

III. Ergebnisse

3.1. Allgemeines

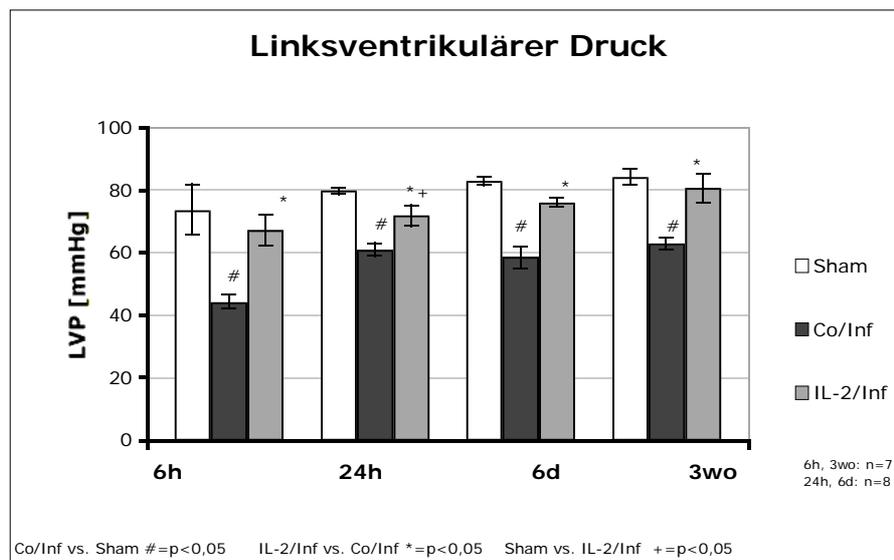
Die durchschnittliche Letalität der Versuchstiere lag etwa bei 30 % und war für alle Gruppen gleich (Daten nicht gezeigt). Die Letalität war innerhalb der ersten 24 Stunden postoperativ am größten. Bei intraoperativ verstorbenen Tieren konnte oft kurz vor dem Tode Kammerflattern sowie -flimmern beobachtet werden.

Die Entwicklung des Körpergewichts über den gesamten Beobachtungszeitraum war für alle Tiere gleich (Daten nicht gezeigt). Am Ende eines jeden Untersuchungszeitraumes konnte kein signifikanter Unterschied im Körpergewicht zwischen den Gruppen gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

3.2. Linksventrikulärer Druck (LVP)

Die unbehandelten Tiere mit einem Infarkt hatten zu allen vier Zeitpunkten einen signifikant reduzierten LVP gegenüber den scheinoperierten Tieren (Sham). Am deutlichsten war dieser Unterschied in der Gruppe der 6-Stunden-Tiere mit einem im Mittel um 40,0 % geringeren LVP (Sham6h 73,7±8,1 mmHg; Co/Inf6h 44,3±2,2 mmHg). Die Reduktion des linksventrikulären Druckes betrug nach 24 Stunden 23,7 % (Sham24h 79,8±0,9 mmHg; Co/Inf24h 60,9±2,1 mmHg), nach 6 Tagen 29,4 % (Sham6d 83,0±1,4 mmHg; Co/Inf6d 58,7±3,6 mmHg) und nach 3 Wochen 26,3 % (Sham3wo 84,2±2,6 mmHg; Co/Inf3wo 62,1±1,6 mmHg)

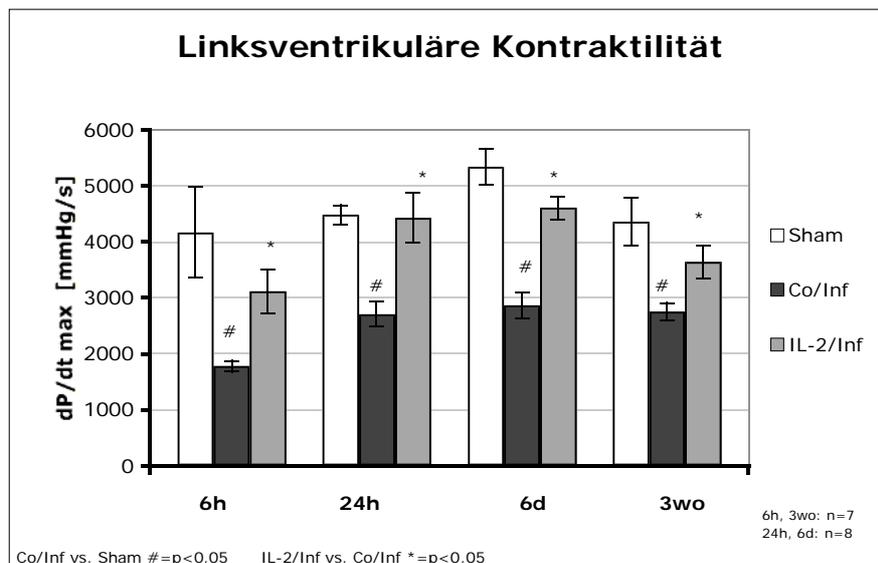
Bei der Behandlung mit dem IL-2-FP boten alle Tiere zu allen vier Zeitpunkten einen signifikant besseren LVP als die unbehandelten, jedoch einen geringeren Druck als die scheinoperierten Tiere. Am deutlichsten war der Druckunterschied wieder in der Gruppe der 6-Stunden-Tiere, bei denen die behandelten Tiere einen um 52,0 % (IL-2/Inf6h 67,3±5,0 mmHg) höheren Druck als die unbehandelten Kontrolltiere aufwiesen. Nach 24 Stunden war der LVP um 21,6 % (IL-2/Inf24h 74,1±5,5 mmHg), nach 6 Tagen um 29,7 % (IL-2/Inf6d 76,1±1,4 mmHg) und nach 3 Wochen um 30,0 % (IL-2/Inf3wo 80,7±5,2 mmHg) höher als bei den unbehandelten Kontrollen.

**Abb. 3.1**

Vergleich der linksventrikulären Drücke (durchschnittliche Maxima) in den Gruppen 6 Stunden, 24 Stunden, 6 Tage und 3 Wochen nach dem Infarkt

3.3. Linksventrikuläre Kontraktilität (dP/dt max)

Verglichen mit scheinoperierten Tieren wiesen die Herzen unbehauelter Tiere mit einem Infarkt 6 Stunden, 24 Stunden, 6 Tage und 3 Wochen postoperativ eine um 37-57 % reduzierte linksventrikuläre Kontraktilität auf. Hier war ebenfalls der Unterschied von Kontrollinfarktieren verglichen mit den scheinoperierten in der Gruppe der 6-Stunden-Tiere mit 57,3 % am größten (Sham6h 4171,1±814,9 mmHg/s; Co/Inf6h 1783,1±90,9 mmHg/s). Eine signifikant bessere Kontraktilität der fusionsproteinbehandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrollinfarkten konnte zu allen vier Untersuchungszeitpunkten beobachtet werden. Die deutlichste Verbesserung war nach 6 Stunden zu beobachten. Hier nahm die Kontraktilität um 74,4 % gegenüber den Kontrolltieren zu. Zu den Zeitpunkten 24 Stunden und 6 Tage nach Infarkt war eine Verbesserung um 63,18 % (Co/Inf24h 2714,4±222,5 mmHg/s; IL-2/Inf24h 4429,4±446,7 mmHg/s) bzw. 60,5 % (Co/Inf6d 2870,8±234,9 mmHg/s; IL-2/Inf6d 4609,0±200,7 mmHg/s) nachweisbar. Dieser Effekt ließ im Laufe der Untersuchung weiter nach, so dass 3 Wochen nach Infarkt nur noch eine 32,3 %ige Steigerung der Kontraktilität durch eine Behandlung mit dem IL-2-FP erreicht wurde.

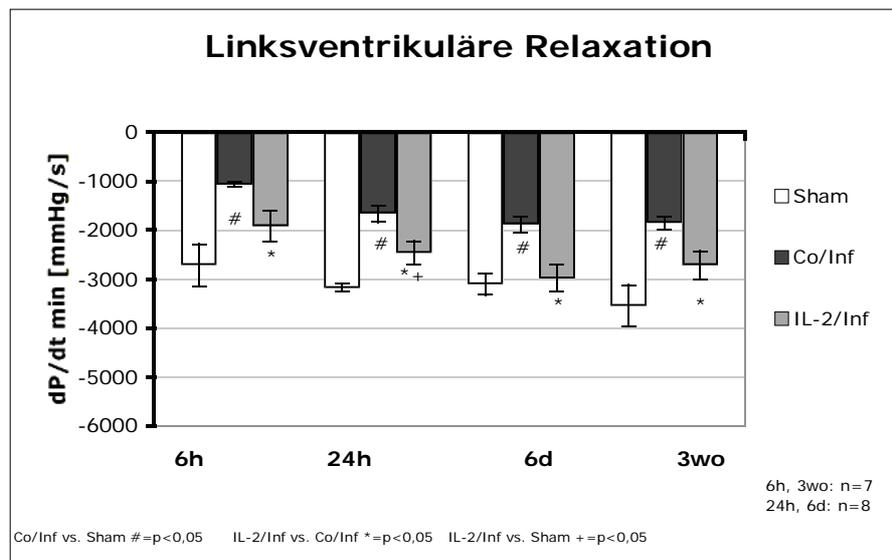
**Abb. 3.2**

Vergleich der linksventrikulären Kontraktilität (durchschnittliche Maxima) in den Gruppen 6 Stunden, 24 Stunden, 6 Tage und 3 Wochen nach dem Infarkt

3.4. Linksventrikuläre Relaxation (dP/dt min)

Zu allen vier Untersuchungszeiträumen war eine signifikante Reduktion der Relaxation um 40-61 % bei den Kontrollinfarkttieren verglichen mit den scheinoperierten Tieren beobachtbar. Am ausgeprägtesten war dies abermals zu einem frühen Zeitpunkt (Co/Inf6h $-1068,1 \pm 50,0$ mmHg/s; Sham6h $-2717,3 \pm 430,5$ mmHg/s). Die geringsten Relaxationsunterschiede zwischen scheinoperierten Tieren und Kontrollinfarktieren fanden sich in der 6-Tage-Gruppe (Co/Inf6d $-1878,0 \pm 157,4$ mmHg/s; Sham6d $-3107,8 \pm 217,7$ mmHg/s).

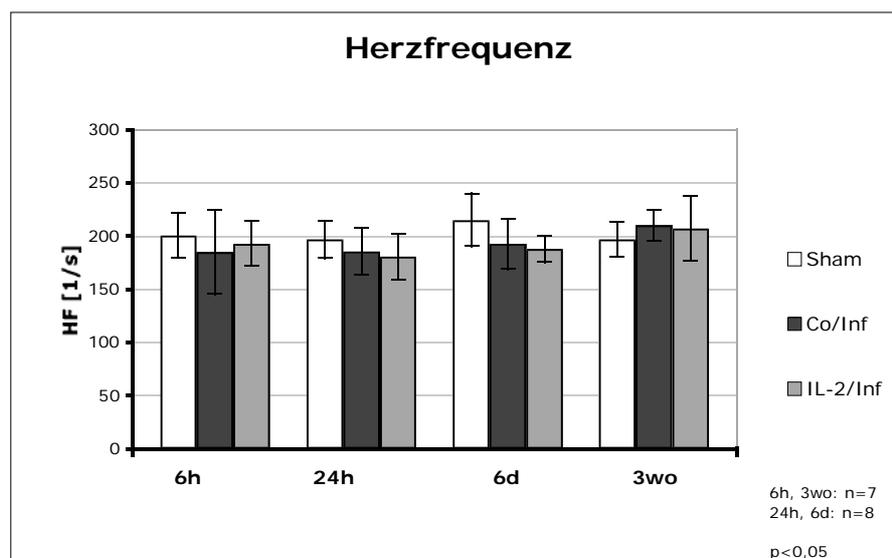
Wie schon bei den zuvor gemessenen Parametern LVP und Kontraktilität wiesen die Tiere auch bzgl. der Relaxation unter einer Fusionsproteinbehandlung zu allen vier Untersuchungszeitpunkten ebenfalls verbesserte Werte auf. Auch hier war die deutlichste Verbesserung nach 6 Stunden nachweisbar mit 80,0 % (Co/Inf6h $-1068,1 \pm 50,0$ mmHg/s; IL-2/Inf6h $-1922,1 \pm 312,7$ mmHg/s). Zu allen späteren Zeitpunkten lag die Steigerung der Relaxation in einem Bereich von 46-59 % und zeigte dabei keinen von der Zeit abhängigen Verlauf wie bei der Kontraktilität.

**Abb. 3.3**

Vergleich der linksventrikulären Relaxation (durchschnittliche Maxima) in den Gruppen 6 Stunden, 24 Stunden, 6 Tage und 3 Wochen nach dem Infarkt

3.5. Herzfrequenz (HF)

Die Herzfrequenz lag in einem Bereich zwischen $185,00 \pm 39,54$ Schlägen pro Minute (Co/Inf6h) und $215,3 \pm 24,7$ Schlägen pro Minute (Sham6d) und war zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant unterschiedlich.

**Abb. 3.4**

Vergleich der Herzfrequenzen in den Gruppen 6 Stunden, 24 Stunden, 6 Tage und 3 Wochen nach dem Infarkt

3.6. Auswirkung des IL-2-FP auf die Hämodynamik scheinoperierter Tiere

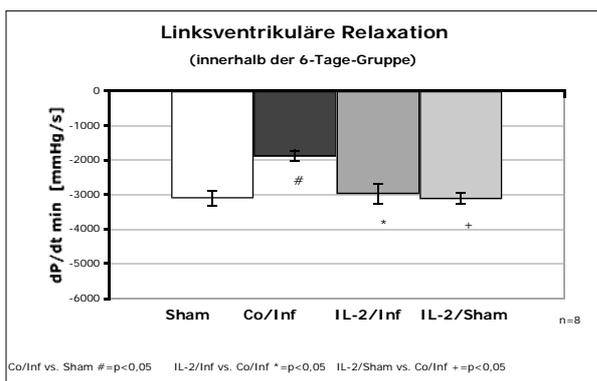
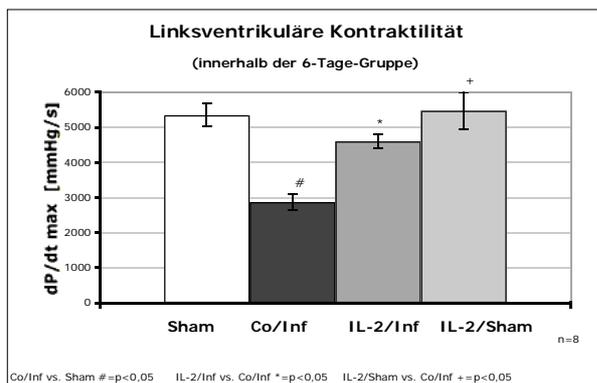
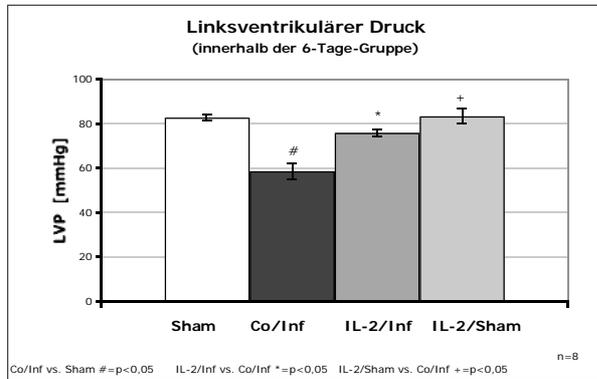


Abb. 3.5, 3.6, 3.7

Auswirkung einer Behandlung mit dem IL-2-FP ohne vorausgegangenes Infarktereignis auf LVP, Kontraktilität und Relaxation am Beispiel der 6-Tage-Gruppe

Um evtl. Einflüsse des benutzten IL-2-Fusionsproteins auf die Hämodynamik unabhängig von einem Infarkt zu untersuchen, wurde eine Gruppe (IL-2/Sham, n=8) von scheinoperierten Tieren 6 Tage lang mit dem Fusionsprotein behandelt und mit den scheinoperierten Tieren, den Kontrollinfarkttieren und den mit IL-2-FP behandelten Infarkttieren der 6-Tage-Gruppe verglichen. Es zeigte sich, dass sich die mit Fusionsprotein behandelten scheinoperierten Tiere in ihrem LVP (Sham6d 83,0±1,4 mmHg; IL-2/Sham6d 83,6±3,2 mmHg), der Kontraktilität (Sham6d 5346,9±323,8 mmHg/s; IL-2/Sham6d 5476,8±534,6 mmHg/s) und der Relaxation (Sham6d -3107,9±217,7 mmHg/s; IL-2/Sham6d -3112,8±150,7 mmHg/s) wie die unbehandelten scheinoperierten Tiere verhielten. Die Unterschiede zwischen den behandelten scheinoperierten Tieren und den Kontrolltieren waren signifikant. Es konnten also durch die Behandlung von scheinoperierten Tieren mit dem Fusionsprotein keine signifikanten hämodynamischen Veränderungen im Vergleich zu unbehandelten scheinoperierten Tieren beobachtet werden.

Die Herzfrequenz war in allen Gruppen gleich (Daten nicht gezeigt.)

3.7. Langfristige Auswirkungen einer kurz andauernden IL-2-Inhibition in der frühen Phase des Infarkts

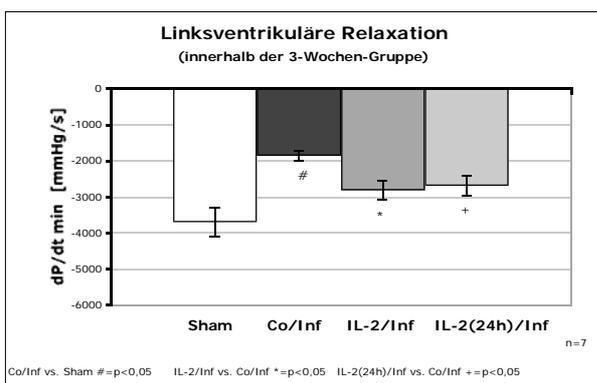
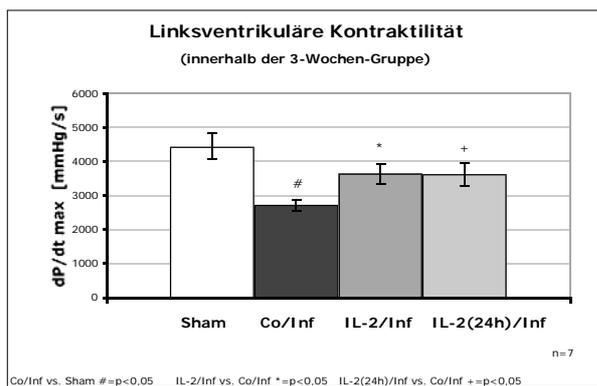
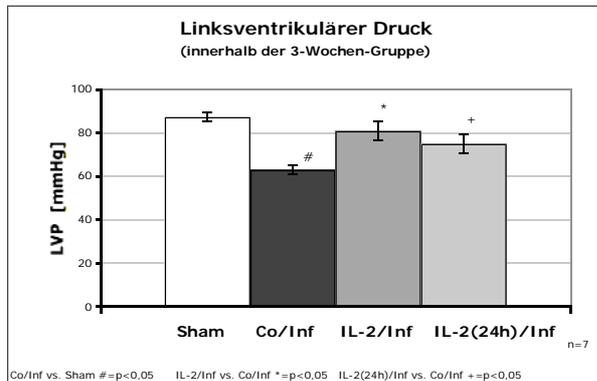


Abb. 3.8, 3.9, 3.10

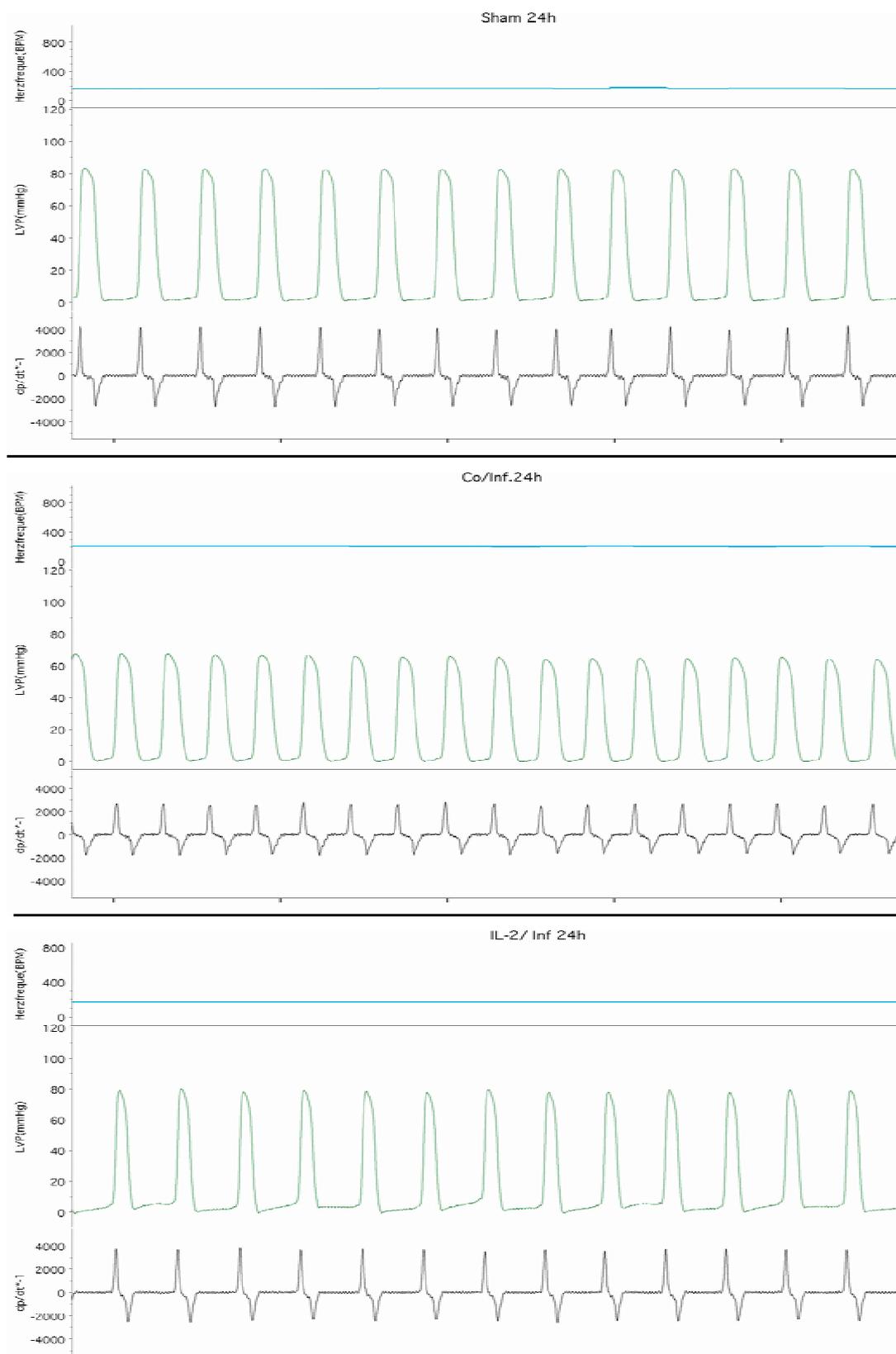
Auswirkung einer 24-stündigen Behandlung mit dem IL-2-FP nach einem Infarkt auf LVP, Kontraktilität und Relaxation nach 3 Wochen

Nach den eindeutigen hämodynamischen Ergebnissen zu den frühen Untersuchungszeitpunkten wurde eine Gruppe (IL-2(24h)/Inf, n=7) von Ratten 24 Stunden lang nach einem Infarkt mit dem Fusionsprotein behandelt (1. Dosis 6. Stunden präoperativ, 2. Dosis 6. Stunden postoperativ, weitere 2 Dosen im Abstand von 12 Stunden) und nach 3 Wochen hämodynamisch ausgewertet. Ziel war es herauszufinden, ob die gleichen hämodynamischen Wirkungen, wie sie nach 24 Stunden messbar waren, auch noch über einen längeren Zeitraum und in Abwesenheit des IL-2-FP erhalten bleiben.

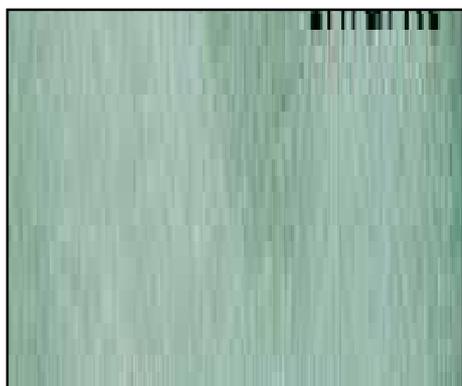
Die über 24 Stunden behandelten Tiere mit einem 3 Wochen alten Myokardinfarkt zeigten einen signifikant höheren LVP (Co/Inf3wo $62,1 \pm 1,6$ mmHg; IL-2(24h)/Inf3wo $75,0 \pm 4,5$ mmHg), eine stärkere Kontraktilität (Co/Inf3wo $2754,3 \pm 156,2$ mmHg/s; IL-2(24h)/Inf3wo $3631,0 \pm 331,3$ mmHg/s) und eine stärkere Relaxation (Co/Inf3wo $-1860,6 \pm 126,2$ mmHg/s; IL-2(24h)/Inf3wo $-2696,7 \pm 274,6$ mmHg/s) als die Kontrollinfarkttiere.

Die Unterschiede zwischen den beiden behandelten Tiergruppen waren nicht signifikant.

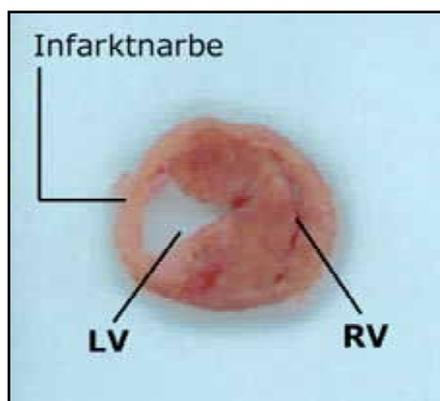
Die Herzfrequenz war für alle Gruppen gleich (Daten nicht gezeigt).

**Abb. 3.11**

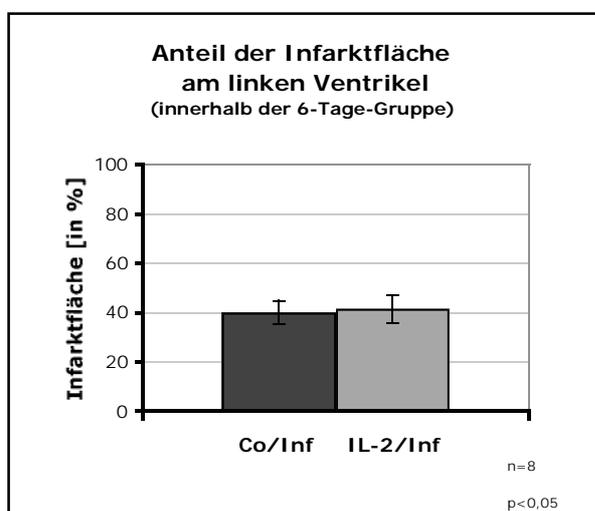
Hämodynamische Daten im direkten Vergleich zwischen scheinoperierten, unbehandelten und behandelten Infarkten (von oben nach unten) in der 24-Stunden-Gruppe (Ausschnitt entspricht immer 5 sec.)

**Abb. 3.12**

6 Tage alter Infarkt im RIVA-Stromgebiet, Ansicht von ventrokaudal

**Abb. 3.13**

3 Wochen alter Infarkt im Herzquerschnitt knapp unterhalb der Klappenebene (LV = linker Ventrikel, RV = rechter Ventrikel)



3.8. Infarktgröße

Die planimetrische Bestimmung der Infarktflächen nach SPILLMANN et al. [108] exemplarisch für die 6-Tage-Gruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Infarktgröße.

Die Infarktfläche betrug durchschnittlich 40-45 % der Gesamtfläche des linken Ventrikels

Abb. 3.14

Vergleich der Infarktflächen als Anteil an der Gesamtfläche innerhalb der 6-Tage-Gruppe bei behandelten und unbehandelten Infarkten.

3.9. Organgewichte

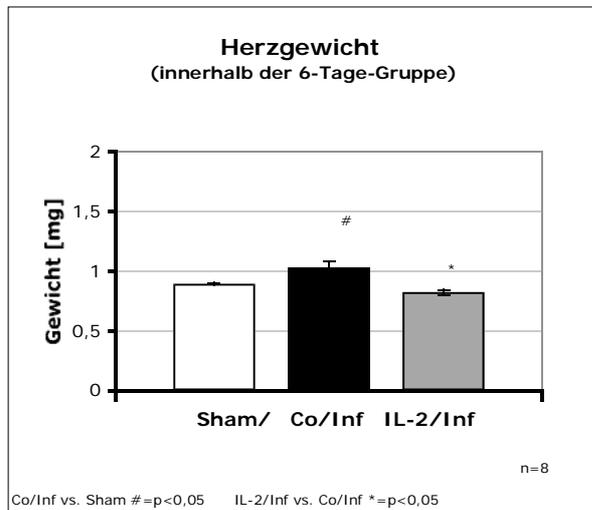


Abb. 3.15

Vergleich der Herzgewichte innerhalb der 6-Tage-Gruppe bei scheinoperierten, unbehandelten und behandelten Infarkten

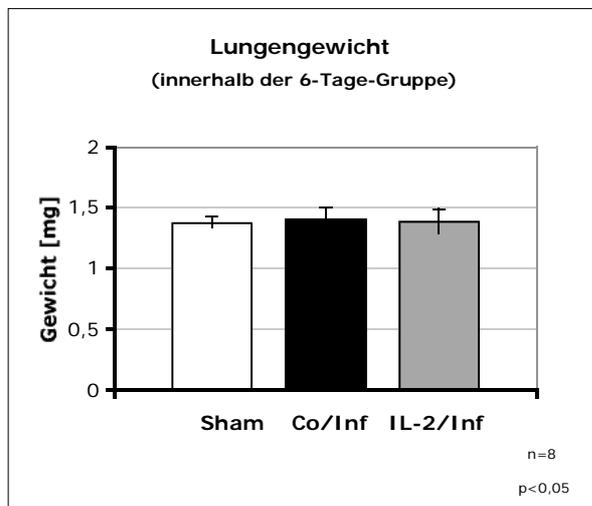


Abb. 3.16

Vergleich der Lungengewichte innerhalb der 6-Tage-Gruppe bei scheinoperierten, unbehandelten und behandelten Infarkten

Die Herz- und Lungengewichte wurden exemplarisch für alle Tiere der 6-Tage-Gruppe bestimmt (Sham/6d, Co/Inf6d, IL-2/Inf6d). Dabei gilt eine Zunahme des Herzgewichts als Hinweis auf ein kardiales Ödem und somit indirekt als Nachweis für ein CLS [112]. Das Lungengewicht dient als Nachweis für ein Lungenödem, das sowohl Folge eines insuffizienten Herzens sein kann als auch durch ein CLS bedingt entstehen kann. Die mittleren Herzgewichte wiesen nach dem Infarkt signifikante Unterschiede auf: Die Herzen der scheinoperierten Tiere waren 13,0 % leichter als die Herzen un behandelter Kontrolltiere (Sham $0,90 \pm 0,01$ g; Co/Inf $1,03 \pm 0,06$ g). Die Herzen der behandelten Tiere waren ebenfalls 20,0 % leichter als die der Kontrollen (IL-2/Inf $0,82 \pm 0,02$ g; Co/Inf $1,03 \pm 0,06$ g).

Die Lungengewichte der 6-Stunden-Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede auf.

3.10. Interleukin-2

Eine Antikörperfärbung gegen IL-2 zeigte sowohl eine signifikant verstärkte Expression 24 Stunden und 6 Tage nach dem Infarkt im Nichtinfarktareal als auch 6 Tage nach dem Infarkt im Infarktareal. Die Menge an IL-2 in den Nichtinfarktarealen hat 6 Tage nach dem Infarkt gegenüber vergleichbaren Gewebearealen zum Untersuchungszeitpunkt nach 24 Stunden deutlich zugenommen (siehe auch Abb. 3.19 und 3.20). Die Menge des Zytokins in den Infarktarealen unterschied sich hingegen zu diesen Zeitpunkten nicht signifikant. Ein Vergleich zwischen den mit Fusionsprotein behandelten Tieren und den Kontrolltieren ist hier nicht gezeigt, da der zur Färbung genutzte Antikörper an den Interleukin-Teil des IL-2-FP binden und so auch im Gewebe befindliches IL-2-FP markieren würde. Eine Unterscheidung zwischen exogen zugeführtem und endogen produziertem IL-2 ist mit den in dieser Arbeit genutzten Methoden nicht möglich gewesen.

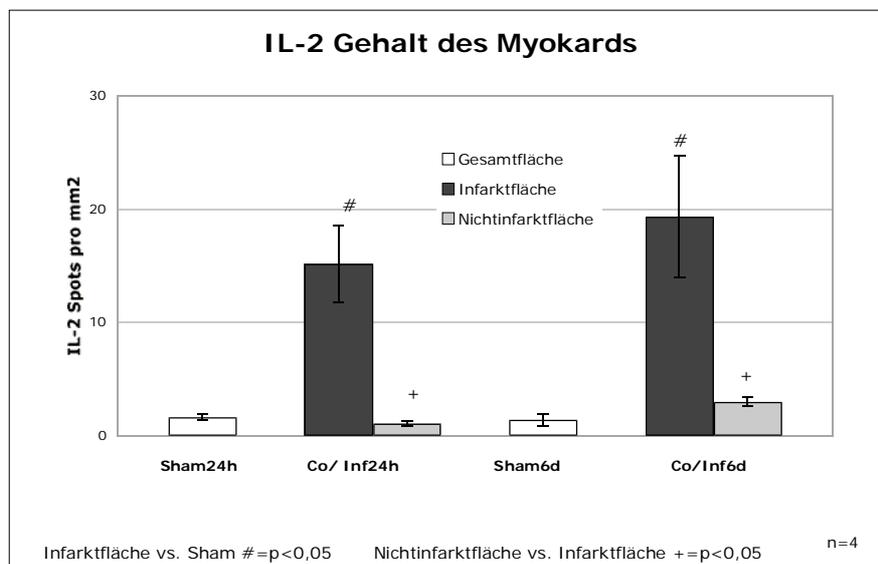


Abb. 3.17

Vergleich bzgl. des IL-2-Gehalts zwischen Kontrollinfarkt-Tieren und scheinoperierten Tieren innerhalb der 24-Stunden-Gruppe und der 6-Tage-Gruppe. Bei den scheinoperierten Tieren ist der IL-2 Gehalt für das gesamte Myokardgewebe (helle Säule) dargestellt. Bei den Infaktieren erfolgt eine Unterteilung zwischen dem infarzierten Bereich (schwarze Säule) und dem nichtinfarzierten Bereich (graue Säule).

Immunhistologische Färbung gegen Interleukin-2:

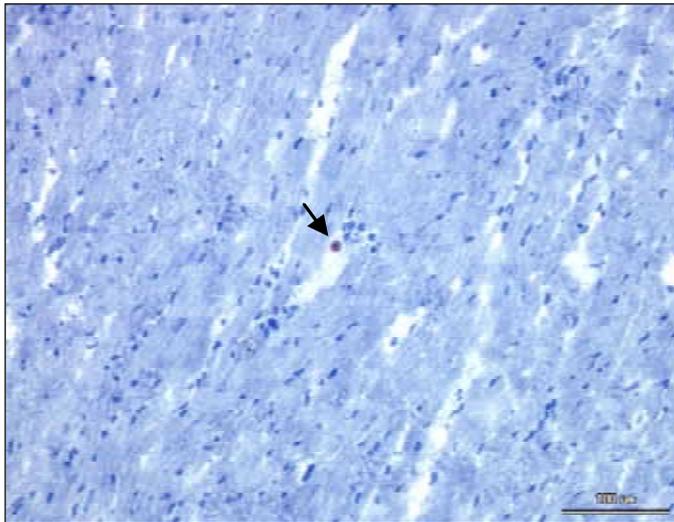


Abb. 3.18
Sham24h, 200fach vergrößert

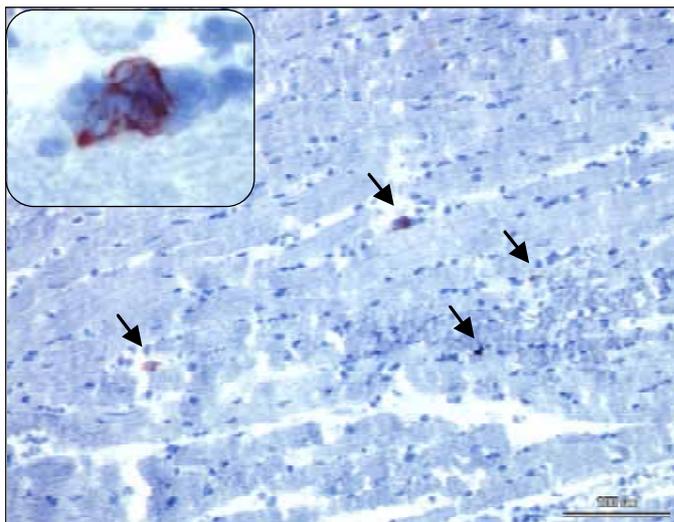


Abb. 3.19, 319a
Co/Inf24h (Infarktfläche), 200fach vergrößert
Einschub zeigt einen IL-2 Cluster in 1000facher Vergrößerung



Abb. 3.20
Co/Inf6d (Infarktfläche), 200fach vergrößert

3.11. Interleukin-1 β

Die Antikörperfärbung der Herzschnitte gegen IL-1 β zeigte eine starke Zunahme von IL-1 β im Herzen infarzierter Tiere gegenüber scheinoperierten Tieren. Nach 24 Stunden konnte etwa 4,4-mal so viel IL-1 β und nach 6 Tagen sogar 7,7-mal so viel wie in vergleichbaren scheinoperierten Tieren gefunden werden (siehe auch Abb. 3.24-3.26). Dabei ist die lokale Verteilung der Anreicherung dieses Zytokins sehr unterschiedlich: Sowohl bei den mit Fusionsprotein behandelten Infarkttieren als auch den Kontrollinfarkttieren war die IL-1 β -Konzentration im Infarktareal signifikant höher als im Nichtinfarktareal. Diese Unterschiede bestanden auch nach 6 Tagen noch, waren dann jedoch statistisch nicht mehr signifikant (Daten nicht gezeigt).

Eine Behandlung mit dem Fusionsprotein reduzierte den IL-1 β -Gehalt im Myokard nach 24 Stunden um 77 % und nach 6 Tagen um rund 60 % gegenüber den Herzen unbehandelter Kontrolltiere.

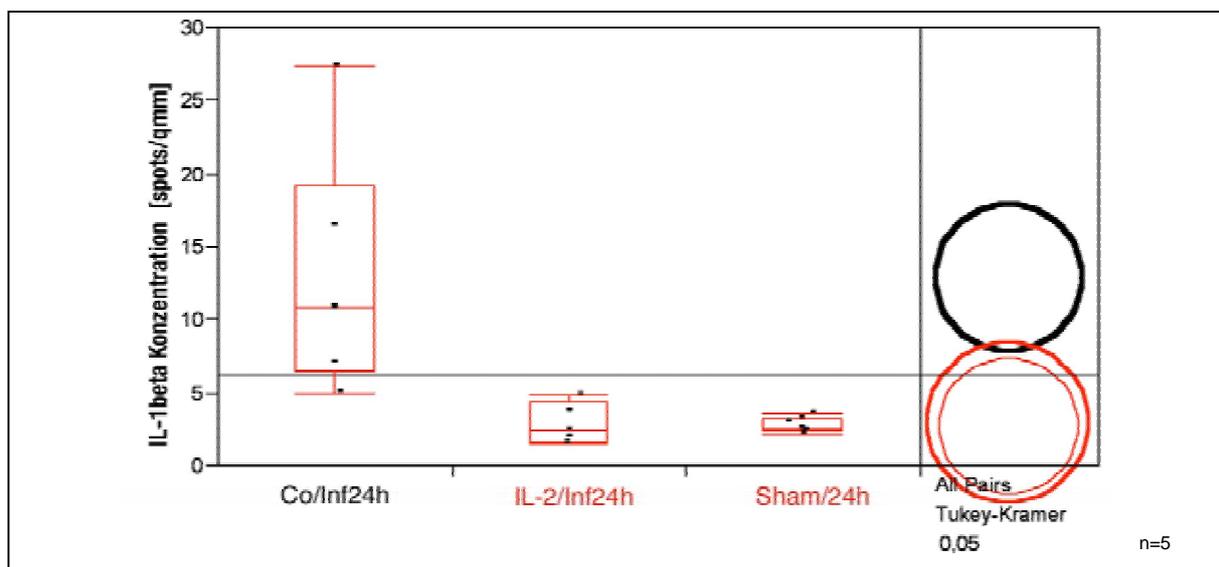
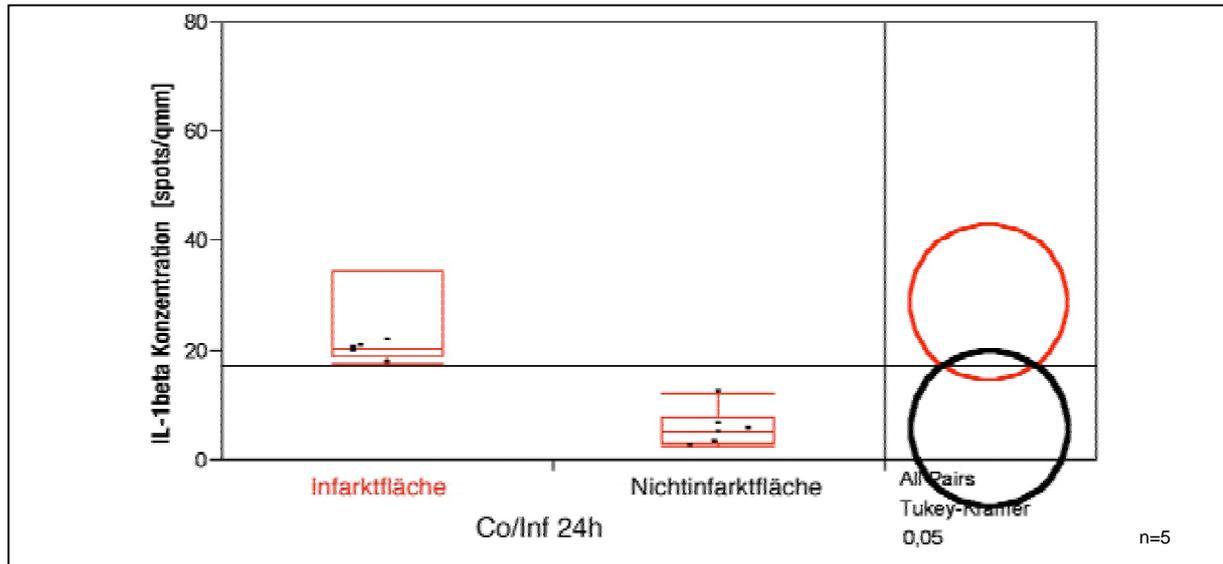
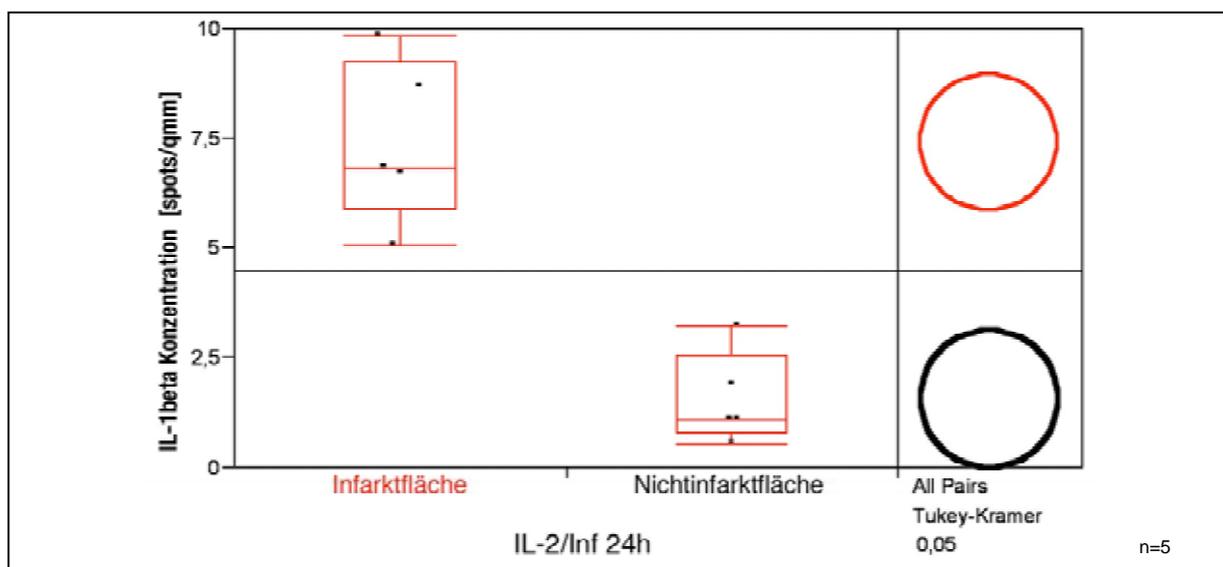


Abb. 3.21

Vergleich des gesamtmuskulären IL-1 β -Gehalts innerhalb der 24-Stunden-Gruppe

**Abb. 3.22**

Vergleich zwischen dem IL-1 β -Gehalt im Infarkt- und im Nichtinfarktgebiet von Kontrollinfarkttieren aus der 24-Stunden-Gruppe (Co/Inf24h)

**Abb. 3.23**

Vergleich zwischen dem IL-1 β -Gehalt im Infarkt- und im Nichtinfarktgebiet von fusionsproteinbehandelten Infarkttieren aus der 24-Stunden-Gruppe (IL-2/Inf24h)

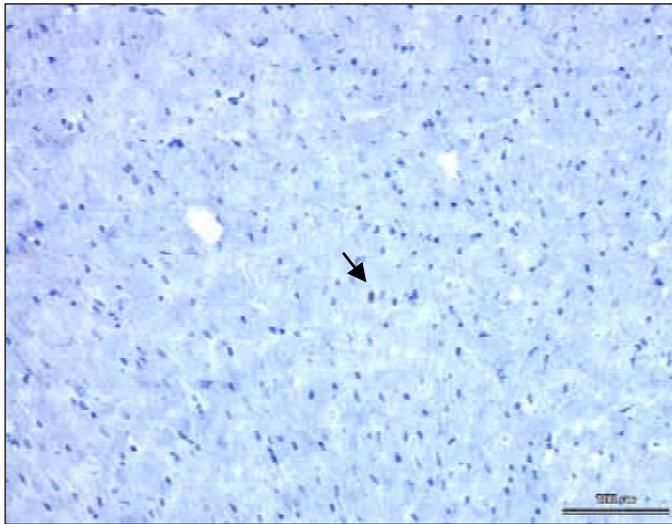
Immunhistologische Färbung gegen Interleukin 1 β :

Abb. 3.24
Sham24h, 200fach vergrößert

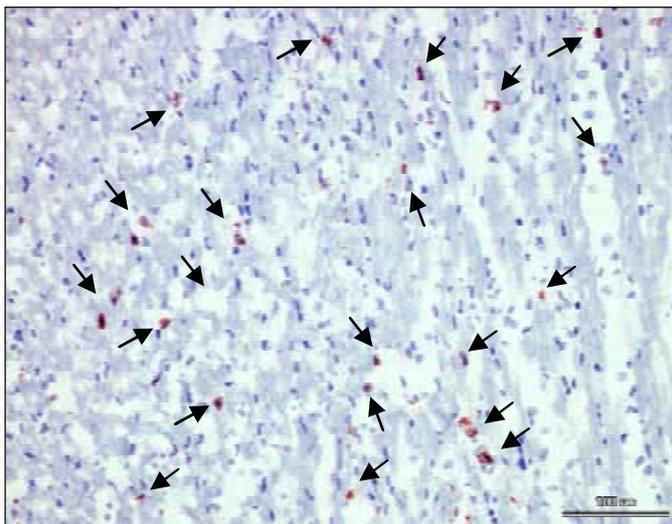


Abb. 3.25
Co/Inf24h (Infarktfläche), 200fach vergrößert

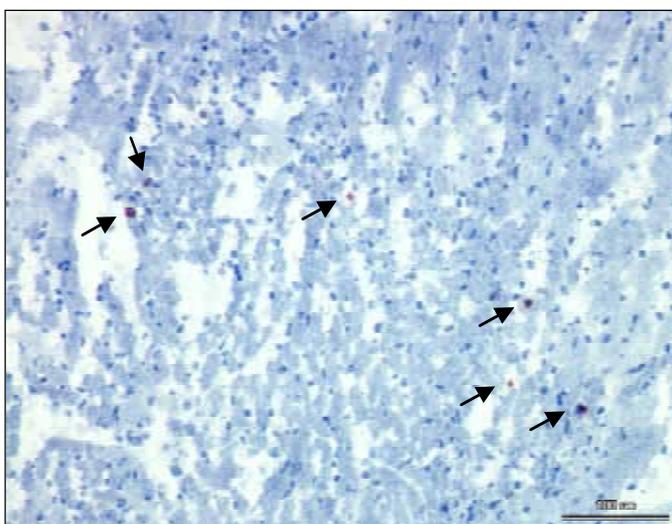


Abb. 3.26
IL-2/Inf24h (Infarktfläche), 200fach vergrößert

3.12. Tumornekrosefaktor- α

In den Herzen der Kontrollinfarkttiere konnte nach 24 Stunden deutlich mehr TNF- α gefunden werden als bei den vergleichbar scheinoperierten. Die mit IL-2-FP behandelten Tiere wiesen im Gesamtherz TNF- α -Mengen auf, die denen von Kontrolltieren ähnelten. Eine postoperative IL-2-FP-Therapie bewirkte hier also keine Veränderungen. Bei Unterscheidung der lokalen TNF- α -Verteilung im Myokard zeigte sich sowohl bei den Kontrollen als auch bei den behandelten Tieren ein signifikant höherer TNF- α Gehalt im Infarktareal als im Nichtinfarktareal.

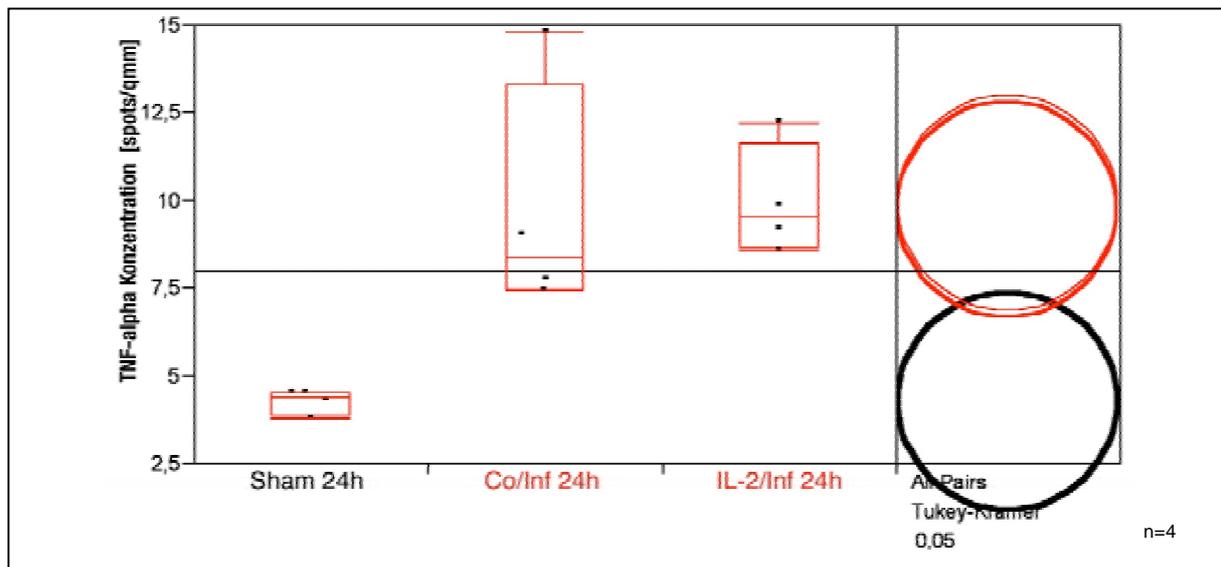


Abb. 3.27

TNF- α -Gehalt im ganzen Herzen von scheinoperierten Tieren, Kontrollinfarkttieren und mit IL-2-FP behandelten Infarkttieren aus der 24-Stunden-Gruppe

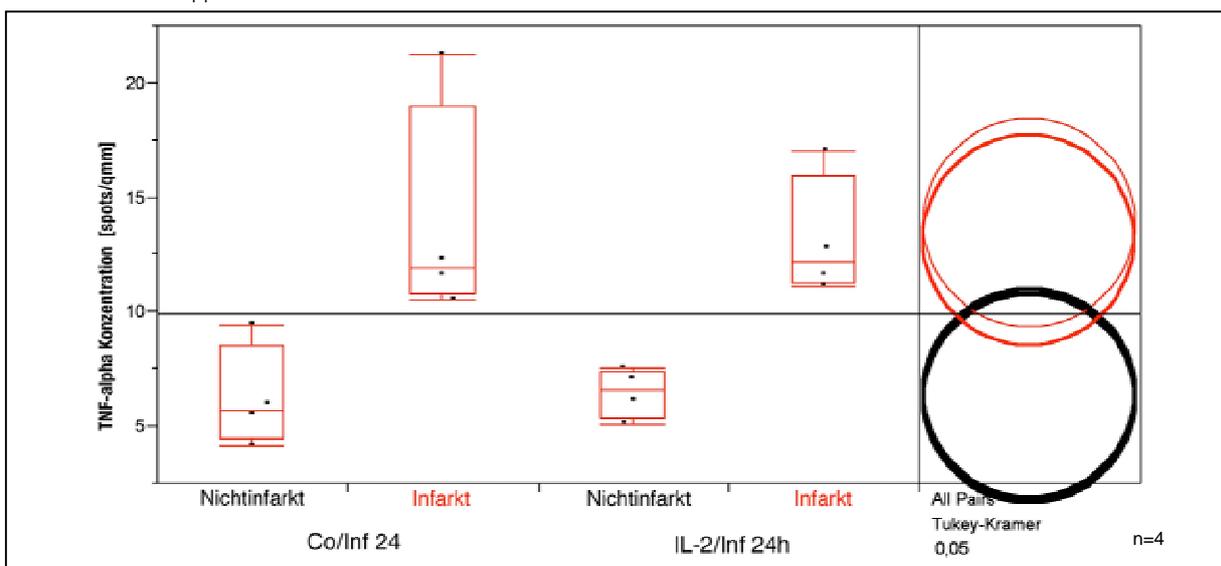


Abb. 3.28

Gegenüberstellung von Nichtinfarkt- und Infarktgebiet bei Kontrollinfarkttieren und fusionsproteinbehandelten Infarkttieren aus der 24-Stunden-Gruppe bzgl. ihres TNF- α -Gehaltes

3.13 Kollagen

Mit der Sirius Red-Färbung wurde der Gesamtkollagengehalt des Myokards semiquantitativ erfasst. Da die Bildung von Kollagen ein langfristiger Prozess ist, wurden dafür nur die Herzen der 3-Wochen-Gruppe histochemisch untersucht. Der Gehalt an Kollagen im gesamten Herz unterschied sich in allen drei Gruppen (Sham3wo, IL-2/Inf3wo und Co/Inf3wo) signifikant, wobei er bei den scheinoperierten Tieren am geringsten und bei den Kontrollinfarkttieren mit einer Steigerung um 347 % am höchsten war. Die Herzen behandelter Infarkttiere wiesen verglichen mit den Kontrollinfarkt Herzen einen um 40 % reduzierten Kollagengehalt auf. Unterscheidet man bei den infarzierten Herzen zwischen Infarkt- und Nichtinfarktareal, so fällt auf, dass hier ein Verteilungsmuster wie bei den Zytokinen vorlag. Der Gehalt an Kollagen im Infarktareal lag um etwa eine Zehnerpotenz höher als im Nichtinfarktareal. Dabei unterschied sich der Kollagengehalt im Infarktareal von IL-2/Inf3wo und Co/Inf3wo nicht. Dagegen unterschieden sich die Nichtinfarktareale dieser Tiere signifikant. Hier war eine deutliche Reduktion des Kollagengehaltes unter IL-2-FP-Behandlung meßbar (siehe auch Abb. 3.32-3.35).

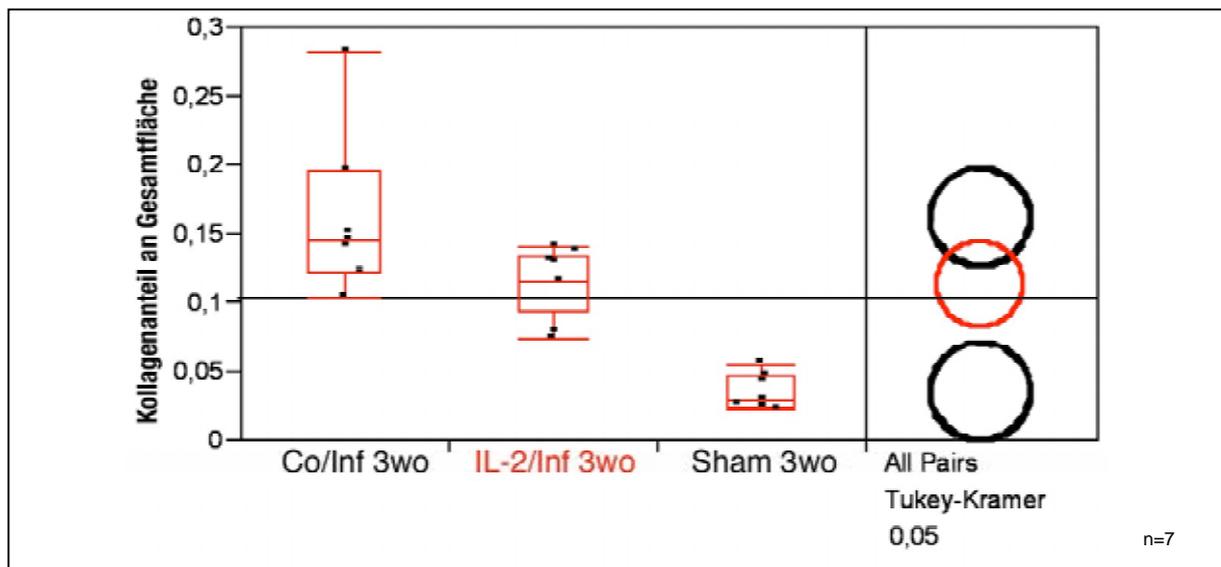


Abb. 3.29

Vergleich der Untergruppen innerhalb der 3-Wochen-Gruppe nach ihrem myokardialen Kollagengehalt im ganzen Herzen

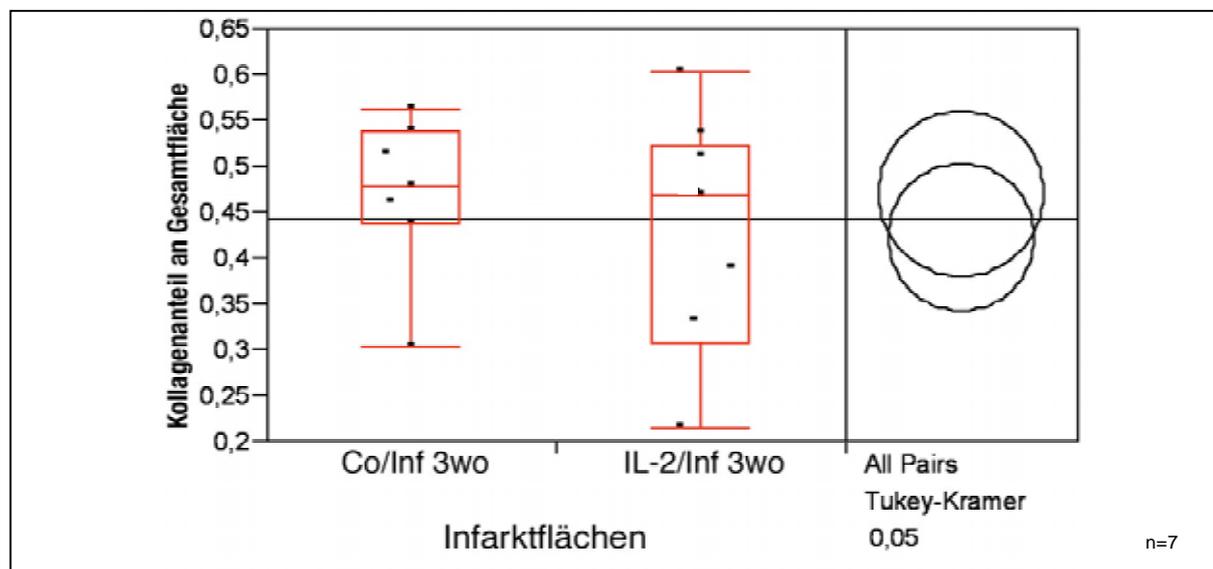


Abb. 3.30

Vergleich der Tiergruppen innerhalb der 3-Wochen-Gruppe nach ihrem myokardialen Kollagengehalt im Infarktbereich.

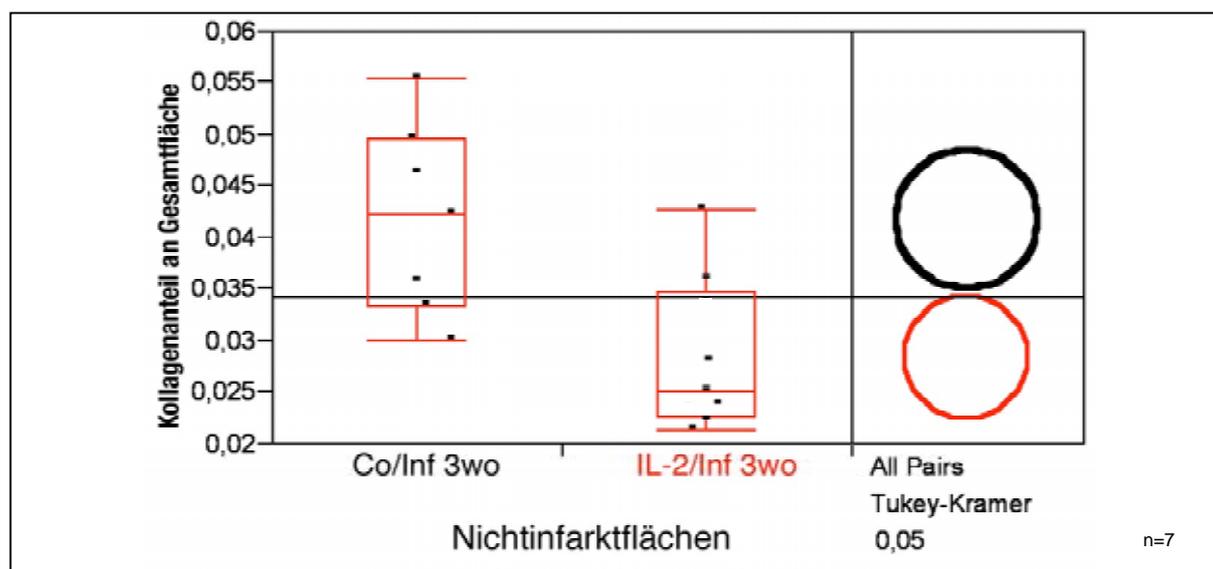


Abb. 3.31

Vergleich der Tiergruppen innerhalb der 3-Wochen-Gruppe nach ihrem myokardialen Kollagengehalt im Nichtinfarktbereich.

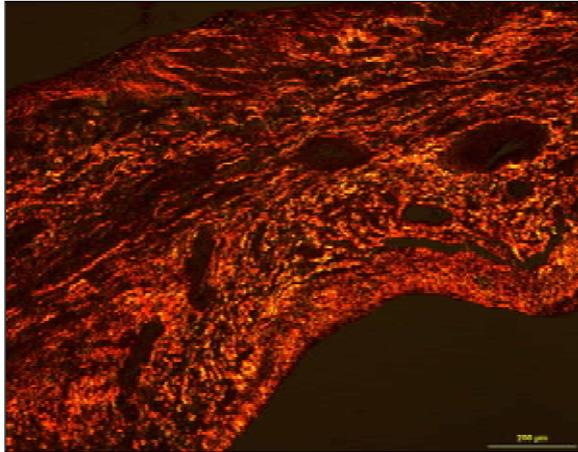
Histochemische Färbung gegen Kollagen (Sirius Red):

Abb. 3.32
Co/Inf3wo (Infarktareal), 100fach vergrößert

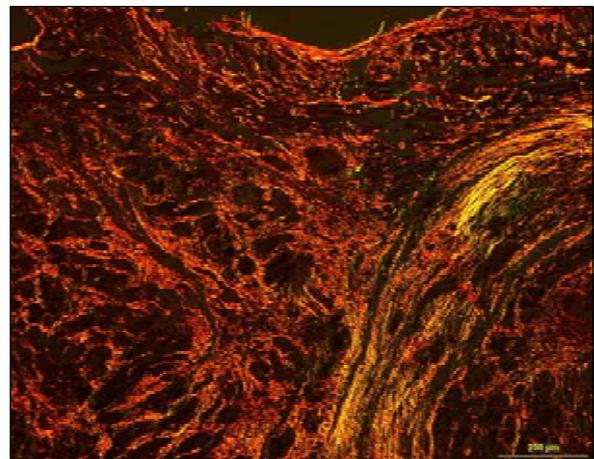


Abb. 3.33
IL-2/Inf3wo (Infarktareal), 100fach vergrößert

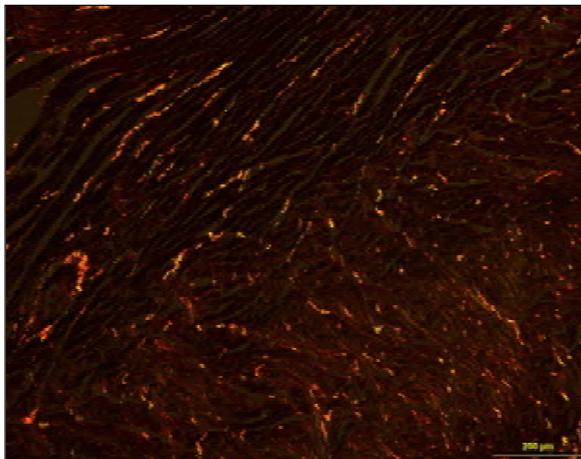


Abb. 3.34
Co/Inf3wo (Nichtinfarktareal), 100fach vergrößert

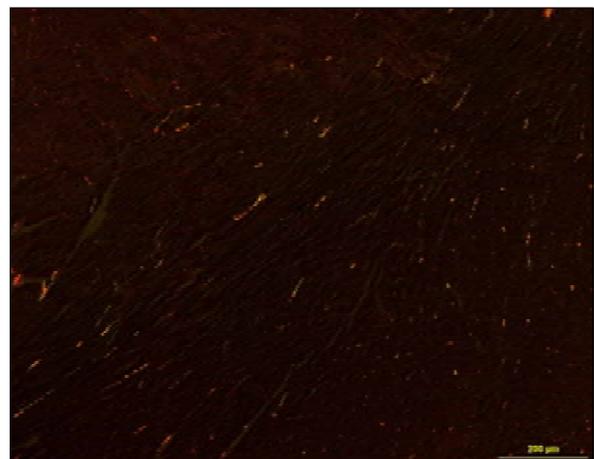


Abb. 3.35
IL-2/Inf3wo (Nichtinfarktareal), 100fach vergrößert