

Aus der Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Der Einfluss des neuartigen Aldosteronantagonisten  
MYO 302 auf Gewichtsverlauf, Körperzusammensetzung,  
Spontanaktivität und Herzfunktion im Rattenmodell  
der Tumor-Kachexie**

**Inaugural-Dissertation**  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
**Karl-Gunther Glowalla**  
Tierarzt aus Gera

Berlin 2018  
Journal-Nr.: 4014







**Aus der Institut für Tierpathologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Der Einfluss des neuartigen Aldosteronantagonisten MYO 302 auf  
Gewichtsverlauf, Körperzusammensetzung, Spontanaktivität und  
Herzfunktion im Rattenmodell der Tumor-Kachexie**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Karl-Gunther Glowalla**

Tierarzt aus Gera

**Berlin 2018**

**Journal-Nr.: 4014**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Robert Klopffleisch  
Zweiter Gutachter: PD Dr. Jochen Springer  
Dritter Gutachter: PD Robert Pieper

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

rats; animal models; tumors; body condition; blood composition; protein composition; echocardiography; body weight

Tag der Promotion: 25.04.2018

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <<https://dnb.de>> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-897-9

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2018**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2018

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

[verlag@menschundbuch.de](mailto:verlag@menschundbuch.de) – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	VI
<b>1 Einleitung</b> .....	1
<b>2 Kachexie als Begleitphänomen einer Tumorerkrankung</b> .....	4
<b>2.1 Definition</b> .....	4
<b>2.2 Epidemiologie</b> .....	5
<b>2.3 Pathophysiologie – Tumorkachexie als Multi-Organ-Syndrom</b> .....	6
<b>2.4 Therapie</b> .....	15
2.4.1 Therapieansätze .....	15
2.4.1.1 Nichtsteroidale Entzündungshemmer .....	15
2.4.1.2 Appetitstimulantien/Ghrelin/GH/IGF-1 .....	17
2.4.1.3 Beta-Blocker .....	19
2.4.1.4 SARMs/Testosteron/Anabole Steroide .....	20
2.4.1.5 Myostatinantagonisten .....	21
2.4.1.6 $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten (Formoterol, Clenbuterol) .....	22
2.4.1.7 ACE-Hemmer .....	24
2.4.2 Aldosteronantagonisten/Aldosteronsynthese-Inhibitoren als potentielle Therapeutika zur Behandlung der Tumorkachexie .....	25
2.4.2.1 Spironolacton .....	25
2.4.2.2 Canrenon .....	26
2.4.2.3 Eplerenon .....	26
2.4.2.4 MYO 302 .....	26
<b>2.5 Fragestellung</b> .....	27
<b>3 Material und Methodik</b> .....	28
<b>3.1 Material</b> .....	28
3.1.1 Tiere und Tierhaltung .....	28
3.1.2 Tierversuchsplan .....	29
3.1.2.1 Überlebensstudie .....	29
3.1.2.2 Echokardiographiestudie .....	30
3.1.3 Substanz .....	31
3.1.4 Puffer .....	31
3.1.5 Fluorogene Substrate .....	32
3.1.6 Geräte .....	33
3.1.7 Computerprogramme .....	33

<b>3.2 Methoden</b> .....	34
3.2.1 Tierexperiment .....	34
3.2.1.1 Tumormodell und Tumorinokulation.....	34
3.2.1.2 Behandlungsgruppen und Medikamentenapplikation .....	35
3.2.1.3 Gewichtsmonitoring und NMR .....	35
3.2.1.5 Tumorzellzahlermittlung .....	37
3.2.1.6 Echokardiographie .....	37
3.2.1.7 Lokomotoraktivitätsmessung, Futter- und Wasseraufnahme.....	38
3.2.2 Proteinbiochemie .....	39
3.2.2.1 Proteinextraktion.....	39
3.2.2.2 Proteinquantifizierung.....	39
3.2.2.3 Ubiquitin-Proteasomaktivitätsassay .....	40
3.2.2.4 Caspaseaktivitätsassay .....	40
3.2.3 Statistik.....	41
<b>4 Ergebnisse</b> .....	42
<b>4.1 Überlebensstudie</b> .....	42
4.1.1 Gewichtsentwicklung und Veränderung der Körperzusammensetzung .....	42
4.1.2 Fettgewebe und Skelettmuskulatur .....	45
4.1.3 Mortalität .....	48
4.1.4 Tumorwachstum .....	50
4.1.5 Proteinbiochemie.....	51
<b>4.2 Echokardiographiestudie</b> .....	53
4.2.1 Gewichtsentwicklung und Veränderung der Körperzusammensetzung .....	53
4.2.2 Organgewichte .....	54
4.2.3 Bewegungsaktivität .....	54
4.2.4 Futter- und Wasseraufnahme.....	55
4.2.5 Echokardiographie.....	55
<b>5 Diskussion</b> .....	58
<b>5.1 Überlebensrate</b> .....	58
<b>5.2 Tumorparameter</b> .....	61
<b>5.3 Gewichtsveränderung während des Versuchs</b> .....	61
<b>5.4 Körperzusammensetzung</b> .....	63
<b>5.5 Gewichte ausgewählter Organe</b> .....	65
<b>5.6 Quality of Life-Indikatoren</b> .....	66
<b>5.7 Proteinbiochemie</b> .....	68

<b>5.8 Echokardiographie</b> .....	70
<b>5.9 Schlussfolgerungen</b> .....	73
<b>6 Zusammenfassung</b> .....	74
<b>7 Summary</b> .....	75
<b>Quellenverzeichnis</b> .....	76
<b>Danksagung</b> .....	88
<b>Selbständigkeitserklärung</b> .....	89



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	angiotensin converting enzyme (engl.)
ACTH	Adrenocortikotrophes Hormon
ActRIIB	Activin receptor type-II B (engl.)
AIDS	acquired immune deficiency syndrome (engl.)
AKT	Proteinkinase B
ANAM	Anamorelin
APR	Akute-Phase-Reaktion
AR	Adrenozeptor
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
BAT	brown adipose tissue (engl.)
B-Mode	brightness-Modus
BMI	Body-Mass-Index (engl.)
Bpm	beats per minute (engl.)
BSA	bovines Serumalbumin
BYM338	Bimagrumab
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding-protein (engl.)
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CHF	chronic heart failure (engl.)
CKD	chronic kidney disease (engl.)
CO	cardiac output (engl.)
COPD	chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease, engl.)
COX	Cyclooxygenase
CREB	cAMP response binding protein (engl.)
CRP	c-reaktives Protein
CYP	Cytochrom P
DNA	Desoxyribonuclein acid (engl.)
EDD	enddiastolischer Durchmesser
EDL	Musculus extensor digitalis longus
EF	Auswurfs-/Ejektionsfraktion (ejection fraction, engl.)
EPO	Erythropoietin
ERK	extrazellulär signal-regulierte Kinase
ESD	endsystolischer Durchmesser
FFA	free fatty acids (engl.)
FS	fractional shortening (engl.)
GDF	growth differentiation factor (engl.)
GH	growth hormone (engl.)
GHSR	growth hormone secretagogue receptor (engl.)
Foxo	forkhead box protein (engl.)
HbA1c	Hämoglobin A1c
HF	Herzfrequenz
HSL	hormonsensitive Lipase
ID	innere Dimension
IGF	insulin-like growth factor (engl.)
IGFBP	insulin-like growth factor-binding protein (engl.)
IL	Interleukin
IVS	interventrikuläres Septum

KDa	Kilodalton
LMF	lipid mobilizing factor (engl.)
LPL	Lipoproteinlipase
LV	linker Ventrikel
MAFBX	muscle atrophy F-box Protein (engl.)
MAPK	mitogen activated protein kinase system (engl.)
Mc3r	Melanocortin-3-Rezeptor
Mc4r	Melanocortin-4-Rezeptor
MCH	melanin concentrating hormone (engl.)
MCH1R	melanin concentrating hormone receptor 1 (engl.)
MCH2R	melanin concentrating hormone receptor 2 (engl.)
MIC	macrophage inhibitory cytokine (engl.)
M-Mode	time/motion-Modus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSH	Melanozytenstimulierendes Hormon
mTOR	mechanistic target of rapamycin (engl.)
MURF	muscle ring finger containing Protein (engl.)
NEFA	nichtveresterte Fettsäuren (non esterified fatty acids, engl.)
NFκB	Nekrosefaktor κ
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance, engl.)
NPY	Neuropeptid Y
NSAID	nicht steroidale Antiphlogistika
NSCLC	non-small cell lung cancer (engl.)
OD	optische Dichte
p	statistisches Maß für die Wahrscheinlichkeit
P	Placebo
PAX	protein paired box (engl.)
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3 Kinase
PLIN	Perilipin
POMC	Proopiomelanocortin
PKA	Proteinkinase A
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter-Rezeptor
PTHRP	parathyroid-hormone-related protein (engl.)
PW	posteriore Wandstärke
RAS	Renin-Angiotensin-System
RIP	receptor-interacting protein (engl.)
S	Sham
SARMS	selective Androgenrezeptor-Modulatoren
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
STAT	Signaltransduktoren und –aktivatoren der Transkription
SV	Schlagvolumen
Tab.	Tabelle
TAG	Triacylglycerin
TGF	transforming growth factor (engl.)
TNF	Tumornekrosefaktor
TORC	target of rapamycin complex (engl.)
TRIM	tripartite motif protein (engl.)
TXA	Thromboxan
UCP	uncoupling protein (engl.)
UDCA	Ursodeoxylcholsäure
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
WAT	white adipose tissue (engl.)
ZAG	zinc alpha 2-glycoprotein (engl.)

# 1 Einleitung

Der Verlust von Körpergewicht, d.h. eine Körpergewichtsreduktion um >5%, resultiert in diversen Ursachen. Neben einer Abmagerung aufgrund kaum oder nicht vorhandener Verfügbarkeit von qualitativ hochwertiger Nahrung spielen pathologische Prozesse im Rahmen der Nahrungsaufnahme (z.B. Appetitlosigkeit), der Nahrungsverwertung, metabolische Veränderungen sowie Begleitphänomene zugrundeliegender Krankheitsprozesse eine große Rolle.

Insbesondere chronische Erkrankungen, welche häufig mit einer systemischen Entzündung einhergehen [1], wie chronische Herzinsuffizienz [2-4], chronisch obstruktive pulmonale Erkrankungen (COPD), Diabetes mellitus, chronische Leber-, Nieren- und Pankreasentzündung [5], Rheumatoide Arthritis, AIDS [6, 7] sowie Krebserkrankungen führen zu einer vergleichsweise schnell voranschreitenden Auszehrung des Körpers. Diese Auszehrung wird als Kachexie bezeichnet und betrifft sowohl Muskel-, Fett- und Knochengewebe.

Im Jahr 2007 wurde von einer internationalen Expertengruppe eine allgemein gültige Definition von Kachexie bei Erwachsenen vorgestellt [8]. Die diagnostischen Kriterien für Kachexie sind demnach:

- Gewichtsverlust von mindestens 5% (nicht-ödematös) in den letzten 12 Monaten oder weniger bei Vorhandensein einer Grunderkrankung oder
- ein BMI <20 kg/m<sup>2</sup>
- sowie das zusätzliche Auftreten drei der folgenden Kriterien:
  - eine reduzierte Muskelkraft
  - Erschöpfung
  - Anorexie
  - Niedriger Index an fettfreier Masse
  - Abnorme biochemische Parameter: pathologisch erhöhte Entzündungswerte (CRP >5 mg/l, IL-6 >4 pg/ml), Anämie (<12 g/dl) und einer niedriger Serumalbuminspiegel (<3,2 g/dl)

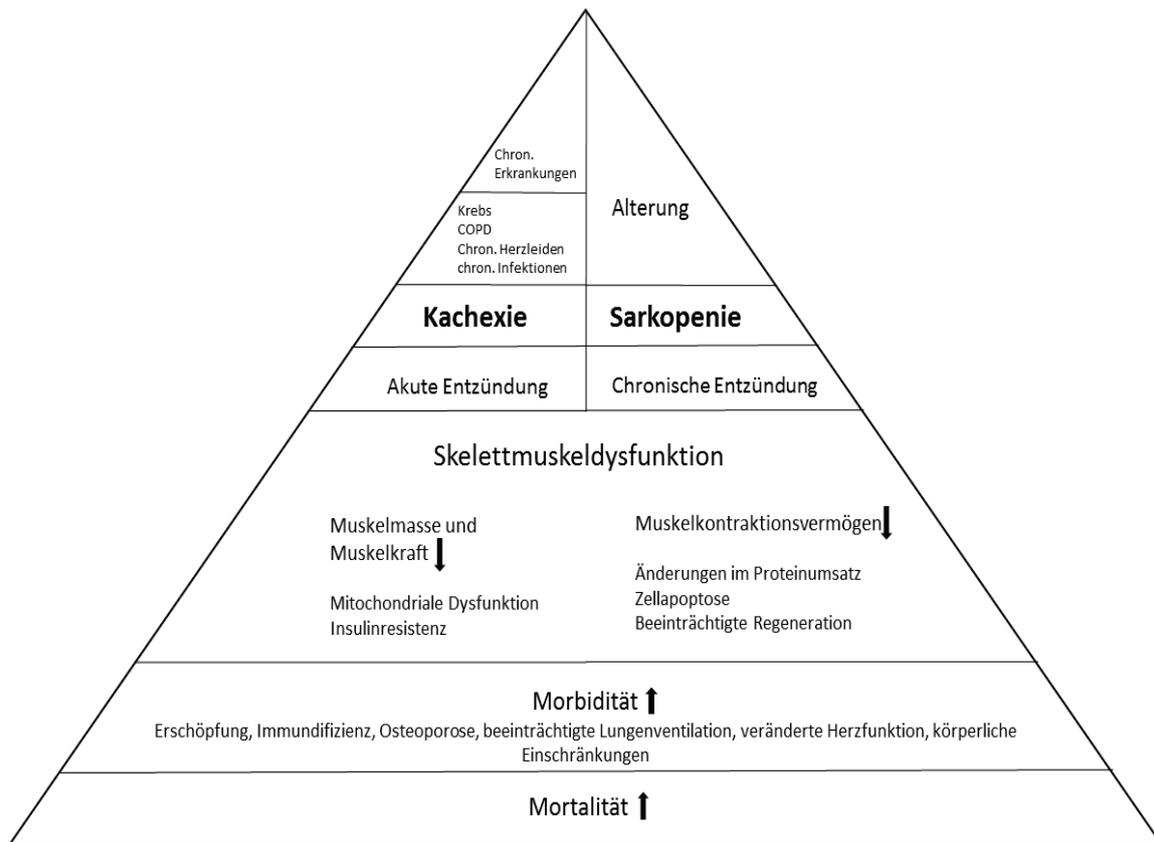
Das Auftreten von Kachexie ist in der Regel mit einer ungünstigen Prognose verbunden [9]. Insbesondere die tumorbedingte Kachexie verursacht eine erhöhte Morbidität und Mortalität [10].

Kachexie ist diagnostisch für eine nachfolgende Therapie von anderen gewichtsreduzierenden Syndromen zu differenzieren. Während die reversible und ohne weitere Begleiterscheinungen auftretende Anorexie wegen der reduzierten Kalorienzufuhr mehr das Fett- als das Muskelgewebe betrifft, tritt bei Kachexie ein Muskel- und Fettabbau irreversibel in annähernd gleichem Ausmaß auf. Der Verlust von Skelettmuskelprotein ist bei Kachexie größer als der Abbau von viszeralem Protein. Bei Anorexie werden in beiden Geweben die Proteine zu weitgehend gleichen Teilen abgebaut [4].

Sarkopenie umschreibt einen in höherem Alter und bei Mangelernährung vorkommenden Gewichtsverlust, wobei hauptsächlich die Skelettmuskulatur betroffen ist [11]. Bei Männern beträgt der jährliche altersbedingte Abbau an Skelettmuskeln ab einem Alter von 50 Jahren ca. 1-2%, bei Frauen liegt er etwas darunter [12].

Der Abbau von Muskelgewebe kann durch die Einlagerung von intramuskulärem Fettgewebe kompensiert werden [13]. In Phasen der Mangelernährung kann dieses jedoch ebenfalls reduziert werden [11].

Abb. 1.1 vergleicht anschaulich Kachexie und Sarkopenie in Form einer Pyramide, entwickelt von Argilés et al. [14].



**Abb. 1.1** Kachexie-Sarkopenie-Pyramide (verändert nach Argilés et al. [14])

In Tabelle 1.1 sind die an beiden Syndromen beteiligten Faktoren gegenübergestellt [14].

**Tab. 1.1** Vergleich von Kachexie und Sarkopenie (verändert nach Argilés et al. [14]) (+ = geringgradig, ++ = mittelgradig, +++ = hochgradig)

Faktor	Kachexie	Sarkopenie
<b>Gewichtsverlust</b>	ja	nein (da Kompensation durch intramuskuläre Fetteinlagerung)
<b>Muskelmasse</b>	sinkt	sinkt
<b>Fettmasse</b>	sinkt	steigt
<b>Anorexie</b>	++	+
<b>Ruheenergiebedarf</b>	steigt	sinkt
<b>Entzündung (systemisch)</b>	+++	+
<b>Grunderkrankung</b>	ja	ja/nein
<b>Muskelproteinabbau</b>	+	+++
<b>beeinträchtigte Muskelproteinsynthese</b>	ja/nein	ja
<b>erhöhte Apoptose von Muskelzellen</b>	ja	ja
<b>verringerte Muskelregeneration</b>	ja	ja
<b>muskuläre mitochondriale Dysfunktion</b>	ja	ja
<b>Insulinresistenz</b>	ja	ja

## 2 Kachexie als Begleitphänomen einer Tumorerkrankung

### 2.1 Definition

Seit langem ist bekannt, dass Kachexie in Verbindung mit Krebserkrankungen auftritt. Sie ist dabei mit reduzierten Körperfunktionen [15], verminderter Toleranz gegenüber antitumoraler Therapie [16] und mit einer geringeren Überlebensrate verbunden [17, 18].

Jedoch fehlte es lange Zeit an einer allgemeingültigen Definition der (Tumor)kachexie. Erst 2011 wurde ein internationaler Konsens für eine Definition gefunden. Tumorkachexie ist demnach ein multifaktorielles Syndrom, welches durch einen fortschreitenden Verlust von Skelettmuskelmasse (mit oder ohne Verlust von Fettgewebe) charakterisiert ist. Dieser ist irreversibel bei unterstützender konventioneller Ernährung und führt zu einer progressiv voranschreitenden funktionellen Beeinträchtigung. Die Pathophysiologie einer Tumorkachexie ist charakterisiert durch eine negative Energie- und Proteinbilanz, bestimmt durch eine Kombination von verringerter Nahrungsaufnahme und gestörten Stoffwechselfunktionen [19].

Diagnostische Kriterien für eine Tumorkachexie sind [19]:

- Gewichtsverlust  $> 5\%$  in den letzten 6 Monaten (bei Ausschluss einer gewöhnlichen Hungerphase), oder
- BMI  $< 20$  und ein Gewichtsverlust  $> 2\%$ , oder
- Starker Abbau der Skelettmuskulatur (Muskelindex Männer  $< 7,26 \text{ kg/m}^2$ , Frauen  $< 5,45 \text{ kg/m}^2$ ) und ein ungewollter Gewichtsverlust  $> 2\%$  in den letzten 6 Monaten

Tumorkachexie wird als Kontinuum mit drei Phasen klinischer Relevanz angesehen (Abb. 2.1). Nicht alle Phasen treten bei jedem Patient auf. Während der Präkachexie kommt es zu einem Gewichtsverlust von weniger als  $5\%$  sowie Stoffwechseleränderungen. Das Stadium der Kachexie wird mit den o.a. Kriterien beschrieben. Die refraktäre Kachexie als dritte Phase ist das Ergebnis einer weit fortgeschrittenen Tumorerkrankung (präterminal) oder tritt bei sehr progressiv verlaufenden Krebserkrankungen ohne Ansprechen auf antitumorale Therapie auf. In dieser Phase kommt es zu einem aktiven Katabolismus. Die refraktäre Kachexie ist charakterisiert durch eine Lebenserwartung von weniger als 3 Monaten [19].



<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gewichtsverlust <math>\leq 5\%</math></li> <li>• Anorexie</li> <li>• Stoffwechseländerungen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gewichtsverlust <math>&gt; 5\%</math> oder</li> <li>• BMI <math>&lt; 20</math> und Gewichtsverlust <math>&gt; 2\%</math> oder</li> <li>• Sarkopenie und Gewichtsverlust <math>&gt; 2\%</math></li> <li>• Häufig reduzierte Nahrungsaufnahme/systemische Entzündung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Variable Kachexieausprägung</li> <li>• Ausgeprägter Katabolismus</li> <li>• Kein Ansprechen auf antitumorale Therapie</li> <li>• Lebenserwartung <math>&lt; 3</math> Monate</li> </ul>
---	--	---

Abb. 2.1 Phasen der Tumorkachexie (verändert nach Fearon, K.C.H. et al. [19])

## 2.2 Epidemiologie

Krebs stellt weltweit eines der Hauptprobleme der öffentlichen Gesundheit dar. Tumorerkrankungen sind mittlerweile für 23% aller Todesfälle verantwortlich und stellen somit nach den Herzerkrankungen das zweithäufigste tödlich verlaufende Krankheitsgeschehen dar. Eine Studie in den USA geht davon aus, dass ein Drittel aller Frauen und die Hälfte aller US-amerikanischen Männer im Laufe ihres Lebens Krebs entwickeln [20]. Jedoch steigt die Zahl der Überlebenden einer Krebserkrankung, im Wesentlichen bedingt durch frühzeitige Diagnose- und bessere Therapiemöglichkeiten. Vor dem Einsatz von effektiven Screening- und Therapiemethoden wurde Krebs häufig erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, wenn die betroffenen Patienten bereits kachektisch waren [21].

Man geht davon aus, dass in Europa jährlich 3,2 Millionen Personen an Krebs erkranken. Etwa 1,7 Millionen Menschen versterben pro Jahr an Krebs. Zu den häufigsten Krebserkrankungen zählen Brust-, Kolorektal- und Lungentumoren [22].

Aufgrund einer bis vor wenigen Jahren fehlenden Definition für Tumorkachexie schwanken die Inzidenzen stark [23]. Laviano et al. (2005) gehen davon aus, dass 63% aller Krebspatienten eine Kachexie entwickeln [24]. Andere Studien erheben eine Kachexierate von 50% bei Krebspatienten [10, 25].

Das Auftreten einer Tumorkachexie ist von der Tumorentität abhängig, jedoch entwickeln nicht alle Patienten mit der gleichen Tumorentität eine Kachexie [26]. Beispielsweise ist bei 85% der Fälle mit Pankreaskarzinom der Krankheitsverlauf mit einer Kachexie verbunden. Bei Magen- und bei Pankreaskarzinom geht die Kachexie mit einem starken Gewichtsverlust einher. Dieser liegt insbesondere beim Pankreaskarzinom im Mittel bei 25% [27]. Es wurde eine negative Korrelation zwischen der Überlebensrate und dem Gewichtsverlust bei Patienten mit Pankreaskarzinom nachgewiesen [17]. Neben einer erhöhten Inzidenz bei gastrointestinalen Tumoren ist eine Kachexie auch eine häufige Begleiterscheinung bei Lungentumoren [10]. Patienten mit Mammakarzinom, non-Hodgkin-Lymphom, nichtlymphozytärer Leukämie und Sarkomen weisen die geringsten Inzidenzraten des Auftretens einer Tumorkachexie auf [28].

Neben der Tumorentität spielen individuelle Patienteneigenschaften wie Geschlecht, Alter, Prädisposition und auch die Form der Therapie eine Rolle für das Entwickeln einer Kachexie [29]. Tumorpatienten mit Kachexie zeigen neben einem massiven Gewichtsverlust auch Anorexie, Anämie, Ödeme und Erschöpfungserscheinungen [30]. Die Ausprägung einer Kachexie ist immer mit einer verringerten Überlebensdauer und damit mit einer schlechten Prognose verbunden [31, 32]. Tumorkachexie wird bei einem Fünftel bis zu einem Drittel der Krebspatienten als Todesursache angesehen [33, 34].

### **2.3 Pathophysiologie – Tumorkachexie als Multi-Organ-Syndrom**

Die pathophysiologischen Mechanismen und Signalwege, welche zu einer tumorbedingten Kachexie führen, sind nicht vollständig verstanden. Kachexie wird als Zusammenspiel einer Vielzahl von Mediatoren angesehen, die sowohl vom Tumor selbst als auch vom nicht-tumorösen Gewebe gebildet werden und miteinander agieren [35]. Der Verlust von Muskelgewebe steht dabei in einem direkten Zusammenhang mit molekularen Mechanismen in anderen Organen und Geweben wie dem braunen und weißen Fettgewebe, Gehirn, Leber, Darm und Herz, so dass bei Tumorkachexie von einem Multi-Organ-Syndrom gesprochen werden kann. Ein zentraler Punkt ist dabei die Entwicklung einer Inappetenz, vermutlich ausgelöst durch Veränderungen im Geschmacks- und Geruchssinn und dem Einsetzen eines vorzeitigen Sättigungsgefühls [36]. Die Folgen davon sind verminderte Nahrungsaufnahme und Mangelernährung [37]. Der Verlust von weißem Fettgewebe im Rahmen einer Tumorkachexie ist eine wesentliche Grundlage für die damit verbundene Energiedefizienz. Offenbar versucht der Körper dagegen zu regulieren, denn Tumorpatienten zeigen sowohl eine Aktivierung als auch eine Expansion des für die Thermogenese verantwortlichen braunen Fettgewebes [38, 39]. Die

Veränderungen im Stoffwechsel des weißen Fettgewebes sowie des ebenso katabolen Skelettmuskelstoffwechsels werden durch Mediatoren wie prokachektische Faktoren (*lipid mobilizing factor* – LMF [40], Cathepsine [41], Akute-Phase-Proteine [42, 43], Zytokine [44, 45], oxidativen Stress [24, 46, 47], gesteigerte Ubiquitinierung sowie Abbau durch das Proteasom [48] und Apoptose [49] ausgelöst. Im Nachfolgenden sollen die molekularen und metabolischen Komponenten der Tumorkachexie beschrieben werden.

#### *Pathophysiologie der Anorexie im Rahmen einer Tumorkachexie*

Tumorpatienten entwickeln häufig eine Inappetenz, die in einen Gewichtsverlust bis hin zur Kachexie mündet [26]. Diese auch als Anorexie bezeichnete Begleiterscheinung der Kachexie resultiert zum einem aus der antitumoralen Chemotherapie, jedoch tritt Anorexie auch bei nicht chemotherapeutisch behandelten kachektischen Patienten auf [50]. Dies legt nahe, dass die Anorexie auch durch den Tumormetabolismus ausgelöst werden kann.

Neben der mechanischen Beeinträchtigung bei Tumoren des Gastrointestinaltrakts und den mit einer Tumorerkrankung verbundenen psychischen Belastungen, die eine Anorexie hervorrufen können, klagen Krebspatienten häufig über eine Beeinträchtigung des Geschmacks- und Geruchssinns. Zytokine wie Interleukin 1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-6 und *tumor necrosis factor- $\alpha$*  (TNF- $\alpha$ ) haben einen appetitbeeinflussenden Effekt [51]. Rezeptoren für TNF- $\alpha$  und IL-1 befinden sich in den Regionen des Hypothalamus, die die Nahrungsaufnahme regulieren.

Es wird angenommen, dass Anorexie bei Tumorerkrankungen mit einem Ungleichgewicht zwischen orexigenen Transmittern wie Neuropeptid Y (NPY) und anorexigenen Substanzen wie Proopiomelanocortin (POMC) in Zusammenhang steht [52]. NPY stammt aus den endokrinen Zellen des Dün- und Dickdarms und senkt den Ruhe-Energie-Umsatz, wogegen POMC über die Stimulation der Sympathikus-Aktivität den Ruhe-Energie-Umsatz anhebt. Tumorstudien an Ratten haben gezeigt, dass die Freisetzung von NPY deutlich reduziert war [53]. Vermutlich wird die NPY-Freisetzung und der NPY-Transport durch den Tumor inhibiert [54]. Bei anorektischen Tumorpatienten waren die NPY-Spiegel gegenüber den Kontrollpersonen niedriger und korrelierten mit dem Ausmaß der Anorexie [55]. Auch Leptin spielt eine Rolle beim Stoffwechsel des im Körper eingelagerten Fettes. Es hemmt die Nahrungsaufnahme und steigert den Energieumsatz über einen Feedbackmechanismus im Hypothalamus. Die Leptinkonzentration im Serum hängt vom Fettanteil des Körpers ab. Sinkt der Körperfettanteil (z.B. bei Kachexie), dann sinkt auch die Leptinkonzentration.

POMC kann in  $\alpha$ -MSH (Melanozytenstimulierendes Hormon) umgewandelt werden, welches die Nahrungsaufnahme hemmt [56]. Durch die Aktivierung zweier distinkter Melanocortin-Rezeptoren im Hypothalamus und anderen Regionen des Gehirns, Mc3r und Mc4r, kann so Anorexie induziert werden. Die Gabe von synthetischen Mc3r- und Mc4r-Antagonisten an Ratten mit Prostatakarzinom erhöhten die Futteraufnahme und das Körpergewicht der Tiere [57].

MIC-1 (*macrophage inhibitory cytokine-1*) aus der Gruppe von TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) wurde auch in Zusammenhang mit Anorexie und Gewichtsverlust bei Krebspatienten beschrieben. Bei Patienten mit Prostatakarzinom wurde eine direkte Korrelation zwischen MIC-1-Konzentration und Verlust von Körpergewicht nachgewiesen [58].

*Melanin concentrating hormone* (MCH) ist leptinsensitiv und stimuliert als orexigenes Neuropeptid die Nahrungsaufnahme. Es bindet an die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren MCH1R und MCH2R im Gehirn. Mittels Immunhistochemie konnte post mortem am Gehirn von kachektischen Patienten eine erhöhte Expression von MCH1R gegenüber einer Kontrollgruppe festgestellt werden [59].

#### *Thermogenese – Umwandlung weißen Fettgewebes in braunes Fettgewebe*

Zahlreiche Studien berichten bei tumortragenden Tieren von einer lipolytischen Aktivierung des braunen Fettgewebes in Folge von Tumorkachexie. Das braune Fettgewebe besitzt eine Schlüsselrolle in der Thermogenese und Energiebalance von Nagetieren. Im Jahr 2009 wurde gezeigt, dass bei Erwachsenen im oberen Rückenbereich und entlang der Wirbelsäule braunes Fettgewebe vorhanden ist, so dass auch von einer physiologischen Funktion ausgegangen wird [60]. Bei humanen Tumorpatienten gibt es bislang jedoch keine Informationen zur Aufgabe des braunen Fettgewebes bei Kachexie [61].

Die massive Lipolyse, eingeschränkte Lipogenese und beeinträchtigte Aufnahme von Fettsäuren im Zuge einer Tumorkachexie führen zu einer geringeren Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL) und damit zu einem Abbau des Fettgewebes. Dem gegenüber steht die vermutete Funktionsübernahme von molekularen Mechanismen des braunen Fettgewebes durch Adipozyten des weißen Fettgewebes. Bei dieser Konversion, dem „Browning“ der Adipozyten, spielt die Bildung von *uncoupling protein 1* (UCP1) eine Rolle. Der Vorgang des „Brownings“ ist abhängig von Entzündungsmediatoren wie IL-6 und tumorassoziierten Substanzen wie dem *parathyroid-hormone-related protein* (PTHrP) [60].

## *Malabsorption*

Tumorkachexie verursacht eine Dysfunktion der Darmbarriere, so dass davon ausgegangen wird, dass die Mikrobiota des Darmes beim Krankheitsgeschehen eine Rolle spielt. Bei Leukämieversuchen im Mausmodell wurden sinkende Konzentrationen von Bakterien mit immunmodulierenden Eigenschaften (*Lactobacillus* spp.) nachgewiesen [62].

Es wird ein Zusammenspiel zwischen der Darmmikrobiota und der Skelettmuskulatur vermutet. Die Darmbakterien bilden Metaboliten, die wiederum in den Muskelzellen den Energieumsatz beeinflussen [63, 64].

Der Verdauungstrakt steht auch über das Peptid Ghrelin im Zusammenhang mit dem Verlust von Skelettmuskulatur. Ghrelin wird hauptsächlich im Magen gebildet und wirkt appetitssteigernd. Bei Magen- [65], Lungen- [66] und neuroendokrinen [67] Tumoren wurden erhöhte Konzentrationen von Ghrelin gemessen. Dies wird jedoch nicht als gegenregulatorischer Mechanismus zur Anorexie angesehen, sondern stellt offenbar eine sogenannte Ghrelin-Resistenz, wie sie bei Tumorpatienten auftritt, dar [61]. Neben seinen orexigenen Eigenschaften hat Ghrelin auch einen direkten Effekt auf die Muskelzellen, indem es die durch katabole Zytokine initiierte Proteindegradation hemmt [68, 69]. Anscheinend ist Ghrelin auch in der Lage, eine durch das Krebstherapeutikum Doxorubicin induzierte Apoptose in Skelettmuskelzellen zu inhibieren [70].

## *Veränderungen im Leberstoffwechsel – Akute-Phase-Reaktion (APR)*

Die Leber spielt mit der Produktion von Akute-Phase-Proteinen eine zentrale Rolle bei der Ausbildung einer Tumorkachexie. Die Akute-Phase-Reaktion ist bei kachektischen Patienten verstärkt und die Glukoneogenese hochreguliert. Erhöhte Serum-IL-6-Werte korrelieren dabei mit dem C-reaktiven Protein (CRP) als Marker für systemische Entzündungen [43]. CRP wird daher als Marker für die Hauptmediatoren der APR, IL-6, IL-1 und TNF- $\alpha$  angesehen. Falconer et al. konnten belegen, dass Patienten, in denen sich anhand des CRP eine APR nachweisen ließ, eine geringere Überlebenszeit hatten, als Patienten ohne APR [42]. Bei vielen humanen Tumorarten wird deshalb dem CRP eine hohe prognostische Aussagekraft zugesprochen [71, 72]. Auch über die Zytokine IL-1, IL-6 und IL-10 lassen sich bei Pankreaskarzinom-Patienten höhere Werte messen als bei gesunden Kontrollen und somit eine verstärkte APR nachweisen. Diese erhöhten Zytokinwerte gehen mit einem Gewichtsverlust der betreffenden Patienten einher, was

nahelegt, dass Zytokine eine wesentliche Beteiligung an der Ausbildung der Kachexie spielen [73]. Im Zuge der APR kommt es zu einer Verschiebung der muskulären Aminosäuren zur Leber hin. Dies dient einerseits der verstärkt ablaufenden Glukoneogenese, andererseits der Synthese von Akute-Phase-Proteinen [61].

Ein weiterer klinischer Marker für eine verstärkt ablaufende APR stellt die Hypalbuminämie dar [74]. Bei Tumorpatienten mit systemischer Entzündung ist die Synthese von Akute-Phase-Proteinen wie CRP und Fibrinogen erhöht [75], während die Albuminsyntheserate unbeeinflusst ist [76]. Dennoch stellt sich eine Hypalbuminämie ein. Diese wird auf eine erhöhte transkapillare Gefäßpermeabilität und einen damit verbundenen Albuminverlust zurückgeführt.

Tierexperimentelle Studien zeigten, dass die Ausschaltung eines spezifischen transkriptionellen Kofaktors in den Hepatozyten, RIP 140 (*receptor-interacting protein*) die Entstehung einer hepatischen Steatose als Folge einer Tumorkachexie verhindert [77]. RIP 140 kontrolliert außerdem die Expression von Entzündungsmediatoren in Makrophagen und könnte demzufolge eine funktionelle Schaltstelle zwischen Entzündungs- (*via Makrophagen*) und Stoffwechsel- (*via Hepatozyten*)prozessen in der Leber bei Kachexie darstellen [78]. Die Aktivität von Makrophagen in der Leber ist bei Tumorkachexie erhöht [79]. Bei mehreren Tumorkachexiemodellen wurde eine erhöhte Aktivität von RIP 140 festgestellt [77].

#### *Veränderungen im Fettstoffwechsel – weißes Fettgewebe*

Das weiße Fettgewebe besteht im Wesentlichen aus Adipozyten als Hauptenergiespeicher des Körpers. Daneben lassen sich undifferenzierte Fettvorläuferzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen finden [80]. Der enorme Verlust dieses Gewebes während einer Tumorkachexie bildet die Basis für den dabei auftretenden energiedefizienten Stoffwechsel.

Physiologisch findet ein Gleichgewicht zwischen Lipogenese und Lipolyse statt. Fettsäuren werden im Fettgewebe als Triacylglycerin (TAG) gespeichert. Das Enzym Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert Fettsäuren aus Lipoproteinen im Plasma. Diese werden dann zur Synthese von TAG in die Adipozyten transportiert. Die Lipolyse wird durch Hormone wie Epinephrin, Glucagon und Adrenocortikotrophes Hormon (ACTH) in einem cAMP-abhängigen Mechanismus gesteuert. Die Produktion von cAMP wird stimuliert durch das Enzym Adenylatcyclase (AC), das ATP in cAMP umbaut [81]. cAMP aktiviert eine

Proteinkinase (PKA), die wiederum die hormonsensitive Lipase (HSL) aktiviert. HSL steuert den Umbau von TAG in nichtveresterte Fettsäuren (NEFA), und Glycerol. Ein weiteres Enzym, die Adipozyten-Triglycerid-Lipase (ATGL), die vor allem TAG aus langkettigen Fettsäuren hydrolysiert, scheint zumindest in Nagetieren eine Rolle im Katabolismus von TAG zu spielen. Beim Menschen ist die ATGL weniger von Bedeutung für die Lipolyse [82]. PKA phosphoryliert auch Perilipin (PLIN), welches die intrazellulären Lipidtropfen umhüllt. Die Phosphorylierung bewirkt, dass HSL für die TAG-Hydrolyse die Lipidoberfläche überwinden kann [83]. Ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor aktiviert eine Unterform der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen, die extrazellulär signal-regulierte Kinase (ERK). Eine aktivierte ERK erhöht die Lipolyse und phosphoryliert HSL an einem Serinrest, wodurch deren Aktivität ansteigt [84].

Die Adipozytendifferenzierung wird durch eine Reihe von Transkriptionsfaktoren gesteuert [85]. Dieser Mechanismus beginnt mit einer Aktivierung des CCAAT/Enhancer-Binding-Proteins (C/EBP). Dieses Protein kontrolliert zusammen mit PPAR $\gamma$  die terminale Differenzierung. Die Bildung von PPAR $\gamma$  wird verstärkt durch das sterol regulatory element-binding protein-1c (SREBP-1c), welches die Transkription von PPAR $\gamma$  aktiviert [86]. Ein Mangel an C/EBP führt zu einem geringeren Körperfettanteil in Mäusen, wobei die Adipozyten weniger TAG speichern und ein insulin-stimulierter Glukosetransport nicht vorhanden ist.

Bei Tumorkachexie verläuft der Verlust von Körperfett viel schneller als der Verlust von Muskelmasse [87]. Der Körperfettverlust resultiert einerseits aus einer verringerten Nahrungsaufnahme der Krebspatienten, andererseits aus tumoreigenen Faktoren und Zytokinen, welche entweder die Lipogenese hemmen oder die Lipolyse steigern. In-vitro-Versuche zeigten, dass inflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  die Liponeogenese hemmen, indem sie die Synthese von essentiellen Transkriptionsfaktoren für die Adipozytendifferenzierung unterdrücken [88]. Klinische Studien messen der Lipolyse größere Bedeutung beim Fettverlust im Zuge einer Kachexie bei [89, 90]. Die Atrophie des Fettgewebes liegt dabei in der Mobilisierung von Lipiden, die 95% des Adipozytenvolumens ausmachen. Dabei werden Triglyceride zu freien Fettsäuren (*free fatty acids*, FFA) und Glycerol hydrolysiert und dann in die Blutzirkulation entlassen. Die begrenzenden Enzyme, die diese Reaktion katalysieren, sind die HSL (*hormone sensitive lipase*) und die ATGL (*adipose tissue triglyceride lipase*) [91]. Sowohl die HSL-Aktivität als auch die Plasmakonzentration an FFA und Glycerol steigen beachtlich bei Tumorkachexiepatienten an [90]. Die HSL-Aktivierung erfolgt über einen durch prolipolytische Faktoren gesteuerten Signalweg.

Tumorkachexie ist außerdem assoziiert mit einer Insulinresistenz, wodurch der antilipolytische Effekt von Insulin auf die Adipozyten wirkungslos bleibt. Dagegen steigt die Sensitivität gegenüber Katecholaminen und dem atrialen natriuretischen Peptid (ANP), welche die Lipolyse steigern [92]. Daneben ist bei Tumorkachexie die Aktivität der LPL, welche die Spaltung von TAG in Glycerol und Fettsäuren im weißen Fettgewebe verringert. Die Lipidaufnahme ist massiv gehemmt. Außerdem ist die Liponeogenese im Fettgewebe von tumortragenden Mäusen und Menschen reduziert. Dies geschieht im Zuge einer verminderten Esterifizierung, weil die Verfügbarkeit von Fettsäuren für die TAG-Synthese gesenkt ist. Damit verbunden ist auch eine verminderte TAG-Einlagerung [92].

Obwohl Zellkulturversuche und Tiermodelle die Rolle von Zytokinen und dem lipid-mobilizing factor (ZAG) beim Fettverlust unterstützen [93-95], war die Lipolyse bei Patienten mit gastrointestinalen Tumoren (bei niedrigem Serumalbumin und schlechtem Ernährungszustand) nicht zwangsläufig mit Zytokinen oder einem Anstieg von Immunzellinfiltraten assoziiert [96].

Samuel et al. entwickelten die Hypothese, dass die intrazelluläre Akkumulation von Diacylglycerol die Aktivierung der novel Proteinkinase C mit nachfolgender Beeinträchtigung des Insulin-Signalwegs bewirkt [97]. Eine Studie mit tumortragenden Mäusen (IL-6-produzierender Colon-26-Tumor) zeigte, dass das genetische Ausschalten der ATGL den Anstieg der Lipolyse verhindert und damit die Netto-Mobilisierung von Fettgewebe in Bezug zum Tumorwachstum [98]. Die Skelettmuskulatur blieb dabei unerwarteter Weise erhalten und die Aktivierung von Proteasomdegradation und Apoptose-Signalwegen im Muskel trat nicht auf. Diese Studie zeigte, dass offenbar eine wichtige physiologische Interaktion zwischen Fettgewebe und Skelettmuskulatur im Zusammenhang mit einer Tumorkachexie existiert [99]. Als Mediatoren für diesen Crosstalk kommen Myokine, Adipokine oder FFA infrage. Im Rahmen einer weiteren Studie wurde eine progressive Akkumulation von intramyozellulären Lipidtröpfchen (*Musculus rectus abdominis*) bei Patienten mit zunehmender Kachexie gefunden [100].

#### *Veränderungen im Proteinstoffwechsel – Skelettmuskulatur*

In der Skelettmuskulatur kommt es im Rahmen einer (Tumor)kachexie zum Verlust von myofibrillären Proteinen in den Muskelzellen [101]. Dies resultiert dann in Muskelschwäche und schneller Muskelermüdung. Der Verlust von Skelettmuskulatur hat eine hohe prognostische Bedeutung, unabhängig vom tatsächlichen Verlust an Körpergewicht [102]. Im Skelettmuskel werden unter Kachexiebedingungen Veränderungen im Protein-

(Synthese und Abbau) als auch im Aminosäuren-(Transport und Oxidation)stoffwechsel beobachtet. Weiterhin kommt es dabei zu einer höheren Apoptoserate und einer beeinträchtigten Regenerationsfähigkeit. All diese Einflüsse führen zu einer negativen Stickstoffbilanz im Skelettmuskel, wie sie bei Tumorpatienten festgestellt wurde. Zusätzlich zum eigentlichen Tumor verstärken sich die Stoffwechseländerungen durch die Tumortherapie, vor allem im Fall von Chemotherapie [103]. Der Signalweg für die Proteindegradation im Skelettmuskel stellt der ubiquitinabhängige Proteasom-Signalweg dar [104]. Auch unabhängig vom Proteasom-Signalweg gibt es Mechanismen, die eine Proteindegradation herbeiführen. Dazu gehört die calpain-abhängige Trennung von Myofilamenten und Proteinen, welche die Myofilamente an der Z-Scheibe verankern [105, 106]. Ein weiterer Mechanismus, der zur Proteindegradation führt, ist die Autophagie [107].

In den Prozess der Skelettmuskeldegradation ist eine Vielzahl von intrazellulären Signalen und Substanzen involviert [108]. Inflammatorische Zytokine, welche sowohl vom Tumor als auch von Immunzellen des Körpers sezerniert werden, induzieren Signalwege, die Enzymaktivitäten für den Skelettmuskelproteinumsatz erhöhen. Proinflammatorische und prokachektische Zytokine, wie TNF $\alpha$  und IL-1, sind dabei in zwei etablierte Signalwege eingebunden: den NF $\kappa$ B Signalweg und den p38MAPK-Signalweg. Diese Mediatoren induzieren die Expression von E3-Ligasen – das Muscle RING finger containing Protein 1 (MURF1 bzw. TRIM63) und das Muscle atrophy F-box Protein (MAFBX bzw. Atrogin1 oder FBXO32) – welche die Muskelproteinstruktur auflösen und die Proteinneusynthese hemmen [109]. MURF1 erleichtert die Ubiquitinierung der dicken Myosinfilamente des Sarkomers [110]. NF $\kappa$ B-Hemmung führte in einer tierexperimentellen Studie zu einer signifikanten Verminderung des tumorinduzierten Muskelverlusts. Dabei wird die Hochregulierung von MURF1 gehemmt [111, 112]. Neben den proteolytischen Mechanismen scheint auch eine verminderte Regenerationsfähigkeit von myogenen Zellen bei einer Krebserkrankung von Bedeutung zu sein. Hierbei spielt das Protein Paired box 7 (PAX7) eine Rolle, ein Protein, welches in den Prozess der Muskelregeneration und abnehmenden Regenerationskapazität involviert ist [113].

Im Gegensatz zu den Signalwegen, die zu einer Muskelatrophie führen, stehen die Mechanismen, die mit einer Muskelhypertrophie verbunden sind. Insbesondere der Insulin-like growth factor 1 (IGF1) induziert die Hypertrophie. IGF1 aktiviert den Insulin receptor substrate 1-(IRS1)-PI3K-AKT-Signalweg. AKT induziert die Proteinsynthese, indem es die Hemmung von mTOR (*mechanistic Target of Rapamycin*) blockiert [114]. Der Mediator mTOR unterstützt den Erhalt der Muskelmasse durch zwei distinkte Komplexe, TORC1 und TORC2 (*Target of Rapamycin complex*) [115, 116]. TORC1 benötigt für die

Muskelproteinsynthese ein Adapterprotein, das Raptor (*regulatory-associated protein of TOR*). TORC2 kontrolliert die Autophagie, die eine Rolle beim Muskelerhalt spielt [117, 118]. Durch die Verwendung von Rapamycin zur Blockade von AKT wird durch fehlende Aktivierung von TORC1 die kompensatorische Hypertrophie gehemmt [119]. Bei Atrophie kommt es neben der ubiquitin-vermittelten Proteolyse zu einer Induzierung der Autophagie. Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade des UPS durch den Proteasom-Inhibitor Velcade zu einem Muskelerhalt führt [120], während die Blockade von Autophagie keinen Muskelerhalt bewirkt [117]. Neben der Aktivierung von TORC1 kommt es durch AKT auch zu einer Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren aus der FoxO-(Forkhead) Familie. Insbesondere Foxo1 und Foxo3 spielen eine Schlüsselrolle bei der Hochregulierung von MuRF1 und MAFbx [121, 122].

### *Kardiale Dysfunktion*

Herzveränderungen treten bei humanen Tumorpatienten als auch bei Tumorstudien mit Labornagern sehr häufig auf [123]. Bei tumortragenden Ratten kam es zu einer Verringerung des Herzgewichtes, begleitet von funktionellen Herzveränderungen, wie sie in ähnlicher Weise auch bei kongestiver Herzinsuffizienz gefunden wurden [124]. Eine Studie am Colon-26-Modell der Maus beschreibt kardiale Veränderungen wie Fibrose, zerstörte myokardiale Ultrastruktur und eine veränderte Zusammensetzung der kontraktilen Proteine wie Troponin 1 und der schweren Aminosäurekette des Myosin [125]. Eine Atrophie des Herzmuskels scheint bei experimenteller Tumorkachexie mit einer Wachstumshemmung durch eine ACTRIIB-vermittelte Stimulation von Liganden der TGF $\beta$ -Familie, wie Myostatin, Activin und Growth Differentiation Factor 11 (GDF11), assoziiert sein. Eine pharmakologische Blockierung des Rezeptors ACTRIIB kann eine tumorinduzierte Kachexie des Herzens verhindern [126]. Neben der kardialen Atrophie berichten Drott und Lundholm von einem Anstieg des Sauerstoffverbrauchs im Herzen [127]. Daneben werden ultrastrukturelle Veränderungen wie sinkendes myofibrilläres Volumen, steigendes sarkoplasmatisches Volumen und steigendes Volumen der Lipidtröpfchen, ähnlich wie während einer Herzinsuffizienz, beobachtet [128]. Der höhere Sauerstoffverbrauch ist mit einem steigenden Energieverbrauch verbunden, was eine energetische Ineffizienz beschleunigt. Die Herzfrequenz ist offensichtlich deshalb bei Krebspatienten erhöht [129]. Die Herzfrequenz gilt auch als Indikator für die Wahrscheinlichkeit, an dem Tumor zu sterben. Jedoch sind die Zusammenhänge zwischen Herzfrequenz und Tumormortalität noch unklar. Der Anstieg der Herzfrequenz kann auch auf den chronischen Stress und Angstzustände zurückzuführen sein, welche natürlicherweise bei Tumorerkrankungen vorkommen.

## 2.4 Therapie

### 2.4.1 Therapieansätze

Die Erkenntnisse über die Pathomechanismen der Tumorkachexie sind in den letzten Jahren stark angewachsen. Dies ermöglicht die Entwicklung von kausalen therapeutischen Lösungen. Die hauptsächlichen Ziele einer Kachexietherapie sind die Verhinderung der Gewichtsreduktion, die Erhaltung des Ruheenergieumsatzes, die Verhinderung des Erschöpfungssyndroms (Fatigue-Syndrom, *Cancer-Fatigue*) und Anorexie, der Erhalt der Lebensqualität, der Erhaltung der physischen Leistungsfähigkeit und die Reduktion der (pro-)inflammatorischen Einflüsse [23].

Trotz des Erkenntnisgewinns über die Entstehung von Tumorkachexie sind die therapeutischen Möglichkeiten begrenzt. Die nichtpharmakologischen Behandlungsansätze umfassen im Wesentlichen die Optionen Training und Ernährung mit hochenergetischer Nahrung [130]. Training ist gegenwärtig die einzige validierte Therapieoption bei Tumorkachexie – es kommt zu einer nachweislichen Hemmung der Muskelatrophie [131-133]. Jedoch ist Training nicht möglich bei bettlägerigen Patienten, älteren Patienten oder Patienten mit Sarkopenie. Pharmakologisch werden Therapieansätze im Einsatz von NSAIDs (nicht steroidale Antiphlogistika), Appetitstimulationen, Ghrelinanaloga, IGF-1-Analoga, Omega-3-Fettsäuren, Insulin,  $\beta$ -Blockern, ACE-(Angiotensin Converting Enzyme)Hemmern,  $\beta$ 2-Agonisten (Formoterol), Inhibitoren des Myostatin- und Activin-A-Signalwegs, Cannabinoiden, SARMs (Selektive Androgenrezeptor-Modulatoren) und Testosteron gesehen [134].

#### 2.4.1.1 Nichtsteroidale Entzündungshemmer

Zum therapeutischen Einfluss von NSAIDs auf Tumorkachexie existieren bislang nur wenige klinische Studien [135-138]. Diese Studien zeigen eine Verbesserung der Lebensqualität, Gewichtszunahme und eine höhere Überlebensrate. Nebenwirkungen der NSAIDs wurden in den aufgeführten Studien nicht beobachtet.

Aspirin (Wirkstoff: Acetylsalicylsäure) und verwandte NSAIDs wie z.B. Ibuprofen sind nicht-selektive Inhibitoren des Cyclooxygenase-(COX)Signalwegs. Sie blockieren die Bildung von Prostaglandinen, die über den COX-2-Signalweg die Entzündungs- und Schmerzreaktion hervorrufen. Die erwähnten NSAIDs verhindern weiterhin die Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) in den Blutplättchen und damit die Plättchenaggregation. NSAIDs

können zu einer Erhöhung des Risikos von gastrointestinalen Blutungen führen, indem sie den COX-1-Signalweg hemmen, über welchen schleimhautprotektive Prostaglandine gebildet werden. Da die Entzündungsreaktion als wesentlicher Faktor für die Ausbildung einer Kachexie bei Tumorpatienten angesehen wird, bildet die antiinflammatorische Therapie einen wesentlichen Ansatz für klinische Versuche. Dabei liegt der Fokus auf der Hemmung des COX-2-Signalwegs, da COX-2 bei einer Krebserkrankung sehr oft hochreguliert ist und mit der Karzinogenese, Tumorwachstum und Metastasierung in Verbindung gebracht wird [139]. Als COX-2-selektiver Wirkstoff kommt dafür beispielsweise Celecoxib in Frage.

Aspirin scheint in geringer Dosis die Tumorinzidenz, die krebsbedingte Todesrate sowie die Metastasierung zu reduzieren, wie zwei großangelegte Studien belegen [140, 141].

Solheim et al. [142] verglichen in einer Meta-Analyse den Einsatz von NSAIDs in 13 Veröffentlichungen. Sämtliche Studien berichten von einem signifikanten Effekt der NSAIDs auf die Tumorkachexie. Jedoch muss dabei erwähnt werden, dass einige Studien ohne Vergleichsgruppe und/oder mit nur einer geringen Patientenzahl durchgeführt wurden.

In Tierexperimenten zeigte die Gabe von NSAIDs einen signifikanten Effekt auf das Tumorwachstum [143-145].

Einer Studie zufolge steigert der Einsatz des COX-2-Hemmers Rofecoxib, unterstützend zur Chemotherapie, signifikant höhere Lebensqualität, weniger Erschöpfungserscheinungen und weniger Gewichtsverlust im Gegensatz zu alleiniger Chemotherapie [146].

Bisher wurden drei verschiedene NSAIDs in humanen Kachexiepatienten getestet: Indomethacin, Celecoxib und Ibuprofen. Indomethacin ist in vielen Ländern aufgrund von erheblichen Nebenwirkungen nicht mehr auf dem Markt. Celecoxib ist das am besten dokumentierte NSAID. Es scheint jedoch Nebenwirkungen auf das kardiovaskuläre System, wie Atherosklerose am Herzen, zu verursachen [147]. Ibuprofen wird als das sicherste NSAID angesehen, hat in höheren Dosierungen jedoch auch negative Auswirkungen auf das Herz [148]. Nachteilig ist darüber hinaus das erhöhte Risiko von Blutungen im Gastrointestinaltrakt.

#### 2.4.1.2 Appetitstimulantien/Ghrelin/GH/IGF-1

##### *Appetitstimulantien*

Tumorkachexie ist eng assoziiert mit Anorexie, weswegen die ersten Therapieversuche in der Anwendung von Appetitstimulantien und der Energie- und Nährstoffsupplementierung bestanden. Weit verbreitet ist die Behandlung mit Megestrolacetat (Megace), ein synthetisches Progestin, welches eine Appetitstimulation über NPY (Neuropeptid Y) im ventromedialen Hypothalamus bewirkt [149] bzw. zu einer Downregulation der Bildung und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führt [150]. Die Anwendung von Megestrolacetat zeigt eine statistisch signifikante Verbesserung hinsichtlich Körpergewicht und Appetitempfinden. Jedoch beruht der Gewichts zugewinn in einer Zunahme der Fettmasse und nicht in Muskelmasse [151]. Ähnliche Ergebnisse wurden mit Medroxyprogesteronacetat (MPA), einem weiteren Progestin, erzielt [152]. Eine Studie, in welcher die Behandlung von Tumorkachexie mit Insulin erfolgte, zeigte ebenso einen Anstieg der Körperfettmasse, ohne Auswirkung auf das fettfreie Gewebe [153]. Dieser Studie zufolge hatte Insulin keinen Effekt auf das Gesamtkörpergewicht oder eine potentiell höhere Nahrungsaufnahme, jedoch wurden eine höhere Überlebensrate und kein wachstumsstimulierender Effekt auf den Tumor beobachtet.

Trotz der häufigen Anwendung von Megestrolacetat kommt es bei den Patienten zum Auftreten von Thrombembolien, vermehrter Ödembildung, einem verringerten Ansprechen auf Chemotherapie und einer reduzierter Überlebenszeit [154].

Appetitstimulantien führen nicht zwingend zu einem Gewichtsanstieg. Cyproheptadin, ein Histamin-Antagonist mit antiserotonergen und appetitstimulierenden Effekten, führt nur zu einer geringen Verbesserung des Appetitempfindens und bietet keinen Schutz vor Gewichtsverlust bei anorektischen Patienten [155]. Von Marihuana ist bekannt, dass es bei den Anwendern den Appetit stimuliert und zu einer Gewichtszunahme führt. Die Gabe von Dronabinol, dem aktiven Bestandteil von Marihuana in einer klinischen Studie, verhinderte nicht den progressiven Gewichtsverlust von Tumorkachexiepatienten [156].

##### *Ghrelin*

Das gastrointestinale Peptidhormon Ghrelin wurde im Jahr 1999 als endogener Ligand des *growth hormone secretagogue receptor* (GHSR) $1\alpha$  entdeckt [157]. Die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zu einer Freisetzung des growth hormon aus der

Hypophyse [158]. Ghrelin reguliert die Nahrungsaufnahme, das Körpergewicht, Adipositas und den Glukosestoffwechsel [159]. Zahlreiche zentrale und periphere Funktionen wurden beschrieben, wie z.B. Stimulierung der Darmmotilität und das Magensäuresekretion, die Modulation von Schlaf, Geschmacksempfinden, Unterdrückung der Thermogenese im braunen Fettgewebe, Modulation von Stress und Angst, Schutz vor Muskelatrophie und Verbesserung der kardiovaskulären Funktionen wie Vasodilatation und Herzkontraktibilität [157].

Ghrelin wird in den Belegzellen des Magenfundus produziert [158]. Seine Blutspiegel steigen mit zunehmendem Hungerempfinden. Der Ghrelinrezeptor befindet sich in den hypothalamischen Neuronen, die die Nahrungsaufnahme und das Sättigungsgefühl regulieren [157]. Es tritt in acylierter und deacylierter Form auf.

Am Skelettmuskel führt Ghrelin zu einer Downregulierung von TNF $\alpha$ -mRNA-Expression ohne signifikante Effekte auf die IGF-1-mRNA im *Musculus gastrocnemius* im Rahmen einer Studie am Modell der verbrennungsinduzierten Schädigung. Das Ghrelin-Präkursor-Peptid Desacyl-Ghrelin (DAG) hat einen regulatorischen Einfluss auf die TNF $\alpha$ - und IFN-induzierte Skelettmuskelatrophie [68, 69]. Bei einer im Lungenkarzinom-Modell induzierten Kachexie bewirkte die Behandlung mit Ghrelin eine Unterdrückung der Entzündung durch Verhinderung der Freisetzung von TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und CRP. Zusätzlich kam es im Skelettmuskel zu einer verringerten Expression der phosphorylierten-p38 mitogen-aktivierten Proteinkinase (p-p38MAPK), NF $\kappa$ B, FoxO1, MuRF1 und Atrogin in tumortragenden Mäusen [160]. Ähnlich wie im Tumorkachexiemodell hat Ghrelin positive Effekte auf den Skelettmuskelmasseverlust beim Syndrom der chronischen Nierenerkrankung (CKD, *chronic kidney disease*). Eine klinische Studie an kachektischen Patienten mit COPD und CHF (*chronic heart failure*, chronische Herzinsuffizienz), die eine dreiwöchige Ghrelingabe beinhaltete, zeigte einen Anstieg an Muskelmasse und Muskelstärke [161, 162]. In einer Untersuchung am Muskelschwund-Modell führte die Ghrelinverabreichung zu einem ansteigenden GH-Plasmaspiegel und einer verstärkten Phosphorylierung von STAT5, einem Transkriptionsfaktor, welcher eine steigende IGF-1-mRNA-Expression im *Musculus plantaris* bewirkte. Ghrelin verringert die Muskelatrophie über den GH-STAT5-IGF-1-Signalweg [163].

In einer Studie wurde die Gabe zweier Ghrelin-Analoga (BIM-28131 und BIM-28125) sowie von Ghrelin im Rattenmodell der Herzinsuffizienz auf das Körpergewicht untersucht. Sowohl Ghrelin als auch beide Analoga führten zu einer Gewichtszunahme im Vergleich

zur Placebogruppe [164]. Einer weiteren Studie zufolge waren die Effekte vom BIM-28131 unabhängig vom Applikationsverfahren (subkutan-Injektion vs. osmotische Pumpe) [165].

Anamorelin HCl (ANAM), ein Ghrelin-Rezeptor-Agonist, hat ebenso einen positiven Effekt auf anorektisch-kachektische Tumorpatienten. ANAM ist oral aktiv und führt zu steigenden Plasmaspiegeln von GH, IGF-1 und IGFBP-3 (*insulin-like growth factor-binding protein 3*), was wiederum einem höheren Körpergewicht und gesteigerten Appetit nach sich zieht [166-168]. Anamorelin HCl hat eine höhere Halbwertszeit von 7-12 Stunden im Vergleich zum Ghrelin mit 30 Minuten.

#### *GH/IGF-1/Insulin*

GH, IGF-1 und Insulin wirken anabol auf die Skelettmuskulatur und führen zu einem Zuwachs an Muskelmasse. GH reguliert primär die Expression von IGF-1 in der Leber. IGF-1 und GH induzieren am Skelettsystem das Knochenwachstum. Insulin und GH sind in den Fettstoffwechsel involviert. GH induziert die Lipolyse und Insulin fördert die Synthese von Fettsäuren in der Leber und hemmt deren Abbau im Fettgewebe. Durch ihr Wirken im Skelettmuskel, im Knochen sowie im Fettgewebe verändern GH, IGF-1 und Insulin über eigenständige und überlappende Signalwege die Körperzusammensetzung.

IGF-1 ist ein Polypeptid von 7,5kDa und strukturell mit Insulin verwandt. Neben der Sekretion in der Leber wird es auch als autokriner Faktor von den Muskelfasern freigesetzt. Es stimuliert die Proteinsynthese, Myoblastendifferenzierung und Muskelhypertrophie, und es hemmt die Proteindegradation. Aufgrund seines schnellen Abbaus eignet sich IGF-1 nicht als Therapeutikum. Ein modifiziertes Analogon, „Long arginin“ IGF-1, zirkuliert länger im Körper, bindet häufiger und effizienter als das endogene IGF-1. Es ermöglicht außerdem das Wachstum von Nervenenden und Myoblastenproliferation und hat somit ein höheres therapeutisches Potenzial [169].

#### *2.4.1.3 Beta-Blocker*

Zu den therapeutischen Ansätzen, insbesondere bei kardialer Kachexie, zählt die Behandlung mit Beta-Blockern. Die Beta-Blocker Metoprolol, Bisoprolol und Carvedilol werden schon seit Jahren zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz (CHF) eingesetzt [170]. Die adrenergen  $\beta$ 1- und  $\beta$ 2-Rezeptoren kommen am Herzen vor,  $\beta$ 2-Rezeptoren jedoch auch in der glatten Muskulatur von Gefäßen, Bronchien und Uterus. Die Stimulation der  $\beta$ -Rezeptoren bewirkt eine erhöhte Kontraktilität am Herzen. Agonisten der  $\beta$ -

Rezeptoren sind die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin, die zur Stimulation der Hormon-sensitiven Lipase führen. Dieses Enzym steigert die Lipolyse und damit den Fettabbau. Der Einsatz von Beta-Blockern soll die Bindung der Katecholamine an den  $\beta$ -Rezeptor verhindern und damit auch der Lipolyse entgegenwirken.

Der Einsatz von Carvedilol bei CHF-Patienten zeigte einen signifikanten Anstieg im Körpergewicht gegenüber unbehandelten Patienten [171]. Ebenso war auch bei Therapie mit Bisoprolol ein signifikantes Ansteigen des Gewichts zu verzeichnen [172].

In einer Rattenkachexie-Studie mit der Anwendung von Bisoprolol als Monopräparat sowie in Kombination mit IGF-1 konnte gezeigt werden, dass die Bisoprolol-Monotherapie einen stärkeren antikachektischen Effekt hervorruft als die Kombinationstherapie. Auch die Überlebensrate war bei der mit ausschließlich Bisoprolol behandelten Gruppe deutlich verbessert [173].

#### 2.4.1.4 SARMs/Testosteron/Anabole Steroide

Das Steroid Testosteron bindet an Rezeptoren im Skelettmuskel und steigert die Proteinsynthese sowie die Muskelmasse [174]. Der Wirkung von Testosteron wurde jedoch experimentell bisher kaum untersucht, was möglicherweise an seinem geringen anabolischen Effekt auf die Muskelmasse von Labornagern liegt [175]. Trotz muskelwachstumsfördernder Wirkung von Testosteron und seiner Analoga ist die klinische Anwendung durch schwere Nebenwirkungen limitiert. Zu diesen Nebenwirkungen zählen Prostatahypertrophie, Krebs [176], Androgenisierung und Verhaltensänderungen. Aus diesem Grund wurden nichtsteroidale selective Androgenrezeptormodulatoren (*selective androgen receptor modulators*, SARMs) entwickelt, um die Nebenwirkungen zu reduzieren bzw. auszuschalten. SARMs binden mit hoher Affinität an den Androgenrezeptor und verursachen eine gewebsspezifische Aktivierung des Androgen-Signalwegs. In Zellkulturen und Labortiermodellen modulieren SARMs Myoblastenproliferation und verändern den Muskelfasertyp. In der klinischen Anwendung können anabole Androgene Kachexie reduzieren und die Wundheilung beschleunigen.

SARMs können nicht in Dihydrotestosteron oder Östrogen umgewandelt werden, was das Risiko einer Prostatahyperplasie verringert. Aus diesem Grund und wegen ihrer therapeutischen Wirkung bei tumorassoziierter Kachexie, Sarkopenie und Osteoporose werden SARMs als vielversprechend angesehen. Bisher wurden diverse SARMs in klinischen Versuchen getestet [177, 178]. Enobosarm zeigte bisher in den klinischen

Studien der Phasen I und II vielversprechende Ergebnisse bei Patienten mit krebsassoziierter Kachexie. Bei diesen Patienten stieg die fettfreie Körpermasse [179]. Eine Studie mit Trenbolon, ein Testosteronanalagon, zeigt, dass dieser Wirkstoff auch SARM-Eigenschaften bei kastrierten Ratten besitzt. Die intramuskuläre Verabreichung von Trenbolon führte nicht zu einer Prostataverkleinerung, reduzierte jedoch die Fettmasse [180].

Die Mechanismen, durch welche steroidale und nichtsteroidale SARMS gewebspezifisch anabol wirken, sind bislang jedoch noch nicht vollständig verstanden [181].

#### *2.4.1.5 Myostatinantagonisten*

Myostatin gehört zu den Zytokinen der TFG- $\beta$ -Superfamilie und reguliert das Skelettmuskelwachstum [182, 183]. Myostatin spielt eine Rolle in der Pathogenese der Muskeldystrophie und stellt damit ein wichtiges Ziel für eine therapeutische Intervention dar. Die antikörpervermittelte Neutralisation bzw. genetische Ausschaltung von Myostatin führte in Tierversuchen zu verstärktem Muskelwachstum, reduzierter Leukozyteninfiltration und verringerter Fibrose im dystrophischen Muskel [184, 185]. Myostatin und Activin A wirken über den GDF11-Signalweg. Die Hemmung dieses Signalwegs kann über mehrere Wirksubstanzen erfolgen. Dazu gehört Follistatin [183, 186], lösliche Formen von ActRIIB [126], Antikörper mit Bindungsstellen an Myostatin oder am Myostatin-Rezeptor [184, 187] sowie rekombinante Myostatin-Propeptide [188]. Myostatin wird aus einem Propeptid synthetisiert. Die Verabreichung dieses Propeptids im Tierversuch verhinderte die Bindung von Myostatin an seinen Rezeptor, bewirkte eine Zunahme von Körper- und Muskelmasse und förderte die Skelettmuskelregeneration nach schweren Muskelverletzungen [188].

Die Gabe eines ActRIIB-decoy-Rezeptors in tumorassoziierten Kachexiemodellen, einschließlich des Colon-26-Tumormodells der Maus, führte zu einer stark verlängerten Überlebenszeit der tumortragenden Tiere [126]. Diese Effekte werden mit einer Blockade der Aktivierung von FoxO-induzierter Expression der Ubiquitin-Ligase in Verbindung gebracht. Diese Behandlung stimuliert das Wachstum von Muskelstammzellen. Ebenso konnte durch eine Myostatininhibition aufgrund Behandlung mit löslichem ActRIIB im Lewis-Lungen-Karzinom-Modell der Maus eine Verbesserung im Körper- und Muskelgewicht erzielt werden [189]. Weiterhin bewirkte die Hemmung des Myostatin-Activin A-Signalwegs auch in anderen Krankheitsgeschehen wie Niereninsuffizienz [190], Herzinsuffizienz [191, 192], Adipositas [193] und Diabetes [194] einen positiven Effekt auf die Muskelmasse und Insulinresistenz. Die Hemmung von Myostatin in der Mausmuskulatur führt eher zu einer

Muskelfaserhypertrophie als zu einer Hyperplasie, möglicherweise unter Beteiligung der Proliferation von Satellitenzellen, welche die Muskelfasern begleiten [195, 196].

Bimagrumab (BYM338) und REGN1033 sind zwei humane monoklonale Antikörper gegen Myostatin. Die Behandlung mit BYM338 bewirkt die Differenzierung von primären humanen Myoblasten und erhöht das Skelettmuskelwachstum bei Mäusen durch Blockierung des ActRIIB. Die Gabe von REGN1033 schützt vor dem Verlust von Muskelmasse bei Immobilisierungs- oder Dexamethason-induzierter Muskelschwäche durch direkte Antagonisierung von Myostatin [197].

Bisher ist noch nicht geklärt, ob diese Ansätze auch bei Patienten mit erblichen Muskelerkrankungen einen positiven Effekt haben. Jedoch können die verschiedenen Behandlungen zu einer Stärkung des Regenerationspotentials der Satellitenzellen führen, was eine wichtige kompensatorische Reaktion mit Verlangsamung der Progression einer Muskeldystrophie darstellt.

Myostatin spielt nicht nur im Skelettmuskel, sondern auch im Fettgewebe eine Rolle. Myostatindefiziente Mäuse zeigen zwar einen enormen Anstieg an Muskelmasse, jedoch auch einen signifikanten Rückgang des Körperfetts und eine verminderte Adipogenese [198].

#### 2.4.1.6 $\beta$ -Adrenozeptor-Agonisten (*Formoterol, Clenbuterol*)

Die Skelettmuskulatur besitzt einen hohen Anteil an  $\beta$ 2-Adrenozeptoren ( $\beta$ 2-AR). Bei Aktivierung dieses Rezeptors kommt es durch die Stimulation der Adenylatcyclase zur Aktivierung von PKA und dem *cAMP response binding protein* (CREB) [199]. Die Phosphorylierung durch PKA bewirkt die Aktivierung von CREB und dessen Bindung an die DNA. Es kommt zur Expression der myogenen Transkriptionsfaktoren Myf5, MyoD und Pax3 [200]. Daneben unterstützt CREB die Proliferation von Satellitenzellen und die Regeneration von Skelettmuskelzellen nach Muskelverletzungen [201]. Der  $\beta$ 2-AR ist somit an der Regulation der Skelettmuskelproliferation und der -differenzierung beteiligt was ihn im Rezeptorsignalweg zu einem neuen therapeutischen Ziel zur Kontrolle von Muskelschwund macht [202, 203]. Insbesondere mit  $\beta$ -Adrenozeptoren wie Formoterol und Clenbuterol finden derzeit Untersuchungen zu deren Potential in der Regulation der Skelettmuskelatrophie statt [204].

### *Formoterol*

Formoterol ist ein  $\beta$ 2-AR mit antikachektischen Eigenschaften. Dieser Wirkstoff besitzt ein therapeutisches Potenzial durch Stimulierung von Skelettmuskelwachstum und -hypertrophie nicht allein durch eine Down-Regulierung des muskelspezifischen proteolytischen Systems (Proteasom- und Caspase-3-abhängiger Apoptose), sondern auch durch einen Proteinanabolismus. Diese protektiven Wirkungen am Skelettmuskel finden sich auch am Herzmuskel wieder [205]. Toledo et al. untersuchten die Wirkung von Formoterol im Yoshida AH-130 Aszites-Tumor-Modell der Ratte [206]. Sie beschreiben eine signifikante Verringerung des Skelettmuskelverlustes nach Verabreichung von Formoterol, jedoch ohne Einfluss der Behandlung auf das Herzgewicht. Einer Studie mit dem gleichen Tumormodell zufolge wurden bei den mit Formoterol behandelten Ratten eine höhere Körperaktivität und größere Greifstärke beobachtet, was auf den „Anti-wasting-effect“ des Wirkstoffs zurückgeführt wird [207].

Bei COPD-Patienten ist aufgrund der muskulären Dysfunktion die körperliche Aktivität begrenzt. Nach Formoteroltherapie kommt es zum Anstieg der PGC 1 $\alpha$  und des mtDNA-Gehalts im Skelettmuskel. COPD-Patienten nach Formoterolgabe zeigen eine erhöhte Belastungsfähigkeit aufgrund verbesserter Lungenfunktion [208, 209].

Bei Versuchen mit tumortragenden Ratten konnte durch die Gabe von Formoterol ein steigender Spiegel an Follistatin sowie sinkende Konzentrationen von Myostatin und ActRIIB festgestellt werden [203, 207, 210].

Formoterol kann weiterhin die mitochondriale Biogenese induzieren, um einer Dexamethason-induzierten Atrophie vorzubeugen [211, 212].

### *Clenbuterol*

Clenbuterol beeinflusst den cAMP-Spiegel und die fasteninduzierte Expression von Atrogin1 und MuRF1 durch Induzierung der Akt/FoxO3-Phosphorylierung [199]. Die Clenbuterolbehandlung bei Muskelatrophie nach künstlicher Denervierung führte zu einer Regulierung des Muskelschwundes durch Aktivierung des Proteinanabolismus und Hemmung von Cathepsin L und der Ubiquitin-Ligasen im proteolytischen System. Diese Effekte werden möglicherweise durch den cAMP/PKA-Signalweg, ohne Beteiligung von Akt, vermittelt [213].

Agonisten des  $\beta$ 2-Adrenozeptors beeinflussen Muskelschwund durch diverse Mechanismen, insbesondere Down-Regulation von Apoptose, Verringerung des Proteinkatabolismus, Up-Regulation des Proteinanabolismus und Förderung von Muskelregenerationsprozessen [204].

#### 2.4.1.7 ACE-Hemmer

Angiotensin II (Ang II) ist das primäre Effektormolekül des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Es hat vielfältige physiologische Funktionen, wie beispielsweise Regulation des Blutdrucks oder des Wasserhaushalts im Körper über Mechanismen im Zentralnervensystem, Nebennieren, Gefäßsystem und Nieren. Weiterhin spielt das RAS eine wichtige Rolle in der Pathogenese der kongestiven Herzinsuffizienz bzw. von Nieren- oder cerebrovaskulären Erkrankungen [214]. Patienten mit CHF entwickeln häufig eine Kachexie. Der Blutspiegel von Ang II ist dabei oft erhöht [215, 216]. Offenbar spielt Ang II eine bedeutende Rolle in der Ausprägung einer Kachexie [217].

Durch Brink et al. wurde zuerst gezeigt, dass eine Ang II-Infusion bei Ratten einen signifikanten Verlust von Körpergewicht durch verringerte Nahrungsaufnahme und steigende Proteolyse im Skelettmuskel verursacht [218]. Diesen Effekten konnte durch die Gabe des Angiotensin1-Rezeptor-Blockers losartan vorgebeugt werden [219].

Ein anderer therapeutischer Ansatz besteht in der Hemmung des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE). Die ersten Entwicklungen dazu fanden bereits in den 1960er Jahren statt. Captopril wurde 1979 auf den Markt gebracht, zunächst für die Behandlung von Bluthochdruck. Bald wurden jedoch auch kardioprotektive Wirkungen, insbesondere die Reduktion der linksventrikulären Hypertrophie, entdeckt [220].

Zahlreiche retrospektive Analysen zeigten, dass ACE-Inhibitoren den Gewichtsverlust bei CHF nicht nur verringern bzw. diesem auch vorbeugen. Die tägliche Behandlung von Patienten mit Enalapril bewirkte einen signifikant geringeren Gewichtsverlust im Gegensatz zu unbehandelten Patienten [221]. Die Gabe von Imidapril im Tierexperiment mit MAC16-Tumor-tragenden Mäusen attenuiert die Entwicklung eines Gewichtsverlustes [222]. Imidapril befand sich in einer Phase-III-Studie zur Therapie von non-small cell lung cancer (NSCLC) sowie des Kolorektalkarzinoms und des Bauchspeicheldrüsenkarzinoms. Eine signifikante Verringerung des Gewichtsverlustes wurde jedoch beim Bauchspeicheldrüsenkrebs nicht festgestellt [223].

## 2.4.2 Aldosteronantagonisten/Aldosteronsynthese-Inhibitoren als potentielle Therapeutika zur Behandlung der Tumorkachexie

### 2.4.2.1 Spironolacton

Spironolacton und seine Derivate finden einen breiten Einsatz als Aldosteron-Rezeptor-Blocker in den epithelialen Zellen der Niere und anderen klassischen Zielgeweben von Aldosteron. Das Einsatzgebiet umfasst den primären Hyperaldosteronismus, Bluthochdruck, Leberzirrhose und Herzinsuffizienz.

Spironolacton war der erste Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonist, welcher klinisch in den 1960er Jahren eingesetzt wurde [224, 225]. Es handelt sich um ein Progesteronderivat. Zu seinen aktiven Metaboliten zählt Canrenon, welches weniger Nebenwirkungen als Spironolacton aufweist. Weitere Metaboliten wie Prorenoat und Mexrenoat haben sich nicht als brauchbar erwiesen [226]. In der jüngeren Vergangenheit wurde der selektivere Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonist Eplerenon entwickelt, mit der Absicht, die antiandrogenen Nebenwirkungen wie Mastodynien (Spannungsempfinden/Schmerzen zwischen den Mammae) und Störungen im weiblichen Zyklus zu reduzieren [227].

In der RALES-Studie (*Randomized Aldactone Evaluation Study*) wurden die Vorteile einer additiven Behandlung der Herzinsuffizienz durch Spironolacton gezeigt [228, 229]. Die zusätzliche Gabe von Spironolacton reduzierte das Mortalitätsrisiko um 30% im Vergleich zu einer Placebogruppe. Jedoch kam es aufgrund seiner Affinität zu Androgen- und Progesteron-Rezeptoren zu Nebenwirkungen wie Gynäkomastie bei Männern. Weiterhin kam es durch die Spironolacton-Therapie zu einer Hyperkaliämie. Ogino et al. testeten den Einsatz von Spironolacton auf die Insulin-Resistenz bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz [230]. Die Insulin-Resistenz spielt bei der Pathophysiologie der CHF eine wichtige Rolle. Sie ist assoziiert mit einer ungünstigen Prognose. Aldosteron ist eng mit dem Insulin-Signalweg verbunden. Es hemmt die insulininduzierte Glukoseaufnahme durch Degradation der Substratproteine des Insulin-Rezeptors [231]. Die Verabreichung von Spironolacton an CHF-Patienten verbesserte die linksventrikuläre Auswurfraction und wirkte sich auch positiv auf die Insulin-Resistenz aus [230].

Der Einsatz von Spironolacton im Rahmen einer Tumorkachexie sowohl im Tierversuch als auch in humanen Studien erfolgte bislang noch nicht.

#### 2.4.2.2 Canrenon

Ein Metabolit des Spironolacton mit geringerer antiandrogener Aktivität stellt Canrenon dar. Diese antiandrogenen Effekte traten jedoch bei Patienten mit Leberzirrhose auf, wobei bei diesem Krankheitsbild der Metabolismus von Steroiden und sonstigen Wirkstoffen stark eingeschränkt ist [232]. Canrenon reduziert ebenso wie Spironolacton die Insulin-Resistenz sowie die Mikroalbuminurie (Ausscheidung von geringen Mengen Albumin mit dem Urin) bei Typ-II-Diabetes und anderen verwandten Erkrankungen [233].

#### 2.4.2.3 Eplerenon

Eplerenon wird generell von Patienten mit CHF besser vertragen [234]. Der EMPHASIS-Studie [235] zufolge gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen der Behandlungsgruppe und der Placebogruppe hinsichtlich des Auftretens von Nebenwirkungen wie Niereninsuffizienz, Hypotension oder Gynäkomastie. Bei den Eplerenon-behandelten Patienten trat jedoch häufiger Hyperkaliämie auf.

Eplerenon hat, im Gegensatz zu Spironolacton, eine kürzere Halbwertszeit von 3-4 Stunden (Spironolacton 12-58 Stunden, aufgrund von aktiven Metaboliten wie Canrenon), bildet jedoch keine Derivate, sondern wird direkt von der Leber durch ein Protein der Cytochrom P450-Familie, CYP3A4, metabolisiert [236]. Es hat keine Effekte auf Stoffwechselfparameter wie die Glukose- und Cortisolkonzentrationen, während die Spironolactongabe mit einem Anstieg des HbA1c und Cortisol im Plasma assoziiert ist [237].

#### 2.4.2.4 MYO 302

Der Wirkstoff MYO 302, ein neuartiger Aldosteron-Antagonist, wurde von Peakdale Molecular Ltd. mit dem Ziel synthetisiert, diesen im Tierversuch hinsichtlich eines möglichen Einsatzes zur Therapie der tumorassoziierten Kachexie zu testen.

## 2.5 Fragestellung

Aldosteronantagonisten haben im Tierexperiment als auch in humanen Studien gezeigt, dass sie positive Auswirkungen auf die Herzfunktion haben. Insbesondere Tumorkachexiepatienten als auch Versuche mit Labornagern im Tumorkachexiemodell zeigen, dass es neben einer Gewichtsabnahme, bedingt durch Verlust an Skelettmuskulatur und Fettmasse, auch zu einer Verringerung des Herzgewichtes sowie zu Veränderungen von Herzparametern kommt.

Mit der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Studie soll untersucht werden, ob die Gabe eines neuartigen Aldosteronantagonisten, MYO 302, geeignet für eine potenzielle Therapie der Tumorkachexie ist. Dazu wurde im Yoshida-Hepatoma-Modell eine artifizielle Tumorkachexie bei Ratten erzeugt und die therapeutische Wirkung bei der Behandlung dieser Tiere mit MYO 302 in verschiedenen Dosierungen ermittelt. Im Speziellen wurden dazu folgende Parameter im Vergleich zwischen Sham-, Placebo- und Behandlungsgruppen erhoben:

- Überlebensrate
- Tumorparameter
- Gewichtsverläufe, Körperzusammensetzung, Gewichte ausgewählter Organe
- proteinbiochemische Daten

Mit der wirksamsten Dosierung wurden in einem Anschlussexperiment mit definiertem Endzeitpunkt nach 11 Tagen die oben erwähnten sowie die folgenden Parameter vergleichend bestimmt:

- Lebensqualität, ausgedrückt durch Spontanaktivität, Futter- und Wasseraufnahme
- echokardiographische Daten

Die Erhebung wurde im Rahmen eines umfangreichen Projektes durchgeführt, an welchem mehrere Doktoranden beteiligt waren sowie weitere neuartige Wirkstoffe getestet wurden. Alle Tätigkeiten wurden von den Beteiligten der Arbeitsgruppe gemeinschaftlich durchgeführt. Die echokardiographischen Daten wurden durch Dr. Anika Tschirner erhoben. Den Durchführenden war nicht bekannt, welche Tiergruppe ein potenzielles Therapeutikum bzw. ein Placebo bekam. Die Verabreichung der Substanzen erfolgte nach einer Farbkodierung.

## 3 Material und Methodik

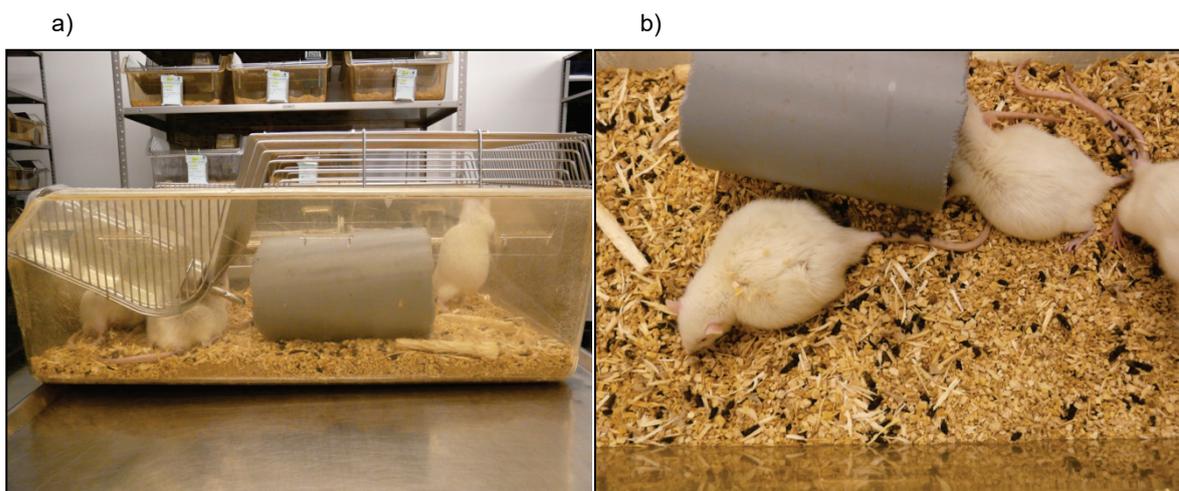
### 3.1 Material

Das Forschungsprojekt umfasst neben tierexperimentellen Arbeiten auch Laboranalysen von Muskelproben, die im Zuge des Tierversuchs entnommenen wurden. Sämtliche Untersuchungen wurden am Center for Cardiovascular Research, Charité, Campus Mitte, durchgeführt.

#### 3.1.1 Tiere und Tierhaltung

Der Tierversuch wurde mit männlichen Ratten vom Stamm Wistar Han (Charles River) durchgeführt. Die Tiere waren bei Versuchsbeginn ca. 7 Wochen alt und zwischen 170 und 230 g schwer.

Die Tierhaltung erfolgte in Makrolonkäfigen vom Typ III, die jeweils mit 4-5 Tieren besetzt waren (Abb. 3.1a/b). Die Zuteilung der Tiere in die jeweiligen Käfige erfolgte randomisiert. Während des gesamten Versuches hatten die Tiere freien Zugang zu Trinkwasser und Futter (V 1534-300 ssniff R/M-H, 10 mm, autoklavierbar, Soest). In den Haltungsräumen wurde ein 12-Stunden-Lichtrhythmus mit einer Lichtphase von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr angewandt. Zweimal pro Woche, montags und donnerstags, wurden die Tiere in saubere Käfige umgesetzt. Die Temperatur im Tierhaltungraum betrug  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , die Luftfeuchte  $55 \pm 10\%$ .



**Abb. 3.1a/b** Makrolonkäfig vom Typ III, mit tumortragenden Ratten besetzt.

Eine tierärztliche Überwachung der Ratten während des Versuches erfolgte mindestens zweimal täglich. Dabei wurden das Allgemeinbefinden und das Verhalten beurteilt. Nach

anfänglichen Abwehrbewegungen während der durchzuführenden Eingriffe zeigten die Tiere bereits nach zwei bis drei Tagen deutliche Anzeichen einer Gewöhnung.

Alle Handlungen an den Tieren erfolgten konform zum Tierschutzgesetz und wurden per Tierversuchsantrag vom Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt (Versuchsnummer: G 0076/06).

### 3.1.2 Tierversuchsplan

#### 3.1.2.1 Überlebensstudie

Zunächst wurde eine Überlebensstudie durchgeführt, um die Wirksamkeit der unterschiedlichen Dosierungen des Compounds MYO 302 zu ermitteln. Die Ratten wurden zu Versuchsbeginn mittels Nummer auf der Schwanzoberseite markiert und nach Randomisierung auf die Käfige verteilt. Weiterhin wurden alle Tiere gewogen, im NMR gescannt und auf einem ca. 3 x 3 cm großen Feld thorakal rasiert. Die Rasur verfolgt eine Vergleichbarkeit zu früheren Experimenten, bei denen die Tiere mittels Ultraschall untersucht wurden, einhergehend mit gesteigertem Energiebedarf, wodurch sich bei den tumorinokulierten Tieren die initiierte Tumorkachexie verstärkt. Anschließend wurden den Tieren  $10^8$  Tumorzellen intraperitoneal mittels Spritze injiziert. Kontrolltiere (Shamtieren) erhielten ein entsprechendes Volumen physiologischer Kochsalzlösung verabreicht.

Ab dem darauf folgenden Tag wurde den Ratten täglich das zu testende Compound MYO 302, nach Gruppen getrennt in den Dosierungen 0,2 mg/kg/d, 1 mg/kg/d, 10 mg/kg/d und 20 mg/kg/d, oral mittels Gavage verabreicht. Placebo- und Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung. Die Gruppenzugehörigkeit der Tiere war, abgesehen von den Kontrolltieren, den Durchführenden nicht bekannt. Im Zwei-Tages-Rhythmus erfolgten Messungen zur Dokumentation der Veränderung von Gewicht und Körperzusammensetzung. Mit Zunahme der Tumorflüssigkeit änderten sich Vitalität und Verhalten der Tiere. Zeigten die Tiere eines der folgenden Auffälligkeiten (humane endpoints), wurden sie aus ethischen Gründen getötet: Blut an den Körperöffnungen, Blässe, Dyspnoe, Zyanose, Schmerzzeichen wie gekrümmter Rücken, Apathie, wiederholtes Auftreten von Krämpfen, unkoordinierte Fortbewegung, anhaltender Durchfall. Spätestens am Tag 18 wurden sämtliche Tiere getötet.

Abb. 3.2 zeigt den Ablauf der Überlebensstudie

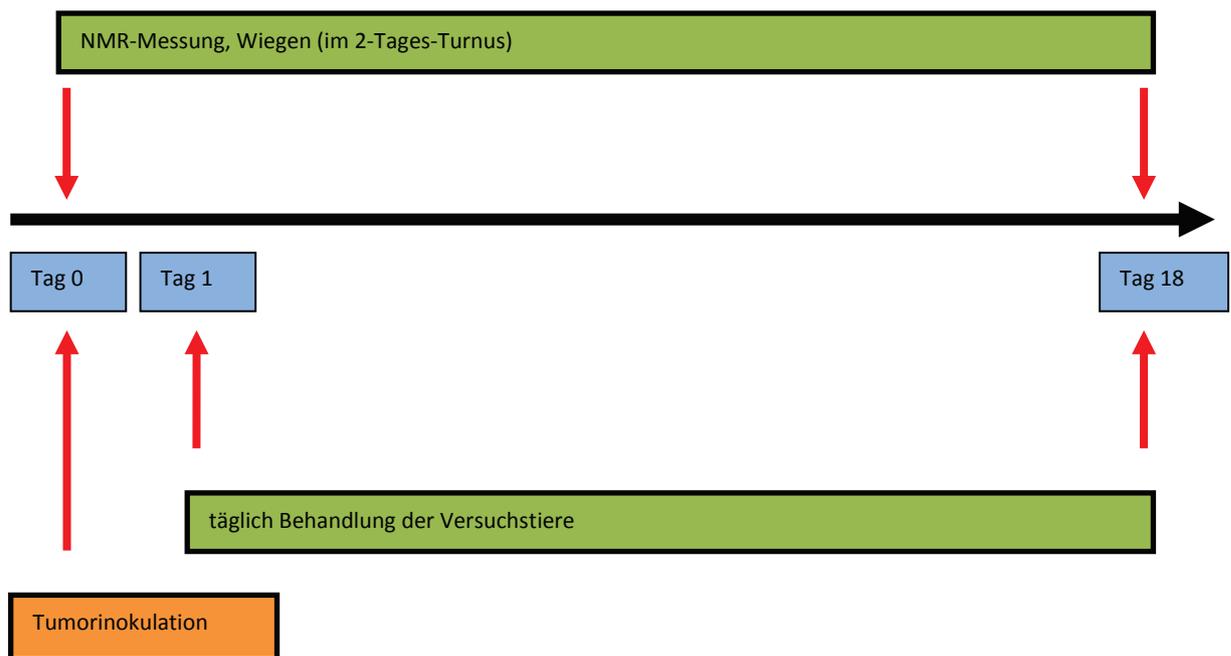


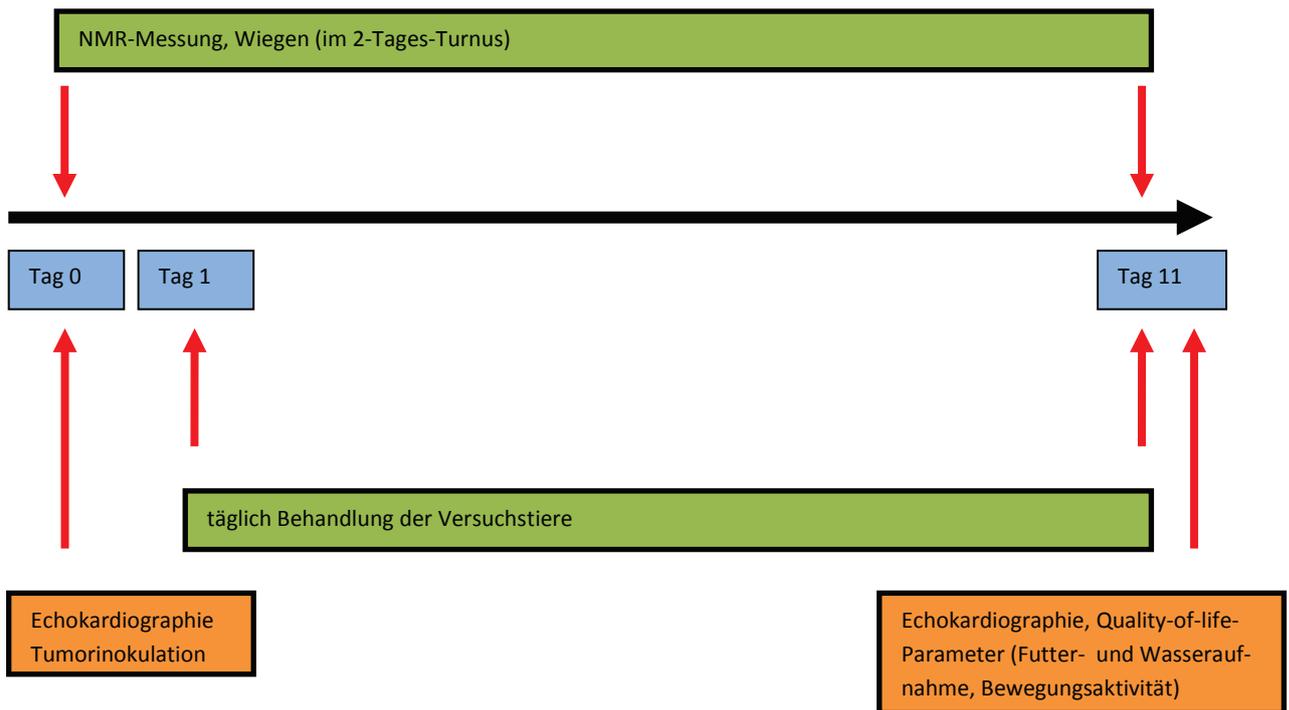
Abb. 3.2 Verlauf der Überlebensstudie

### 3.1.2.2 Echokardiographiestudie

Nach Auswertung der Ergebnisse der Überlebensstudie wurde mit der wirksamsten Dosierung, in diesem Fall 1 mg/kg/d MYO 302, eine weitere Studie mit erweitertem Studiendesign durchgeführt. Diese Studie vergleicht eine mit der Dosis von 1 mg/kg/d behandelte Gruppe mit einer Placebogruppe. Neben den in der Überlebensstudie erfassten Parametern Körpergewichtsveränderung und Veränderung der Körperzusammensetzung wurden die Bewegungsaktivität, Futter- und Wasseraufnahme sowie echokardiographische Daten erhoben.

Die Markierung, Randomisierung, Rasur, NMR-Scan, Gewichtsermittlung sowie Tumordinokulation zu Studienbeginn erfolgten ebenso wie bei der Überlebensstudie.

Abb. 3.3 stellt die Durchführung dieses Versuchsabschnitts grafisch dar.



**Abb. 3.3** Verlauf der Echokardiographiestudie

Die Verabreichung des Compounds bzw. des sterilen Wassers erfolgte täglich oral per Gavage.

### 3.1.3 Substanz

Das Compound MYO 302 wurde von Peakdale Molecular Ltd, Chapel-en-le-Frith, UK, bezogen. Im Labor der Arbeitsgruppe wurde die Substanz durch eine nicht am Versuch beteiligte Person in den verschiedenen Dosierungen, farblich verblindet für den Durchführenden, angefertigt.

### 3.1.4 Puffer

Von den Tieren der Überlebensstudie wurden im Zuge der Sektion diverse Gewebeproben entnommen (s. Kapitel 3.2.1.4). Die Muskelproben wurden biochemisch analysiert um die Caspase- und Proteasomaktivität zu bestimmen. Die dafür notwendigen Pufferlösungen sind in Tab. 3.1 aufgelistet.

**Tabelle 3.1** Puffer und Pufferzusammensetzung

Puffer	Pufferzusammensetzung
<b>Caspaselysispuffer</b>	100mM HEPES (pH 7,5); 10% (w/v) Sucrose; 0,1% (v/v) IGEPAL® CA-630; 10mM DTT; 1 Tablette Complete Mini
<b>Puffer für Caspaseaktivitätsmessung</b>	100mM HEPES (pH 7,5); 10% (w/v) Sucrose; 0,1% (w/v) CHAPS; 2% (v/v) DMSO; 10mM DTT; 50µM fluorogenes Caspase-Substrat; ± 100µM Caspase-Inhibitor
<b>Proteasomlysispuffer</b>	10mM Tris (pH 7,5); 1mM EDTA; 2mM ATP; 20% (v/v) Glycerin; 4mM DTT
<b>Puffer für Proteasomaktivitätsmessung</b>	50mM Tris (pH 8,0); 0,5mM EDTA; 40µM fluorogenes Proteasom-Substrat; ± 40µM MG-132

### 3.1.5 Fluorogene Substrate

Die zur Messung der Caspase- und Proteasomaktivität notwendigen fluorogenen Substrate zeigt Tab. 3.2.

**Tabelle 3.2** Fluorogene Substrate

Fluorogenes Substrat	Target von	Hersteller
Ac-DEVD-AMC	Caspase 3	Enzo Life Sciences®, Lörrach, Deutschland
Ac-VEID- AMC	Caspase 6	Enzo Life Sciences®, Lörrach, Deutschland
Bz-VGR-AMC	UPS	Enzo Life Sciences®, Lörrach, Deutschland
LLVY-AMC	UPS	Enzo Life Sciences®, Lörrach, Deutschland
ZLLE-AMC	UPS	Enzo Life Sciences®, Lörrach, Deutschland

### 3.1.6 Geräte

Tabelle 3.3 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
<b>Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer</b>		BioRad®, München, Deutschland
<b>Echo MRI-700</b>		Echo Medical Systems, Houston, Texas, USA
<b>Laborwaage</b>	CS 2000	Ohaus Corporation, Pine Brook, NY, USA
<b>Minishaker</b>	MS 1	IKA Werke® GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
<b>Mikroskop</b>	DM LB-2; DMIL	Leica, Bensheim, Deutschland
<b>Neubauer Zählkammer</b>	Superior (Tiefe 0,1mm, 0,0025 mm <sup>2</sup> )	Marienfeld GmbH & Co. KG, Königshofen, Deutschland
<b>Präzisionswaage</b>	CP225D	Sartorius AG®, Göttingen, Deutschland
<b>Sonifizierer</b>	HD 2070 MS 72	BANDELIN SONOPLUS®, Berlin, Deutschland
<b>„Supermex“-Locomotor-System</b>		Muromachi Kikai Co. Ltd., Tokyo, Japan
<b>Thermomixer</b>	comfort	Eppendorf®, Hamburg, Deutschland
<b>Tischzentrifuge</b>	SD 220 VAC; 6rpm	Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland
<b>Ultra-Turrax mit Netzgerät und Dispersionswerkzeug</b>	T8/T8.01/S8N-5G	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
<b>Univentor 400 Anaesthesia Unit</b>		Agn Tho's AB, Lindigo, Schweden
<b>Zentrifuge</b>	5804R	Eppendorf®, Hamburg, Deutschland
<b>Rasierer</b>	GT 104	Aesculap®, Melsungen, Deutschland

### 3.1.7 Computerprogramme

Tabelle 3.4 Computerprogramme

Programm	Beschreibung	Hersteller
<b>compact AMS</b>	Erfassen von Lokomotordaten, Version 3	Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan
<b>GraphPad Prism</b>	Statistikprogramm, Version 5.0	Graph Pad Software
<b>Microplate Manager</b>	Quantifizieren der optischen Dichte von Proteinproben, Version 5.2	Bio-Rad®, München, Deutschland
<b>Microwin 2000</b>	Quantifizieren von Fluoreszenz	BERTHOLD Technologies GmbH & Co. KG, Wildbad, Deutschland
<b>EndNote 9.0</b>	Literaturverwaltung	Thomsen Reuters

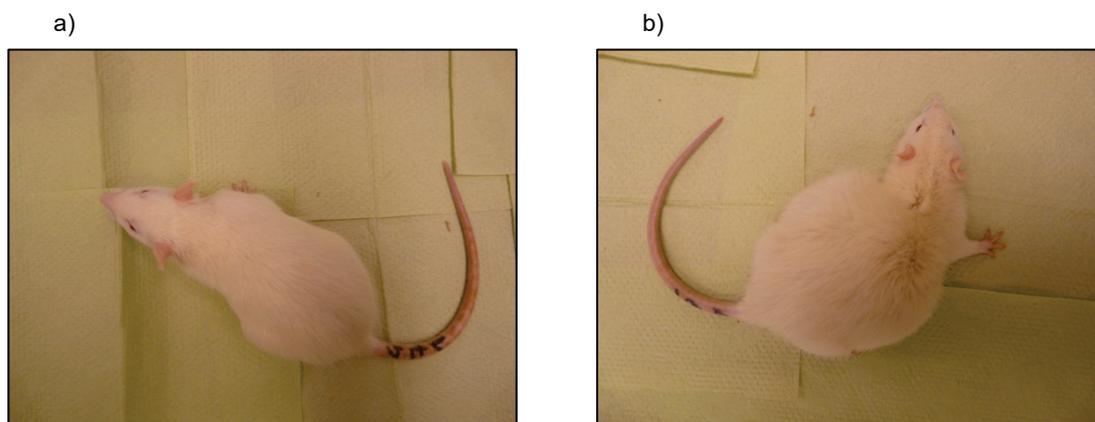
## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tierexperiment

#### 3.2.1.1 Tumormodell und Tumorinokulation

Zur Auslösung eines Tumors wurden den Versuchstieren AH-130 Yoshida Hepatoma-Zellen in den Peritonealraum injiziert. Dieses Tumormodell ist bei der Ratte etabliert. Es zeichnet sich durch eine geringe Variabilität im Verlauf der Erkrankung aus. Die Tumorzellen stammen aus Passagetieren, in welchen der Tumor stetig reproduziert wird. Die Passagetiere wurden zur Tumorentnahme getötet, die Tumorzellen gezählt und  $10^8$  Tumorzellen jedem Versuchstier injiziert. Den Kontrolltieren (Sham-Gruppe) wurde eine adäquate Menge physiologischer Kochsalzlösung, ebenfalls intraperitoneal, verabreicht. Die Bezugsquelle für die Tumorzellen stellt die Arbeitsgruppe von Prof. J.M. Argilés, Cancer Research Group, Departament de Bioquímica y Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spanien, dar.

Die Tumorzellen teilen sich bis zum 7. Tag nach der Inokulation exponentiell. Danach stellt sich ein Plateau ein. Die Zellmasse beträgt dann ungefähr 1% des Körpergewichts einer ca.  $200,0 \pm 30,0$  g schweren Ratte. Daneben kommt es zur Produktion von Aszitesflüssigkeit. Abb. 3.4 zeigt ein Shamtier sowie ein Placebotier, jeweils zu Versuchsende der Überlebensstudie. Die Ansammlung von Aszitesflüssigkeit, in welcher sich die Tumorzellen befinden, ist unverkennbar. Parallel zur Zellzahlvermehrung stellt sich ein zunehmender Verlust von Fett- und Muskelgewebe ein.



**Abb. 3.4** Shamtier (3.4a) sowie Placebotier (3.4b) zu Versuchsende

### 3.2.1.2 Behandlungsgruppen und Medikamentenapplikation

Die Behandlung der Tiere erfolgte zunächst in vier Dosierungen des eingesetzten Compounds. Für jede Dosis wurde eine Gruppe von Tieren gebildet. Zum Vergleich dazu wurden außerdem eine Placebogruppe sowie eine Shamgruppe (Tiere ohne Tumorzellinokulation) herangezogen. Die Placebogruppe erhielt Wasser im Laufe des Versuchs. Die Einteilung der Ratten in die jeweiligen Gruppen erfolgte randomisiert, in den Käfigen befanden sich ausschließlich Ratten einer Gruppe. Die an der Versuchsdurchführung beteiligten Doktoranden hatte keine Kenntnis, welche Tiere zu welcher Gruppe gehörten, mit Ausnahme der Tiere der Shamgruppe.

Die Applikation des Compounds per Gavage fand, unabhängig von der Dosis, zweimal täglich verblindet, mit Hilfe einer Buchstaben-, Zahlen- und Farbcodierung, statt. Dazu wurde eine Knopfkanüle mit weicher Silikonspitze den Tieren bis in den Magen vorgeschoben und somit das Medikament verabreicht.

Im ersten Teil der Studie wurden 171 Tiere verwendet, wie nachfolgende Tabelle 3.5 zeigt.

**Tab. 3.5** Tierzahlen pro Versuchsgruppe

Gruppe	Sham	Placebo	0,2 mg/kg/d MYO 302	1,0 mg/kg/d MYO 302	10,0 mg/kg/d MYO 302	20,0 mg/kg/d MYO 302
Tierzahl	14	76	22	22	21	16

In einer nachfolgenden Studie mit definiertem Versuchsende am Tag 11 wurde die aussichtsreichste Dosis verwendet, um weitere Untersuchungen (Echokardiographie, Futter- und Wasseraufnahme, Bewegungsaktivität) mit einer Placebogruppe zu vergleichen.

Am zweiten Teil der Studie wurden 20 Tiere, jeweils 10 Tiere pro Gruppe (Placebo und 1,0 mg/kg/d MYO 302) Tiere verwendet.

### 3.2.1.3 Gewichtsmonitoring und NMR

Zur Ermittlung des Gewichtsverlaufes und der Körperzusammensetzung der Tiere während des Experiments wurden diese, beginnend ab Tag 1, jeden zweiten Tag gewogen und mittels Kernresonanzspektroskopie gescannt. Beide Messungen erfolgten am Vormittag zwischen 9.00 und 12.00 Uhr. Die Gewichtsermittlung wurde mit einer Präzisionswaage

vom Typ „CS 2000“ der Firma OHAUS Corporation, Pine Brook, New Jersey, USA durchgeführt. Das Gewicht wurde in Gramm angegeben.

Die Analyse der Körperzusammensetzung beruht auf der Kernspinresonanz. Anhand des Protonengehaltes, der gewebspezifisch ist, kann auf die Anteile von Körperfett, fettfreiem Gewebe, freier Flüssigkeit und Gesamtwasser geschlossen werden. Zur Messung wird die nicht narkotisierte Ratte in eine Plastikröhre gesetzt und diese in das „Echo-MRI 500“-Gerät (Echo Medical Systems, Houston, Texas, USA) geschoben (Abb. 3.5a/b). Nach einer Messdauer von 73 Sekunden werden auf einem Monitor die Messwerte in Gramm dargestellt.

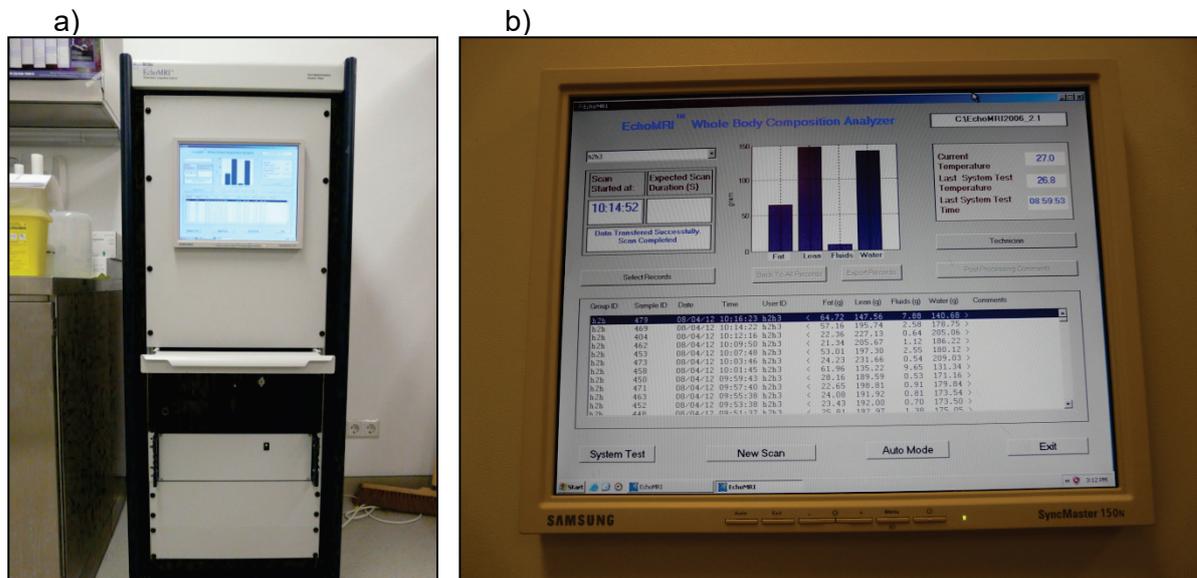


Abb. 3.5 Darstellung des NMR-Gerätes (3.5a) sowie des die Messdaten anzeigenden Bildschirms (3.5b)

### 3.2.1.4 Tötung, Tumor- und Gewebeentnahme

Die Tötung der bis zum Tag 18 überlebenden Versuchstiere sowie der Kontrolltiere erfolgte in einer Narkosekammer mittels Isofluran (Isofluran „Forene“, Abott GmbH Co.KG, Wiesbaden, Deutschland) in Überdosierung. Zuvor wurden die Tiere gewogen und im NMR gescannt.

Nach dem Töten wurde den Tieren durch Eröffnung der Brusthöhle mit einer EDTA-gespülten 3-ml-Spritze Herzblut aus dem linken Ventrikel entnommen, welches sofort in ein EDTA-Röhrchen überführt und gekühlt wurde. Danach erfolgte die Tumorentnahme durch Eröffnung der Bauchhöhle zur Bestimmung der Tumormenge. Davon wurden 45 ml Tumorfliissigkeit in ein Reaktionsgefäß überführt und ebenfalls bis zum Auszählen der Tumorzellen auf Eis gelagert.

Blut und Tumorflüssigkeit wurden anschließend 10 Minuten bei 4°C und 3000 Umdrehungen/min zentrifugiert (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Das Plasma wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße, der zellfreie Überstand der Tumorflüssigkeit sowie das Zellkonzentrat in 2,0 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße (Safe-seal micro tube, PP, Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland) pipettiert und bei -80°C eingefroren.

Nach vollständiger Tumorentnahme wurde durch erneutes Wiegen der Tiere das Finalgewicht ermittelt sowie mittels NMR-Scan die Körperzusammensetzung ohne Tumor bestimmt.

Im Rahmen der Sektion wurden in beiden Versuchsabschnitte neben Tumorflüssigkeit und Blut folgende Organe/Gewebe entnommen: Herz, braunes Fettgewebe (BAT), einseitig weißes epididymales Fettgewebe (WAT), Musculus gastrocnemius, Musculus extensor digitorum longus (EDL), Musculus tibialis, Musculus soleus. Die entnommenen Organe/Gewebe wurden unverzüglich in flüssigen Stickstoff überführt und später bei -80 °C tiefgefroren.

#### *3.2.1.5 Tumorzellzahlermittlung*

Zur Zellzahlermittlung in der Tumorflüssigkeit wurde eine Suspension aus 875 µl physiologischer Kochsalzlösung (0,9%, Fresenius, Kabi, Bad Homburg, Deutschland), 100 µl Färbelösung (Trypan Blue Solution, Fluka, Sigma Aldrich, Bucks, Schweiz) und 25 µl Tumorflüssigkeit hergestellt. Diese Suspension wurde daraufhin auf eine Neubauer-Zählkammer (Superior Marienfeld, Deutschland) mit aufgelegtem Deckgläschen überführt. Bei 10facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop (Leica Microsystems Wetzlar GmbH) wurden auf 24 Zählfeldern die Tumorzellen gezählt und summiert. Die Ermittlung der Tumorzellzahl je ml errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl/ml} \times 10^6 = \sum / 24 \times 16 \times 40 \times 10000.$$

Gezählt wurden lediglich die lebenden Tumorzellen.

#### *3.2.1.6 Echokardiographie*

Die Tiere der Kurzzeitstudie wurden am Tag 0 und am Tag 11 echokardiographisch mit dem Vevo 770 High-Resolution Imaging System (VisualSonics, Toronto, Kanada) untersucht. Dabei werden Ultraschallwellen, welche an Gewebestrukturen reflektiert werden, in Bilder umgewandelt.

Die Ratten wurden dazu mittels Inhalationsnarkose aus einem Isofluran/Sauerstoffgemisch betäubt. Die Narkoseeinleitung erfolgte mit einem Isoflurananteil von 3,5% in einer Kammer. Nach Erreichen des chirurgischen Toleranzstadiums wurde die Narkose mittels größenangepasster Maske und einem Isoflurangehalt von 2% aufrechterhalten. Danach wurden die Tiere auf einer Heizplatte mit 38°C fixiert und die Thoraxregion rasiert sowie mit Veet-Enthaarungscreme (Reckitt Benckiser, Hull, Großbritannien) enthaart.

Die Sonographie des Herzens mittels 25-MHz-Schallkopf erfolgte zunächst im B-Modus (*brightness modulation*), welcher die Darstellung zweidimensionaler Bilder in Echtzeit ermöglicht. Ermittelt wurden am linken Ventrikel (LV) die Fläche (LV Area d/s) und die längsten Achsen (LV Major d/s) in der Diastole und Systole. Auch der Aortendurchmesser wurde gemessen.

Im M-Modus (*motion modulation*) wurden die Herzwandstärken und die Herzrate analysiert. Es wird dabei ein virtueller Herzquerschnitt vor dem Papillarmuskel erstellt, welcher in eindimensionale Bilder umgewandelt wird. Dies ermöglicht die Vermessung des interventrikulären Septums (IVS) und die posteriore Wandstärke (PW) sowie die innere Dimension (ID) während Diastole und Systole.

Aus den erhobenen Daten konnten dann das linksventrikuläre Auswurfvolumen (EF, *ejection fraction*), die prozentuale Flächenveränderung (FS, *fractional shortening*), das Schlagvolumen (SV) und das Herzzeitvolumen (CO, *cardiac output*) berechnet werden.

### 3.2.1.7 Lokomotoraktivitätsmessung, Futter- und Wasseraufnahme

Die Messung der Bewegungsaktivität der Versuchstiere erfolgte in einem „Supermex“-Locomotor-System (Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan). Die Tiere befanden sich dabei in Makrolonkäfigen vom Typ III. Vor Beginn der Messung wurde die Wassermenge in der Trinkflasche bestimmt sowie für jede Ratte 100 g zur Verfügung stehendes Futter abgewogen. Im Käfig befanden sich außer der Einstreu keine weiteren Enrichmentelemente, da sonst die Registrierung der abgestrahlten Körperwärme durch den Infrarotbewegungssensor nicht gewährleistet wäre. Die Messung des Sensors erfolgt im Abstand von 10 Minuten über einen Zeitraum von 24 Stunden.

Für die Ermittlung der Bewegungsaktivität wurden zehn Tiere aus der Vergleichsstudie, welche mit der aussichtsreichsten Dosis der Überlebensstudie behandelt wurden, sowie zehn Tiere, welche ein Placebo verabreicht bekamen, verwendet. Diese wurden direkt vor der ersten Behandlung (Tag 0) sowie von Tag 10 auf Tag 11 der Studie, sofern sie vorher nicht getötet werden mussten, jeweils für 24 Stunden im Locomotor-System gehalten. Die

Bewegungen wurden im Nachhinein als counts/24 Stunden ausgegeben. Die Restmengen von Futter und Wasser wurden nach 24 Stunden erneut ermittelt, so dass auf den Futter- bzw. Wasserverbrauch geschlossen werden konnte.

### 3.2.2 Proteinbiochemie

Jedes Experiment wurde als Duplikat durchgeführt.

#### 3.2.2.1 *Proteinextraktion*

Die zu untersuchenden Organe wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Vor Proteinextraktion wurden die Proben zunächst pulverisiert und mit dem entsprechenden Puffer lysiert (Tab. 3.1). Die Proteinlyse wurde mit dem Dispergiergerät DT2100 (POLYTRON) durchgeführt.

Bei der Extraktion des Proteasoms wurden 50-100 mg pulverisiertes Gewebe mit 500  $\mu\text{l}$  Proteasom-Lysispuffer versetzt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit dem Dispergiergerät zerkleinert. Anschließend wurde das gewonnene Homogenat bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 20 Sekunden mittels Sonifier Ultraschallwellen ausgesetzt, damit sämtliche noch intakte Zellen zerstört sowie proteasomgefüllte Vesikel in den Zellen eröffnet werden. Die Proben wurden direkt danach bei 13000 x g bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 15 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde erneut Ultraschallwellen am Sonifier ( $4^{\circ}\text{C}$ , 20 Sekunden) ausgesetzt. Nach nochmaliger Zentrifugation ( $4^{\circ}\text{C}$ , 15 min, 13000 x g) wurde der Überstand abgenommen und bis zur Weiterbehandlung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Zur Extraktion von Caspase wurden zu 50 mg Gewebepulver 300  $\mu\text{l}$  Caspase-Lysispuffer gegeben und danach bei  $4^{\circ}\text{C}$  dispergiert. Das entstandene Homogenat wurde anschließend dreimal im Wechsel bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nachdem auf diese Weise alle Zellen gespalten wurden, erfolgte eine Zentrifugation bei 20000 x g bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 30 min. Nach Abnahme des Überstandes wurde wiederholt zentrifugiert (20000 x g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 20 min). Bis zur Aktivitätsmessung wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 3.2.2.2 *Proteinquantifizierung*

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mittels Bradford-Assay. Dazu wurden die Proben 1:10 und 1:20 verdünnt, mit Quick Start™ Bradford Dye Reagent versetzt und 15 Minuten inkubiert. Die Bradford Reagenz bindet an die Proteine. In der nachfolgenden

photometrischen Messung bei 595 nm am Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer wurde die proportional zum Proteingehalt zunehmende Optische Dichte (OD) ermittelt. Ein Vergleich mit der OD eines bekannten Proteingemisches (BSA) erlaubt im Anschluss die Berechnung der genauen Proteinkonzentrationen in den Proben.

### 3.2.2.3 Ubiquitin-Proteasomaktivitätsassay

Die Ubiquitin-Proteasomaktivität wurde anhand von drei proteolytischen Aktivitäten ermittelt: Chymotrypsin-artige, Trypsin-artige und Peptidyl-glutamylhydrolysierende Aktivität (Tab. 3.6). Nach Zugabe von einem Amidomethylcoumarin (AMC)-gebundenen fluorogenen Substrat (40  $\mu\text{M}$ ) und Tris/EDTA-Puffer zu 100  $\mu\text{g}$  Protein, sowohl mit als auch ohne Proteasominhibitor (MG132, 40  $\mu\text{M}$ ), wurde der entstandene Mix bei 37°C für 30 Minuten inkubiert und anschließend bei 360ex/460em nm im Twinkle-Fluorometer gemessen. Die Ermittlung der Daten erfolgt mit dem Programm MicroWin2000.

Die Freisetzung des AMC bei vorhandener Proteasomaktivität durch Abspaltung des Substrats von den Proteasomen ermöglicht die Fluoreszenzmessung. Zwischen der proteolytischen Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems und den fluorogenen Messwerten besteht eine Korrelation. Bei der Messung mit Proteasominhibitor wird die unspezifische Proteasomaktivität ermittelt, die von den Messwerten ohne Inhibitor abgezogen wurde. Die Messungen erfolgten im Vergleich mit der AMC-Fluoreszenz bekannter Konzentrationen. Die Aktivität wurde in nmol/mg Protein/min angegeben.

**Tab. 3.6** proteolytische Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Fluorogenes Substrat	Aktivität	Spaltung von
<b>LLVY-AMC</b>	chymotrypsin-artige Aktivität	hydrophoben Aminosäuren
<b>Bz-VGR-AMC</b>	trypsin-artige Aktivität	basischen Aminosäuren
<b>ZLLE-AMC</b>	peptidyl-glutamyl-hydrolysierende Aktivität	sauren Aminosäuren

### 3.2.2.4 Caspaseaktivitätsassay

Der Nachweis von Caspase-3- und Caspase-6-Aktivität dient als Apoptosemarker. Nach Zugabe von einem AMC-gebundenen fluorogenen Substrat (50  $\mu\text{M}$ ) und Caspase-Assaypuffer zu 100  $\mu\text{g}$  Protein, sowohl mit als auch ohne Caspaseinhibitor (100  $\mu\text{M}$ ), wurde der entstandene Mix bei 37°C für 60 Minuten inkubiert und anschließend bei 360ex/460em nm im Twinkle-Fluorometer gemessen. Aus den Fluoreszenzwerten konnte anschließend

die Caspaseaktivität ermittelt werden. Die Aktivitäten wurden in nmol/mg Protein/min angegeben.

### 3.2.3 Statistik

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung der erhobenen Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm Prism (Version 5.0 Graph Pad Software Inc. 1994-2007).

Als Test auf Normalverteilung wurde der KOLMOGOROV-SMIRNOFF-Test verwendet. Bei normalverteilten Daten erfolgte der Vergleich mehrerer Gruppen mittels Varianzanalyse (ANOVA). Zwei Gruppen wurden daraufhin mit dem Test nach Bonferroni miteinander auf ihre Signifikanz verglichen. Lag keine Normalverteilung vor wurden die Daten mit dem Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn´s-Test untersucht. Als signifikant wurde ein p-Wert von  $<0,05$  angesehen.

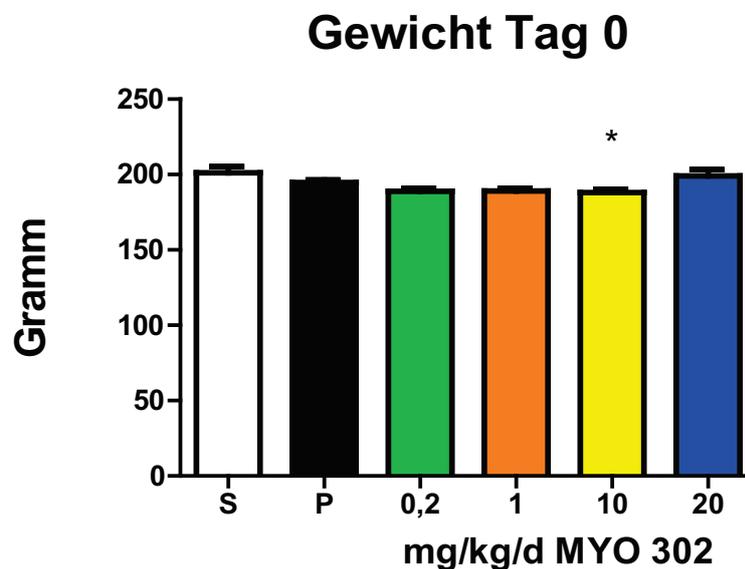
Zur Auswertung und Darstellung der Überlebenskurven wurden Kaplan-Meier-Kurven verwendet. Daneben wurde die Hazard Ratio, das Konfidenzintervall sowie der im Log-Rank-Test ermittelte p-Wert angegeben. Als signifikant wurden p-Werte  $<0,05$  angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Überlebensstudie

#### 4.1.1 Gewichtsentwicklung und Veränderung der Körperzusammensetzung

Zu Versuchsbeginn waren, trotz Randomisierung der Tiere, teilweise signifikante Unterschiede im Körpergewicht der Behandlungsgruppen gegenüber der Placebogruppe erkennbar (s. Abb. 4.1). Das Körpergewicht lag zu Versuchsbeginn zwischen 171,0 g und 236,9 g.



**Abb. 4.1 Mittleres Körpergewicht an Tag 0**

Darstellung: Mittelwerte der Behandlungsgruppen vs. Placebo, Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,

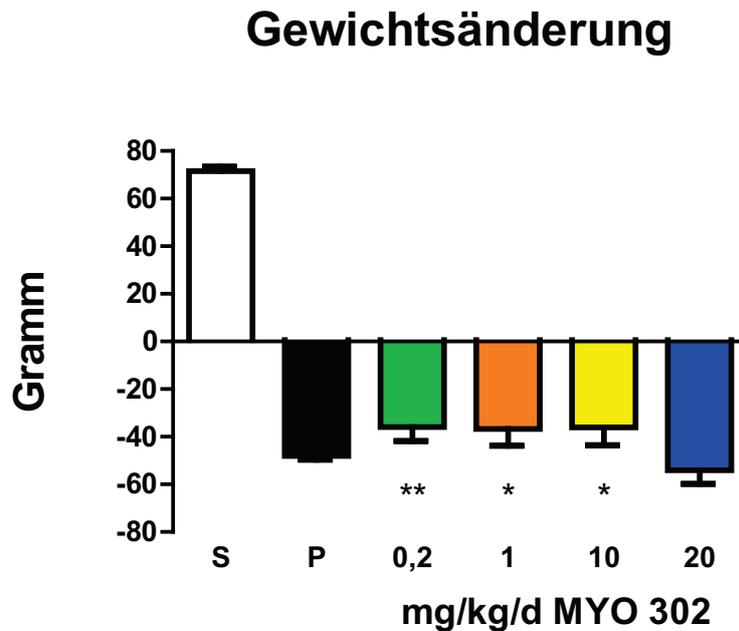
$p < 0,05$ : \*,  $p > 0,05$ : nicht signifikant

(Sham (S): n=14, Placebo (P): n=76, 0,2 mg/kg/d MYO 302: n=22, 1,0 mg/kg/d MYO 302: n=22, 10,0mg/kg/d MYO 302: n=21, 20,0 mg/kg/d MYO 302: n=16)

Zum Tötungszeitpunkt wiesen die Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede im Endgewicht ohne Tumor auf.

Ratten mit Tumor zeigten jedoch eine deutliche Reduktion der Körpermasse gegenüber Sham-Tieren (Abb. 4.2). Bei der Sham-Gruppe betrug die Zunahme von Körpermasse über den Versuchszeitraum hinweg durchschnittlich  $71,6 \text{ g} \pm 1,8 \text{ g}$  (35,6%). Bei der Placebo-Gruppe betrug der Gewichtsverlust durchschnittlich  $48,0 \text{ g} \pm 1,6 \text{ g}$  (24,6%). Die Gruppe mit

der Dosis 20,0 mg/kg/d MYO 302 zeigte keine signifikanten Unterschiede gegenüber der Placebo-Gruppe. Dagegen zeigten die Gruppen mit den anderen Dosierungen einen signifikant geringeren Verlust an Körpermasse gegenüber den Placebo-Tieren. Einzelne Tiere aus den Behandlungsgruppen wiesen trotz Tumorentwicklung eine Gewichtszunahme auf.



**Abb. 4.2 Gewichtsveränderung während des Versuchszeitraumes**

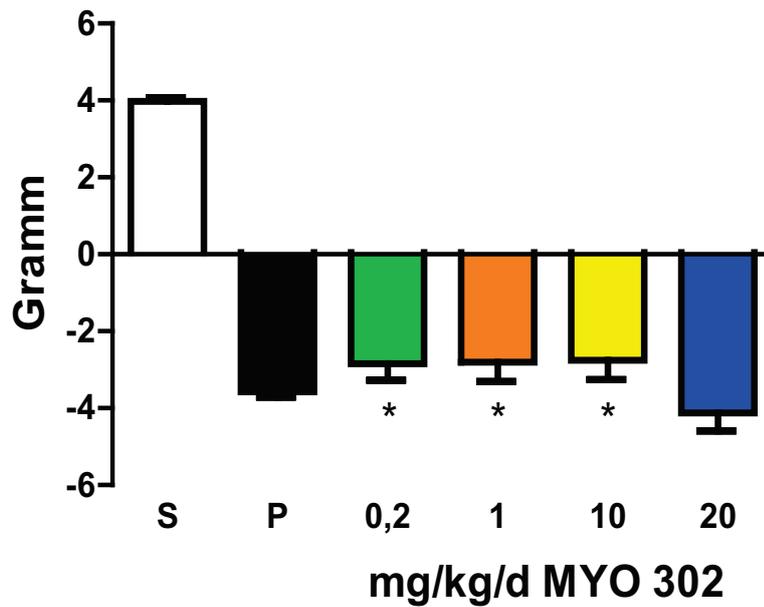
Darstellung: Mittelwerte der Behandlungsgruppen vs. Placebo, Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,

$p < 0,01$ : \*\*,  $p < 0,05$ : \*,  $p > 0,05$ : nicht signifikant

(Sham (S): n=14, Placebo (P): n=76, 0,2 mg/kg/d MYO 302: n=22, 1,0 mg/kg/d MYO 302: n=22, 10,0mg/kg/d MYO 302: n=21, 20,0 mg/kg/d MYO 302: n=16)

Der tägliche Gewichtsverlust der tumorinokulierten Gruppen unterschied sich bei den Behandlungsgruppen mit den drei geringen Dosierungen signifikant gegenüber der Placebo-Gruppe. Diese Gruppen hatten eine durchschnittliche tägliche Gewichtsabnahme von 2,8 g (1,5 %), die Placebo-Gruppe dagegen 3,5 g (1,8 %) vom Gewicht zu Versuchsbeginn. In der Sham-Gruppe hatten die Tiere im Vergleich dazu eine durchschnittliche Gewichtszunahme von durchschnittlich 4,0 g (2,0 %) täglich (s. Abb. 4.3).

## durchschnittliche Gewichtsveränderung pro Tag



**Abb. 4.3 durchschnittliche tägliche Gewichtsveränderung während des Versuchszeitraumes**

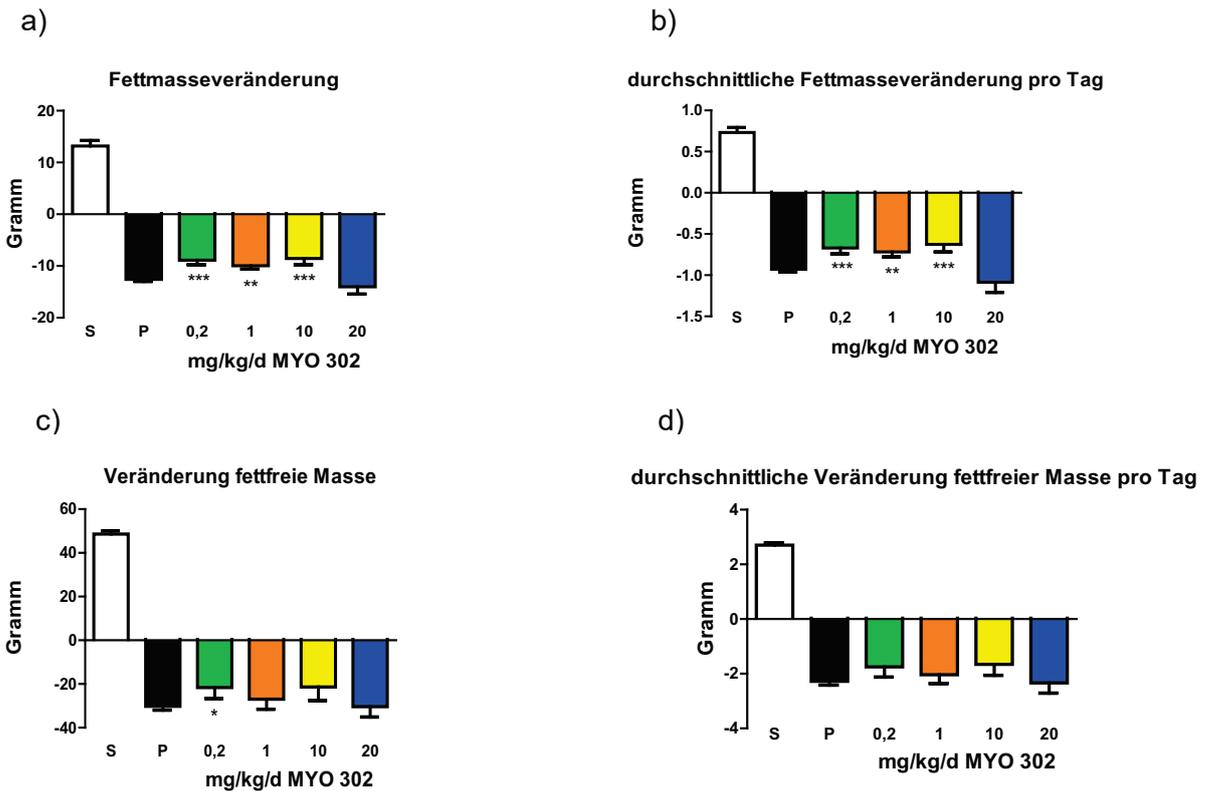
Darstellung: Mittelwerte der Behandlungsgruppen vs. Placebo, Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,

$p < 0,05$ : \*,  $p > 0,05$ : nicht signifikant

(Sham (S): n=14, Placebo (P): n=76, 0,2 mg/kg/d MYO 302: n=22, 1,0 mg/kg/d MYO 302: n=22, 10,0mg/kg/d MYO 302: n=21, 20,0 mg/kg/d MYO 302: n=16)

Bei den NMR-Messungen zeigten die drei Behandlungsgruppen mit den geringen Dosierungen einen zum Teil hochsignifikanten niedrigeren mittleren Verlust an Fettmasse als die Placebo-Gruppe im Versuchszeitraum (s. Abb. 4.4a). Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei den durchschnittlichen täglichen Fettmasseverlusten, bei denen die Überlebensdauer mitberücksichtigt wurde (Abb. 4.4b).

Bei dem Verlust an fettfreier Masse wurde lediglich ein gering signifikanter Unterschied zwischen der Placebo-Gruppe und der Behandlungsgruppe mit der geringsten Dosierung festgestellt (Abb. 4.4c/d).



**Abb. 4.4 Fettmasseveränderung (4.4a), tägliche Fettmasseveränderung (4.4b), Veränderung der fettfreien Masse (4.4c), tägliche Veränderung der fettfreien Masse (4.4d) während des Versuchszeitraumes, gemessen im NMR**

Darstellung: Mittelwerte der Behandlungsgruppen vs. Placebo, Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,

$p < 0,001$ : \*\*\*,  $p < 0,01$ : \*\*,  $p < 0,05$ : \*,  $p > 0,05$ : nicht signifikant

(Sham (S): n=14, Placebo (P): n=76, 0,2 mg/kg/d MYO 302: n=22, 1,0 mg/kg/d MYO 302: n=22, 10,0mg/kg/d MYO 302: n=21, 20,0 mg/kg/d MYO 302: n=16)

#### 4.1.2 Fettgewebe und Skelettmuskulatur

Die Gewichte von epididymalem Fettgewebe (WAT, *white adipose tissue*), braunem Fettgewebe (BAT (*brown adipose tissue*), den vier Muskeln Musculus gastrocnemius, Musculus EDL (*Musculus extensor digitorum longus*), Musculus soleus und Musculus tibialis sowie des Herzens zum Zeitpunkt der Euthanasie zeigten zwischen Sham-Gruppe und tumorinokulierten Gruppen deutliche signifikante Unterschiede (Tab 4.1).

Tab. 4.1 Mittelwerte der Organgewichte der Sham-, Placebo- und Behandlungsgruppen.

Organ-gewicht (mg)	Sham (n=14)	Placebo (n=76)	MYO 302 0,2 mg/kg/d (n=22)	MYO 302 1,0 mg/kg/d (n=22)	MYO 302 10,0 mg/kg/d (n=21)	MYO 302 20,0 mg/kg/d (n=16)
Herz	875,2 ± 23,8	563,2 ± 10,6	566,1 ± 101,9	562,2 ± 21,7	575,4 ± 22,1	572,0 ± 29,0
BAT	280,1 ± 32,0	91,0 ± 3,4	97,2 ± 10,5	93,3 ± 9,4	95,2 ± 6,8	95,1 ± 8,0
M. gastrocnemius	1420,0 ± 31,4	778,8 ± 14,9	821,4 ± 42,6	778,3 ± 50,4	782,0 ± 48,1	772,7 ± 49,8
M. soleus	114,8 ± 2,5	73,4 ± 1,5	77,3 ± 2,3	74,8 ± 3,4	73,5 ± 3,4	72,2 ± 4,1
M. tibialis	477,0 ± 10,4	269,7 ± 5,6	278,5 ± 14,7	264,1 ± 17,7	266,6 ± 17,0	291,3 ± 19,1
M. EDL	119,7 ± 2,5	67,3 ± 1,2	71,4 ± 3,2	65,6 ± 3,9	66,8 ± 3,6	63,9 ± 4,6

Zwischen den Behandlungsgruppen und der Placebo-Gruppe waren jedoch, abgesehen vom epididymalem Fettgewebe, keine Signifikanzen erkennbar. Das Gewicht vom epididymalen Fettgewebe war bei den Behandlungsgruppen mit den geringen Dosierungen signifikant höher ( $p=0,0007$  bei 0,2 mg/kg/d MYO 302 und 10,0 mg/kg/d MYO 302 bzw.  $p=0,0008$  bei 1,0 mg/kg/d MYO 302) im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Abb. 4.6). Shamtiere hatten ein ausgeprägtes epididymales Fettgewebe mit einem durchschnittlichen Gewicht von 1,75 g. Bei den Placebotieren lag das Gewicht des epididymalen Fettgewebes im Durchschnitt bei 0,08 g.

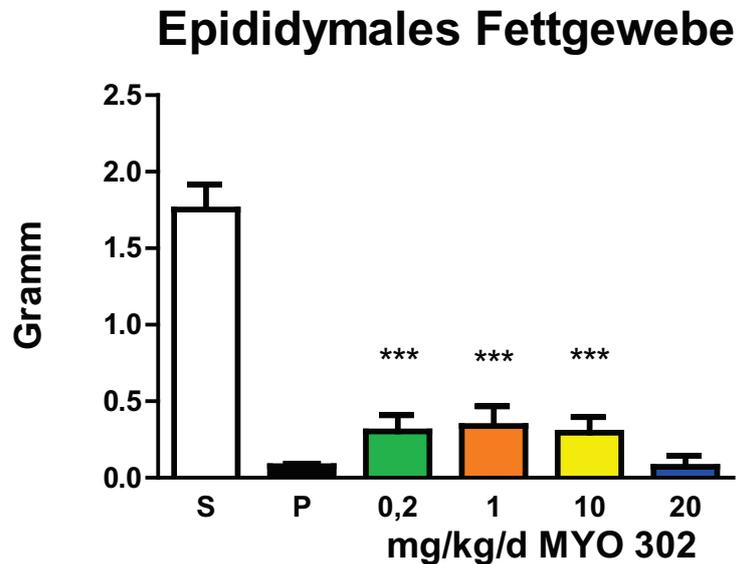


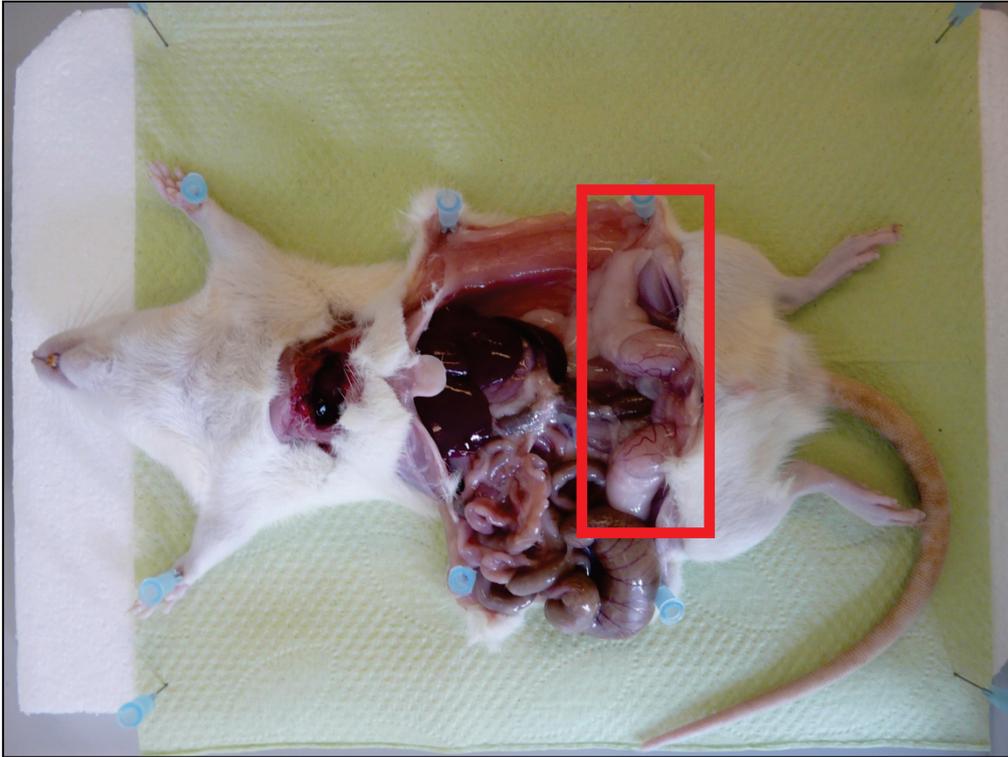
Abb. 4.6 Gewicht des epididymalen Fettgewebes zum Zeitpunkt der Euthanasie

Darstellung: Mittelwerte der Behandlungsgruppen vs. Placebo, Angaben als Mittelwerte ± SEM,

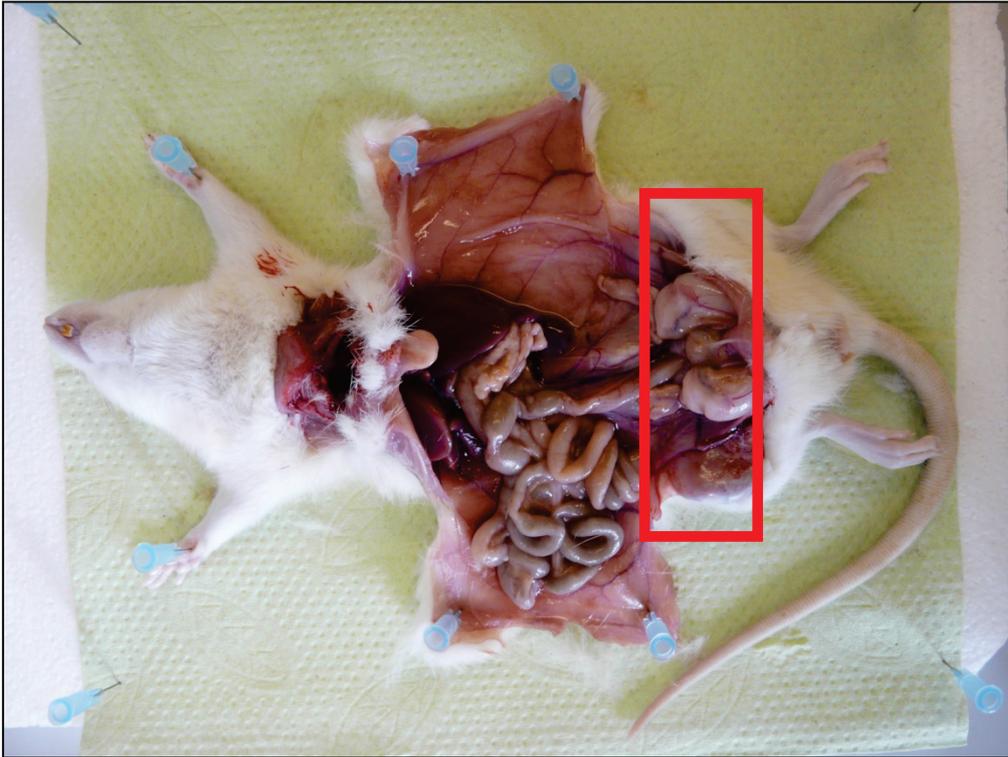
$p < 0,001$ : \*\*\*,  $p > 0,05$ : nicht signifikant

(Sham (S): n=14, Placebo (P): n=76, 0,2 mg/kg/d MYO 302: n=22, 1,0 mg/kg/d MYO 302: n=22, 10,0mg/kg/d MYO 302: n=21, 20,0 mg/kg/d MYO 302: n=16)

Die Abbildungen 4.7a und 4.7b zeigen die deutlichen Unterschiede beim epididymalen weißen Fettgewebe zwischen jeweils einer Ratte der Sham-Gruppe (Abb. 4.7a) und Placeo-Gruppe (Abb. 4.7b). Während der Situs des Sham-Tieres eine ausgeprägte Ansammlung epididymalen Fettgewebes präsentiert, ist dieses bei dem Tier der Placebogruppe nur noch ansatzweise vorhanden.



**Abb. 4.7a Situs eines Sham-Tieres zum Zeitpunkt der Euthanasie zur Darstellung des weißen epididymalen Fettgewebes (siehe rot umrandeter Kasten)**

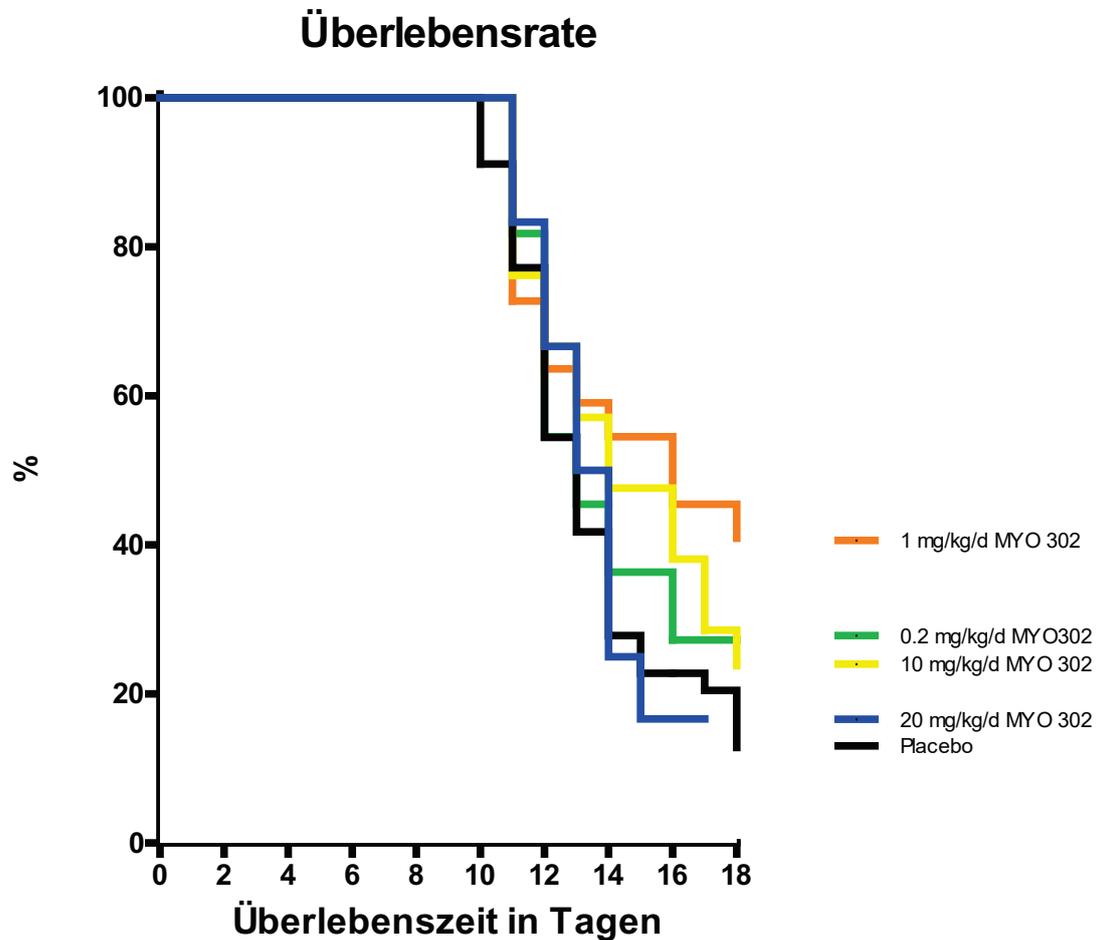


**Abb. 4.7b Situs eines Placebo-Tieres zum Zeitpunkt der Euthanasie zur Darstellung des weißen epididymalen Fettgewebes (siehe rot umrandeter Kasten)**

#### 4.1.3 Mortalität

Abb. 4.8 und Tab. 4.2 zeigen die Überlebensdaten der Behandlungsgruppen und der Placebo-Gruppe. Die höchste Überlebenswahrscheinlichkeit hatte die Behandlungsgruppe mit der Dosis 1,0 mg/kg/d MYO 302 (41%), gefolgt von der Gruppe mit der Dosis 0,2 mg/kg/d MYO 302 (27%) und der Gruppe mit der Dosis 10,0 mg/kg/d MYO 302 (24%). Die Placebogruppe und die Gruppe mit der Dosierung 20 mg/kg/d MYO 302 hatten geringere Überlebenswahrscheinlichkeiten mit 18% bzw. 17%. Die längste mittlere Überlebensdauer wies mit 16 Tagen die Gruppe, welche das Compound MYO 302 in der Dosierung 1,0 mg/kg/d verabreicht bekam, auf. Beim Log-Rank-Test hatte diese Gruppe gegenüber der Placebogruppe einen signifikanten Unterschied in der Überlebenszeit mit  $p=0,03$ . Zwischen den anderen Behandlungsgruppen und der Placebogruppe war die Überlebenszeit statistisch nicht verschieden. Die Hazard Ratio als Vergleich der Hazards (momentane Sterberate) zweier Untersuchungsgruppen liegt bei der Gruppe mit der Dosierung von 1,0 mg/kg/d MYO 302 mit 0,53 am niedrigsten. Das Sterberisiko ist bei dieser Gruppe demzufolge halb so groß wie bei der Placebogruppe. Die Gruppe mit der höchsten

Dosierung hat dagegen mit einer Hazard Ratio von 0.94 ein nahezu ähnliches Sterberisiko wie die Placebogruppe.



**Abb. 4.8 Kaplan-Meier-Kurve für die Placebo- und die Behandlungsgruppen**

(Placebo: n=76, 0,2 mg/kg/d MYO 302: n=22, 1,0 mg/kg/d MYO 302: n=22, 10,0mg/kg/d MYO 302: n=21, 20,0 mg/kg/d MYO 302: n=16)

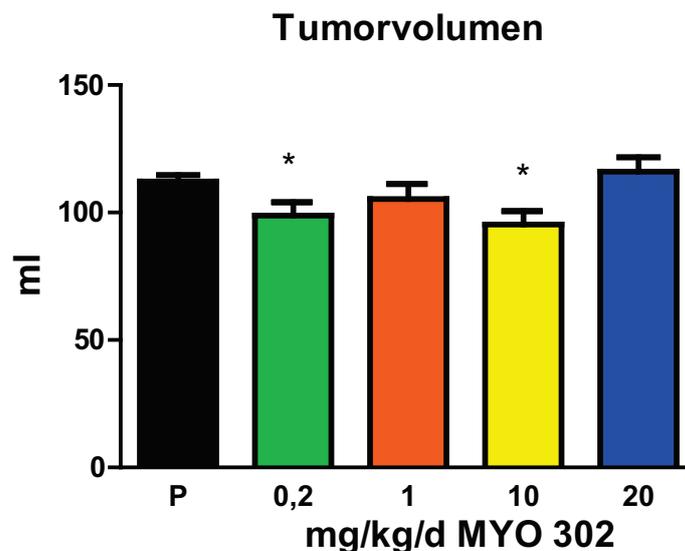
**Tab. 4.2 Überlebensanalyse: Behandlungsgruppen vs. Placebogruppe**

Gruppe	Verstorbene (n)	Überlebende (%)	Hazard Ratio	CI (95%)	p (Log-Rank-Test)	Durchschnittliche Überlebensdauer (d)
<b>Placebo</b> (n=76)	62	18				13
<b>Myo-0,2</b> (n=22)	16	27	0,74	0,42-1,3	0,31	13
<b>Myo-1</b> (n=22)	13	41	0,53	0,30-0,93	0,03*	16
<b>Myo-10</b> (n=21)	16	24	0,68	0,39-1,20	0,18	14
<b>Myo-20</b> (n=16)	10	17	0,94	0,45-1,99	0,63	13,5

p < 0,05: \*, p > 0,05: nicht signifikant; CI=confidence interval

#### 4.1.4 Tumorwachstum

Das Tumolvolumen lag zum Todeszeitpunkt zwischen  $95,3 \pm 5,3$  ml bei der Behandlungsgruppe mit der Dosis von  $10,0$  mg/kg/d MYO 302 und  $116,0 \pm 5,7$  ml bei der Gruppe mit der Dosis von  $20,0$  mg/kg/d MYO 302. Die Behandlungsgruppen mit den Dosierungen  $0,2$  und  $10,0$  mg/kg/d MYO 302 wiesen einfach signifikante geringere Tumorumfänge gegenüber der Placebogruppe (Tumorumfang  $112,2$  ml  $\pm$   $2,5$  ml), aber nicht jedoch gegenüber der Gruppe mit der höchsten Dosierung auf (Abb. 4.9).

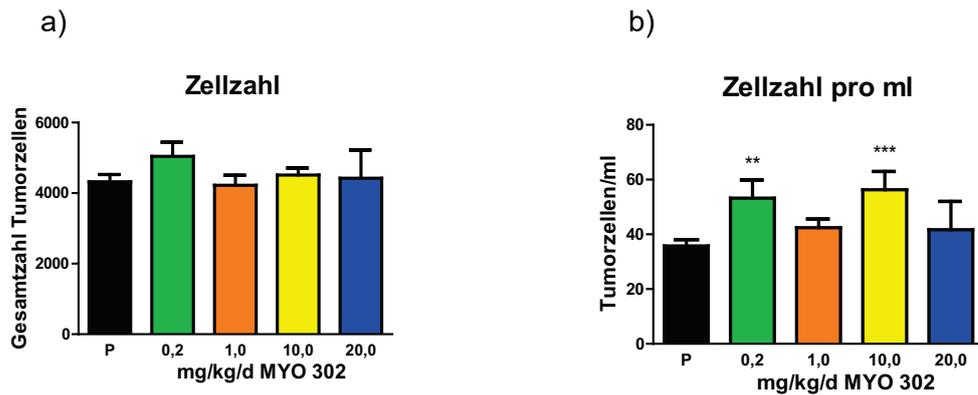


**Abb. 4.9 Tumolvolumen am Tag der Euthanasie**

Darstellung: Mittelwerte der Behandlungsgruppen vs. Placebo, Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ : \*,  $p > 0,05$ : nicht signifikant  
(Placebo:  $n=76$ , Myo 0,2:  $n=22$ , Myo 1:  $n=22$ , Myo 10:  $n=21$ , Myo 20:  $n=16$ )

Hinsichtlich der Gesamtzellzahl in der Tumorfüssigkeit unterschieden sich die einzelnen Gruppen nicht signifikant (Abb. 4.10a). Die Gruppen mit den Dosierungen  $0,2$  und  $10,0$  mg/kg/d MYO 302 hatten neben den geringsten Tumorumfängen die höchste Anzahl an Zellen in der Tumorfüssigkeit. Die Zelldichte betrug bei diesen Gruppen durchschnittlich  $53,3$  Zellen/ml ( $0,2$  mg/kg/d MYO 302) bzw.  $56,3$  Zellen/ml ( $10,0$  mg/kg/d MYO 302). Beide Gruppen unterschieden sich signifikant von der mittleren Zellzahl der Placebogruppe ( $\bar{x}=35,7$  Zellen/ml) (Abb. 4.10b).

Die Zellzahlen konnten nicht von jedem Tier bestimmt werden, da einige zum Zeitpunkt der Tumorentnahme bereits verstorben waren.



**Abb. 4.10 Gesamtzahl Tumorzellen am Tag der Euthanasie (Abb. 4.10a) bzw. Tumorzellen pro ml (Abb. 4.10b)**

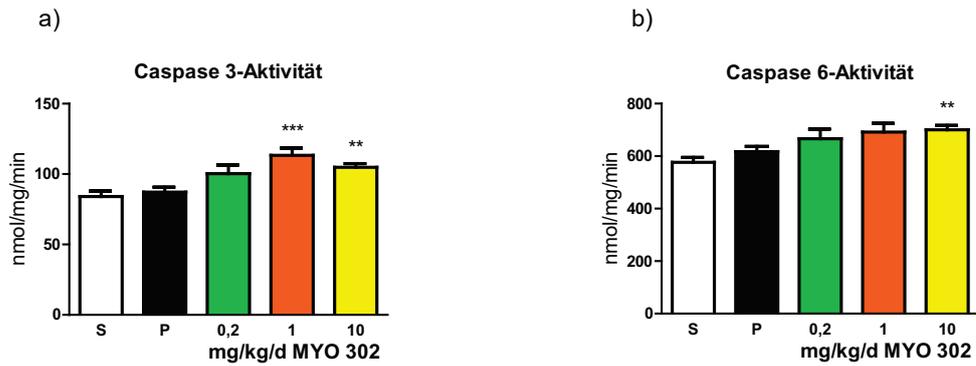
Darstellung: Mittelwerte der Behandlungsgruppen vs. Placebo, Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,

$p < 0,001$ : \*\*\*,  $p < 0,01$ : \*\*,  $p > 0,05$ : nicht signifikant

(Placebo (P):  $n=42$ , 0,2 mg/kg/d MYO 302:  $n=15$ , 1,0 mg/kg/d MYO 302:  $n=19$ , 10,0mg/kg/d MYO 302:  $n=11$ , 20,0 mg/kg/d MYO 302:  $n=7$ )

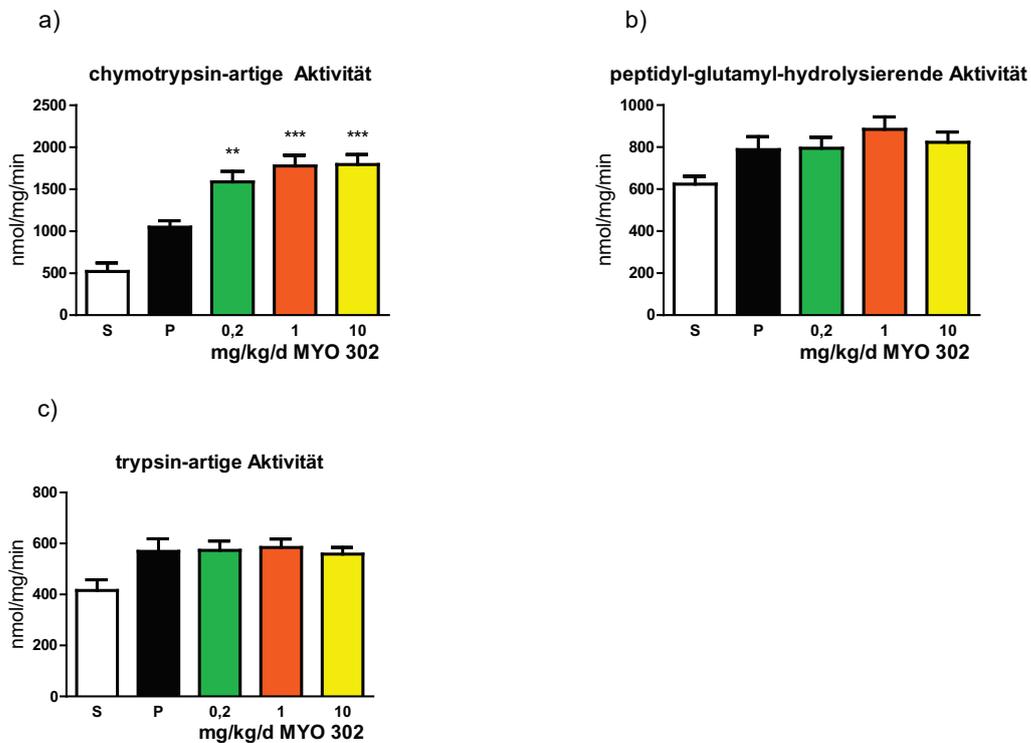
#### 4.1.5 Proteinbiochemie

Zwischen den Behandlungsgruppen und der Placebo-Gruppe traten bei den Caspase-Aktivitäten zum Teil signifikante Unterschiede auf. Alle Behandlungsgruppen wiesen sowohl gegenüber der Placebo- als auch gegenüber der Sham-Gruppe höhere Caspase-3- und Caspase-6-Aktivitäten auf. Die Caspase-6-Aktivität war bei den Behandlungsgruppen mit den mittleren Dosierungen 1,0 und 10,0 mg/kg/d MYO 302 signifikant höher als bei der Placebogruppe (Abb. 4.11a), die Caspase-6-Aktivität war bei der Gruppe mit der Dosis 10,0 mg/kg/d MYO 302 signifikant höher als bei den Placebotieren (Abb. 4.11b). Zwischen Placebo- und Sham-Gruppe wurden keine signifikanten Unterschiede bei den Caspase-Aktivitäten festgestellt. Von der Gruppe 20 mg/kg/d MYO 302 wurden keine Caspase- und Proteasomaktivitäten gemessen



**Abb. 4.11 Caspaseaktivitäten von Sham-, Placebo- und Behandlungsgruppen (Abb. 4.11a: Caspase-3-Aktivität; Abb. 4.11b: Caspase-6-Aktivität)**

Darstellung: Mittelwerte der Behandlungsgruppen vs. Placebo, Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ : \*\*\*,  $p < 0,01$ : \*\*,  $p > 0,05$ : nicht signifikant  
(Sham: n=14, Placebo: n=17, Myo 0,2: n=16, Myo 1: n=20, Myo 10: n=11)



**Abb. 4.12 Proteasomaktivitäten von Sham-, Placebo- und Behandlungsgruppen (Abb. 4.12a: chymotrypsin-artige Aktivität; Abb. 4.12b: peptidyl-glutamyl-hydrolysierende Aktivität; Abb. 4.12c: trypsin-artige Aktivität)**

Darstellung: Mittelwerte der Behandlungsgruppen vs. Placebo, Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $p < 0,001$ : \*\*\*,  $p < 0,01$ : \*\*,  $p > 0,05$ : nicht signifikant  
(Sham: n=14, Placebo: n=17, Myo 0,2: n=16, Myo 1: n=20, Myo 10: n=11)

Abb. 4.12 zeigt die gemessenen Proteasomaktivitäten. Die Proteasomaktivitäten LLVY (chymotrypsin-artige Aktivität) und ZLLE (peptidyl-glutamyl-hydrolysierende Aktivität) waren

bei den Behandlungsgruppen höher als bei der Placebogruppe (Abb. 4.12a/b), bei LLVY waren die Unterschiede signifikant. Die BzVal-Aktivität (trypsin-artige Aktivität) war bei Placebogruppe und Behandlungsgruppen nahezu identisch (Abb. 4.12c). Bei allen drei Aktivitäten zeigte die Sham-Gruppe die geringsten Aktivitätswerte. Die Sham-Gruppe unterschied sich mit ihren geringen Werten sowohl gegenüber der Placebogruppe als auch gegenüber den Behandlungsgruppen signifikant.

## 4.2 Echokardiographiestudie

Im Anschluss an die Überlebensstudie wurde eine Vergleichsstudie zwischen einer mit Placebo behandelten Tumorgruppe und einer mit der Dosierung 1,0 mg/kg/d MYO 302 behandelten Tumorgruppe durchgeführt. Die Dosierung 1,0 mg/kg/d MYO 302 wurde aufgrund der bei diesen Tieren signifikant längeren Lebensdauer in der Überlebensstudie (Kapitel 4.1.3) ausgewählt. Im Rahmen der auf 11 Tage begrenzten Vergleichsstudie wurden neben Gewichtsentwicklung der Tiere und einzelner Organe auch Futter- bzw. Wasserverbrauch, Bewegungsaktivität sowie kardiale Parameter miteinander verglichen.

### 4.2.1 Gewichtsentwicklung und Veränderung der Körperzusammensetzung

Die Behandlungsgruppe und die Placebo-Gruppe zeigten bei den Anfangsgewichten, aufgrund Randomisierung, am Tag 0 keine signifikanten Unterschiede (Abb. 4.13). Das durchschnittliche Gewicht der Placebogruppe lag bei  $190,9 \pm 2,2$  g, das der Behandlungsgruppe bei  $188,7 \pm 2,8$  g.

Die Tiere beider Gruppen verloren im Laufe des 11-tägigen Versuchs deutlich an Gewicht. Das durchschnittliche Endgewicht, abzüglich Tumormasse, der Placebogruppe betrug  $147,7 \pm 3,0$  g (77,4 % vom Anfangsgewicht) gegenüber  $141,4 \pm 2,7$  g (74,9 % vom Anfangsgewicht) der mit dem Compound behandelten Gruppe. Die Behandlungsgruppe wies zu Versuchsende ein durchschnittliches Gesamtgewicht (inklusive Tumor) von  $246,4 \pm 6,1$  g auf, die Placebogruppe dagegen  $243,1 \pm 4,6$  g. Signifikante Unterschiede ließen sich daraus nicht ableiten.

Auch hinsichtlich der Fettmasse sowie fettfreien Masse zu Versuchsbeginn und –ende unterschieden sich beide Gruppen nicht signifikant (Tab. 4.3). Die Compound-Gruppe zeigte gegenüber der Placebogruppe einen geringeren prozentualen Verlust an Fettmasse als auch an fettfreier Masse. Der Fettmasseverlust ist bei der Placebogruppe relativ 3,5fach

höher als der Verlust an fettfreier Masse. Bei der Behandlungsgruppe beträgt dieser Quotient 4,5.

**Tab. 4.3 Darstellung der im NMR gemessene Fettmasse und fettfreie Masse zu Versuchsbeginn und Versuchsende (nach Tumorentnahme) sowie des daraus errechneten gesamten und täglichen Verlusts an Fettmasse und fettfreier Masse**

Parameter	Placebo (n=10)	1,0 mg/kg/d MYO 302 (n=10)
Fettmasse Tag 1 (g)	17,52 ± 0,87	18,01 ± 0,96
Fettmasse Tag 11 (g)	4,64 ± 0,37	5,99 ± 0,68
Fettmasseverlust (g)	-12,88 ± 0,67 (-74% gegenüber Tag 1)	-12,02 ± 0,67 (-67% gegenüber Tag 1)
täglicher Fettmasseverlust (g)	-1,07 ± 0,06	-1,00 ± 0,06
fettfreie Masse Tag 1 (g)	145,8 ± 2,6	144,8 ± 1,6
fettfreie Masse Tag 11 (g)	115,6 ± 3,4	122,4 ± 5,0
Verlust fettfreier Masse (g)	-30,22 ± 2,94 (-21% gegenüber Tag 1)	-22,41 ± 4,22 (-15% gegenüber Tag 1)
täglicher Verlust fettfreier Masse (g)	-2,52 ± 0,24	-1,87 ± 0,35

#### 4.2.2 Organgewichte

Wiederum wurden auch in dieser Studie die Gewichte ausgewählter Organe bzw. Gewebe zu Versuchsende erfasst. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Untersuchungsgruppen waren jedoch nicht zu erkennen (Tab. 4.4).

**Tab. 4.4 Gewichte des Herzens, des epididymalen Fettgewebes, des braunen Fettgewebes sowie ausgewählter Muskeln (Musculus gastrocnemius, Musculus soleus, Musculus EDL, Musculus tibialis)**

Parameter	Placebo (n=10)	1,0 mg/kg/d MYO 302 (n=10)
Herzgewicht (mg)	568,9 ± 22,4	596,0 ± 15,5
Epididymales Fettgewebe (mg)	220,0 ± 53,5	193,7 ± 28,1
Braunes Fettgewebe (mg)	90,7 ± 10,2	87,3 ± 8,4
M. gastrocnemius (mg)	805 ± 22,1	727 ± 29,4
M. soleus (mg)	69,2 ± 4,7	63,8 ± 1,6
M. tibialis (mg)	288,5 ± 7,4	265,4 ± 12,5
M. EDL (mg)	71,0 ± 3,1	68,2 ± 3,7

#### 4.2.3 Bewegungsaktivität

Im Locomotorsystem wurde die Bewegungsaktivität der Tiere erfasst. Insbesondere der Vergleich beider Gruppen zu Versuchsbeginn und Versuchsende soll hier dargelegt

werden. Beide Gruppen zeigten einen ausgeprägten Rückgang der Bewegungsaktivität. Die Placebogruppe zeigte einen Aktivitätsrückgang um  $90,6 \pm 2,4$  %, die mit dem Compound behandelte Gruppe um  $85 \pm 2,2$  %. Eine rechnerische Signifikanz ergibt sich dadurch jedoch nicht.

#### 4.2.4 Futter- und Wasseraufnahme

Die Tiere beider Gruppen zeigten zu Versuchsbeginn eine nahezu identische Futteraufnahme von ca. 20 g pro Tag. Die Wasseraufnahme lag bei 44 ml/Tag/Tier in der Placebogruppe bzw. 42 ml/Tag/Tier in der Compoundgruppe.

Am Tag 11 nach Versuchsbeginn wurden von den Tieren der Placebogruppe  $1,2 \pm 0,5$  g Futter aufgenommen, von den behandelten Tiere  $2,2 \pm 0,8$  g. Der Unterschied ist jedoch nicht signifikant gegenüber der Placebo-Gruppe. Auch die Wasseraufnahme war bei den behandelten Tieren höher, jedoch wiederum nicht signifikant verschieden im Vergleich zur Placebo-Gruppe (Tab. 4.5).

**Tab. 4.5 Veränderung bei Futteraufnahme und Wasseraufnahme zwischen Versuchsende und Versuchsbeginn bei der Placebo- und der Behandlungsgruppe**

Parameter	Placebo (n=10)	1,0 mg/kg/d MYO 302 (n=10)
Futteraufnahme Tag 1 (g)	$19,7 \pm 0,7$	$20,4 \pm 0,7$
Futteraufnahme Tag 11 (g)	$1,2 \pm 0,5$	$2,2 \pm 0,8$
Wasseraufnahme Tag 1 (g)	$43,9 \pm 3,5$	$42,1 \pm 2,4$
Wasseraufnahme Tag 11 (g)	$14,7 \pm 2,7$	$21,3 \pm 3,2$

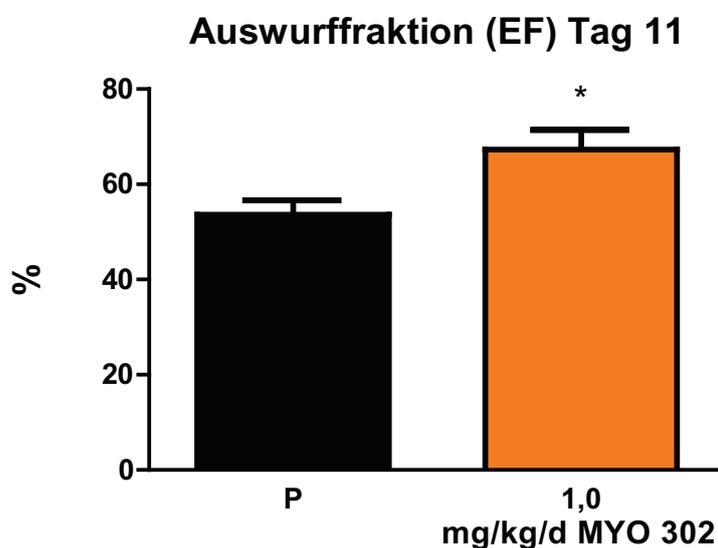
#### 4.2.5 Echokardiographie

Zu Beginn und Ende der Studie wurden mittels Ultraschallgerät echokardiographische Parameter erhoben, um festzustellen, ob sich diese zwischen Placebo- und Behandlungsgruppe unterscheiden. Ein Ultraschall an Tag 11 war nur an den bis dahin überlebenden Tieren möglich.

Die erhobenen Daten sind in Tabelle 4.6 aufgeführt. Signifikante Unterschiede konnten lediglich bei der Auswurffraktion zu Versuchsende festgestellt werden (s. Abb. 4.13). Die Auswurffraktion als Anteil des Gesamtblutvolumens im Herzen war zu Versuchsbeginn bei beiden Gruppen nahezu identisch mit durchschnittlich  $79,33 \pm 1,02$  % bei der Placebogruppe und  $81,03 \pm 0,61$  % bei der Behandlungsgruppe. Im Laufe des Versuchs verringerte sich die Auswurffraktion bei beiden Gruppen bis auf durchschnittlich  $53,63 \pm$

3,04 % bei den Placebotieren bzw.  $67,32 \pm 4,09$  % bei den compoundbehandelten Tieren ( $p=0,012$ ).

Die Prozentzahlen in der Tabelle geben die relative Veränderung des jeweiligen Parameters im Laufe des Versuchs an. Nahezu alle Parameter veränderten sich bei beiden Gruppen im Versuchszeitraum. Bei beiden Gruppen weist das Herz zu Versuchsbeginn eine geringere Verkürzung (FS) im Vergleich zu Versuchsende auf. Während an Tag 0 das *fractional shortening* bei über  $45,2 \pm 0,7$  % (Placebogruppe) bzw.  $48,5 \pm 1,3$ % (Behandlungsgruppe) liegt, beträgt es an Tag 11 nur noch  $29,4 \pm 2,0$ % bei der Placebogruppe und  $36,5 \pm 3,3$ % bei der Behandlungsgruppe. Eine deutliche Reduktion um 43,5% bei den Placebotieren bzw 46,7% bei den Behandlungstieren ist auch bei der Herzrate festzustellen, welche bei beiden Gruppen zu Versuchsbeginn bei >400 Schlägen pro Minute ( $424,6 \pm 6,3$  bpm bei der Placebogruppe bzw.  $436,9 \pm ,2$  bpm bei der Behandlungsgruppe) lag, zu Versuchsende auf <240 Schläge pro Minute ( $239,7 \pm 33,1$  bpm bei der Placebogruppe bzw.  $233,0 \pm 67,8$  bpm bei der Behandlungsgruppe) sank. Ähnlich starke Veränderungen wurden auch beim Herzschlagvolumen (LV SV) festgestellt. Hier betrug die Reduktion 64,1% (Placebogruppe) bzw. 56,9% (Behandlungsgruppe). Das durch Multiplikation aus Herzrate und Schlagvolumen berechnete Herzminutenvolumen (CO) spiegelt diesen Rückgang ebenso wieder.



**Abb. 4.13 Darstellung der Auswurfraction des Herzens zu Versuchsende bei der Placebo- und der Behandlungsgruppe**

Darstellung: Mittelwerte Gruppe Behandlungsgruppe vs. Placebogruppe, Angaben als Mittelwerte  $\pm$  SEM,  $p < 0,05$ : \*

(Placebo (P):  $n=7$ , 1,0 mg/kg/d MYO 302:  $n=4$ )

**Tab. 4.6 Darstellung der während der Echokardiographie ermittelten Parameter zu Versuchsbeginn (Tag 0) und Versuchsende (Tag 11)**

p < 0,05: \*, p > 0,05: nicht signifikant

Parameter		Placebo (Tag 0 n=10, Tag 11 n=7)	1,0 mg/kg/d MYO 302 (Tag 0 n=10, Tag 11 n=4)
EF (%)	Tag 0	79.33 ± 1.02	81.03 ± 0.61
	Tag 11	53.63 ± 3.04	67.32 ± 4.09*
	Veränderung (%)	-32,4	-16,9
FS (%)	Tag 0	45.19 ± 0.73	48.50 ± 1.27
	Tag 11	29.44 ± 1.99	36.54 ± 3.33
	Veränderung (%)	-34,9	-24,7
CO (ml/min)	Tag 0	78,76 ± 3,72	84,43 ± 1,93
	Tag 11	16,98 ± 2,77	18,52 ± 5,91
	Veränderung (%)	-78,4	-78,1
LV ESD (mm)	Tag 0	3.621 ± 0.057	3.327 ± 0.125
	Tag 11	3.713 ± 0.302	3.595 ± 0.303
	Veränderung (%)	+2,5	+8,1
LV EDD (mm)	Tag 0	6.606 ± 0.064	6.449 ± 0.097
	Tag 11	5.236 ± 0.325	5.638 ± 0.202
	Veränderung (%)	-20,7	-12,6
IVS sys (mm)	Tag 0	2.528 ± 0.091	2.697 ± 0.058
	Tag 11	2.181 ± 0.124	2.425 ± 0.144
	Veränderung (%)	-13,7	-10,1
IVS dia (mm)	Tag 0	1.325 ± 0.053	1.264 ± 0.041
	Tag 11	1.526 ± 0.155	1.358 ± 0.083
	Veränderung (%)	+15,2	+7,4
LV PW sys (mm)	Tag 0	0.962 ± 0.044	1.037 ± 0.026
	Tag 11	1.084 ± 0.054	1.140 ± 0.082
	Veränderung (%)	+12,7	+9,9
LV PW dia (mm)	Tag 0	0.830 ± 0.056	0.788 ± 0.028
	Tag 11	0.920 ± 0.110	0.933 ± 0.174
	Veränderung (%)	+10,8	+18,4
LV SV (µl)	Tag 0	184.9 ± 6.88	193.1 ± 2.29
	Tag 11	66.32 ± 6.93	83.19 ± 9.56
	Veränderung (%)	-64,1	-56,9
HF (bpm)	Tag 0	424.6 ± 6.27	436.9 ± 7.23
	Tag 11	239.7 ± 33.12	233.0 ± 67.75
	Veränderung (%)	-43,5	-46,7
LV mass (mg)	Tag 0	493.4 ± 18.3	457.7 ± 18.4
	Tag 11	396.6 ± 38.2	375.6 ± 31.4
	Veränderung (%)	-19,6	-17,9

## 5 Diskussion

Tumorerkrankungen gehen beim Menschen, abhängig von dem betroffenen Organ, oft mit einer mehr oder weniger ausgeprägten Kachexie einher. Das Auftreten einer tumorassoziierten Kachexie verringert die Überlebensrate des Patienten und wirkt sich negativ auf die Lebensqualität aus [31]. Bislang wurde mit keinem der in Tierversuchen als auch bereits beim Menschen eingesetzten Wirkstoffe eine ausreichend befriedigende Option zur Therapie und Prävention von Tumorkachexie erzielt.

In der durchgeführten Studie wurde die Wirkung eines Aldosteronantagonisten als potentiell Therapeutikum bei tumorassoziiert Kachexie im Rattenmodell untersucht. Dazu wurden insbesondere folgende Parameter vergleichend mit einer Placebo- und Shamgruppe untersucht:

- Überlebensrate
- Tumoreigenschaften
- Gewichtsveränderung im Laufe des Versuchs
- Gewichte ausgewählter Organe
- Körperzusammensetzung
- „quality of Life“-Indikatoren
- proteinbiochemische Zelldegradationsfaktoren
- Herzfunktion

Beim Yoshida-AH-130-Hepatoma-Modell der Ratte handelt es sich um ein etabliertes, reproduzierbares Tumor-Kachexie-Modell. Die Tumorzellzahl steigt von Tag 2 bis 7 nach der Injektion exponentiell an, bis sich danach eine Plateauphase einstellt [238, 239]. Im Zuge der Tumorzellteilung stellt sich ein Aszites ein und die Tiere verlieren massiv an Fett- und Muskelmasse. Der Tod tritt in der Regel nach 12-16 Tagen ein, wenn die Tiere unbehandelt bleiben [240, 241], was in der vorliegenden Studie an der Placebogruppe bestätigt werden konnte.

### 5.1 Überlebensrate

Die vier Dosierungen des Compounds MYO 302 unterschieden sich untereinander in ihrer Wirkung auf die Überlebenswahrscheinlichkeit. Die Überlebenswahrscheinlichkeit der Placebogruppe lag mit 18% annähernd bei derjenigen der 20,0 mg/kg/d-MYO 302-Gruppe

mit 17%. Tiere, welche mit der Dosis 1,0 mg/kg/d MYO 302 behandelt wurden, hatten die höchste Überlebenswahrscheinlichkeit mit 41%, welche sich signifikant von der Überlebenswahrscheinlichkeit der Placebogruppe unterscheidet.

Die tumorbegleitende Therapie mit dem Compound MYO 302 hat dosisabhängig einen Effekt auf das Überleben der Tiere. Die geringste Dosierung von 0,2 mg/kg/d MYO 302 bewirkt offenbar nur eine subtherapeutische Wirkung, ohne signifikanten Unterschied zur Placebogruppe. Die Überlebenswahrscheinlichkeit unterscheidet sich lediglich um 9%. Ähnlich verhält es sich mit der Dosierung 10,0 mg/kg/d MYO 302 mit einem Unterschied in der Überlebenswahrscheinlichkeit im Vergleich zu Placebogruppe von 6%, was auf eine Überdosierung des Compounds schließen lässt. Offenbar kommt es mit einer weiteren Dosiserhöhung, wie auch bei der Gruppe mit der höchsten Dosierung dargestellt, zu keiner therapeutischen Wirkung. Neben einer Überdosierung könnte auch das Auftreten von Nebenwirkungen den therapeutischen Effekt überdecken. Ob eine darüberhinausgehende Dosis zu einer möglichen Verringerung der Überlebenswahrscheinlichkeit führt, bleibt ungeklärt. Eine Dosiserhöhung über 1,0 mg/kg/d MYO 302 hinaus führt zunehmend zu höheren Mortalitätsraten.

Aldosteronantagonisten, wie Spironolacton, Canrenon und Eplerenon werden üblicherweise zur Behandlung von Hyperaldosteronismus, welcher mit einem Aszites einhergeht, sowie bei Bluthochdruck, Herzinsuffizienz und Leberzirrhose eingesetzt. MYO 302 als neuartiger Aldosteronantagonist hat offenbar bei einer Dosierung von 1,0 mg/kg/d eine positive Wirkung auf die tumortragenden Ratten. Möglicherweise ist diese Wirkung auf eine Protektion des Herzens (siehe auch Kapitel 5.8) zurückzuführen, da auch hier die Behandlung mit dem Compound eine signifikant höhere Auswurfraction bewirkt und somit eine Herzinsuffizienz hinauszögert.

Ähnlich sind die Ergebnisse bei Betrachtung der Überlebenszeit. Die Gruppe mit der Dosis von 1 mg/kg/d MYO 302 hatte die längste mittlere Überlebenszeit von 16 Tagen. Darauf folgt mit 14 Tagen die Gruppe mit 10,0 mg/kg/d MYO 302. Die geringste durchschnittliche Überlebenszeit hatten die Tiere der Placebogruppe und der Gruppe mit der geringsten Dosis mit jeweils 13 Tagen. Dies lässt auch hinsichtlich der Überlebenszeit auf einen dosisabhängigen Effekt schließen. Es zeigt sich, dass eine geringe Dosis von 0,2 mg/kg/d MYO 302 keinen Einfluss auf die Überlebenszeit hat. Höhere Dosen als 1,0 mg/kg/d MYO 302 erhöhen die Überlebenszeit gegenüber einer placebobehandelten Gruppe nur gering. In der Gruppe mit einer Dosis von 1,0 mg/kg/d MYO 302 überlebten die meisten Tiere bis

zum eigentlichen Versuchsende am Tag 18. In den anderen Gruppen waren an Tag 18 nur noch 20-25% der Tiere am Leben.

Studienergebnisse mit der Anwendung von Aldosteronantagonisten auf die Behandlung der Tumorkachexie im Tiermodell liegen bislang nur aus einer Publikation von Springer et al. vor [242]. Hier wurden die Verabreichung von Spironolacton, Bisoprolol und Imidapril und ihr Einfluss auf Herzparameter im Rattenmodell untersucht. Vergleiche lassen sich deshalb fast ausschließlich nur mit Untersuchungen anführen, welche auch das Yoshida AH-130-Hepatoma-Modell bzw. weitere Tumormodelle, jedoch mit der Anwendung anderer Wirkstoff(gruppen), anwenden.

Schmidt et al. untersuchten die Wirkung von IGF-1 auf die Kachexieentwicklung von tumortragenden Ratten [243]. Hier überlebten die Placebotiere im Mittel 12 Tage und die IGF-1-behandelten Tiere mit einer Dosis von 0,3 mg/kg/d hatten eine mittlere Überlebenszeit von 14 Tagen.

Eine weitere Studie, welche im gleichen Modell den Einfluss mehrerer Xanthinoxidasehemmer sowie Betablocker, sowohl in Mono- als auch in Kombinationstherapie, untersuchte, zeigte eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 5,4% für die Placebogruppe, für die Bisoprolol-behandelte (5 mg/kg/d) Gruppe 62,%, für die Oxypurinol-behandelte (4mg/kg/d) Gruppe 54,5%. Die mit einer Kombination aus beiden Wirkstoffen behandelten Gruppen hatten Überlebenswahrscheinlichkeiten zwischen 25% und 27,3% [244]. Die Monotherapie von Allopurinol in einer Dosierung von 40 mg/kg/d hatte eine Überlebenswahrscheinlichkeit von 54,5% zur Folge [245].

Tschirner et al. untersuchten die Wirkung von Ursodeoxycholsäure (UDCA) in unterschiedlichen Dosierungen im Kachexie-Rattenmodell [246]. Das mittlere Überleben der Placebotiere lag bei 12 Tagen, dasjenige der UDCA-behandelten Tiere bei 13 Tagen (25 mg/kg/d) bzw. 13.5 Tagen (100 mg/kg/d).

Saitoh et al. [247] wendeten im o.g. Kachexiemodell die Verabreichung von Erythropoetin an. Sie stellten dabei fest, dass die Gabe von sowohl 500 als auch 5000 Units EPO die Mortalität gegenüber der Placebogruppe reduziert.

Ebenso zeigen die Untersuchungen von Toledo et al. [248] im Rattenmodell der Tumorkachexie, dass die Verabreichung von Sorafenib, ein Proteinkinaseinhibitor zur Behandlung von Krebs in der Humanmedizin, das Überleben der Tiere signifikant im

Vergleich zur unbehandelten Gruppe verlängert. Sorafenib verlängerte die Überlebenszeit der behandelten Tiere auf bis zu 33 Tage, während die unbehandelte Gruppe lediglich bis zu 12 Tage überlebte.

Im Colon 26-Tumormodell der Maus wurde die Anwendung einer Behandlung mit einem „Cocktail“ aus Antioxidantien getestet. Die Antioxidantien wurden oral verabreicht. Neben einem negativen Effekt auf die Entwicklung des Körpergewichtes war auch die Überlebensrate bei den behandelten Tieren im Vergleich zur unbehandelten Tumorguppe signifikant geringer [249].

## **5.2 Tumorparameter**

Das Tumolvolumen der Placebogruppe lag im Vergleich zur Gruppe mit der Dosis 1,0 mg/kg/d MYO 302 etwas höher, im Vergleich zur Gruppe mit der Dosis 20,0 mg/kg/d MYO 302 etwas niedriger. Eine signifikante therapeutische Wirkung war somit bei den entsprechenden Dosierungen nicht feststellbar. Die Gruppen mit den Dosierungen 0,2 mg/kg/d und 10,0 mg/kg/d MYO 302 hatten signifikant geringere Tumorumina, was eine Wirkung des Compounds auf das Tumolvolumen nahelegt. Ein direkter Zusammenhang zwischen Tumolvolumen und Überlebenszeit scheint jedoch nicht zu bestehen.

Neben dem Tumolvolumen wurde auch die Zellzahl pro Milliliter Tumorfüssigkeit ermittelt. Die höchsten Zellzahlen/ml wurden bei den Gruppen mit den Dosierungen 0,2 und 10,0 mg/kg/d MYO 302 nachgewiesen, welche sich signifikant von der Zellzahl der Placebogruppe unterschieden. Beide Compoundgruppen hatten damit vermutlich deutlich höhere Mitoseraten als die Placebogruppe und auch die anderen Behandlungsgruppen. Im Vergleich zu anderen Studien, welche am gleichen Tumorkachexiemodell durchgeführt wurden [173, 244] wiesen die Placebo- und Behandlungstiere der vorliegenden Untersuchung ähnlich hohe durchschnittliche Tumorumina auf.

## **5.3 Gewichtsveränderung während des Versuchs**

### *Überlebensstudie*

Zu Beginn der Überlebensstudie waren die Anfangsgewichte der Versuchstiere, trotz Randomisierung, nicht ohne signifikante Unterschiede. Die Gruppe mit der Dosierung 10,0 mg/kg/d MYO 302 unterschied sich gering signifikant zur Placebogruppe. Die Anfangsgewichte bei den Gruppen lagen  $188,0 \pm 2,1$  g und  $201,2 \pm 4,2$  g. Deutliche

Signifikanzen traten, wie erwartet, zu Versuchsende zwischen der Sham-Gruppe und den anderen Gruppen auf. Während die Sham-Tiere naturgemäß an Gewicht zunahmten, zeigten die Placebo- und die Behandlungsgruppen eindeutige Gewichtsabnahmen bei der Gewichtsmessung ohne Tumorflüssigkeit. Die Gruppen mit den geringen Dosierungen unterschieden sich dabei signifikant von der Placebogruppe durch eine geringere Gewichtsabnahme. Hier spiegeln sich die Ergebnisse aus der Mortalitätsberechnung wieder. Eine geringere Gewichtsabnahme senkt das Mortalitätsrisiko. Bei der Dosierung von 20,0 mg/kg/d MYO 302 könnte es sich um eine sich nachteilig auswirkende Überdosierung des Compounds handeln. Die tägliche Gewichtsveränderung zeigte ein ähnliches Bild wie die Gesamtgewichtszu- bzw. -abnahme über den Versuchszeitraum. Auch hatten die Gruppen mit den niedrigen Dosierungen einen signifikant geringeren Gewichtsverlust als die Placebogruppe.

Da Aldosteronantagonisten vermutlich keinen direkten Einfluss auf das Körpergewicht haben, müssen andere Wirkmechanismen bzw. Nebeneffekte eine Rolle bei der signifikant geringeren Gewichtsabnahme der Behandlungsgruppen, abgesehen von der Gruppe mit einer Dosis von 20,0 mg/kg/d MYO 302, gegenüber der Placebogruppe spielen. In der Literatur wurden bislang keine Wirkmechanismen einer Aldosteronantagonistbehandlung auf Fett- bzw. Muskelmasse beschrieben. Möglicherweise besteht hier jedoch ein protektiver Effekt.

Hartmann konnte in seiner Dissertation zur Wirkung von Xanthinoxidasehemmern im Tumorkachexiemodell ebenso feststellen, dass die behandelten Tiere dosisabhängig einen signifikant geringeren Gewichtsverlust gegenüber der Placebogruppe über den Versuchszeitraum aufwiesen [244, 245, 250]. Sowohl unter der Behandlung mit Allopurinol in der Dosierung 40,0 mg/kg/d als auch mit Oxypurinol in der Dosierung 4,0 mg/kg/d zeigten die Tiere einen deutlich schwächer ausgeprägten Gewichtsverlust von weniger als der Hälfte im Vergleich zur Placebogruppe. Die Dosis von 40 mg/kgd Oxypurinol unterschied sich dagegen nicht signifikant zur Placebobehandlung.

Ein ähnliches Bild zeigen die Ergebnisse von Schmidt [173], die den Einfluss von IGF-1 sowie Bisoprolol im Tumorkachexiemodell untersuchte. Die Tiere wurden sowohl mit IGF-1 und Bisoprolol als Monotherapie sowie mit der Kombination beider Wirkstoffe behandelt. Alle Behandlungsgruppen hatten signifikant geringere Gewichtsverluste als die Placebogruppe.

Die Verabreichung von Erythropoietin im gleichen Modell führte zu einem signifikant geringeren Gewichtsverlust im Vergleich zur Placebogruppe, unabhängig von der Dosis EPO 500 Einheiten/d bzw. EPO 5000 Einheiten /d [247]. Ebenso konnten auch Musolino et al. feststellen, dass die Gabe von Megestrolacetat den Gewichtsverlust von tumortragenden Ratten um ca. zwei Drittel reduziert [251].

#### *Echokardiographiestudie*

Die Ergebnisse aus der Überlebensstudie ließen sich nach 11 Tagen nicht reproduzieren. Zwischen der Behandlungsgruppe (Dosis 1,0 mg/kg/d MYO 302) und der Placebogruppe waren im Endgewicht, sowohl mit als auch ohne Tumorflüssigkeit, keine signifikanten Unterschiede feststellbar. Die erwartete, jedoch nicht bestätigte, geringere Gewichtsabnahme der Behandlungsgruppe könnte auf die zeitlich verkürzte Behandlungsdauer zurückgeführt werden. Offenbar wurde innerhalb der 11 Tage kein ausreichend hoher Wirkspiegel des Compounds erreicht, um messbar einen Einfluss auf das Körpergewicht auszuüben. Springer et al. konnten zudem nachweisen, dass der Großteil des Gewichtsverlustes erst nach Tag 11 auftritt [242].

Springer et al. beschreiben die Wirkung von Bisoprolol, Spironolacton und Imidapril im gleichen Tumorkachexiemodell und konnten am Tag 11 bei allen drei Wirkstoffen einen signifikanten Unterschied im Gewichtsverlust gegenüber der Placebogruppe feststellen [242]. Die Behandlung von Ratten mit Spironolacton in der Dosis 50 mg/kg/d hatten dabei mit durchschnittlich  $21,0 \pm 11,0$  g den geringsten Verlust an Körpergewicht, gefolgt von den Tieren, die mit Bisoprolol ( $21,9 \pm 10,5$  g Verlust an Körpergewicht) bzw. Imidapril ( $30,0 \pm 14,1$  g Verlust an Körpergewicht) behandelt wurden. Die Placebotiere verloren bis zum Tag 11 in diesem Experiment  $53,7 \pm 1,8$  g an Körpergewicht.

## **5.4 Körperzusammensetzung**

#### *Überlebensstudie*

Erwartungsgemäß zum Gewichtsverlust des weißen epididymalen Fettgewebes weisen auch die Daten der NMR-Messung einen deutlichen Fettmasseverlust der tumorinokulierten Tiere auf. Es zeigt sich auch hier, dass die Gruppen mit den niedrigen Dosierungen signifikant geringere Verluste an Fettgewebe haben als die Placebogruppe. Die Unterschiede sind bei den Gruppen mit den Dosierungen 0,2 und 10,0 mg/kg/d MYO 302 hochsignifikant. Die Veränderungen in der Masse des Fettgewebes zeigen sich nicht nur

beim Vergleich zwischen Anfangs- und Endgewicht, sondern auch bei den täglichen Verlusten an Fettmasse.

Die Betrachtung der fettfreien Masse, welche vor allen durch die gesamte Skelettmuskulatur repräsentiert wird, fällt anders aus. Alle Behandlungsgruppen, außer die Gruppe mit der hohen Dosis, hatten geringere Verluste an fettfreier Masse gegenüber der Placebogruppe im Lauf des Versuchs aufzuweisen. Jedoch war der Unterschied lediglich bei der Gruppe mit der Dosis 0,2 mg/kg/d MYO 302 im Vergleich zur Placebogruppe signifikant. Die Signifikanz geht bei der Darstellung der mittleren täglichen Verluste an fettfreier Masse verloren.

Die Behandlung von Ratten mit IGF-1 im Tumorkachexiemodell hatte keine Auswirkung auf die Fettmasse in der NMR-Messung [243]. Dagegen zeichnete sich ein signifikant geringerer Verlust an Skelettmuskelmasse im Vergleich zur Placebogruppe ab. Eine Studie zur Therapie der Tumorkachexie an Ratten mit Allopurinol (40,0 mg/kg/d) und Oxypurinol (4 mg/kg/d) wies sowohl hinsichtlich Fettmasse und fettfreier Masse deutlich geringere Verluste nach [245]. Palus et al. wiesen ebenso durch die Behandlung von Ratten mit Simvastatin (ein Cholesterinsenker) im Tumorkachexiemodell eine reduzierte Gewichtsabnahme sowie geringe Verluste an Fettmasse und fettfreier Masse nach [256]. Toledo et al. zeigen, dass die Verabreichung von Formoterol ( $\beta_2$ -Agonist) zu einer Reduktion des Verlustes an fettfreier Masse führt, jedoch keinen Einfluss auf den Fettmasseverlust hat [206].

#### *Echokardiographiestudie*

Die Ergebnisse der verkürzten Studie mit definiertem Endpunkt wiesen keine Unterschiede im Verlust an Fettmasse sowie fettfreier Masse zwischen Placebogruppe und Behandlungsgruppe auf. Tendenziell zeigt sich bei der Behandlungsgruppe eine geringfügig kleinere Differenz zwischen Anfangs- und Endgewicht im Vergleich beider Gruppen. Das Einschmelzen des Fettgewebes läuft stärker ab als eine Reduktion der fettfreien Gewebe.

Die Überlebensstudie zeigt aufgrund der signifikanten Unterschiede im Fettmasseverlust zwischen Placebogruppe und zumindest drei der Behandlungsgruppen einen deutlichen Einfluss der Medikation. Die Dosis von 20 mg/kg/d MYO 302 hat offenbar keinen Effekt auf den Fettmasseverlust bzw. könnte bereits toxisch wirken. Auf die fettfreie Masse fällt die Compoundwirkung deutlich geringer aus. Dies legt nahe, dass der Wirkstoff seinen

Wirkmechanismus vorrangig direkt oder indirekt in Adipozyten entfaltet und es durch die Behandlung zu einer verringerten Lipolyse kommt, die wiederum auf eine verbesserte Herzfunktion mit einhergehender Sympathikusaktivierung beruht. In der verkürzten Echokardiographiestudie treten die Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen nicht zutage. Dies deutet darauf hin, dass gravierende Unterschiede erst nach Tag 11 auftreten.

## 5.5 Gewichte ausgewählter Organe

### *Überlebensstudie*

Im Rahmen der Sektion wurden von den euthanasierten Tieren einzelne Muskeln sowie das Herz, das braune Fettgewebe und einseitig das epididymale weiße Fettgewebe entnommen. Abgesehen vom weißen Fettgewebe wurden bei der Gewichtsmessung der einzelnen Organe bzw. Gewebe keine signifikanten Unterschiede zwischen Placebogruppe und Behandlungsgruppen festgestellt. Die Sham-Gruppe hatte hochsignifikant höhere Organgewichte aufzuweisen als die Tumorgruppen.

Die Gruppen mit den Dosierungen 0,2 mg/kg/d, 1,0 mg/kg/d und 10 mg/kg/d MYO 302 hatten mehr weißes Fettgewebe zum Zeitpunkt der Euthanasie als die Placebotiere und die Gruppe mit der Dosis 20,0 mg/kg/d MYO 302. Wie bei der Betrachtung des Gesamtgewichts zu Versuchsende (siehe auch Kapitel 5.3) kann auch hier von einer nachteiligen Überdosierung des Wirkstoffs bei der Dosierung 20 mg/kg/d MYO 302 ausgegangen werden. Möglicherweise kann dies auf ein erhöhtes Ansprechen des weißen Fettgewebes auf die Behandlung zurückgeführt werden. Unklar ist in diesem Zusammenhang, welche biochemischen Signalwege dabei beteiligt sind.

Hartmann [244] konnte in seiner Studie zur Therapie der Tumorkachexie mit Xanthinoxidasehemmern nachweisen, dass eine Behandlung signifikante höhere Organgewichte im Vergleich zur Placebogruppe bewirkt. In seiner Untersuchung hatte nicht nur das epididymale Fettgewebe, sondern auch die Muskeln M. gastrocnemius, M. EDL und M. tibialis sowie das braune Fettgewebe signifikant höhere Gewichte. Elkina et al. beschreiben am vorliegenden Tumorkachexiemodell einen geringeren Verlust von braunem und weißem Fettgewebe unter der Therapie von Tandospiron (10,0 mg/kg/d) im Vergleich zur Placebogruppe [252]. Die Anwendung von UDCA im Tumorkachexiemodell hatte keine Auswirkungen auf einen potentiellen geringeren Verlust an epididymalem und braunem Fettgewebe [246].

## *Echokardiographiestudie*

Wie bereits im Kapitel 5.3 bei der Veränderung des Gesamtgewichts beschrieben, waren auch bei Organen/Gewebe keine signifikanten Unterschiede zum festgelegten Tötungszeitpunkt vorzuweisen. Auch konnten bei Betrachtung des weißen Fettgewebes keine nennenswerten Gewichtsunterschiede festgestellt werden. Der kurze Zeitraum von 11 Tagen Wirkstoffverabreichung könnte auch hier für die fehlende Ausprägung von Unterschieden verantwortlich sein. Offenbar äußern sich die Differenzen zwischen Behandlungs- und Placebogruppe erst nach längerer Wirkstoffgabe.

Penna et al. untersuchten die Wirkung des Proteasominhibitors Bortezomib im Tumorkachexiemodell und stellten dabei keine Gewichtsunterschiede bei *M. gastrocnemius* zwischen behandelten und unbehandelten Tieren an Tag 7 nach Tumorinokulation fest [253]. Dagegen zeigten Toledo et al., dass eine Formoterolbehandlung insbesondere bei den Muskeln *M. gastrocnemius* und *M. tibialis* signifikant sieben Tage nach Tumorzellinjektion signifikant höhere Gewichte aufwiesen als die unbehandelte Gruppe [254].

Auch eine Studie, welche die Anwendung von Febuxostat, ein Xanthin-Oxidase-Inhibitor, zeigt an Tag 11 nach Tumorinokulation keine Unterschiede bei den vier untersuchten Muskeln (*M. gastrocnemius*, *M. tibialis*, *M. EDL*, *M. soleus*) [255].

## **5.6 Quality of Life-Indikatoren**

Die Daten zur Beurteilung der Lebensqualität der Tiere wurden nur bei den Tieren der verkürzten Studie vorgenommen. Die Einschätzung der Lebensqualität ist bei Tieren im Gegensatz zum Menschen nicht ohne weiteres objektiv möglich. Als Parameter wurden hierzu die Bewegungsaktivität, die Futter- und die Wasseraufnahme herangezogen. Damit wird angenommen, dass die Bewegungsaktivität und die Nahrungsaufnahme mit dem Wohlbefinden positiv korrelieren.

Die Placebogruppe zeigte innerhalb der elf Tage einen Aktivitätsrückgang um 90%. Derjenige der Behandlungsgruppe lag geringfügig darunter bei 85%. Ein signifikanter Unterschied war dabei nicht zu ermitteln. Ähnlich verhielt es sich mit der Futter- bzw. Wasseraufnahme. Während beide Gruppen zu Versuchsbeginn annähernd dieselbe Menge an Futter bzw. Wasser aufnahmen, waren zu Versuchsende die Unterschiede zwischen den Gruppen zwar ersichtlich, jedoch nicht statistisch abgesichert.

Die Daten zur Lebensqualität zeigen lediglich Tendenzen auf, wobei die Tiere der Behandlungsgruppe dabei eine offenbar höhere Lebensqualität aufweisen. Wird der Versuchszeitraum verlängert, stellen sich die Unterschiede möglicherweise deutlicher und statistisch gesichert dar. Dazu sind Wiederholungs- bzw. Ergänzungsversuche notwendig.

Toledo et al. beschreiben für das Yoshida AH-130 Aszites Hepatoma Modell eine normale Futteraufnahme bis zum Tag nach Tumorinokulation. Danach sinkt die Futteraufnahme rapide bis zum Erreichen der Abbruchkriterien [257]. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für die Bewegungsaktivität festgestellt werden.

Wie oben beschrieben, hat der Wirkstoff lediglich einen Einfluss auf die Fettgewebe. Ein Masseverlust von Skelettmuskulatur legt nahe, dass die Lebensqualität, hier vor allem die Bewegungsaktivität, stärker reduziert ist und kaum durch einen verminderten Verlust von Fettmasse ausgeglichen werden kann.

In der bereits erwähnte Studie von Penna et al., in welcher die Tiere 7 Tage lang mit Bortezomib behandelt und anschließend getötet wurden, waren über den Versuchszeitraum keine Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und tumortragender Behandlungsgruppe hinsichtlich Futter- und Wasseraufnahme feststellbar [253].

Musolino et al. konnten dagegen unter der Gabe von 100 mg/kg/d Megestrolacetat eine signifikant höhere Futteraufnahme der behandelten gegenüber den unbehandelten Ratten feststellen [251]. Die Bewegungsaktivität der Tiere unterschied sich zwischen den Gruppen jedoch nicht. Ebenso konnten auch Busquets et al. eine signifikant höhere Bewegungsaktivität der Ratten unter einer Behandlung mit Megestrolacetat erkennen [258].

Saitoh et al. konnten unter der Behandlung von tumortragenden Ratten mit Erythropoetin eine höhere Bewegungsaktivität, gemessen im Lokomotorsystem, der Tiere feststellen [247]. Hinsichtlich der Futteraufnahme zeigten sich keine Unterschiede zwischen Behandlungs- und Placebogruppe.

Konishi et al. stellen in ihrer Studie zur Behandlung von Ratten im Kachexiemodell mit Febuxostat keine signifikanten Unterschiede in den Quality-of-life-Parametern zwischen den untersuchten Gruppen [255].

Cremades et al. zeigen in einer Studie die Therapie von tumortragenden Ratten mit einer Spezialdiät [259]. Dabei handelt es sich um ein Enzymextrakt, welches aus Flusskrebsen

gewonnen wurde. Dieses Enzymextrakt wurde zusätzlich mit essentiellen Aminosäuren, omega-3-Fettsäuren sowie Carotinoiden (v.a. Astaxanthin) angereichert. Die Futteraufnahme der Tiere mit Spezialdiät war signifikant höher als bei den Tieren, die lediglich Standardfutter erhielten.

Pietra et al. [167] zeigten im Rattenversuch am Tumorkachexiemodell nach oraler Verabreichung des Ghrelin-Rezeptoragonisten Anamorelin HCl (ONO-7643), dass dosisunabhängig (3,0, 10,0 und 30,0 mg/kg/d) eine höhere Futteraufnahme erfolgte.

Auch Springer et al. wiesen eine höhere Futteraufnahme nach oraler Gabe von Oxypurinol in einer Dosis von 4 mg/kg/d bzw nach oraler Gabe von Allopurinol (4,0 sowie 40,0 mg/kg/d) im Vergleich zu Placebotieren im Tumorkachexiemodell nach [245].

Ebenso konnte auch Schmidt in ihrer Tumorkachexie-Studie zur Anwendung von IGF-1 in der Dosierung von 0,3 mg/kg/d eine mehr als doppelt ( $8,9 \pm 2,1$  g/d vs.  $3,2 \pm 0,5$ ) so hohe Futteraufnahme gegenüber den Tieren der unbehandelten Gruppe nachweisen [173]. Weiterhin zeigten diese Tiere auch einen deutlich geringeren Rückgang der Spontanaktivität um ca. 50% gegenüber der Placebogruppe, welche nur noch ca. 25% der Bewegungsaktivität vom Versuchsbeginn aufwiesen.

## 5.7 Proteinbiochemie

Im Rahmen der Sektion am Ende der Überlebensstudie wurden von jedem Tier vier Muskeln entnommen. Direkt nach der Entnahme wurde diese in Reaktionsgefäße überführt, die wieder sofort in flüssigen Stickstoff verbracht wurden, um spätere laborchemische Analysen durchzuführen. Für die proteinbiochemischen Analysen wurde der *Musculus gastrocnemius* verwendet. Diese Analysen wurden durchgeführt, um festzustellen, ob potentielle phänotypisch auftretende Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auch biochemisch bestätigt werden können. Mittels der Laboranalysen wurde gezielt das Vorkommen von degradierenden Proteinen des Caspasesystems und der Proteasomsystems bestimmt. Es wurden die Shamgruppe, die Placebogruppe sowie die Gruppen mit den Dosierungen 0,2, 1,0 und 10,0 mg/kg/d MYO 302 miteinander verglichen.

Bei den Tieren der Shamgruppe wurden erwartungsgemäß die geringsten Caspaseaktivitäten gemessen. Diese lagen nur geringfügig niedriger, jedoch ohne signifikant zu sein, als die Aktivitäten der Placebogruppe. Möglicherweise waren bei der Placebogruppe zu Ende des Versuchs die Aktivitäten bereits erschöpft, weil zu wenig ATP

für den Abbau zur Verfügung stand. Die Caspaseaktivitäten der Behandlungsgruppen waren höher als diejenigen der Placebogruppe, zum Teil waren die Unterschiede signifikant. Ein Erklärungsversuch könnte darin liegen, dass bei der Placebogruppe die Aktivitäten schnell erschöpft waren und nicht erfasst werden konnten. Bei der Caspase-3-Aktivität wurden bei der Gruppe mit der Dosis 1,0 mg/kg/d MYO 302 die höchsten Werte gemessen (mit statistisch hochsignifikanten Unterschieden zur Placebogruppe). Die Gruppe mit der Dosis 10,0 mg/kg/d MYO 302 hatte die zweithöchsten Caspase-3-Aktivitäten.

Ähnliche Ergebnisse lieferten die Messungen der Caspase-6-Aktivität. Hier unterschied sich lediglich die Gruppe mit der Dosis 10,0 mg/kg/d MYO 302 signifikant von der unbehandelten Placebogruppe.

Diese paradoxen Ergebnisse der Caspaseaktivitätsmessungen stehen im Gegensatz zur Gewichtsveränderung der einzelnen Gruppen über den Versuchszeitraum. Die drei Behandlungsgruppen verloren weniger Gewicht als die Placebogruppe, es lassen sich jedoch höhere Aktivitäten von degradierenden Proteinen der Caspasefamilie nachweisen. Eine Erklärung könnte darin bestehen, dass die Unterschiede im Gewichtsverlust durch einen geringeren Skelettmasseverlust bei den Behandlungsgruppen entstehen. Die Verluste an Skelettmuskelmasse unterscheiden sich zwischen Placebo- und Behandlungsgruppen kaum. Offenbar scheint die Verabreichung des Compounds neben der antikachektischen Wirkung auf das weiße Fettgewebe einen negativen, die Kachexie verstärkenden, Effekt auf die Skelettmuskulatur auszuüben.

Die Daten zu den Proteasomaktivitäten liefern ein ähnliches Bild wie die Caspaseaktivitäten. Insbesondere die LLVY-Aktivität (chymotrypsin-artige Aktivität) ist bei den Behandlungsgruppen deutlich höher als bei der Placebogruppe, die Unterschiede sind bei den Tieren der Dosierungen 1,0 und 10,0 mg/kg/d MYO 302 hochsignifikant. Bei den ZLLE- und BzVAL-Aktivitäten (peptidyl-glutamyl-hydrolysierende Aktivität bzw. trypsin-artige Aktivität) waren keine statistisch gesicherten Unterschiede zwischen den tumorinokulierten Gruppen zu ermitteln. Die Aktivitäten in der Shamgruppe waren im Vergleich zu den anderen Gruppen niedriger, bei der LLVY-Aktivität lag diese ungefähr bei der Hälfte der Placebogruppe bzw. bei einem Drittel der Behandlungsgruppen.

Auch im Proteasomsystem lässt sich bei den verwendeten Dosierungen keine antikatabole Wirkung des Wirkstoffs im Muskel nachweisen. Entgegen den Erwartungen sind Effekte, zumindest bei der LLVY-Aktivität, sogar kachexieverstärkend.

Es muss daher überprüft werden, ob diese Ergebnisse im Wiederholungsversuch bestätigt werden. Falls dabei wiederum die Aktivitäten degradierender Proteine erhöht sind, erscheint ein therapeutischer Einsatz dieses Compounds fraglich.

Elkina et al. kamen bei ihren Untersuchungen zum Einsatz von Tandospiron bei Tumorkachexie zu anderen Ergebnissen. Die Gabe von Tandospiron hat einen deutlichen Einfluss auf die Caspaseaktivitäten. Sowohl die Caspase-3- als auch die Caspase-6-Aktivität waren bei den behandelten Tieren um 32% bzw. 22% geringer als bei den unbehandelten Kontrolltieren [252].

Springer et al. [245] verglichen ebenso die Caspase- und Proteasom-Aktivitäten von Allopurinol- und Oxypurinol-behandelten Tiere mit Placebotieren. Die Caspase-3-Aktivität war dabei signifikant geringer als bei der unbehandelten Gruppe, lag jedoch höher als diejenige der Sham-Tiere. Sämtliche Proteasom-Aktivitäten lagen unter denen der Placebogruppe und weisen damit auf einen therapeutischen Effekt der Xanthinoxidasehemmer hin.

Im Versuch von Konishi et al. zeigten sich keine Unterschiede zwischen Placebo- und der mit Febuxostat behandelten Gruppe in den Aktivitäten von Caspase 3 und 6 an Tag 11 nach Tumorinokulation [255]. Sie konnten jedoch zeigen, dass die trypsin-ähnliche Proteasom-Aktivität in der Behandlungsgruppe signifikant niedriger war als in der unbehandelten Gruppe. Bei den chymotrypsin- sowie die peptidyl-glutanyl-ähnlichen Aktivitäten wurden dagegen keine Unterschiede festgestellt.

Ebenso konnten auch Saitoh et al. keine Unterschiede bei den chymotrypsin- sowie die peptidyl-glutanyl-ähnlichen Aktivitäten, jedoch bei der trypsin-ähnlichen Aktivität zwischen mit Erythropoetin behandelten Gruppen gegenüber Placebogruppen ermitteln [247].

Tumorinokulierte Ratten, welche mit L-Carnitin behandelt wurden, hatten eine signifikant geringere Caspase-3-mRNA-Expression sowie eine signifikant geringere Proteasom-Aktivität [260].

## **5.8 Echokardiographie**

Die Sonografie des Herzens wurde lediglich bei den Tieren der Tag-11-Studie durchgeführt. Dabei wurden die Placebo- und Behandlungsgruppe (Dosis 1,0 mg/kg/d MYO 302)

miteinander vergleichen. Die Messungen erfolgten an Tag 0 und Tag 11, um festzustellen, ob Einflüsse der Behandlung nachweisbar sind.

Die Herzfunktion unterschied sich erwartungsgemäß deutlich zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende. Die Auswurffraktion verringerte sich zum Beispiel um ein Drittel, der kardiale Output (Herzzeitvolumen [ml/min]) sank sogar um nahezu 80% bei beiden Gruppen.

Signifikante Unterschiede am Versuchsende zwischen beiden Gruppen waren lediglich bei der Auswurffraktion des Herzens festzustellen. Diese war bei der Behandlungsgruppe höher. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen betrug circa 14%. Während die Auswurffraktion bei der Behandlungsgruppe von 81% zu Versuchsbeginn auf 67% sank, verringerte sich die Auswurffraktion bei den Tieren der Placebogruppe von 79% auf 54%. In allen anderen Parametern unterschieden sich beide Gruppe nicht signifikant. Es fällt lediglich auf, dass die relativen Unterschiede zwischen Versuchsbeginn und Versuchsende bei der Behandlungsgruppe tendenziell geringer ausfallen.

Eine Compoundwirkung am Herzen lässt sich anhand der Messwerte damit nicht sicher konstatieren. Möglicherweise war der Versuchszeitraum zu kurz, um deutlichere Unterschiede festzustellen. Dies sollte in einer weiteren Studie untersucht werden.

Andere Studien am selben Tumorkachexiemodell untersuchten ebenso die Auswirkungen einer Behandlung auf die Herzfunktionen.

Elkina et al. [252] setzten Tansospiron in hoher (10,0 mg/kg/d) und niedriger (1,0 mg/kg/d) Dosis ein. Neben einem höherem Herzgewicht bei der hochdosierten Gruppen gegenüber der Placebogruppe waren auch mehrere Herzfunktionsparameter, wie Auswurffraktion, *fractional shortening* und das Herzzeitvolumen im Vergleich zu den unbehandelten Tieren höher.

Eine Untersuchung mit dem Xanthinoxidaseinhibitor Oxypurinol als potentielles Therapeutikum einer Tumorkachexie an Ratten [245], zeigte ebenfalls Unterschiede in der Herzfunktion zwischen Behandlungsgruppe und unbehandelten Tieren. Die linksventrikuläre Auswurffraktion sowie das *fractional shortening* und die Wanddicke des linken Ventrikels waren nach einer 11tägigen Behandlung gegenüber der Placebogruppe deutlich höher, was auf eine therapeutische Wirkung von Oxypurinol zurückgeführt werden kann.

Einer Studie von Palus et al. [256] zufolge, zeigte die Behandlung von Simvastatin an tumortragenden Ratten einen klaren Effekt auf die Herzfunktion. So verbessert Simvastatin signifikant in den Dosierungen 1,0, 10,0 und 20,0 mg/kg/d die Auswurffraktion am linken Ventrikel im Vergleich mit der unbehandelten Gruppe. Ebenso ist das Herzzeitvolumen bei diesen Behandlungsgruppen gegenüber der Placebogruppe signifikant erhöht.

Auch Toledo et al. [206] konnten durch die Behandlung mit Formoterol (0,3 mg/kg/d) von tumortragenden Ratten keine signifikanten Unterschiede in den Herzparametern zwischen behandelten und unbehandelten Tieren feststellen.

Die Verabreichung des Aldosteroninhibitors Spironolacton an Ratten im Tumorkachexiemodell zeigte deutliche Unterschiede in mehreren Parametern der Herzfunktion [242]. Die linksventrikuläre Auswurffraktion betrug bei den behandelten Tieren  $66\pm 4\%$  gegenüber der Placebogruppe mit  $52\pm 2\%$ . Der Unterschied bei dem kardialen Output lag bei  $70\pm 8$  ml/min gegenüber  $42\pm 3$  ml/min. Andere Parameter wie das linksventrikuläre *fractional shortening* sowie die linksventrikuläre Masse waren bei den behandelten Tieren signifikant höher als bei der Placebogruppe. In der gleichen Studie wurde auch die Gabe von Bisoprolol gegenüber einer unbehandelten Tiergruppe untersucht. Dabei zeigten sich ebenso signifikante Unterschiede, insbesondere bei der Gesamtmasse des Herzens wie auch bei der linksventrikulären Masse sowie beim linksventrikulären *stroke volume*. Mit Imidapril behandelte Tiere unterschieden sich nicht gegenüber Placebotieren hinsichtlich der Herzfunktion.

Mit Erythropoetin behandelte Ratten wiesen im Versuch bei den Herzparametern zum Teil Signifikanzen gegenüber unbehandelten Tieren auf. Die linksventrikuläre Masse und die Auswurffraktion des Herzens waren unter Behandlung weniger stark reduziert [247].

Ebenso beschreiben Konishi et al. eine verringerte Gewichtsabnahme des linken Ventrikels unter der Verabreichung des Xanthinoxidaseinhibitors Febuxostat [255].

Musolino et al. zeigten, dass Ratten unter der Behandlung mit Megestrolacetat neben einer signifikant höherer Auswurffraktion des Herzens auch ein stärkeres *fractional shortening* aufweisen [251].

## 5.9 Schlussfolgerungen

Der neuartige Aldosteronantagonist MYO 302 hat eindeutige Effekte bei den behandelten Tieren gegenüber den unbehandelten Tieren hervorgerufen. Hier sind vor allem bei der Gruppe mit der Dosierung 1,0 mg/kg/d MYO 302 eine um drei Tage längere Überlebenszeit, ein geringerer Gewichtsverlust während des Versuchszeitraums der Überlebensstudie, geringere Reduktion des epididymalen Fettgewebes sowie der gesamten Fettmasse zu nennen. Die fettfreie Masse (vor allem Skelettmuskulatur) sowie die vier im Rahmen der Sektion entnommenen Muskeln (M. gastrocnemius, M. EDL, M. tibialis, M. soleus) wiesen keine signifikanten Unterschiede zwischen Behandlungs- und Placebogruppen auf. Dies legt eine Wirkung des Compounds MYO 302 auf das Fettgewebe nahe. Die kardialen Parameter wurden im Rahmen einer Vergleichsstudie mit definiertem Endpunkt zwischen unbehandelter Gruppe und einer mit der Dosis von 1,0 mg/kg/d MYO 302 behandelten Gruppe untersucht. Die Herzfunktion unterschied sich, abgesehen von der Auswurfraction, nicht signifikant zwischen beiden Gruppen.

Aldosteronantagonisten wurden bislang kaum auf ihre Wirkung am Herzen untersucht. Ogino et al. [230] konnten bei humanen Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz durch die Verabreichung von Spironolacton die Insulinresistenz verbessern. Insulinresistenz tritt bei Herzinsuffizienzpatienten häufig auf und ist mit einer schlechteren Prognose verbunden [261, 262]. Durch die Gabe von Spironolacton wurden bei den Patienten das linksventrikuläre *fractional shortening* sowie die Auswurfraction verbessert. Volterrani and Iellamo [263] beschreiben den Einsatz von Eplerenon bei humanen Patienten mit milder und moderater bis schwerer chronischer Herzinsuffizienz. Demnach wird die Gabe von Eplerenon bei Patienten mit Herzinsuffizienz empfohlen, da es das Risiko, an kardiovaskulären Erkrankungen zu sterben, signifikant (um 37%) senkt [264].

Möglicherweise spielt auch in der durchgeführten Studie am Rattenmodell der Tumorkachexie die Stärkung des Herzens eine Rolle für das längere Überleben der mit der Dosis von 1,0 mg/kg/d MYO 302 behandelten Tiere.

Um die bisherigen Ergebnisse zu verifizieren sind Wiederholungs- und weiterführende Untersuchungen notwendig. Dabei sollte auch die Ermittlung nach der optimalen Dosis einbezogen werden.

MYO 302 kann ein vielversprechendes Compound bei der additiven Behandlung von Kachexie im Rahmen von Tumorerkrankungen, aber auch bei der Herzinsuffizienz sein.

## 6 Zusammenfassung

Eine im Rahmen einer Tumorerkrankungen auftretende Kachexie stellt für den betreffenden Patienten eine schlechte Prognose dar. Bisher ist es nicht gelungen, eine wirksame Therapie zur Behandlung der Tumorkachexie zu finden.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss eines neuartigen Aldosteronantagonisten, MYO 302, im Rattenmodell der Tumorkachexie untersucht. Dazu wurden Laborratten Yoshida AH-130-Hepatomazellen intraperitoneal injiziert.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von MYO 302 dosisabhängig zu positiven Effekten bei den behandelten Tieren im Vergleich zu den unbehandelten Tieren führte. Die behandelten Tiere wiesen eine längere Überlebensdauer und einen geringeren Gewichtsverlust auf. Dieser war im Wesentlichen auf einen geringeren Verlust von Fettgewebe zurückzuführen. Auf den Erhalt der Skelettmuskulatur war keine therapeutische Wirkung feststellbar.

Die Behandlung der tumortragenden Ratten ist mit MYO 302 geeignet, die Kachexie bedingt abzuschwächen, jedoch die Überlebenszeit zu verlängern und damit den Krankheitsverlauf positiv zu beeinflussen. Weitere Untersuchungen zur optimalen Dosisfindung sind noch notwendig.

## 7 Summary

**The impact of the new aldosterone antagonist MYO 302 on the development of body weight, on body composition, on spontaneous activity and cardiac function in a rat model of cancer cachexia.**

Cachexia combined with a cancer disease represents a poor survival prognosis. So far no effective therapy to treat tumor associated cachexia was discovered.

This study shows the effect of a new aldosterone antagonist, MYO 302, in a rat model of cancer cachexia. The rats were inoculated with Yoshida AH-130-Hepatoma cells into the peritoneal cavity to develop a liquid tumor.

The treatment with MYO 302 shows positive effects in treated rats in comparison to untreated rats, depending on the dose of MYO 302. The animals under treatment with the dose of 1mg/kg/d MYO 302 showed the highest survival rate. There was less weight loss of the white adipose tissue than in untreated rats. The treatment shows no effect on the mass of the muscle weight.

The treatment of tumor bearing rats with MYO 302 is, depending on the dose, suitable to increase the survival rate and to attenuate the cancer cachexia. This leads to positive impact on the disease. Further studies are necessary to find the optimal therapeutic dose.

## Quellenverzeichnis

1. Baracos, V.E., *Cancer-associated cachexia and underlying biological mechanisms*. Annu Rev Nutr, 2006. **26**: p. 435-61.
2. Kung, T.e.a., *Cachexia in heart disease: highlights from the ESC 2010*. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2011. **2**: p. 63-69.
3. Anker, S.D. and A.J. Coats, *Cachexia in heart failure is bad for you*. Eur Heart J, 1998. **19**(2): p. 191-3.
4. Anker, S.D. and e. al, *Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure*. Lancet, 1997. **349**(9058): p. 1050-3.
5. Mitch, W.E., *Robert H Herman Memorial Award in Clinical Nutrition Lecture, 1997. Mechanisms causing loss of lean body mass in kidney disease*. Am J Clin Nutr, 1998. **67**(3): p. 359-66.
6. Mulligan, K., V.W. Tai, and M. Schambelan, *Cross-sectional and longitudinal evaluation of body composition in men with HIV infection*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1997. **15**(1): p. 43-8.
7. Kotler, D.P. and e. al, *Magnitude of body-cell-mass depletion and the timing of death from wasting in AIDS*. Am J Clin Nutr, 1989. **50**(3): p. 444-7.
8. Evans, W.J., *Cachexia: a new definition*. Clin Nutr, 2008. **27**: p. 793-99.
9. von Haehling, S., et al., *Cachexia: a therapeutic approach beyond cytokine antagonism*. Int J Cardiol, 2002. **85**(1): p. 173-83.
10. Muscaritoli, M. and e. al, *Prevention and treatment of cancer cachexia: new insights into an old problem*. Eur J Cancer, 2006. **42**(1): p. 31-41.
11. Rensing, L. and J. Ockenga, *Sarkopenie und Kachexie: Muskelabbau und Mangelernährung: Aktuelle Ergebnisse zur Entstehung und Therapie*. Dtsch Med Wochenschr, 2010. **135**: p. 1605-11.
12. Goodpaster, B.H., et al., *The loss of skeletal muscle strength, mass, and quality in older adults: the health, aging and body composition study*. J Gerontol, 2006. **61A**: p. 1059-64.
13. Muscaritoli, M. and e. al, *Muscle atrophy in aging and chronic diseases: is it sarcopenia or cachexia?* Intern Emerg Med, 2013. **8**(553-60).
14. Argilés, J.M. and e. al, *Cachexia and sarcopenia: mechanisms and potential targets for intervention*. Current Opinion in Pharmacology, 2015. **22**: p. 100-6.
15. Moses, A.W.G. and e. al, *Reduced total energy expenditure and physical activity in cachectic patients with pancreatic cancer can be modulated by an energy and protein dense oral supplement enriched with n-3 fatty acids*. Br J Cancer, 2004. **90**(996-1002).
16. Bachmann, J. and e. al, *Cachexia worsens prognosis in patients with resectable pancreatic cancer*. J Gastrointest Surg, 2008. **12**: p. 1193-201.
17. Dewys, W.D. and e. al, *Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group*. Am J Med, 1980. **69**: p. 491-7.
18. Fearon, K.C.H. and e. al, *Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake and systemic inflammation on functional status and prognosis*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**: p. 1345-50.
19. Fearon, K.C.H. and e. al, *Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus*. Lancet Oncol, 2011. **12**: p. 489-95.
20. Siegel, R. and e. al, *Cancer statistics*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
21. Rock, C.L. and e. al, *Nutrition and physical activity guidelines for cancer survivors*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(4): p. 243-74.
22. Ferlay, J. and e. al, *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*. Ann Oncol, 2007. **18**(3): p. 581-92.

23. Zimmer, P. and e. al, *Tumorkachexie*, in *Sport und körperliche Aktivität in der Onkologie*, F.T. Baumann and e. al, Editors. 2012, Springer: Berlin, Heidelberg. p. 89-97.
24. Laviano, A. and e. al, *Oxidative stress and wasting in cancer*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2007. **10**: p. 449-56.
25. Rivadeneira, D.E., W.B. Tuckson, and T. Naab, *Nutritional support of the cancer patient*. *CA Cancer J Clin*, 1998. **48**(2): p. 69-80.
26. Tisdale, M.J., *Mechanisms of Cancer Cachexia*. *Physiol Rev*, 2009. **89**: p. 381-410.
27. Wigmore, S.J., et al., *Changes in nutritional status associated with unresectable pancreatic cancer*. *Br J Cancer*, 1997. **75**: p. 106-9.
28. Dewys, W.D., *Weight loss and nutritional abnormalities in cancer patients: incidence, severity and significance*, in *Clinics in Oncology*, K.C. Calman and K.C.H. Fearon, Editors. 1986, Saunders: London. p. 251-61.
29. Argilés, J.M. and e. al, *Cancer-associated malnutrition*. *Eur J Oncol Nurs*, 2005. **9**: p. 39-50.
30. Fearon, K.C.H. and T. Preston, *Body composition in cancer cachexia*. *Infusionstherapie*, 1990. **17**(3): p. 63-6.
31. Argilés, J.M. and e. al, *Catabolic mediators as targets for cancer cachexia*. *Drug Discov Today*, 2003. **8**(18): p. 838-44.
32. Ross, P.J., S. Ashley, and e. al, *Do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for lung cancers?* *Br J Cancer*, 2004. **90**(1905-11).
33. Argilés, J.M. and e. al, *Cancer cachexia: the molecular mechanisms*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**(4): p. 405-9.
34. Tisdale, M.J., *Cachexia in cancer patients*. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(11): p. 862-71.
35. Herzig, S., *Molekulare und metabolische Komponenten der Tumorkachexie*. *Der Gynäkologe*, 2010. **7**(559-63).
36. Tisdale, M.J., *Cancer anorexia and cachexia*. *Nutrition*, 2001. **17**(438-42).
37. Wilcock, A., *Anorexia: a taste of things to come?* *Palliat Med*, 2006. **20**: p. 43-5.
38. Brooks, S.L. and e. al, *Sympathetic activation of brown-adipose-tissue thermogenesis in cachexia*. *Biosci Rep*, 1981. **1**(509-17).
39. Shellock, F.G. and e. al, *Brown adipose tissue in cancer patients: possible cause of cancer-induced cachexia*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1986. **111**(82-5).
40. Tisdale, M.J., *Reversing cachexia*. *Cell*, 2010. **142**(4): p. 511-2.
41. Busotti, A. and e. al, *Regulation of muscle cathepsin B proteolytic activity in protein-depleted patients with chronic diseases*. *Clin Nutr*, 2002. **21**(5): p. 373-8.
42. Falconer, R. and e. al, *Acute-phase protein response and survival duration of patients with pancreatic cancer*. *Cancer Res*, 1995. **75**(8): p. 2077-82.
43. Deans, C. and S.J. Wigmore, *Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2005. **8**(3): p. 265-9.
44. Donohoe, C.L. and e. al *Cancer cachexia: mechanisms and clinical implications*. *Gastroenterol Res Pract*, 2011. DOI: 10.1155/2011/601434.
45. Lenk, K. and e. al, *Skeletal muscle wasting in cachexia and sarcopenia: molecular pathophysiology and impact of exercise training*. *J Cachex Sarcopenia Muscle*, 2010. **1**(1): p. 9-21.
46. Buck, M. and M. Chojkier, *Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants*. *EMBO J*, 1996. **15**(8): p. 1753-65.
47. Li, Y.P. and e. al, *Skeletal muscle myocytes undergo protein loss and reactive oxygen-mediated NFκB activation in response to tumor necrosis factor α*. *FASEB J*, 1998. **12**: p. 871-80.
48. Tintignac, L.A. and e. al, *Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(4): p. 2847-56.

49. Argilés, J.M. and e. al, *Apoptosis signaling is essential and precedes protein degradation in wasting skeletal muscle during catabolic conditions*. Int J Biochem Cell Biol, 2008. **40**(9): p. 1674-8.
50. Trammer, J.E. and e. al, *Measuring the symptom experience of seriously ill cancer and noncancer hospitalised patients near the end of life with the memorial symptom assessment scale*. J Pain Symptom Management, 2003. **25**: p. 420-9.
51. Plata Salaman, C.R. and e. al, *Tumor necrosis factor and interleukin 1 beta: suppression of food intake by direct action in the central nervous system*. Brain Res, 1998. **448**: p. 106-14.
52. Davis, M.P. and e. al, *Appetite and cancer-associated anorexia: a review*. J Clin Oncol, 2004. **22**: p. 1510-17.
53. Chance, W.T. and e. al, *Hypothalamic concentration and release of neuropeptide Y into microdialysates is reduced in anorectic tumor-bearing rats*. Life Sci, 1994. **54**: p. 1869-74.
54. Bing, C. and e. al, *Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice*. Br J Cancer, 2006. **95**: p. 1028-37.
55. Jatoi, A. and e. al, *Neuropeptide Y, leptin and cholecystokinin 8 in patients with advanced cancer and anorexia*. Cancer, 2001. **92**: p. 629-37.
56. Fan, W. and e. al, *Role of melanocortinergic neurones in feeding and the agouti obesity syndrome*. Nature, 1997. **365**: p. 165-8.
57. Wisse, B.E. and e. al, *Reversal of cancer anorexia by blockade of central melanocortin receptors in rats*. Endocrinology, 2001. **14**: p. 3292-3301.
58. Johnen, H. and e. al, *Tumor-induced anorexia and weight loss are mediated by the TGF- $\beta$  superfamily cytokine MIC-1*. Nat Med, 2007. **13**: p. 1333-40.
59. Unmehopa, U.A. and e. al, *Increased melanin concentrating hormone receptor type I in the human hypothalamic infundibular nucleus in cachexia*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**: p. 2412-9.
60. Virtanen, K.A. and e. al, *Functional brown adipose tissue in healthy adults*. N Engl J Med, 2009. **360**: p. 1518-25.
61. Argilés, J.M. and e. al, *Cancer cachexia: understanding the molecular basis*. Nature, 2014. **14**: p. 754-62.
62. Bindels, L.B. and e. al *Restoring specific lactobacilli levels decreases inflammation and muscle atrophy markers in an acute leukemia mouse model*. PloS ONE, 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0037971.
63. Bindels, L.B. and N.M. Delzenne, *Muscle wasting: the gut microbiota as a new therapeutic target?* Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**: p. 2186-90.
64. Watanabe, M. and e. al, *Bile acids induce energy expenditure by promoting intracellular thyroid hormone activation*. Nature, 2006. **439**: p. 484-9.
65. Kerem, M. and e. al, *Adipokines and ghrelin in gastric cancer cachexia*. World J Gastroenterol, 2008. **14**: p. 3633-41.
66. Karapanagiotou, E.M. and e. al, *Increased serum levels of ghrelin at diagnosis mediate body weight loss in non small cell lung cancer (NSCLC) patients*. Lung Cancer, 2009. **66**: p. 393-8.
67. Wang, H.S. and e. al, *Elevated serum ghrelin exerts an origenic effect that may maintain body mass index in patients with metastatic neuroendocrine tumors*. J Mol Neurosci, 2007. **33**: p. 225-31.
68. Sheriff, S. and e. al, *Des-acyl ghrelin exhibits pro-anabolic and anti-catabolic effects on C2C12 myotubes exposed to cytokines and reduces burn-induced muscle proteolysis in rats*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **351**: p. 286-95.
69. Reano, S. and e. al, *Acylated and unacylated ghrelin administration to blunt muscle wasting*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2014. **17**: p. 236-40.
70. Yu, A.P. and e. al, *Acylated and unacylated ghrelin inhibit doxorubicin-induced apoptosis in skeletal muscle*. Acta Physiol, 2014. **211**: p. 201-13.
71. Roxburgh, C.S. and D.C. McMillan, *Role of systemic inflammatory response in predicting survival in patients with primary operable cancer*. Futur Oncol, 2010. **6**: p. 149-63.

72. Proctor, M.J. and e. al, *An inflammation-based prognostic score (mGPS) predicts cancer survival independent of tumour site: a Glasgow Inflammation Outcome Study*. Br J Cancer, 2011. **104**: p. 726-34.
73. Ebrahimi, B. and e. al, *Cytokines in pancreatic carcinoma: correlation with phenotypic characteristics and prognosis*. Cancer, 2004. **101**(2727-36).
74. Fearon, K.C.H. and e. al, *Cancer Cachexia: Mediators, Signaling, and Metabolic Pathways*. Cell Metabolism, 2012. **16**: p. 153-66.
75. Preston, T. and e. al, *Fibrinogen synthesis is elevated in fasting cancer patients with an acute phase response*. J Nutr, 1998. **128**: p. 1355-60.
76. Fearon, K.C.H. and e. al, *Albumin synthesis rates are not decreased in hypoalbuminemic cachectic cancer patients with an ongoing acute-phase protein response*. Ann Surg, 1998. **227**: p. 249-54.
77. Berriel Diaz, M. and e. al, *Nuclear receptor cofactor receptor interacting protein 140 controls hepatic triglyceride metabolism during wasting in mice*. Hepatology, 2008. **48**: p. 782-91.
78. Zschiedrich, I. and e. al, *Coaktivator function of RIP140 for NFkappaB/RelA-dependent cytokine gene expression*. Blood, 2008. **112**: p. 264-76.
79. Martignoni, M.E. and e. al, *Liver macrophages contribute to pancreatic cancer-related cachexia*. Oncol Rep, 2009. **21**: p. 363-9.
80. Gesta, S. and e. al, *Developmental origin of fat: tracking obesity to its source*. Cell, 2007. **131**: p. 242-56.
81. Jocken, J.W.E. and E.E. Blaak, *Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity*. Physiol Behav, 2008. **94**: p. 219-30.
82. Ryden, M. and e. al, *Comparative studies on the role of hormone-sensitive lipase and adipose triglyceride lipase in human fat cell lipolysis*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**: p. E1847-55.
83. Londos, C. and e. al, *Perilipins, ADRP, and other proteins that associate with intracellular neutral lipid droplets in animal cells*. Semin Cell Dev Biol, 1999. **10**: p. 51-8.
84. Greenberg, A.S. and e. al, *Stimulation of lipolysis and hormone-sensitive lipase via the extracellular signal-regulated kinase pathway*. J Biol Chem, 2001. **276**: p. 45456-61.
85. Mandrup, S. and M.D. Lane, *Regulating adiogenesis*. J Biol Chem, 1997. **272**: p. 5367-70.
86. Fajas, L. and e. al, *Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression by adipocyte differentiation and determination factor 1/sterol regulatory element binding protein 1: implications for adipocyte differentiation and metabolism*. Mol Cell Biol, 1999. **19**: p. 5495-503.
87. Fouladiun, M. and e. al, *Body composition and time course changes in regional distribution of fat and lean tissue in unselected cancer patients on palliative care-correlations with food intake, metabolism, exercise capacity, and hormones*. Cancer, 2005. **103**: p. 2189-98.
88. Oliff, A. and e. al, *Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice*. Cell, 1987. **50**: p. 555-63.
89. Zuijdgeest-van Leeuwen, S.D. and e. al, *Lipolysis and lipid oxidation in weight-losing cancer patients and healthy subjects*. Metabolism, 2000. **49**: p. 931-6.
90. Ryden, M. and P. Arner, *Fat loss in cachexia – is there a role for adipocyte lipolysis?* Clin Nutr, 2007. **26**: p. 1-6.
91. Zimmermann, R. and e. al, *Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase*. Science, 2004. **306**: p. 1383-6.
92. Argilés, J.M. and e. al, *Cross-talk between skeletal muscle and adipose tissue: a link with obesity?* Med Res Rev, 2005. **25**: p. 49-65.
93. Inadera, H. and e. al, *Molecular analysis of lipid-depleting factor in a colon-26-inoculated cancer cachexia model*. Int J Cancer, 2002. **101**: p. 37-45.
94. Beck, S.A. and M.J. Tisdale, *Effect of cancer cachexia on triacylglycerol/fatty acid substrate cycling in white adipose tissue*. Lipids, 2004. **39**: p. 1187-9.

95. Bing, C. and e. al, *Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia*. Proc Natl Acad Sci USA, 2004. **101**: p. 2500-5.
96. Ryden, M. and e. al, *Lipolysis – not inflammation, cell death, or lipogenesis – is involved in adipose tissue loss in cancer cachexia*. Cancer, 2008. **113**: p. 1695-704.
97. Samuel, V.T. and e. al, *Lipid-induced insulin resistance: unraveling the mechanism*. Lancet, 2010. **375**: p. 2267-77.
98. Das, S.K. and e. al, *Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia*. Science, 2011. **333**: p. 233-8.
99. Zechner, R. and e. al, *FAT SIGNALS-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling*. Cell Metabolism, 2012. **15**: p. 279-91.
100. Stephens, N.A. and e. al, *Intramyocellular lipid droplets increase with progression of cachexia in cancer patients*. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2011. **2**: p. 111-7.
101. Cospér, P.F. and L.A. Leinwand, *Myosin heavy chain is not selectively decreased in murine cancer cachexia*. Int J Cancer, 2012. **130**: p. 2722-7.
102. Martin, L. and e. al, *Cancer cachexia in the age of obesity: skeletal muscle depletion is a powerful prognostic factor, independent of body mass index*. J Clin Oncol, 2013. **31**: p. 1539-47.
103. Le Bricon, T. and e. al, *Negative impact of cancer chemotherapy on protein metabolism in healthy and tumor-bearing rats*. Metabolism, 1995. **44**: p. 1340-87.
104. Argilés, J.M. and F.J. López-Soriano, *The ubiquitin-dependent proteolytic pathway in skeletal muscle: its role in pathological states*. Trends Pharmacol Sci, 1996. **17**: p. 223-6.
105. Hasselgren, P.-O. and e. al, *Molecular regulation of muscle cachexia: it may be more than the proteasome*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**: p. 1-10.
106. Smith, I.J. and e. al, *Calpain activity is increased in skeletal muscle from gastric cancer patients with no or minimal weight loss*. Muscle Nerve, 2011. **43**: p. 410-4.
107. Tardif, N. and e. al, *Autophagic-lysosomal pathway is the main proteolytic system modified in the skeletal muscle of esophageal cancer patients*. Am J Clin Nutr, 2013. **98**: p. 1485-92.
108. Egermann, M.A. and D.J. Glass, *Signaling pathways controlling skeletal muscle mass*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2014. **49**(1): p. 59-68.
109. Glass, D.J., *Signalling pathways perturbing muscle mass*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2010. **13**: p. 225-9.
110. Clarke, B.A. and e. al, *The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle*. Cell Metab, 2007. **6**: p. 376-85.
111. Cai, D. and e. al, *IKK $\beta$ /NF- $\kappa$ B-activation causes severe muscle wasting in mice*. Cell, 2004. **119**: p. 285-98.
112. Moore-Carrasco, R. and e. al, *The AP-1/NF- $\kappa$ B double inhibitor SP100030 can revert muscle wasting during experimental cancer cachexia*. Int J Oncol, 2007. **30**: p. 1239-45.
113. He, W.A. and e. al, *NF- $\kappa$ B-mediated Pax7 dysregulation in the muscle microenvironment promotes cancer cachexia*. J Clin Invest, 2013. **123**: p. 4821-35.
114. Rommel, C. and e. al, *Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/AKT/mTOR and PI(3)K/AKT/GSK3 pathways*. Nature Cell Biol, 2001. **3**: p. 1009-13.
115. Bentzinger, C.F. and e. al, *Skeletal muscle-specific ablation of raptor, but not of rictor, causes metabolic changes and results in muscle dystrophy*. Cell Metab, 2008. **8**: p. 411-24.
116. McGee, S.L. and e. al, *Normal hypertrophy accompanied by phosphorylation and activation of AMP-activated protein kinase  $\alpha$ 1 following overload in LKB1 knockout mice*. J Physiol, 2008. **586**: p. 1731-41.
117. Mammucari, C. and e. al, *FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo*. Cell Metab, 2007. **6**: p. 458-71.
118. Mieulet, V. and e. al, *S6 kinase inactivation impairs growth and translational target phosphorylation in muscle cells maintaining proper regulation of protein turnover*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **293**: p. C712-22.

119. Bodine, S.C. and e. al, *Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo*. Nat Cell Biol, 2001. **3**: p. 1014-9.
120. Krawiec, B.J. and e. al, *Hindlimb casting decreases muscle mass in part by proteasome-dependent proteolysis but independent of protein synthesis*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**: p. E969-80.
121. Sandri, M. and e. al, *Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy*. Cell, 2004. **117**: p. 399-412.
122. Stitt, T.N. and e. al, *The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors*. Mol Cell Biol, 2004. **14**: p. 395-403.
123. Eschenhagen, T. and e. al, *Cardiovascular side effects of cancer therapies: a position statement from the Heart Failure Association of the European Society of Cardiology*. Eur J Heart Fail, 2011. **13**: p. 1-10.
124. Olivan, M. and e. al, *Theophylline is able to partially revert cachexia in tumour-bearing rats*. Nutr Metab, 2012. **9**: p. 76.
125. Tian, M. and e. al, *Cardiac alterations in cancer-induced cachexia in mice*. Int J Oncol, 2010. **37**: p. 347-53.
126. Zhou, X. and e. al, *Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival*. Cell, 2010. **142**: p. 531-43.
127. Drott, C. and K. Lundholm, *Glucose uptake and amino acid metabolism in perfused hearts from tumour-bearing rats*. J Surg Res, 1990. **49**: p. 62-8.
128. Mühlfeld, C. and e. al *Cancer induces cardiomyocyte remodeling and hypoinnervation in the left ventricle of the mouse heart*. PLoS ONE, 2011. **6**, DOI: 10.1371/journal.pone.0020424.
129. Hyltander, A. and e. al, *Elevated energy expenditure in cancer patients with solid tumours*. Eur J Cancer, 1991. **27**: p. 9-15.
130. Elia, M. and e. al, *Enteral (oral or tube administration) nutritional support and eicosapentaenic acid in patients with cancer: a systematic review*. Int J Oncol, 2006. **28**(1): p. 5-23.
131. Adams, G.R. and e. al, *Combined isometric, concentric, and eccentric resistance exercise prevents unloading-induced muscle atrophy in rats*. J Appl Physiol, 2007. **103**: p. 1644-54.
132. Gielen, S. and e. al, *Exercise training attenuates MuRF-1 expression in the skeletal muscle of patients with chronic heart failure independent of age: the randomized Leipzig Exercise Heart Failure and Aging catabolism study*. Circulation, 2012. **125**: p. 2716-27.
133. Hurst, J.E. and R.H. Fitts, *Hindlimb unloading-induced muscle atrophy and loss of function: protective effect of isometric exercise*. J App. Physiol, 2003. **95**: p. 1405-17.
134. Tomoyoshi, A. and e. al, *Cancer caxechia, mechanism and treatment*. World J Gastrointest Oncol, 2015. **7**(4): p. 17-29.
135. Lai, V. and e. al, *Results of a pilot study of the effects of celecoxib on cancer cachexia in patients with cancer of the head, neck, and gastrointestinal tract*. Head Neck, 2008. **30**: p. 67-74.
136. McMillan, D.C. and e. al, *A prospective randomized study of megestrol acetate and ibuprofen in gastrointestinal cancer patients with weight loss*. Br J Cancer, 1999. **79**: p. 495-500.
137. Cerchiatti, L.C. and e. al, *Effects of eicosapentenoic and docosahexaenoic n-3 fatty acids from fish oil and preferential Cox-2-inhibition on systemic syndromes in patients with advanced lung cancer*. Nutr Cancer, 2007. **59**: p. 14-20.
138. Lundholm, K. and e. al, *Anti-inflammatory treatment may prolong survival in undernourished patients with metastatic solid tumors*. Cancer Res, 1994. **54**: p. 5602-6.
139. Induru, R.R. and e. al, *Managing cancer pain: Frequently asked questions*. Cleveland Clin J Med, 2011. **78**: p. 449-64.

140. Rothwell, P.M. and e. al, *Short-term effects of daily aspirin on cancer incidence, mortality, and non-vascular death: Analysis of the time course of risks and benefits in 51 randomised controlled trials*. Lancet, 2012. **379**(9826): p. 1602-12.
141. Rothwell, P.M. and e. al, *Effects of daily aspirin on risk of cancer metastasis: A study of incident cancers during randomized controlled trials*. Lancet, 2012. **379**(9826): p. 1591-601.
142. Solheim, T.S. and e. al, *Non-steroidal anti-inflammatory treatment in cancer cachexia: A systematic literature review*. Acta Oncologica, 2013. **52**: p. 6-17.
143. Cahlin, C. and e. al, *The role of host-derived cytokines interleukin (IL)-6, IL-12, interferon-gamma, and tumor necrosis factor alpha evaluated in gene knockout, tumor-bearing mice on C57 Bl background and eicosanoid-dependent cachexia*. Cancer Res, 2000. **60**: p. 5488-93.
144. Yao, M. and e. al, *Effects of nonselective cyclooxygenase inhibition with low-dose ibuprofen on tumor growth, angiogenesis, metastasis, and survival in a mouse model of colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**: p. 1618-28.
145. Ninomixy, I. and e. al, *Antitumor and anti-metastatic effects of cyclooxygenase-2-inhibition by celecoxib on human colorectal-carcinoma xenografts in nude mouse rectum*. Oncol Report, 2012. **28**: p. 777-84.
146. Gridelli, C. and e. al, *Factorial phase III randomized trial of rofecoxib and prolonged constant infusion of gemcitabine in advanced non-small-cell lung cancer: The GEMcitabine-COxib in NSCLC (GECO) study*. Lancet Oncol, 2007. **6**: p. 500-12.
147. Bertagnolli, M.M. and e. al, *Five-year efficacy and safety analysis of the Adenoma Prevention with Celecoxib Trial*. Cancer Prev Res, 2009. **2**: p. 310-21.
148. Trelle, S. and e. al, *Cardiovascular safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Network metaanalysis*. BMJ, 2011. **342**: p. c7086.
149. Mantovani, G. and e. al, *Managing cancer-related anorexia/cachexia*. Drugs, 2001. **61**: p. 499-541.
150. Mantovani, G. and e. al, *Medroxyprogesterone acetate reduces the in vitro production of cytokines and serotonin involved in anorexia/cachexia and emesis by peripheral blood mononuclear cells of cancer patients*. Eur J Cancer, 1997. **33**: p. 602-7.
151. Loprinzi, C.L. and e. al, *Body-composition changes in patients who gain weight while receiving megestrol acetate*. J Clin Oncol, 1993. **11**: p. 152-4.
152. Simons, J.P.F.H.A. and e. al, *Effects of medroxyprogesterone acetate on food intake, body composition, and resting energy expenditure in patients with advanced, non hormone sensitive cancer*. Cancer, 1998. **82**: p. 553-60.
153. Lundholm, K. and e. al, *Insulin treatment in cancer cachexia: effects on survival, metabolism and physical functioning*. Clin Cancer Res, 2007. **13**: p. 2699-706.
154. Rowland, K.M.J. and e. al, *Randomised double-blind placebo-controlled trial of cisplatin and etoposide plus megestrol acetate/placebo in extensive-stage small-cell lung cancer: a North Central Cancer Treatment Group Study*. J Clin Oncol, 1996. **14**: p. 135-41.
155. Kardinal, C.G. and e. al, *A controlled trial of cyproheptadine in cancer patients with anorexia and/or cachexia*. Cancer, 1990. **65**: p. 2657-62.
156. Wadleigh, R. and e. al, *Donabinal enhancement of appetite and cancer patients*. Proc Am Soc Oncol, 1990. **9**: p. 331.
157. Müller, T.D. and e. al, *Ghrelin*. Molecular Metabolism, 2015. **4**: p. 437-60.
158. Kojima, M. and e. al, *Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach*. Nature, 1999. **402**: p. 656-60.
159. Tschöp, M. and e. al, *Ghrelin induces adiposity in rodents*. Nature, 2000. **407**: p. 908-13.
160. Tsubouchi, H. and e. al, *Ghrelin relieves cancer cachexia associated with the development of lung adenocarcinoma in mice*. Eur J Pharmacol, 2014. **743**: p. 1-10.
161. Nagaya, N. and e. al, *Treatment of cachexia with ghrelin in patients with COPD*. Chest, 2005. **128**: p. 1187-93.

162. Nagaya, N. and e. al, *Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure*. *Circulation*, 2004. **110**: p. 3674-9.
163. Koshinka, K. and e. al, *Therapeutic potential of ghrelin treatment for unloading-induced muscle atrophy in mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **412**: p. 296-301.
164. Palus, S. and e. al *Ghrelin and Its Analogues, BIM-28131- and BIM-28125, Improve Body Weight and Regulate the Expression of MuRF-1 and MAFbx in a Rat Heart Failure Model*. *PLoS ONE*, 2011. **6**, DOI: 10.1371/journal.pone.0026865.
165. Palus, S. and e. al, *Effect of application route of the ghrelin analog BIM-28131 (RM-131) on body weight and body composition in a rat heart failure model*. *Int J Cardiol*, 2013. **168**: p. 2369-74.
166. Garcia, J.M. and e. al, *Therapeutic potential of anamorelin, a novel, oral ghrelin mimetic, in patients with cancer-related cachexia: a multicenter, randomized, double-blind, crossover, pilot study*. *Support Care Cancer*, 2013. **21**: p. 129-37.
167. Pietra, C. and e. al, *Anamorelin HCl (ONO-7643), a novel ghrelin receptor agonist, for the treatment of cancer anorexia-cachexia syndrome: preclinical profile*. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2014. **5**: p. 329-37.
168. Currow, D.C. and e. al, *Anamorelin hydrochloride in the treatment of cancer anorexia-cachexia syndrome*. *Future Oncol*, 2014. **10**: p. 789-802.
169. Dunshea, F.R. and e. al, *Insulin-like growth factor-1 and analogues increase growth in artificially-reared neonatal pigs*. *Br J Nutr*, 2002. **87**: p. 587-93.
170. von Haehling, S. and e. al, *Cardiac cachexia: A systematic overview*. *Pharmacology & Therapeutics*, 2008. **121**: p. 227-52.
171. Anker, S.D. and e. al, *Does carvedilol prevent and reverse cardiac cachexia in patients with severe heart failure? Results of the COPERNICUS study*. *Eur Heart J*, 2002. **394**.
172. Anker, S.D. and e. al, *Prevention and reversal of cachexia in patients with chronic heart failure by bisoprolol: an observational study*. *Lancet*, 2003. **349**: p. 156A-157A.
173. Schmidt, K., *Der Einfluss von Bisoprolol und IGF-1 als alleinige Medikation und in Kombination auf Gewichtsverlauf, Körperzusammensetzung, spontane Aktivität und Herzfunktion in einem Rattenmodell der Tumor-Kachexie*, in *Fachbereich Veterinärmedizin*. 2010, FU Berlin.
174. Sinha-Hikim, I. and e. al, *Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002. **283**: p. E154-64.
175. Griggs, S. and e. al, *Effect of testosterone on muscle mass and muscle protein synthesis*. *J Appl Physiol*, 1989. **66**: p. 498-503.
176. Curran, M.J. and W. Bihrlé, *Dramatic rise in prostate-specific antigen after androgen replacement in a hypogonadal man with occult adenocarcinoma of the prostate*. *Urology*, 1999. **53**: p. 423-4.
177. Bhasin, S. and e. al, *Drug insight: Testosterone and selective androgen receptor modulators as anabolic therapies for chronic illness and aging*. *Nature Clin Pract Endocrinol Metab*, 2006. **2**: p. 146-59.
178. Narayanan, R. and e. al, *Selective androgen receptor modulators in preclinical and clinical development*. *Nucl Recept Signal*, 2008. **6**: p. e010.
179. Zilbermint, M.F. and A.S. Dobs, *Nonsteroidal selective androgen receptor modulator Ostarine in cancer cachexia*. *Future Oncol*, 2009. **5**: p. 1211-20.
180. Yarrow, J.F. and e. al, *17 $\beta$ -Hydroxyestra-4,9,11-trien-3-one (trenbolone) exhibits tissue selective anabolic activity: effects on muscle, bone, adiposity, hemoglobin, and prostate*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011. **300**: p. 650-60.
181. Ebner, N. and e. al, *Mechanism and novel therapeutic approaches to wasting in chronic disease*. *Maturitas*, 2013. **75**: p. 199-206.

182. Grobet, L. and e. al, *A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle*. *Nature Genetics*, 1997. **17**: p. 71-4.
183. Lee, S.J. and A.C. McPherron, *Regulation of myostatin activity and muscle growth*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001. **98**: p. 9306-11.
184. Bogdanovich, S. and e. al, *Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade*. *Nature*, 2002. **420**: p. 418-21.
185. Wagner, K.R. and e. al, *Loss of myostatin attenuates severity of muscular dystrophy in mdx mice*. *Ann Neurol*, 2002. **52**: p. 832-6.
186. Kota, J. and e. al, *Follistatin gene delivery enhances muscle growth and strength in nonhuman primates*. *Sci Transl Med*, 2009. **1**(6): p. 6re15.
187. Lach-Trifilieff, *An antibody blocking activin type II receptors induces strong skeletal muscle hypertrophy and protects from atrophy*. *Mol Cell Biol*, 2014. **34**: p. 606-18.
188. Hamrick, M.W. and e. al, *Recombinant myostatin (GDF-8) propeptide enhances the repair and regeneration of both muscle and bone in a model of deep penetrant musculoskeletal injury*. *J Trauma*, 2010. **69**: p. 579-83.
189. Busquets, S. and e. al, *Myostatin blockage using actRIIB antagonism in mice bearing the Lewis lung carcinoma results in the improvement of muscle wasting and physical performance*. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*, 2012. **3**: p. 37-43.
190. Zhang, L. and e. al, *Pharmacological inhibition of myostatin suppresses systemic inflammation and muscle atrophy in mice with chronic kidney disease*. *FASEB J*, 2011. **25**: p. 1653-63.
191. Heineke, J. and e. al, *Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure*. *Circulation*, 2010. **121**: p. 419-25.
192. Springer, J. and e. al, *Myostatin: Regulator of Muscle Wasting in Heart Failure and Treatment Target for Cardiac Cachexia*. *Circulation*, 2010. **121**(3): p. 354-6.
193. Zhang, L. and e. al, *Inhibition of myostatin protects against diet-induced obesity by enhancing fatty acid oxidation and promoting a brown adipose phenotype in mice*. *Diabetologia*, 2012. **55**: p. 183-93.
194. Akpan, I. and e. al, *The effects of a soluble activin type IIB receptor on obesity and insulin sensitivity*. *Int J Obes*, 2009. **33**: p. 1265-73.
195. Wang, Q. and e. al, *Myostatin inhibition induces muscle fibre hypertrophy prior to satellite cell activation*. *J Physiol*, 2012. **590**: p. 2151-65.
196. Gilson, H. and e. al, *Follistatin induces muscle hypertrophy through satellite cell proliferation and inhibition of both myostatin and activin*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. **297**: p. E157-64.
197. Ma, J.D. and e. al, *Novel investigational biologics for the treatment of cancer cachexia*. *Expert Opin Biol Ther*, 2014. **14**: p. 1113-20.
198. Argilés, J.M. and e. al, *Myostatin: more than just a regulator of muscle mass*. *Drug Discovery*, 2012. **17**: p. 702-9.
199. Goncalves, D.A. and e. al, *Mechanism involved in 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-mediated inhibition of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle*. *Endocrinology*, 2009. **150**: p. 5395-404.
200. Knight, J.D. and R. Kothary, *The myogenic kinome: protein kinases critical to mammalian skeletal myogenesis*. *Skelet Muscle*, 2011. **1**: p. 29.
201. Stewart, R. and e. al *CREB is activated by muscle injury and promotes muscle regeneration*. *PLoS ONE*, 2011. **6**, DOI: 10.1371/journal.pone.0024714.
202. Ryall, J.G. and G.S. Lynch, *The potential and the pitfalls of beta-adrenoceptor agonists for the management of skeletal muscle wasting*. *Pharmacol Ther*, 2008. **120**: p. 219-32.
203. Quanjun, Y. and e. al, *Serum metabolic profiles reveal the effect of formoterol on cachexia in tumor-bearing mice*. *Mol Biosyst*, 2013. **9**: p. 3015-25.
204. Dutt, V. and e. al, *Skeletal muscle atrophy: Potential therapeutic agents and their mechanism of action*. *Pharmacological Research*, 2015. **99**: p. 86-100.

205. Joassard, O.R. and e. al, *Regulation of Akt-mTOR, ubiquitin-proteasome and autophagy-lysosome pathways in response to formoterol administration in rat skeletal muscle*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**: p. 2444-55.
206. Toledo, M. and e. al, *Formoterol in the treatment of experimental cancer cachexia: effects on heart function*. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2014. **5**: p. 315-20.
207. Busquets, S. and e. al, *Formoterol and cancer muscle wasting in rats: Effects on muscle force and total physical activity*. Exp Ther Med, 2011. **2**(4): p. 731-5.
208. D'Agostino, B. and e. al, *Exercise capacity and cytochrome oxidase activity in muscle mitochondria of COPD patients*. Respir Med, 2010. **104**: p. 83-90.
209. Sullo, N. and e. al, *Skeletal muscle oxidative metabolism in an animal model of pulmonary emphysema: formoterol and skeletal muscle dysfunction*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2013. **48**: p. 198-203.
210. Busquets, S. and e. al, *Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting*. Cancer Res, 2004. **64**: p. 6725-31.
211. Ametller, H. and e. al, *Formoterol may activate rat muscle regeneration during cancer cachexia*. Insci J, 2011. **1**: p. 1-17.
212. Jesinky, S.R. and e. al, *Atomoxetine prevents dexamethasone-induced skeletal muscle atrophy in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2014. **351**: p. 152-63.
213. Goncalves, D.A. and e. al, *Clenbuterol suppresses proteasomal and lysosomal proteolysis and atrophy-related genes in denervated rat soleus muscles independently of Akt*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2012. **393**: p. 152-63.
214. Werner, C. and e. al, *Optimal antagonism of the Renin-Angiotensin-aldosteron system: do we need dual or triple therapy?* Drugs, 2010. **70**: p. 1215-30.
215. Masson, S. and e. al, *Within-patient variability of hormone and cytokine concentrations in heart failure*. Pharmacol Res, 1998. **37**: p. 213-7.
216. Roig, E. and e. al, *Clinical implications of increased plasma angiotensin II despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure*. Eur Heart J, 2000. **21**: p. 53-7.
217. Yoshida, T. and e. al, *Molecular mechanisms and signaling pathways of angiotensin II-induced muscle wasting: potential therapeutic targets for cardiac cachexia*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**: p. 5322-32.
218. Brink, M. and e. al, *Angiotensin II causes weight loss and decreases circulating insulin-like growth factor 1 in rats through a pressor-independent mechanism*. J Clin Invest, 1996. **97**: p. 2509-16.
219. Brink, M. and e. al, *Angiotensin II induces skeletal muscle wasting through enhanced protein degradation and down-regulates autocrine insulin-like growth factor 1*. Endocrinology, 2001. **142**: p. 1489-96.
220. Franz, I.W. and e. al, *Time course of complete normalization of left ventricular hypertrophy during long-term antihypertensive therapy with angiotensin converting enzyme inhibitors*. Am J Hypertens, 1998. **11**: p. 631-9.
221. Anker, S.D. and e. al, *Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study*. Lancet, 2003. **361**: p. 1077-83.
222. Sanders, P.M. and e. al, *Angiotensin II directly induces muscle protein catabolism through the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway and may play a role in cancer cachexia*. Br J Cancer, 2005. **93**: p. 425-34.
223. Smith, N. *Ark plans second Phase III study of Vitor in cancer cachexia after mixed results*. 2006;  
Available from: [http://www.apmhealthurope.com/print\\_story.php?numero=L1135](http://www.apmhealthurope.com/print_story.php?numero=L1135).
224. Cranston, W.I. and B.E. Juel-Jensen, *The effects of spironolacton and chlorthalidone on arterial pressure*. Lancet, 1962. **1**: p. 1161-4.
225. Wolf, R.L. and e. al, *Treatment of hypertension with spironolactone. Double-blind study*. JAMA, 1966. **198**: p. 1143-9.

226. Garthwaite, S.M. and E.G. McMahon, *The evolution of aldosterone antagonists*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **217**: p. 27-31.
227. Sica, D.A., *Eplerenone: a new aldosterone receptor antagonist. Are the FDA's restrictions appropriate?* J Clin Hypertens, 2002. **4**: p. 441-5.
228. Pitt, B. and e. al, *Effectiveness of spironolactone added to an angiotensin-converting enzyme inhibitor and a loop diuretic for severe chronic congestive heart failure (the Randomized Aldactone Evaluation Study [RALES])*. Am J Cardiol, 1996. **78**: p. 902-7.
229. Pitt, B. and e. al, *The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators*. N Engl J Med, 1999. **341**: p. 709-17.
230. Ogino, K. and e. al, *Spironolactone, not furosemide, improved insulin resistance in patients with chronic heart failure*. Int J Cardiol, 2014. **171**: p. 398-403.
231. Wada, T. and e. al, *Aldosterone inhibits insulin-induced glucose uptake by degradation of insulin receptor substrate (IRS) 1 and IRS 2 via a reactive oxygen species-mediated pathway in 3T3-L1 adipocytes*. Endocrinology, 2009. **150**: p. 1662-9.
232. Andriulli, A. and e. al, *Canrenone and androgen receptor-active materials in plasma of cirrhotic patients during long-term K-canrenoate or spironolactone therapy*. Digestion, 1989. **44**: p. 155-62.
233. Armanini, D. and e. al, *Aldosterone receptor blockers spironolactone and canrenone: two multivalent drugs*. Expert Opin Pharmacother, 2014. **15**: p. 909-12.
234. Pitt, B. and e. al, *Serum potassium and clinical outcomes in the Eplerenone Post-Acute Myocardial Infarction Heart Failure Efficacy and Survival Study (EPHESUS)*. Circulation, 2008. **118**: p. 1643-50.
235. Eschaliier, R. and e. al, *Safety and efficacy of eplerenone in patients at high risk for hyperkalemia and/or worsening renal function: analyses of the EMPHASIS-HF study subgroups (Eplerenone in Mild Patients Hospitalization and Survival Study in Heart Failure)*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(1585-93).
236. Kolkhof, P. and e. al, *Molecular pharmacology of the mineralocorticoid receptor: prospects for novel therapeutics*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **350**: p. 310-7.
237. Pitt, B. and F. Zannaf, *Eplerenone: is it time to add this drug to current heart failure therapy?* Ther Adv Chronic Dis, 2012. **3**: p. 5-9.
238. Tessitore, L. and e. al, *Early development of protein metabolic perturbations in the liver and skeletal muscle of tumour-bearing rats. A model system for cancer cachexia*. Biochem J, 1987. **241**(1): p. 153-9.
239. Marzabal, M. and e. al, *A flow cytometric study of the rat Yoshida AH-130 ascites hepatoma*. Cancer Lett, 1993. **72**(3): p. 169-73.
240. Llovera, M. and e. al, *Muscle wasting associated with cancer cachexia is linked to an important activation of the ATP-dependent ubiquitin-mediated proteolysis*. Int J Cancer, 1995. **61**(1): p. 138-41.
241. Lopez-Soriano, J. and e. al, *Lipid metabolism in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma*. Mol Cell Biochem, 1996. **165**(1): p. 17-23.
242. Springer, J. and e. al, *Prevention of liver cancer cachexia-induced cardiac wasting and heart failure*. European heart journal, 2014. **35**: p. 932-941.
243. Schmidt, K. and e. al, *IGF-1 treatment reduces weight loss and improves outcome in a rat model of cancer cachexia*. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2011. **2**: p. 105-9.
244. Hartmann, K., *Der Einfluss der Xanthinoxidasehemmer Allopurinol und Oxypurinol auf Gewichtsverlauf, Körperzusammensetzung und spontane Aktivität in einem Rattenmodell der Tumorkachexie*, in Fachbereich Veterinärmedizin. 2009, FU Berlin.
245. Springer, J. and e. al, *Inhibition of xanthine oxidase reduces wasting and improves outcome in a rat model of cancer cachexia*. Int J Cancer, 2012. **131**(2187-96).
246. Tschirner, A. and e. al, *Ursodeoxycholic acid treatment in a rat model of cancer cachexia*. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2012. **3**: p. 31-6.

247. Saitoh, M.e.a., *Erythropoietin improves cardiac wasting and outcomes in a rat model of liver cancer cachexia*. Int J Cardiol, 2016. **218**: p. 312-317.
248. Toledo, M. and e. al., *A multifactorial anti-cachectic approach for cancer cachexia in a rat model undergoing chemotherapy*. J Cachex Sarcopenia Muscle, 2016. **7**: p. 48-59.
249. Assi, M. and e. al., *Antioxidant supplementation accelerates cachexia development by promoting tumor growth in C26 tumor-bearing mice*. Free Radic Biol Med, 2016. **91**: p. 204-214.
250. Springer, J. and e. al., *The xanthine oxidase inhibitor oxypurinol reduces cancer cachexia-induced cardiomyopathy*. Int J Cardiol, 2013(168): p. 3527-3531.
251. Musolino, V. and e. al., *Megestrol acetate improves cardiac function in a model of cancer cachexia-induced cardiomyopathy by autophagic modulation*. J Cachex Sarcopenia Muscle, 2016.
252. Elkina, Y. and e. al., *Tandospirone reduces wasting and improves cardiac function in experimental cancer cachexia*. Int J Cardiol, 2013. **170**: p. 160-6.
253. Penna, F. and e. al., *Effect of the specific proteasome inhibitor bortezomib on cancer-related muscle wasting*. J Cachex Sarcopenia Muscle, 2016(7): p. 345-354.
254. Toledo, M. and e. al., *Sirtuin 1 in skeletal muscle of cachectic tumour-bearing rats: a role in impaired regeneration?* J Cachex Sarcopenia Muscle, 2011(2): p. 57-62.
255. Konishi, M. and e. al., *Febuxostat improves outcome in a rat model of cancer cachexia*. J Cachex Sarcopenia Muscle, 2015(6): p. 174-180.
256. Palus, S. and e. al., *Simvastatin reduces wasting and improves cardiac function as well as outcome in experimental cancer cachxia*. Int J Cardiol, 2013. **168**: p. 3412-8.
257. Toledo, M. and e. al., *Cancer cachexia: Physical activity and muscle force in tumour-bearing rats*. Oncol Rep, 2011(25): p. 189-193.
258. Busquets, S. and e. al., *Megestrol acetate: Its impact on muscle protein metabolism supports its use in cancer cachexia*. Clin Nutr, 2010(29): p. 733-737.
259. Cremades, O. and e. al., *Nutritional treatment of cancer cachexia in rats*. Eur J Nutr, 2007(46): p. 347-353.
260. Busquets, S. and e. al., *L-Carnitine: An adequate supplement for a multi-targeted anti-wasting therapy in cancer*. Clin Nutr, 2012(31): p. 889-895.
261. Swan, J.W. and e. al., *Insulin resistance in chronic heart failure: relation to severity and etiology of heart failure*. J Am Coll Cardiol, 1997. **30**: p. 527-32.
262. Doehner, W. and e. al., *Impaired insulin sensitivity as an independent risk factor for mortality in patients with stable chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**: p. 1019-26.
263. Volterrani, M. and F. Iellamo, *Eplerenone in chronic heart failure with depressed systolic function*. Int J Cardiol, 2015. **200**: p. 12-4.
264. Zannad, F. and e. al., *Eplerenone in patients with systolic heart failure and mild symptoms*. N Engl J Med, 2011. **364**: p. 11-21.



## Danksagung

Zu allererst bedanke ich mich sehr bei Herrn Prof. Robert Klopffleisch für seine Zusage zur Betreuung meiner Arbeit.

Besonderer Dank gebührt Herrn PD Jochen Springer für die Überlassung des Themas und die immerwährende Unterstützung, sowohl bei der Durchführung der Experimente als auch bei der Erstellung dieser Arbeit. Weiterhin bedanke sehr ich mich bei meinen Kolleginnen der ehemaligen AG Anker im Center for Cardiovascular Research der Charité, insbesondere bei Sandra Palus für die Unterweisung in die versuchstierkundlichen Techniken bei Laborratten und die Supervision des Gesamtexperiments sowie bei Anika Tschirner für ihre Ruhe und Geduld bei der Vermittlung der biochemischen Methoden und der Unterstützung bei den sonographischen Untersuchungen. Bei Miriam Toledo an der AG Argilés der Universität Barcelona bedanke ich mich für die Unterstützung in der experimentellen Phase.

Weiterhin möchte ich mich bei allen ehemaligen Mitdotorandinnen der AG Anker bedanken.



## **Selbständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebene Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, 25. April 2018

Karl-Gunther Glowalla











9 783863 878979

**mbv**berlin mensch und buch verlag

49,90 Euro | ISBN: 978-3-86387-897-9