet wird. Bei anderen Autoren kam es dagegen im Verlauf der viralen Myokarditis bereits drei Wochen nach Infektion zu einer deutlichen Erhöhung des Herzgewichts [240]. Eine direkte Wirkung der in dieser Arbeit beobachteten erhöhten MMP-Expression oder katabole Effekte anderer Zytokine auf das Herzgewicht scheinen bei der geringen Infektionsdauer eher unwahrscheinlich. Wie sich im Vergleich der hämodynamischen Parameter in den Versuchsgruppen zeigte, hatte die Abnahme des Herzgewichts auch keinen unmittelbaren Einfluss auf die Herzfunktion. Insgesamt muss die Erklärung für dieses Phänomen weiterhin offen bleiben.

## **4.3 Veränderung der Entzündungsreaktion sowie des Anteils myokardialer Läsionen bei akuter viraler Myokarditis und unter IL-4-Behandlung**

Mehrere Arbeitsgruppen haben die Immunreaktion als entscheidende Ursache für die Myokardschädigung [61-64] sowie als Promoter für das pathologische Remodeling und die Entwicklung einer kardialen Dysfunktion bei Myokarditis identifiziert [26,60,138,243].

Am 10. Tag p.i. bestand das zelluläre Infiltrat vornehmlich aus CD3<sup>+</sup>-T-Lymphozyten, mit einem Überwiegen des CD8<sup>+</sup>- gegenüber dem CD4<sup>+</sup>-Phänotyp. Mononukleäre Zellen waren nur in untergeordnetem Anteil vertreten. Diese Daten decken sich mit den

Studienergebnissen von Lenzo et al. [244] bei Cytomegalievirusmyokarditis in BALB/c-Mäusen am 10. Tag p.i. und den eingangs beschriebenen Befunden von Kawai [26]. Eine andere Untersuchung von Huber [245] zeigte bei CVB3-Myokarditis in BALB/c-Mäusen am 7. Tag p.i. vergleichbare Resultate für CD3<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten, jedoch einen deutlich höheren Anteil an Makrophagen. Diese scheinbare Diskrepanz könnte durch den früheren Untersuchungszeitpunkt begründet sein, da das T-lymphozytäre Infiltrat erst zwischen dem 7. bis 14. Tag p.i. sein Maximum erreicht [26].

Mittels Luxol Fast Blue-Färbung konnte im Myokard der infizierten Tieren ein großer Anteil myofibrillär veränderter Kardiomyozyten identifiziert werden. Diese Färbemethode ist in der Lage, bereits frühe Störungen der zellularen Integrität zu detektieren [230]. Leider liegen zu dieser Methode bei Myokarditis keine vergleichbaren Daten vor. Gleichwohl wurden in mehreren Studien [53,54,60-64] mit konventionellen Nachweismethoden schwere Gewebeschäden infolge der Infektion beschrieben, deren Größe jedoch nicht dem hier gefunden Ausmaß entsprach.

Immunzellen koordinieren ihre Interaktionen vorwiegend durch Modulation der Expression von Zytokinen und Zytokinrezeptoren. Außerdem sind Zytokine elementare Regulatoren des MMP-TIMP-Systems [151,160,192,246] und können so die Zusammensetzung der ECM beeinflussen. IL-1 $\beta$  kann die Expression von MMP-3, MMP-9 und MMP-13 auf mRNA- und Protein-Level stimulieren [169-172] und die TIMP-Expression in Endothelzellen inhibieren [169]. IL-4 und TGF- $\beta_1$  können dagegen die MMP-Expression in Makrophagen und Fibroblasten supprimieren [151,162,177,178], während sie die TIMP-1-Expression induzieren [179,183,184]. IL-6 hat keinen wesentlichen Einfluss auf die MMP-Expression, führt jedoch zu einer Upregulation von TIMP [180-182]. Darüberhinaus ist der Nachweis von Th<sub>1</sub>-/Th<sub>2</sub>-Zytokinen wichtig zur Unterscheidung des CD4<sup>+</sup>-Zelltypes, da spezifische Oberflächenmarker nicht bekannt sind [94].

Bei allen in dieser Arbeit untersuchten Zytokinen zeigte sich bei infizierten Mäusen am 10.Tag p.i. eine signifikante Expressionserhöhung gegenüber den nichtinfizierten Tieren. Dabei waren sowohl Zytokine der Th1-Immunantwort wie IL-1 $\beta$  und IL-2, als auch Th<sub>2</sub>-Zytokine wie IL-4 und IL-6, erhöht. Die beobachteten Veränderungen der Zytokinexpression sind vereinbar mit den in verschiedenen Studien der akuten und chronischen Phase der virusinduzierten Myokarditis in unterschiedlichen Mausstämmen gezeigten Verhältnissen. Seko et al. [43] zeigten bei EMCV-Myokarditis in DBA/2-Mäusen unter anderem eine Erhöhung von IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4 und IL-6 am 7. Tag p.i. Dabei waren Th<sub>1</sub>-Zytokine stärker exprimiert als Th<sub>2</sub>-Zytokine. Leider ließen sich die Ergebnisse dieser Arbeit nur deskriptiv und

nicht quantitativ auswerten. Die dort postulierte Hypothese, dass die exprimierenden Zellen für IL-6 ortsständige Kardiomyozyten, Fibroblasten und Endothelzellen seien, konnte in unserer Arbeit nicht bestätigt werden. Die Analyse des Expressionsmuster mittels in situ-Hybridierung zeigte für IL-6 – ebenso wie für TGF- $\beta_1$  – eine perivaskulär betonte Expression, was eher als Einfluss einer Infiltration gedeutet werden kann. Die hier untersuchten Fallzahlen sind jedoch zu gering, um sichere Aussagen über den Expressionsursprung treffen zu können.

Auch Shioi et al. [29] zeigten eine Expressionserhöhung bei akuter EMCV-Myokarditis in DBA/2-Mäusen für IL-1 $\beta$  und IL-2, die bis zum 80. Tag p.i. detektierbar war. Dabei waren die Expressionsänderungen am 7. Tag p.i. mit mehr als 10fach für IL-1 $\beta$  und mehr als 20fach für IL-2 deutlich stärker als in dieser Arbeit (1,5fach für IL-1 $\beta$  bzw. 12fach für IL-2), was durch den differierenden Mausstamm und Virus erklärt werden könnte. Auch eine weitere Arbeitsgruppe [247] zeigte eine erhöhte Expression von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TGF- $\beta_1$  7 Tage nach CVB3-Infektion in NMRI-Mäusen.

Trotz der gemeinsamen Upregulation von Th<sub>1</sub>- und Th<sub>2</sub>-Zytokinen scheint durch die bei dieser Arbeit beobachteten drastischen Erhöhung der IL-2-Expression als Schlüsselenzym der Th<sub>1</sub>-Immunantwort bei akuter viraler Myokarditis ein Th<sub>1</sub>-Phänotyp prädominant zu sein. Dieses Erkenntnis deckt sich auch mit den Untersuchungen der Myokarditis in männlichen und weiblichen BALB/c-Mäusen [114,115], bei denen männliche Tiere eine Th<sub>1</sub>-Antwort mit schwerer Myokarditis ausbilden, während weibliche Tiere einen Th<sub>2</sub>-Phänotyp mit reduzierter Infiltration und Mortalität entwickeln.

Durch die IL-4-Behandlung konnte insbesondere bei frühzeitig einsetzender Therapie die Anzahl infiltrierender Zellen reduziert, und die Zusammensetzung zugunsten der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten modifiziert werden. Dies kann durch die antiinflammatorischen Effekte von IL-4 auf zytotoxische T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen erklärt werden [248,249]. Dagegen zeigte sich tendentiell eine Zunahme myozytischer Veränderungen unter IL-4-Therapie. Entscheidend ist die Frage nach dem kausalen Pathogen der Myokardschädigung. In bisherigen Studien wurde ein ursächlicher Zusammenhang mit dem Anteil an zytotoxischen T-Lymphozyten vermutet, da sich sowohl in genetisch T-Lymphozyten-defizienten Mäusen [62,64] als auch bei Behandlung mit anti-CD8-Antikörpern in BALB/c-Mäusen eine Verringerung der Gewebeschäden bei CVB3-Myokarditis finden ließ [245]. Diese Diskrepanz zu den in dieser Untersuchung gefundenen Verhältnissen könnte darin begründet liegen, das Luxol Fast Blue empfindlich sehr frühe Phasen myofibrillärer

Veränderungen anfärben kann [230], und daher konventionelle Nachweismethoden für die kardiale Nekrose möglicherweise das Ausmaß der Kardiomyozytenveränderung unterschätzen. Ein direkter toxischer Effekt der IL-4-Behandlung, wie vereinzelt beschrieben [250,251], erscheint eher unwahrscheinlich, da sich bei durchgehender IL-4-Applikation bei infizierten und nicht-infizierten Tieren keine Zunahme der myokardialen Veränderungen zeigte, ist jedoch auch nicht sicher auszuschließen. Wahrscheinlicher ist eine gestörte Viruselimination durch die gefundene Verminderung der CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten unter IL-4-Einwirkung. Eine Zunahme myokardialer Läsionen bei hoher Viruslast wurde in einigen Studien beschrieben [31,32]. Kritisch anzumerken ist, dass die Nekrosereduktion in genetisch T-Lymphozyten-defizienten Mäusen [62,64] und unter Behandlung mit anti-CD8-Antikörpern [235] nicht mit einer Veränderung der Virustiter verbunden war. Hier scheinen daher weitere Untersuchungen an einem größeren Untersuchungsgut mit Bestimmung der myokardialen Viruslast nötig, um die Wertigkeit der Luxol Fast Blue-Färbung bei der Myokarditisiagnostik zu klären.

Des Weiteren kam es zu einer deutlichen Veränderung der Zytokinexpression infolge der IL-4-Behandlung. Den stärksten Effekt hatte eine frühzeitig begonnene Therapie, während bei später Applikation keine wesentliche Veränderung zu beobachten war. Erklärbar ist dieser Befund durch die in Kapitel 1.3.2.1 aufgezeigte Feststellung, dass IL-4 bei bereits länger aktivierten Th<sub>1</sub>-Zellen nicht mehr zu einem Wechsel zum Th<sub>2</sub>-Phänotyp, sondern zu einer Stimulation der bestehenden Th<sub>1</sub>-Antwort führt [105,111]. So kam es durch IL-4-Gabe in der frühen akuten Phase zu einer deutlichen Downregulation des wichtigen Th<sub>1</sub>-Zytokins IL-2. Die Reduktion von IL-2 scheint zumindest teilweise verantwortlich für die reduzierte zelluläre Infiltration zu sein, da IL-2 ein wichtiges Schlüsselenzym sowohl für die Th<sub>1</sub>-Zell-Rekrutierung als auch für die T-Lymphozyten- und Makrophagenproliferation ist [252]. Desweiteren wurde auch die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-1 $\beta$  tendentiell durch IL-4 supprimiert. Th<sub>2</sub>-Zytokine wie IL-4 und IL-6, aber auch TGF- $\beta$ <sub>1</sub>, waren dagegen noch stärker als in den unbehandelten Myokarditismäusen exprimiert. Diese Veränderungen können als ein Überwiegen der Th<sub>2</sub>-Immunantwort unter IL-4-Behandlung gegenüber den Verhältnissen bei unbehandelter Infektion gewertet werden. Da in der vorliegenden Arbeit sowohl Th<sub>1</sub>-Zytokine vermindert als auch Th<sub>2</sub>-Zytokine gegenüber unbehandelten infizierten Mäusen erhöht waren, scheint der Erfolg der IL-4-Therapie sowohl in einer Induktion der Th<sub>2</sub>-Immunantwort als auch in einer Suppression der bestehenden Immunreaktion begründet zu sein.

#### **4.4 Veränderung der mRNA-Expression und der gelatinolytischen Aktivität von matrixaktiven Enzymen bei akuter viraler Myokarditis und unter IL-4-Behandlung**

Die myokardiale Matrix erfüllt entscheidende Aufgaben für die koordinierte myokardiale Kontraktion, die Verhinderung der Überdehnung der Kardiomyozyten und die hämodynamische Funktion [151,160,246]. Frühere Studien haben einen Zusammenhang zwischen pathologischem kardialen Remodeling und linksventrikulärer Dysfunktion nahegelegt [123,124]. Zu der Expression von MMP bzw. TIMP bei akuter viraler Myokarditis liegen bislang keine vergleichbaren Daten vor.

Im Rahmen der fortschreitenden akuten Myokarditis bis zur dilatativen Kardiomyopathie kommt es zur übersteigerten Expression von Kollagen Typ I und folglich zu erhöhter Wandsteifigkeit und verminderter Compliance [122-124]. In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an dem vorliegenden Mausmodell ließ sich im Rahmen der akuten viralen Myokarditis weder eine Veränderung der mRNA-Expression von Kollagen Typ I oder Typ III mittels RT-PCR noch des Gesamtkollagengehalts mittels Sirius-Red-Färbung feststellen [253]. Allerdings konnte mittels Western-Blot-Analyse ein signifikantes Ansteigen des löslichen Anteils des Kollagen Typ I nachgewiesen werden [253]. Der Unterschied zwischen löslichem und unlöslichem Kollagen ist im wesentlichen in der Quervernetzung durch intakte Hydroxyprolinbrücken begründet [254]. Es scheint daher in der Akutphase der viralen Myokarditis vornehmlich zur Zerstörung der Quervernetzungen und nicht zu einer weiteren Degradation in Matrixfragmente zu kommen. Diese diskreten Modifikationen der kardialen Matrix scheinen bereits für eine Verschlechterung der linksventrikulären Funktion ausreichend zu sein.

Die wichtigsten interstitiellen Proteinasen stellen die MMP dar. So konnte in dieser Arbeit auch eine erhöhte mRNA-Expression von allen untersuchten MMP nachgewiesen werden, gemeinsam mit einer reduzierten Expression von TIMP-1, TIMP-3 und TIMP-4. Nichtsdestotrotz war auch die Gelatinase MMP-9 stark erhöht, ein Enzym, das gerade den Abbau löslichen Kollagens in weitere Subfragmente initiieren soll [151,160,246], aber auch eine weite Substratspezifität für die Kollagene Typ I, III, IV und V hat [255]. Des Weiteren scheint gerade MMP-9 in der Lage zu sein, die Quervernetzung von Kollagenpolymeren zu spalten [256]. Interessanterweise konnte für MMP-9 in der Zymographie eine etwa 15fache Aktivitätssteigerung bei den infizierten Tieren gegenüber den Kontrolltieren gezeigt werden. Eine geringere Aktivitätszunahme fand sich für MMP-2 (etwa 4fach). Bezüglich der anderen untersuchten MMP sagen Veränderungen der mRNA-Expression alleine recht wenig über

die induzierte Matrixdegradation aus, da die proteolytische Aktivität der MMP durch die posttranslationale Abspaltung des Propeptids erfolgt. Dennoch ist MMP-3 ein Schlüsselenzym des Matrixabbaus, da es sowohl sich selber als auch die meisten anderen MMP aktivieren kann. Desweiteren konnten auch drastisch erhöhte mRNA-Level für das membranständige Stimulierungs-/Aktivierungssystem aus EMMPRIN und MT1-MMP detektiert werden, so dass auch für andere MMP eine posttranslationale Aktivierung anzunehmen ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass andere, hier nicht untersuchte, MMP und Proteasen wie Cathepsin K [257] an der Matrixdegradation beteiligt sind. Nebenbei konnte in dieser Arbeit in allen infizierten Tieren enterovirales Genom nachgewiesen werden, so dass auch unidentifizierte virale Proteasen am Matrixabbau beteiligt sein könnten.

Zur Produktion von MMP und TIMP sind eine Vielzahl von Zellen wie Fibroblasten, Kardiomyozyten, Endothelzellen, neutrophile Granulozyten und Makrophagen in der Lage [151]. Mittels in situ-Hybridisierung konnte für MMP-3 und TIMP-1 sowohl eine perivaskulär betonte als auch diffuse Expression detektiert werden, ohne aber die Präferenz für einen bestimmten Zelltyp aufzudecken.

TIMP binden im aktiven Zentrum der MMP und blockieren so deren Zugang zu Matrixproteinen [258]. Im Mausmodell führt eine TIMP-1-Depletion zur Verbesserung der kardialen Funktion [208], ebenso konnte bei kardialer Dysfunktion beim Menschen eine verminderte TIMP-Expression nachgewiesen werden [258]. In zwei weiteren Studien an dilatativer Kardiomyopathie beim Menschen konnten vergleichbare Mechanismen gezeigt werden, indem eine erhöhte MMP-Expression mit vermindertem quervernetzten Kollagen bzw. einem erhöhten Anteil des löslichen Kollagens assoziiert waren [140,141].

Insgesamt zeigt diese Arbeit bei akuter viraler Myokarditis ein Übergewicht der MMP- gegenüber der TIMP-Expression und demzufolge eine Degradation der extrazellulären Matrix, welche sich vermutlich in erster Linie in einer Verarmung der Kollagenquervernetzung manifestiert.

Da die Expression von MMP und TIMP überwiegend durch Zytokine reguliert wird [151,169], vermuteten wir eine Beeinflussbarkeit dieses matrixregulierenden Systems durch die IL-4-Immunmodulation. Die Erhöhung der Expression von MMP-2, MMP-3, MMP-9 und MMP-13 im Rahmen der viralen Infektion war in den früh und spät mit IL-4 behandelten Gruppen signifikant vermindert, wobei insbesondere für MMP-9 eine drastische Reduktion der infektionsbedingten Aktivitätssteigerung gezeigt werden konnte. Zusätzlich waren die mRNA-

Level von TIMP-1, TIMP-3 und TIMP-4 nach frühzeitiger IL-4-Immunmodulation nahezu normalisiert. Diese Veränderungen sind möglicherweise durch die reduzierte myokardiale Infiltration mit Überwiegen des CD4<sup>+</sup>-Phänotypes erklärbar, da zum einen die Änderungen im MMP-TIMP-System mit den Abweichungen der Zytokinexpression korrelieren, und zum anderen aktivierte Entzündungszellen direkt MMP produzieren können [259]. Darüberhinaus ist IL-4 selber ein Inhibitor der Expression einiger MMP und induziert TGF- $\beta_1$  sowie IL-6, zwei wichtige Induktoren der TIMP-Expression [259]. Hierbei scheint eine Kombination von Faktoren für die Senkung der MMP- bzw. Erhöhung der TIMP-Expression verantwortlich zu sein, die durch die frühzeitige IL-4-Applikation begünstigt werden.

Für TIMP-2 konnte in dieser Arbeit weder bei viraler Infektion noch bei IL-4-Behandlung eine signifikante Änderung der Expression festgestellt werden. Dieses Resultat deckt sich mit früheren Studien, die TIMP-2 als konstitutiv exprimierten Inhibitor beschreiben [169,173,181,187]. Die von einigen Autoren [197,198] beschriebene Korrelation der TIMP-2 mit der MMP-9-Expression konnte dagegen nicht bestätigt werden.

Eine Expressionsveränderung des membrangebundenen Induktions-/Aktivierungssystems, bestehend aus MT1-MMP und EMMPRIN, wurde bisher bei akuter Myokarditis im Mausmodell noch nicht beschrieben. Bei der Untersuchung an Patienten mit DCM mittels Western-Blot zeigte sich eine Erhöhung der Proteinkonzentration von mehr als 1000% für MT1-MMP und über 250% für EMMPRIN [155]. Die in dieser Arbeit gefundenen Expressionssteigerungen der mRNA bei CVB3-induzierter Myokarditis am 10. Tag p.i. waren weniger stark als die beobachteten Proteinerhöhungen bei DCM-Patienten. Diese Daten sind aufgrund der unterschiedlichen Untersuchungsgruppe und Methode nur bedingt vergleichbar. Interessanterweise zeigte sich auch für dieses System eine Verringerung der Expression bei Behandlung mit IL-4. Da es an der Stimulation der MMP-Expression sowie an deren Aktivierung beteiligt ist, kann durch die verringerte Expression ein matrixstabilisierender und damit kardioprotektiver Effekt vermutet werden.

#### **4.5 Häodynamische Funktionsparameter bei akuter viraler Myokarditis und unter IL-4-Behandlung**

Die Erhebung häodynamischer Funktionsänderungen bei der viralen Myokarditis im Mausmodell ist aus verschiedenen Gründen sinnvoll. Mit dem klinischen Verlauf und der Überlebens- bzw. Mortalitätsrate existieren nur zwei Parameter, um die Auswirkungen der

Infektion zu untersuchen. Dabei sind die Überlebens- und die Mortalitätsrate nur sehr grobe Anhaltspunkte, da sie nur zwei polarisierte Möglichkeiten des Verlaufs darstellen. Auch die klinische Situation ist nicht sicher objektivierbar und weitgehend von der subjektiven Einschätzung des Beobachters abhängig. Durch die Messung der kardialen Funktionsparameter lassen sich dagegen objektive Aussagen über Auswirkungen der Virusmyokarditis und über Erfolge therapeutischer Ansätze machen.

In bisherigen Untersuchungen wurde das linksventrikuläre Myokard als Hauptzielort der Infektion mit kardiotropen Coxsackieviren identifiziert [260]. Außerdem ist die Linksherzinsuffizienz eine der schwersten Folge der akuten Virusmyokarditis [261]. Daher beschränkte sich in dieser Arbeit die Erhebung hämodynamischer Funktionsparameter auf die Untersuchung des linken Ventrikel. Nach der Fragestellung dieser Arbeit musste sich ein Erfolg der therapeutischen Intervention auch in diesem Bereich dokumentieren lassen.

Vorangehende Untersuchungen haben gezeigt, dass die experimentelle Realisierung intrakardialer Druckmessungen eine große Empfindlichkeit gegenüber methodischen Fehlern aufweist [262]. Speziell die gleichbleibende Lokalisation des Katheters und eine stabile Lage während der Messung sind immens wichtig [262]. Daher sollte innerhalb einer Versuchsreihe immer die gleiche Person diese Messungen durchführen, um individuelle Schwankungen in der Messung zu eliminieren. Aus diesen Gründen wurde die hämodynamische Messung, wie in Kapitel 2.2 beschrieben, von der erfahrenen Arbeitsgruppe von Dr. med. Carsten Tschöpe durchgeführt, um eine möglichst exakte und realitätsgetreue Messung zu erhalten.

Die in dieser Arbeit ermittelten hämodynamischen Parameter lassen Rückschlüsse auf die Wandspannung des linken Ventrikels, die Kontraktilität und Relaxationsfähigkeit sowie die Herzfrequenz zu. Diese Parameter bestimmen im Wesentlichen die Leistungsfähigkeit des linken Ventrikels [263].

Der linksventrikuläre systolische Druck (LVsP) ist ein Maß für die maximale Wandspannung in der Systole und weitgehend abhängig von der Nachlast, gegen die der linke Ventrikel anpumpen muss [264]. Im linken Ventrikel wird die Nachlast durch den endsystolisch zu überwindenden Aortendruck bestimmt. Bei Kompensation einer Herzinsuffizienz steigt dieser durch Sympathikusaktivierung an, um durch Zunahme des peripheren Gefäßwiderstandes ausreichende Blutdruckverhältnisse herzustellen [263]. Dadurch steigt auch der linksventrikuläre enddiastolische Druck an. Gründe dafür sind der erhöhte Widerstand im venösen Schenkel des Kreislaufsystems, wodurch der Blutfluss zum Herzen erhöht wird, und die Erhöhung der Herzfrequenz durch die sympathikotone Stimulation der kardialen  $\beta$ -Rezeptoren. Daraus resultiert eine beschleunigte und vermehrte Füllung des Ventrikels zum

Ausgleich der sinkenden Herzkraft bei Herzinsuffizienz [263]. Erst beim Versagen der Kompensationsmechanismen kommt es zur Dekompensation mit Abnahme der Nachlast und des LVsP [264].

Daneben kommt es bei Myokarderkrankungen zu einer Störung der Kontraktilität und Compliance. Die bei Myokarditis zu beobachtende lokalisierte oder diffuse Zerstörung von Herzmuskelzellen stört das komplizierte Zusammenspiel dieser Zellen und führt zu einem Verlust kontraktile Elemente, mit dem Ergebnis einer gestörten Ventrikelkontraktilität. Die exakte Definition und damit auch die Messung der Kontraktilität ist aber schwierig [263]. Auch der in dieser Arbeit verwendete Index der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit im linken Ventrikel  $dP/dt \max$  hat gewisse Einschränkungen. Der Parameter nimmt zwar bei verminderter Kontraktilität ab, ist jedoch abhängig von der Herzfrequenz. Daher stellt sich die Frage, ob eine Verringerung dieses Wertes von einer tatsächlichen Abnahme der Kontraktilität oder einer Verringerung der Herzfrequenz herrührt. Daneben ergeben sich erhebliche interindividuelle Schwankungen, so dass sich dieser Parameter hauptsächlich zur Verlaufsbeobachtung in einem Organismus eignet [265]. Da in dieser Arbeit jedoch nicht der gemessene Absolutwert im Vordergrund stand, sondern die vergleichende Betrachtung von Gruppen genetisch identischer Tiere unter verschiedenen Bedingungen, ist dieser Parameter wohl ausreichend zur Abschätzung der Kontraktilität [265].

Die diastolische Relaxation der Herzmuskulatur kann man als Gegensatz zur Kontraktilität mit einem weiteren Index, dem  $dP/dt \min$  beschreiben. Dieser Parameter ist ebenso wie  $dP/dt \max$  abhängig von Nachlast und Herzfrequenz und ergänzt die Beurteilung der Ventrikelfunktion [265].

Die Herzfrequenz ist der vierte wichtige Faktor für die Herzfunktion. Sie wird durch das sympathische und parasympathische System reguliert und erfordert ein intaktes Reizleitungssystem. Elektrophysiologische Studien von Terasaki [209,210] konnten jedoch einen Befall des Reizleitungssystems durch Coxsackieviren nachweisen.

Mehrere Arbeitsgruppen zeigten bisher einen Zusammenhang zwischen viraler Myokarditis und kardialer Dysfunktion. Herzum et al. [37] fanden bei CVB3-Myokarditis in DBA/2-Mäusen eine deutliche Suppression von LVsP,  $dP/dt \max$  und  $dP/dt \min$  10 Tage nach Infektion. Eine andere Arbeitsgruppe [266] transfundierte immundefizienten SCID-Mäusen Blut von Patienten mit gesicherter viraler Myokarditis und fand eine deutliche Minderung der systolischen Herzfunktion. Eine weitere Studie [213] untersuchte die EMCV-Myokarditis in DBA/2-Mäusen zu verschiedenen Zeitpunkten im Verlauf der Infektion. Sie fanden initial eine

hyperdynamische Phase mit Erhöhung von LVsP und  $dP/dt$  max bei den infizierten Tieren, die bis zum 3. Tag p.i. wieder normale Werte erreichte und dann in eine deutliche Depression der LV-Funktion wechselte.

Die in dieser Arbeit erhobenen Werte am 10. Tag der Infektion zeigen eine weitgehende Übereinstimmung mit den in bisherigen Untersuchungen ermittelten Veränderungen. Es kam durch die Infektion mit Coxsackieviren zu einer erheblichen Einschränkung der kardialen Leistungsfähigkeit. Im Einzelnen betrachtet war der linksventrikuläre systolische Druck und damit die Nachlast in allen virusinfizierten Gruppen signifikant reduziert. Entsprechend des schlechten klinischen Zustandes und der einleitend beschriebenen Zusammenhänge kann das als linksventrikuläres Pumpversagen mit einer erheblichen Abnahme des zirkulierenden peripheren Volumens gedeutet werden. Auch der Kontraktilitätsparameter  $dP/dt$  max war bei Infektion deutlich reduziert. Isoliert betrachtet kommt es also zu einer offensichtlichen Abnahme der Ventrikelkontraktilität, die sich durch die histomorphologisch nachgewiesene ausgedehnte Zerstörung des Herzmuskelgewebes und die Dysbalance im MMP/TIMP-System erklären lässt. So konnten Herzum et al. [212] eine signifikante Korrelation zwischen der Reduktion des  $dP/dt$  max und dem Höhepunkt der kardialen Entzündung am 10. Tag p.i. zeigen. Wie erwartet gleichsinnig verhält sich der Relaxationsparameter  $dP/dt$  min. Erklärbar ist dies durch die erhebliche Abnahme der Nachlast. Für beide Parameter ist kritisch anzumerken, dass ihre Abnahme mit einer erheblichen Reduktion der Herzfrequenz einhergeht. Für die Kontraktilitäts- bzw. Relaxationswerte bedeutet dies eine gewisse Einschränkung der Aussagekraft, da zumindest ein Teil der Verringerung auf eine sinkende Herzfrequenz zurückzuführen ist.

Die Abnahme der Herzfrequenz in den virusinfizierten Gruppen erscheint zunächst überraschend, da man bei Kompensation der Herzinsuffizienz ein Ansteigen der Schlagfrequenz durch  $\beta$ -Rezeptorstimulation erwarten würde. Erklärbar ist dies durch die oben beschriebene Möglichkeit der Schädigung des Reizleitungssystems durch Coxsackieviren [209,210]. Dies würde unter anderem zur Folge haben, dass die Herzfrequenz nicht regulierend bei einer Herzinsuffizienz erhöht werden könnte und es schneller zur Dekompensation kommt.

Durch die Behandlung mit dem Zytokin IL-4 konnten die systolischen Parameter deutlich gebessert werden. Besonders die Verabreichung in den ersten fünf Tagen nach Infektion verbesserte die Herzfunktion dramatisch. Erklärbar könnte dies durch die Reduktion des MMP/TIMP-Verhältnisses unter IL-4-Therapie im Vergleich zur unbehandelten virusinfizierten

Gruppe sein. Bisher liegen jedoch keine vergleichbaren Daten zur hämodynamischen Situation unter IL-4-Behandlung im Rahmen der akuten Virusmyokarditis vor. Gleichwohl wurde im Rattenmodell unter Gabe von IL-10 – einem Zytokin, das von IL-4-induzierten Th<sub>2</sub>-Zellen verstärkt gebildet wird und die Th<sub>1</sub>-Antwort unterdrückt – eine Verbesserung der Hämodynamik beobachtet [213]. Diese Besserung entsprach jedoch nicht dem in dieser Arbeit beschriebenen Ausmaß bei einer IL-4-Behandlung. Denkbar ist, dass hier noch andere Zytokine eine Rolle spielen, die durch die Th<sub>2</sub>-Zellen vermehrt gebildet werden. So werden TGF-β<sub>1</sub> und IL-6 von Th<sub>2</sub>-Zellen und in dieser Arbeit unter IL-4-Behandlung vermehrt gebildet. TGF-β<sub>1</sub> ist in vitro als starker Induktor der TIMP- und Hemmer der MMP-Expression bekannt. IL-6 wirkt stimulierend auf die TIMP-Expression und hat nur geringen Einfluss auf die MMP-Expression. Dadurch könnten beide Faktoren indirekt den Abbau der kardialen Matrix reduzieren und eine IL-4-Behandlung damit protektiv für die kardiale Funktion sein. Andererseits könnte auch die bei Th<sub>2</sub>-Zellen verminderte Expression von IL-1β eine Rolle spielen, indem die schädigende Inhibition von TIMP und die Induktion von MMP reduziert wären.

Der Einfluss einzelner Zytokine ist in vivo durch das komplexe Zusammenspiel mit anderen Zytokinen jedoch kaum beurteilbar. Die in dieser Arbeit erhobenen hämodynamischen Daten zeigten aber, dass die IL-4-Behandlung in der Frühphase der Infektion zu einer deutlichen und signifikanten Verbesserung der Herzfunktion führt. Dies kann nach den vorliegenden Daten als matrixprotektiver Effekt von durch IL-4-Wirkung erhöhter Th<sub>2</sub>-Zytokine und nachfolgender Suppression der infektionsbedingten Matrixdegradation gewertet werden.

Die vorliegende Arbeit zeigt deutliche Einflüsse einer Immunmodulation mit IL-4 auf die Expression von Zytokinen. Dabei zeigte sich eine Prädominanz von Th<sub>2</sub>-Zytokinen und eine günstige Beeinflussung des MMP-TIMP-Systems und der linksventrikulären Funktion. Des Weiteren führte die IL-4-Applikationen zu einer Veränderung der Infiltratzusammensetzung mit Abnahme der CD3<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-Lymphozyten sowie Makrophagen bei Zunahme der CD4<sup>+</sup>-Lymphozyten, was jedoch zu einer Ausbreitung der myokardialen Schädigung in der Luxol Fast Blue-Färbung führte. Bemerkenswert ist die große Wirksamkeit einer frühzeitigen Behandlung nach Infektion und der fast fehlende Erfolg bei durchgehender IL-4-Applikation. Die Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Therapie und Art der herrschenden Immunantwort, als auch die in verschiedenen Mausmodellen gezeigten Wirkungen eines Th<sub>1</sub>- bzw. Th<sub>2</sub>-Phänotyps, zeigen, dass therapeutische Immunmodulation sowohl positive als auch negative

Effekte auf die Herzfunktion und die Progression der viralen Myokarditis haben kann. Die Ergebnisse sind daher nur sehr begrenzt auf die Verhältnisse im Menschen übertragbar. Da in dieser Studie nur der Höhepunkt der inflammatorischen Reaktion am 10. Tag der Infektion untersucht wurde, sollten zukünftige Studien die induzierten Veränderungen einer frühzeitigen IL-4-Behandlung zu verschiedenen Zeitpunkten in der akuten als auch der chronischen Phase der viralen Myokarditis untersuchen. Insbesondere die möglicherweise eingeschränkte Viruselimination bei Induktion einer Th<sub>2</sub>-Immunantwort durch IL-4 könnte die in dieser Arbeit beobachteten protektiven Effekte nivellieren, da bekanntermaßen auch enterovirale Proteasen zum Abbau der zytoskelettalen Struktur und damit zur linksventrikulären Dysfunktion führen können. Darüberhinaus wurde in dieser Arbeit ein direkter Zusammenhang zwischen dem MMP-TIMP-System und der Herzfunktion bei viraler Myokarditis festgestellt, wie auch schon in vorherigen Studien bei verschiedenen anderen Herzerkrankungen [161,257,267]. Als weiterer zukünftiger Ansatzpunkt der Therapie wäre daher auch eine MMP-Inhibition denkbar. Dies würde im Gegensatz zur Immunmodulation eventuell die kardiale Dysfunktion limitieren, ohne die Viruselimination zu behindern.