

**Vergleich der Einflussnahme  
herzinsuffizienzbedingter sowie  
tumorassoziierter Kachexie auf Parameter der  
kardialen Morphologie und Funktion im  
Rattenmodell**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Anika Tschirner  
aus Königs Wusterhausen**

**Januar 2012**

**Die Dissertation wurde durchgeführt in der Arbeitsgruppe Angewandte Kachexieforschung in der Charité - Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Stefan Anker vom Oktober 2007 bis Januar 2012.**

**1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Stefan Anker,  
Campus Virchow-Klinikum,  
Charité – Universitätsmedizin Berlin**

**2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel,  
Institut für Pflanzenphysiologie und Mikrobiologie,  
Freie Universität Berlin**

**Disputation am: 10.05.2012**

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungen.....	VII
Abbildungsverzeichnis.....	XI
Tabellenverzeichnis.....	XV
Zusammenfassung.....	XVII
Abstract.....	XIX
1 Einleitung.....	1
1.1 Kachexie.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.2 Tumorassoziierte Kachexie.....	1
1.2.1 Definition.....	1
1.2.2 Klassifizierung.....	2
1.2.3 Epidemiologie.....	2
1.2.4 Klinische Diagnose.....	3
1.2.5 Pathogenese und Pathophysiologie.....	4
1.2.5.1 Mediatoren.....	6
1.2.5.2 Neuroendokrine Mechanismen.....	7
1.2.5.3 Metabolische Veränderungen.....	7
1.2.5.4 Veränderungen des Proteinstoffwechsels im Muskel.....	11
1.2.5.5 Effekte auf das Herz.....	19
1.3 Kardiale Kachexie als Folge von Herzinsuffizienz.....	20
1.3.1 Definition.....	20
1.3.2 Epidemiologie.....	20
1.3.3 Klinische Diagnose.....	21
1.3.4 Pathogenese und Pathophysiologie.....	21
1.3.4.1 Proinflammatorische Cytokine.....	22

1.3.4.2	Neurohumorale Aktivierung.....	22
1.3.4.3	Kardiales Remodelling .....	24
1.4	Kardiovaskuläre Medikamente .....	24
1.4.1	β-Blocker (Bisoprolol, Carvedilol).....	24
1.4.2	Spironolacton.....	25
1.4.3	Imidapril.....	25
1.5	Ziel der Arbeit.....	26
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Material.....	27
2.1.1	Tiere.....	27
2.1.2	Tierhaltung .....	27
2.1.3	Operationsmaterial .....	27
2.1.4	Verbrauchsmaterial für Tiere .....	28
2.1.5	Tumorzellen .....	28
2.1.6	Medikamente .....	28
2.1.7	Chemikalien .....	28
2.1.8	Inhibitoren .....	30
2.1.9	Enzyme.....	30
2.1.10	Puffer .....	31
2.1.11	Fluorogene Substrate.....	32
2.1.12	SDS-Polyacrylamidgele .....	32
2.1.13	Marker.....	32
2.1.14	Antikörper .....	33
2.1.15	Multiplex Kits.....	34
2.1.16	Real-time PCR.....	34
2.1.17	Zellkultur .....	34
2.1.18	Geräte .....	35
2.1.19	Computerprogramme .....	36

2.1.20	Sonstiges.....	37
2.2	Methoden.....	38
2.2.1	Tierexperimenteller Teil.....	38
2.2.1.1	Tiere und Tierhaltung.....	38
2.2.1.2	Modell der Tumorkachexie.....	39
2.2.1.3	Modell der kardialen Kachexie.....	42
2.2.1.4	Gewichtsanalyse.....	44
2.2.1.5	Aktivitätsmessung.....	44
2.2.1.6	Messung der Körperzusammensetzung mittels NMR.....	44
2.2.1.7	Untersuchung des Herzens.....	44
2.2.2	Aufarbeitung und Analyse des Plasma.....	46
2.2.3	Zellkultur.....	46
2.2.3.1	Isolierung und <i>in vitro</i> Kultivierung neonataler Rattenkardiomyozyten.....	46
2.2.3.2	<i>In vitro</i> Behandlung neonataler Rattenkardiomyozyten.....	46
2.2.4	Molekularbiologische Methoden.....	47
2.2.4.1	RNA-Isolierung mit Trizol®.....	47
2.2.4.2	Quantifizieren von Nukleinsäuren.....	47
2.2.4.3	Reverse Transkription und Taqman-miR-q-RT-PCR.....	48
2.2.5	Proteinbiochemie.....	48
2.2.5.1	Proteinextraktion aus Gewebe.....	48
2.2.5.2	Proteinextraktion aus Zellkultur (für Western Blot).....	49
2.2.5.3	Quantifizierung von Proteinen.....	49
2.2.5.4	Ubiquitin-Proteasomaktivitätsassay.....	50
2.2.5.5	Caspaseaktivitätsassay.....	50
2.2.5.6	SDS-PAGE.....	51
2.2.5.7	Western Blot.....	51
2.2.5.8	Immundetektion.....	51

2.2.5.9	Luminex-Assay.....	52
2.2.5.10	Histologische Aufarbeitung und Färbung.....	52
2.2.5.11	Humane Daten .....	53
2.2.5.12	Statistische Auswertung .....	53
3	Ergebnisse.....	54
3.1	Vergleich tumorassoziierter mit kardialer Kachexie.....	54
3.1.1	Tumorvolumen und Tumorzellzahl in der Tumorstudie .....	54
3.1.2	Mortalität und Infarktgrößen in der Herzinfarktstudie.....	55
3.1.3	Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Organgewichte .....	56
3.1.4	Parameter für Lebensqualität.....	61
3.1.5	Analyse des Plasma.....	62
3.1.6	Herzgewicht und Herzfunktion.....	63
3.1.6.1	Herzgewicht .....	63
3.1.6.2	Herzfunktion.....	64
3.1.6.3	Linksventrikuläre Wandstärken .....	68
3.1.6.4	Elektrokardiogramm und hämodynamische Untersuchung.....	70
3.1.6.5	Biomarker für Herzinsuffizienz.....	72
3.1.6.6	Fibrose.....	73
3.1.7	Katabole Mechanismen im Herzen .....	74
3.1.7.1	Apoptose .....	74
3.1.7.2	Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems.....	75
3.1.7.3	Foxo3 $\alpha$ und MuRF-1 .....	76
3.1.7.4	Autophagie.....	77
3.1.8	Anabole Signalwege im Herzen .....	78
3.2	Pharmakologische Behandlung tumorinduzierter Kardiomyopathie .....	81
3.2.1	Überleben.....	81
3.2.2	Tumorzellzahl und Tumorvolumen.....	82
3.2.3	Körpergewicht und Körperzusammensetzung.....	83

3.2.4	Lebensqualität .....	84
3.2.5	Herzfunktion .....	85
3.2.6	Korrelation .....	87
3.2.7	Biomarker .....	88
3.2.8	Katabole Abbauege im Herzgewebe .....	88
3.2.8.1	Apoptose .....	88
3.2.8.2	Ubiquitin-Proteasom-System .....	89
3.2.8.3	Autophagie .....	90
3.2.8.4	Foxo3 $\alpha$ und MuRF-1 .....	90
3.2.9	Anabole Signalwege .....	91
3.2.10	Veränderung des Zytoskeletts .....	93
3.3	<i>In vitro</i> Effekte kardiovaskulärer Medikamente .....	94
3.4	Humane Daten .....	95
3.4.1	Klinische Daten von Tumorpatienten .....	95
3.4.2	Humane Daten <i>post mortem</i> .....	96
4	Diskussion .....	99
4.1	Tumorinduzierte Kachexie im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell .....	99
4.1.1	Tumorzellzahl und Tumolvolumen .....	99
4.1.2	Effekte auf das Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Organgewichte .....	100
4.1.3	Parameter der Lebensqualität .....	102
4.1.4	Effekte auf die Herzstruktur und -funktion .....	103
4.1.5	Einfluss auf katabole und anabole Signalwege .....	105
4.2	Kardiale Kachexie im LAD-Rattenmodell .....	108
4.2.1	Mortalität und Infarktgröße .....	109
4.2.2	Effekte auf das Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Organgewichte .....	109
4.2.3	Effekte auf die Herzstruktur und -funktion .....	111

4.2.4	Einfluss auf katabole und anabole Signalwege .....	113
4.3	Pharmakologische Therapie im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell .....	114
4.3.1	Einfluss auf das Überleben .....	115
4.3.2	Tumorzellzahl und Tumorzellenvolumen.....	115
4.3.3	Körpergewicht und Körperzusammensetzung .....	116
4.3.4	Parameter der Lebensqualität .....	117
4.3.5	Einfluss auf die Herzfunktion .....	118
4.3.6	Katabole und anabole Mechanismen .....	119
4.3.7	<i>In vitro</i> Versuch zur Klärung des Wirkmechanismus von Bisoprolol und Spironolactone.....	120
4.4	Kardiale Kachexie bei Tumorzellenpatienten .....	121
5	Literatur.....	123
	Danksagung.....	144
	Erklärung .....	145



## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACE	<b>Angiotensin-konvertierendes Enzym</b>
AH-130	<b>Aszites Hepatom 130</b>
AIF	<i>Apoptose-induzierender Faktor</i>
AMC	<b>7-Amino-4-methylcumarin</b>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP	<b>Alkaline Phosphatase</b>
APS	<b>Ammoniumpersulfat</b>
APP	<b>Akut Phase Protein</b>
ATGL	<b>Adipozyten-Triglyzerid-Lipase</b>
ATP	<b>Adenosintriphosphat</b>
BAT	Braunes Fettgewebe
B-Mode	<i>brightness modulation</i>
BMI	<b>Körpermassenindex</b>
BNP	natriuretisches Peptid Typ B
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
Bz-VGR	Benzoyl- Val-Gly-Arg-7
C26	<b>Colon-26 Karzinom</b>
CASCO	<b>Cachexia Score</b>
CHAPS	<i>3-[(3Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propanesulfonate</i>
CHI	<b>Chronische Herzinsuffizienz</b>
CHIP	<b>C-terminus of Hsc70-interacting protein</b>
CO	Herzminutenvolumen
COPD	Chronische obstruktive Lungenerkrankung
CRP	<b>C-reaktives Protein</b>
d	Tag
DED	<i>Death effector domain</i>
DMEM	<b>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</b>
DMF	<b>Dimethylformamid</b>
DMSO	<b>Dimethylsulfoxid</b>
DTT	<b>Dithiothreitol</b>
EDL	<i>Extensor digitorum longus</i>
EDTA	<b>Ethylendiamintetraacetat</b>

EF	Auswurfsfraktion
EGTA	<i>Ethyleneglycol-bis(β-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
FOXO	<i>Forkhead box-O</i>
GAPDH	<b>G</b> lycerinaldehyd-3- <b>p</b> hospat- <b>D</b> ehydrogenase
GC	M. <b>g</b> astrocnemius
GH	<i>Growth Hormone</i>
GLUT	<b>G</b> lukose <b>T</b> ransportprotein
GSK	<b>G</b> lykogen <b>S</b> ynthase <b>K</b> inase
GV-SOLAS	<b>G</b> esellschaft für <b>V</b> ersuchstierkunde/ <i>Society for laboratory animal science</i>
HEPES	2-(4-(2- <b>H</b> ydroxyethyl)- 1-piperaziny)- <b>e</b> thansulfonsäure
HSL	<b>H</b> ormon-sensitive <b>L</b> ipase
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor 1</i>
IL	Interleukin
INT-γ	<b>I</b> nterferon- <b>γ</b>
IRS	Insulin <b>R</b> ezeptor <b>S</b> ubstrat
LAD	<i>Left Anterior Descending</i>
LC-3	<i>Microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
LLC	Lewis <b>L</b> ungenkarzinom
LPL	<b>L</b> ipoproteinlipase
Suc-LLVY	Suc-Leu-Leu-Val-Tyr
LV Area (d/s)	<i>Left ventricular Area (diastole/systole)</i>
MAC16	<b>M</b> urines <b>A</b> denokarzinom des <b>K</b> olon
MAFbx	<i>Muscle Atrophy F-box</i>
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
MDM2	<i>Murine double minute</i>
β-ME	<b>β</b> - <b>M</b> ercaptoethanol
mGPS	<i>Modified Glasgow Prognostic Score</i>
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>
MI	<b>M</b> yokardialer <b>I</b> nfarkt
miRNA	<b>m</b> icro <b>R</b> NA
M-Mode	<i>Motion modulation</i>
MMP	<b>M</b> atrix <b>M</b> etalloproteinase

mRNA	<i>messenger RNA</i>
MuRF	<i>Muscle specific RING Finger protein</i>
MyHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>
MyoD	<b>Myogener Determinator</b>
n	Anzahl
NFκB	<i>Nuclear factor κB</i>
NGAL	<i>Neutrophil gelatinase associated lipoprotein</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NPY	<b>Neuropeptid Y</b>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
OD	<b>Optische Dichte</b>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGC-1α	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator</i>
PGPH	<b>Peptidyl-Glutamyl-Protein-Hydrolisierend</b>
PI3K	<b>Phosphoinositol-3-Kinase</b>
PKB	<b>Proteinkinase B</b>
PMSF	<b>Phenylmethylsulfonylfluorid</b>
pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PW-Doppler	<b>Pulsed-Wave Doppler</b>
PVDF	<b>Polyvinylidenfluorid</b>
RAAS	<b>Renin-Angiotensin-Aldosteron-System</b>
REE	<i>Resting Energy Expenditure</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SDS-PAGE	<b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese</b>
SMAD	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 2</i>
SPF	spezifisch pathogen frei
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
TAE	<b>Tris-Acetat-EDTA</b>
TBS	<b>Tris buffered saline</b>
TBST	<b>TBS + Tween®20</b>
TE	<b>Tris-EDTA</b>
TEMED	<b>Tetramethylethylendiamin</b>
TIMP	<i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinase</i>

TNF- $\alpha$	<b>Tumornekrosefaktor alpha</b>
Tris	<b>Tris</b> (Hydroxymethyl)-Aminomethan
UCP	<b><i>Uncoupling Protein</i></b>
UPS	<b>Ubiquitin-Proteasom-System</b>
Vs.	<b>Versus</b>
WAT	Weißes Fettgewebe
Z-LLE-AMC	Z-Leu-Leu-Glu

## Abbildungsverzeichnis

<u>Einleitung</u>	Seite
Abbildung 1: Klassifizierung von Tumorkachexie	2
Abbildung 2: Pathophysiologie von Tumorkachexie	6
Abbildung 3: Veränderungen des Stoffwechsels bei Tumorkachexie	8
Abbildung 4: Fettstoffwechsel in Adipozyten	11
Abbildung 5: Induktion von Apoptose	14
Abbildung 6: Struktur der 26S-Proteasomen	15
Abbildung 7: Mechanismus der Ubiquitinierung und anschließenden Proteindegradation	16
Abbildung 8: Bildung des Autophagolysosoms	17
Abbildung 9: Übersicht der Signalwege im Skelettmuskel, die Atrophie und Hypertrophie vermitteln	19
<u>Material/ Methoden</u>	
Abbildung 10: Studiendesign der tumorassoziierten Kachexie	39
Abbildung 11: Studiendesign der tumorassoziierten Kachexieprävention	40
Abbildung 12: Studiendesign akuter und chronischer Herzinfarktversuch	42
Abbildung 13: Aufbau des Western Blots, Transfer von einem Gel	51
<u>Ergebnisse</u>	
Abbildung 14: Darstellung der Ratten und Zellen aus der Tumorstudie	55
Abbildung 15: Infarktstudie (Herzen, Infarktgröße)	55
Abbildung 16: Veränderung des Körpergewichts in der Tumorstudie und 56 und 210 Tage nach myokardialer Infarktoperation	57
Abbildung 17: Veränderung der fettfreien Masse in der Tumorstudie und 56 Tage nach myokardialer Infarktoperation	57
Abbildung 18: Veränderung der Fettmasse in der Tumorstudie und 56 Tage nach myokardialer Infarktoperation	58

Abbildung 19:	Veränderung der Nahrungsaufnahme und Aktivität in der Tumorstudie	62
Abbildung 20:	Plasma-Messung von Albumin, Cholesterol, HDL, LDL und Triglyzeriden in der Tumorstudie	62
Abbildung 21:	Herzgewicht in der Tumorstudie und 56 und 210 Tage nach myokardialer Infarktoperation	63
Abbildung 22:	Herzrate und Herzminutenvolumen in der Tumorstudie und 56 Tage nach myokardialer Infarktoperation	67
Abbildung 23:	Echokardiographische M-Mode-Darstellung des linken Ventrikels in der Tumorstudie und 56 und 210 Tage nach myokardialer Infarktoperation	68
Abbildung 24:	Veränderung der Hinterwandstärke in der Diastole und Systole in der Tumorstudie sowie 56 Tage nach myokardialer Infarktoperation	69
Abbildung 25:	Veränderung der Septumstärke in der Diastole und Systole in der Tumorstudie sowie 56 Tage nach myokardialer Infarktoperation	69
Abbildung 26:	Elektrokardiogramm der Tiere aus dem Tumorversuch	70
Abbildung 27:	Hämodynamische Druckkurven von Sham- und Tumortieren	71
Abbildung 28:	Messung von Biomarkern für Herzinsuffizienz im Tumorversuch	73
Abbildung 29:	Masson Goldner Trichromfärbung des linksventrikulären Gewebes in der Tumorstudie	73
Abbildung 30:	Plasma-Messung von Fibrinogen, MCP-1 und TIMP-1 im Tumorversuch	74
Abbildung 31:	Caspase-3 Aktivität im Herzgewebe im Tumorversuch und 56 und 210 Tage nach myokardialer Infarktoperation	74
Abbildung 32:	Caspase-6 Aktivität im Herzgewebe im Tumorversuch und 56 und 210 Tage nach myokardialer Infarktoperation	75
Abbildung 33:	<i>Trypsin-like</i> Aktivität im Herzgewebe im Tumorversuch und 56 und 210 Tage nach myokardialer Infarktoperation	75
Abbildung 34:	miR-199a im Herzgewebe von Sham- und Tumortieren	76
Abbildung 35:	Western Blot Analyse von Foxo3 $\alpha$ , pFoxo3 $\alpha$ und MuRF-1 im Herzgewebe im Tumorversuch und 56 und 210 Tage nach myokardialer Infarktoperation	76

Abbildung 36:	Western Blot Analyse von p62 im Herzgewebe im Tumorversuch und 56 und 210 Tage nach myokardialer Infarktoperation	77
Abbildung 37:	Western Blot Analyse von Akt im Herzgewebe im Tumorversuch und 56 und 210 Tage nach myokardialer Infarktoperation	78
Abbildung 38:	Western Blot Analyse im Herzgewebe im Tumorversuch und 56 und 210 Tage nach myokardialer Infarktoperation	79
Abbildung 39:	Kaplan-Meier-Überlebensanalyse von Placebo, Bisoprolol und Carvedilol	81
Abbildung 40:	Kaplan-Meier-Überlebensanalyse von Placebo, Spironolactone und Imidapril	82
Abbildung 41:	Tumorvolumen und Tumorzellzahl in der Interventionsstudie	83
Abbildung 42:	Veränderung des Körpergewichtes, der fettfreien Masse und der Fettmasse in der Interventionsstudie	84
Abbildung 43:	Veränderung der Nahrungsaufnahme und Aktivität in der Interventionsstudie	84
Abbildung 44/	Veränderung der Parameter der Herzfunktion in der	
Abbildung 45:	Interventionsstudie	86
Abbildung 46:	Veränderung der Hinterwandstärke in der Diastole und Systole in der Interventionsstudie	87
Abbildung 47:	Korrelation zwischen der linksventrikulären Masse und den Überlebenstagen	87
Abbildung 48:	Plasma-Messung von Aldosteron, NGAL, Natrium, Kalium, Kreatinin und von der Kreatinin Kinase von Sham- und Tumortieren	88
Abbildung 49:	Effekte kardiovaskulärer Medikamente auf die Caspase-3 und Caspase-6 Aktivität im Herzgewebe von Tumortieren	89
Abbildung 50:	Effekte kardiovaskulärer Medikamente auf die Ubiquitin-Proteasom-Aktivität im Herzgewebe von Tumortieren	89
Abbildung 51:	Effekte kardiovaskulärer Medikamente auf die Autophagie im Herzgewebe von Tumortieren	90
Abbildung 52:	Effekte kardiovaskulärer Medikamente auf katabole Mediatoren im Herzgewebe von Tumortieren	91
Abbildung 53:	Effekte kardiovaskulärer Medikamente auf die anabole Proteinexpression im Herzgewebe von Sham- und Tumortieren	92

Abbildung 54:	Veränderung des Zytoskeletts im Herzgewebe des Yoshida Hepatoma Modells und der Einfluss von Bisoprolol oder Spironolacton	93
Abbildung 55:	Veränderung des Zytoskeletts im Herzgewebe des Yoshida Hepatoma Modells und der Einfluss von Carvedilol oder Imidapril	93
Abbildung 56:	Effekte von $\beta$ -Blockern auf die Proteinexpression von GSK-3 und die mRNA Expression von MHC $\alpha$ in neonatalen Rattenkardiomyozyten	94
Abbildung 57:	Effekte von kardiovaskulären Medikamenten auf die mRNA Expression von MHC $\alpha$ und die Ratio von pGSK-3/GSK-3 in neonatalen Rattenkardiomyozyten	95
Abbildung 58:	Aldosteron- und BNP-Level im Plasma von gesunden Probanden und von Tumorpatienten mit und ohne Kachexie	96
Abbildung 59:	Herzgewicht und Stärke der linksventrikulären und rechtsventrikulären Hinterwand in Kontrollen und Tumorpatienten mit und ohne Kachexie	97
Abbildung 60:	Histologische Färbung der linksventrikulären Hinterwand von Kontrollen und nicht kachektischen und kachektischen Tumorpatienten mit Azan oder Sirius Red	98



## Tabellenverzeichnis

<u>Material/</u>	Seite
<u>Methoden</u>	
Tabelle 1: Tierstämme	27
Tabelle 2: Medikamente	28
Tabelle 3: Chemikalien	28
Tabelle 4: Inhibitoren	30
Tabelle 5: Enzyme	30
Tabelle 6: Puffer und Pufferzusammensetzung	31
Tabelle 7: Fluorogene Substrate	32
Tabelle 8: SDS-Polyacrylamidgele	32
Tabelle 9: Primärantikörper	33
Tabelle 10: Sekundärantikörper	33
Tabelle 11: Multiplex-Kits	34
Tabelle 12: Zellkulturmedium	34
Tabelle 13: Geräte	35
Tabelle 14: Computerprogramme	36
Tabelle 15: Medikamente und Gruppeneinteilung	41
Tabelle 16: Behandlung der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit Medikamenten	47
Tabelle 17: Proteolytische Aktivitäten des Ubiquitin-Proteasom-Systems	50
 <u>Ergebnisse</u>	
Tabelle 18: Tumorvolumen	54
Tabelle 19: Körpergewicht, fettfreie Masse und Fettmasse vor Beginn der Tumorstudie ( <i>Baseline</i> )	56
Tabelle 20: Körpergewicht, fettfreie Masse und Fettmasse vor Beginn der Infarktstudien ( <i>Baseline</i> )	56
Tabelle 21: Organgewichte der Shamtiere in der Tumorstudie und in den Infarktstudien	59
Tabelle 22: Organgewichte in der Tumorstudie	60
Tabelle 23: Organgewichte 56 und 210 Tage nach myokardialem Infarkt	60

Tabelle 24: Nahrungsaufnahme und Aktivität vor Beginn der Tumorstudie ( <i>Baseline</i> )	61
Tabelle 25: Gewicht der Herzkompartimente 56 und 210 Tage nach myokardialen Infarkt	64
Tabelle 26: Parameter der Herzfunktion in der Tumorstudie	65
Tabelle 27: Parameter der Herzfunktion 56 und 210 Tage nach myokardialen Infarkt	66
Tabelle 28: Stärke der Hinterwand und des Septums in der Diastole und Systole in der Tumorstudie und 56 Tage nach myokardialen Infarkt	68
Tabelle 29: Messung des Füllungszustandes des Herzens anhand des Mitralflusses in der Tumorstudie und 56 Tage nach myokardialen Infarkt	71
Tabelle 30: Bestimmung von hämodynamischen Parametern im Tumorversuch	72
Tabelle 31: Ergebnisse der Western Blot Analyse des Herzgewebes im Tumorversuch und 56 und 210 Tage nach myokardialen Infarkt	80
Tabelle 32: <i>Baseline</i> -Werte für das Körpergewicht, fettfreie Masse und Fettmasse in der Interventionsstudie	83
Tabelle 33: Echokardiographische <i>Baseline</i> -Werte für die Interventionsstudie	85
Tabelle 34: Ergebnisse der Western Blot Analyse des Herzgewebes in der Interventionsstudie	92
Tabelle 35: Daten von lebenden Kontrollen und Tumorpatienten	96
Tabelle 36: Daten von verstorbenen Kontrollen und Tumorpatienten	97

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wurden die Induktion und Progression der Kachexie sowie deren Auswirkungen auf die Herzmorphologie und –funktion in dem AH-130 Yoshida Hepatoma Modell (Tumormodell) mit dem LAD-Modell (Myokardinfarktmodell) in jungen männlichen Ratten miteinander verglichen. Danach erfolgte eine kardiovaskuläre Behandlung von mit AH-130 Yoshida Hepatoma Zellen inokulierten Ratten. Als letztes wurden Daten bezüglich der Herzmorphologie von kachektischen Tumorkachexiepatienten analysiert. Dabei ergaben sich folgende Erkenntnisse:

- 1) Vergleich von tumorassoziierter Kachexie (AH-130 Yoshida Hepatoma Modell) mit kardialer Kachexie (Myokardinfarktmodell):
  - Während Tumortiere frühzeitig eine Kachexie, gekennzeichnet durch Verlust von Fettmasse und Skelettmuskelmasse, aufwiesen, entwickelten die Infarkttiere keine Kachexie. Bei den Tumortieren zeigte sich insbesondere auch eine Atrophie der Organe, vor allem des Myokards.
  - Desweiteren war die Entwicklung einer kardialen Dysfunktion in den Tumortieren feststellbar, die sich durch verschlechterte echokardiographische Parameter wie zum Beispiel dem Schlagvolumen, der Verkürzungsfraction und dem Herzminutenvolumen äußerte. Auch der Blutdruck und die Erregungsleitung im Herzen nahmen durch Tumorinokulation ab. Biomarker bestätigten die Schädigung des Herzens sowie ventrikuläres Remodelling. Die Infarkttiere wiesen aufgrund der induzierten Herzinsuffizienz Ödeme auf. Ferner kam es durch die Infarktinduktion zu einer Zunahme des Herzgewichtes, einer Dilatation des Ventrikels und es zeigte sich ein Trend hinsichtlich einer Erhöhung der Herzrate. Im Gegensatz dazu nahmen der ventrikuläre Durchmesser und die Herzrate in den Tumortieren ab, wodurch sich diese Kardiomyopathie von einer klassischen Herzinsuffizienz unterschied.
  - Die Analyse des Herzgewebes zeigte eine Zunahme von Apoptose, Autophagie und der Ubiquitin-Proteasomaktivität in den Tumortieren. Ferner wiesen diese Tiere eine reduzierte anabole Signaltransduktion auf. Hingegen wurden durch Infarktinduktion Hypertrophie-vermittelnde Signalwege induziert.

## 2) Behandlung von Tumortieren (AH-130 Modell) mit kardiovaskulären Medikamenten:

- Der spezifische  $\beta_1$ -Blocker Bisoprolol (5mg/kg/d) oder der Aldosteronantagonist Spironolacton (50mg/kg/d) konnten das Überleben von Tumortieren verlängern, während der unspezifische  $\beta$ -Blocker Carvedilol (30mg/kg/d) oder der ACE-(Angiotensin-konvertierendes-Enzym)-Inhibitor Imidapril (0,4mg/kg/d) keinen positiven Effekt auf das Überleben zeigten.
- Bisoprolol oder Spironolacton konnten den Verlust von Skelettmuskelmasse, Fettmasse und des linksventrikulären Gewebes verringern. Die Behandlung mit Spironolacton führte sogar zu einer Zunahme der linksventrikulären Masse und zu einer verbesserten Herzfunktion. Imidapril konnte zwar den Verlust von Körpergewicht verhindern, jedoch hatte es keinen Einfluss auf die in Tumortieren verschlechterte Herzfunktion. Carvedilol konnte weder die Kachexie mildern, noch die Kardiomyopathie verhindern.
- Bisoprolol oder Spironolacton konnten den Katabolismus reduzieren und den Anabolismus in den Tumortieren steigern, Carvedilol und Imidapril hingegen nicht.

## 3) Analyse von humanen Daten kachektischer Tumorpatienten:

- Die Ergebnisse zeigten eine Atrophie des Herzens mit Abnahme der Hinterwandstärke und Fibrose. Erhöhtes BNP ließ eine Schädigung des Myokards vermuten. Die Daten deuten auf eine eventuell verschlechterte Herzfunktion hin.

## Abstract

In this dissertation the induction and progression of cachexia and its impact on the heart were investigated and compared in a tumor model (AH-130 Yoshida Hepatoma) and a myocardial infarction model (LAD) in young male rats. In AH-130 study the treatment of tumor-bearing rats with cardiovascular drugs was made. The analysis of cardiac data of cachectic cancer patients was presented in this research as well. The following scientific findings were shown:

1) Comparison of a cancer cachexia model (AH-130 Yoshida Hepatoma) with an cardiac cachexia model (myocardial infarction):

- While tumor animals developed a real cachexia characterized by a loss of fat mass and skeletal muscle mass, infarct animals did not. Tumor animals had also atrophic organs, especially the heart.
- Tumor animals showed a myocardial dysfunction visible by echocardiographic parameters like stroke volume, fractional shortening and cardiac output. Blood pressure and repolarization decreased in the heart due to the tumor inoculation. Biomarkers confirmed the damage of the heart and ventricular remodeling. Infarct animals developed heart failure induced edema. In addition, myocardial induction led to a gain of heart weight, dilatation of the ventricle and there was a trend to an increase of the heart rate. In contrast the ventricular diameter and the heart rate decreased in tumor-bearing rats distinguishing this cardiomyopathy from classical heart failure.
- Analysis of the heart revealed more apoptosis, autophagy and a higher ubiquitin proteasome activity in the tumor animals. Furthermore, these animals showed a reduced anabolic signaling. In contrast myocardial infarction induced hypertrophic signaling.

2) Treatment of tumor-bearing rats with cardiovascular drugs (AH-130):

- The specific  $\beta_1$ -blocker bisoprolol (5mg/kg/d) or the aldosterone antagonist spironolactone (50mg/kg/d) showed an increase in the survival of tumor-bearing animals, while the unspecific  $\beta$ -blocker carvedilol (30mg/kg/d) or the angiotensin-converting-enzyme inhibitor imidapril (0,4mg/kg/d) showed no positive effect.

- Bisoprolol or spironolactone could prevent the loss of skeletal muscle mass, fat mass and left ventricular tissue. Treatment with spironolactone increased the left ventricular mass and led to an improved heart function. Imidapril inhibited the loss of body weight, but had no effect on the impaired heart function in tumor-bearing animals. Carvedilol could neither attenuate the cachexia nor the cardiomyopathy.
- Bisoprolol or spironolacton reduced the catabolism and increased anabolism in Tumor-bearing animals, but carvedilol or imidapril did not.

### 3) Analysis of heart data of cachectic cancer patients:

- The results revealed atrophy of the heart with a reduced posterior wall and elevated fibrosis. Higher BNP supposed a damaged heart. These data may indicate an impaired heart function of cachectic cancer patients.

## **1 EINLEITUNG**

### **1.1 Kachexie**

#### **1.1.1 Definition**

Kachexie wird als ein komplexes metabolisches Syndrom definiert, das als Komorbidität mit anderen Grunderkrankungen assoziiert ist und durch Verlust von Muskelmasse mit oder ohne Abnahme von Fettmasse gekennzeichnet ist.<sup>1</sup> Kachexie tritt u.a. sowohl bei zahlreichen chronischen Organerkrankungen (z.B. chronische Herzinsuffizienz, chronisch obstruktive Lungenerkrankung), Sepsis, Karzinomen als auch bei AIDS auf.<sup>2</sup> Da Kachexie schlecht festgestellt werden kann, muss für die klinische Diagnose ein nicht ödematöser Gewichtsverlust von 5% oder mehr innerhalb von 12 Monaten vorliegen sowie drei der folgenden Kriterien wie zum Beispiel Anorexie, ein Erschöpfungszustand, verringerte Muskelkraft, ein geringer fettfreier Massenindex oder veränderte biochemische Werte als Folge von Inflammation, Anämie oder Hypoalbuminämie vorhanden sein. Kachexie bei Kindern hingegen äußert sich durch Wachstumsstörungen.<sup>1</sup> Da die Atrophie des Gewebes zu einer allgemeinen Schwächung führt, sind Kachexiepatienten durch eine verminderte Mobilität in ihrer Lebensqualität eingeschränkt und weisen durch das Fehlen erfolgreicher Therapien eine erhöhte Mortalität auf.<sup>2, 3</sup> Deswegen ist die Entwicklung von Medikamenten zur Behandlung von Kachexie von großem Interesse.<sup>4-6</sup> Kachexie muss jedoch von anderen Abmagerungsprozessen wie Anorexie, Sarkopenie, Dehydrierung, Malabsorption und Hyperthyreose abgegrenzt werden, da diese einen prä-kachektischen Zustand beschreiben, der zumeist behandelt werden kann.<sup>1, 7</sup>

### **1.2 Tumorassoziierte Kachexie**

#### **1.2.1 Definition**

Tumorassoziierte Kachexie wird als „multifaktorielles Syndrom“ beschrieben, das durch kontinuierlichen Verlust an Skelettmuskelmasse mit oder ohne Verlust von adipösem Gewebe charakterisiert ist.<sup>8</sup> Dabei erfolgt aber gleichzeitig der Erhalt der viszeralen Proteinvorkommen.<sup>9</sup> Dabei dienen zur Diagnose ein Gewichtsverlust von über 5%

innerhalb von 6 Monaten, ein BMI niedriger als 20kg/m<sup>2</sup> oder Sarkopenie mit mehr als 2% anhaltendem Gewichtsverlust<sup>8</sup>. Weitere Merkmale der Tumorkachexie sind Anorexie, Asthenie, Müdigkeit sowie ein veränderter Metabolismus.<sup>10, 11</sup> Laut Tisdale *et al.* sind vom Tumor ausgeschiedene Faktoren maßgeblich an der Entwicklung und Progression der Tumorkachexie beteiligt.<sup>12</sup>

### 1.2.2 Klassifizierung

Klinisch betrachtet wird Tumorkachexie in die Phasen Prä-Kachexie und Kachexie mit den Stufen leicht, mittelschwer und schwer eingeteilt (Abbildung 1).<sup>8</sup> Die Prä-Kachexie schreitet, abhängig vom Typ der Neoplasie und dem Ansprechen auf die Therapie, unterschiedlich stark fort und endet als Kachexie bei fortgeschrittenem Krebsleiden mit schwerwiegenden körperlichen Beeinträchtigungen, resultierend im Tod.<sup>8</sup> Um den Grad der Kachexie bei Tumorpatienten einschätzen und sie dementsprechend besser therapieren zu können, schlugen Argiles *et al.* ein noch nicht validiertes Punktesystem namens CASCO (*Cachexia score*) vor.<sup>13</sup> Dieses System vergibt bis zu 100 Punkte für die Faktoren Verlust von Körpergewicht und Muskelmasse, Anorexie, Veränderungen des Immunsystems und des Stoffwechsels, für den physischen Zustand und die Lebensqualität.<sup>13</sup>

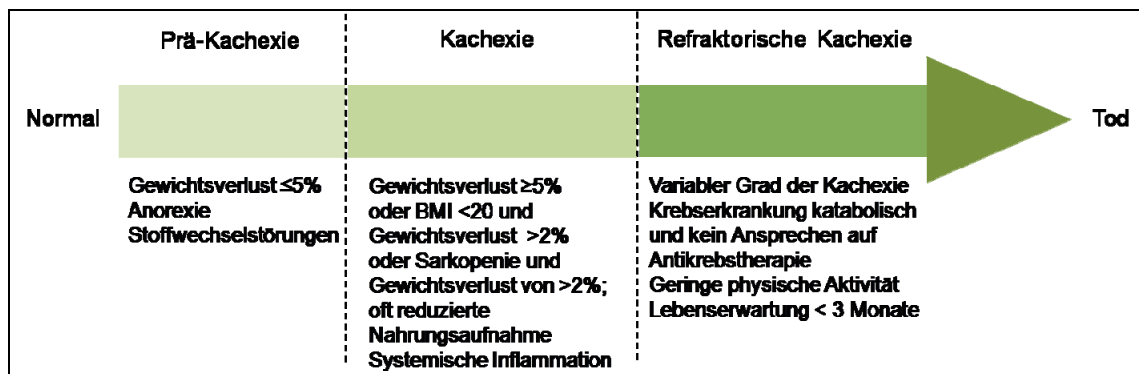


Abbildung 1. Klassifizierung von Tumorkachexie, modifiziert nach Fearon *et al.*<sup>8</sup>

### 1.2.3 Epidemiologie

13-55% der Krebspatienten weisen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung bereits Anorexie auf, die dann im Endstadium der Krankheit eine Prävalenz von 65% erreicht.<sup>14, 15</sup> Weiterhin tritt bei 50% der Patienten mit Neoplasien Kachexie als Begleiterscheinung auf, wobei die Inzidenz abhängig von der Art des Tumors unterschiedlich hoch ist.<sup>16</sup> Die höchste Inzidenz für Kachexie liegt bei Patienten mit



soliden Tumoren vor, wovon Patienten mit Magen- und Pankreaskarzinomen mit 83-87% am häufigsten von Kachexie betroffen sind.<sup>17</sup> Desweiteren schließen sich Tumore des Gehirns, der Speiseröhre und des Halses mit einer Inzidenz von 72-79% an, gefolgt vom Lungenkarzinom, kolorektalen Karzinomen und hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphomen mit einer Häufigkeit von 48-61%.<sup>17</sup> Patienten mit Brustkarzinom, akuter nicht-lymphatischer Leukämie, Sarkomen und weniger aggressiven Formen des Non-Hodgkin-Lymphoms zeigen mit 31-40% das geringste Auftreten von Kachexie.<sup>17</sup> Kachexie kann mit unterschiedlicher Prävalenz in allen Stadien der Tumorerkrankung auftreten, steigt jedoch auf bis zu 86% in den letzten Lebenswochen vor dem Tod.<sup>11, 18</sup> Die Ausbildung einer Kachexie kann sich auch bei Patienten gleicher Neoplasie unterschiedlich manifestieren.<sup>19</sup> Als Ursache dafür werden sowohl der Einfluss des Phänotyps des Tumors als auch des Genotyps des Patienten auf die Entwicklung der Kachexie gesehen.<sup>19, 20</sup>

Weiterhin ist bekannt, dass Gewichtsverlust ein prognostischer Faktor für das Überleben von Tumorpatienten ist und mit dem Ansprechen auf die Chemotherapie korreliert.<sup>11, 17</sup> Dabei hängt das Ausmaß des Gewichtsverlustes von der Lokalisation des Tumors, dessen Größe, Art und Stadium sowie vom Alter des Patienten und der Therapie ab.<sup>21</sup> Hess *et al.* konnten beim Ovarialkarzinom eine 7%ige Erhöhung des Todesfallrisikos für jede 5%ige Reduktion des Gewichtes nachweisen.<sup>22</sup> Gründe für die schlechteren Überlebenschancen kachektischer Tumorpatienten könnten auftretende Komplikationen von chirurgischen Eingriffen, der Strahlen- oder Chemotherapie sein.<sup>21</sup> Durch die von der Kachexie resultierende Muskelschwäche sind Patienten physisch eingeschränkt bis hin zu bettlägerig, so dass ihre Lebensqualität, bestehend aus dem normalen alltäglichen und sozialen Leben, sehr eingeschränkt wird.<sup>23, 24</sup> Laut Tisdale *et al.* ist ein 30%iger Verlust von Körpergewicht letal.<sup>11</sup> Letztendlich sterben 20% der Krebspatienten an den Folgen der Kachexie und nicht an der Ausgangserkrankung.<sup>25</sup>

#### 1.2.4 Klinische Diagnose

Zur Diagnose von Kachexie bei Tumorpatienten dienen Faktoren wie das Körpergewicht, verminderter Appetit (Anorexie), Erschöpfung und die Berechnung des Körpermassenindex, der nicht unter  $18\text{kg/m}^2$  liegen sollte.<sup>26</sup> Dabei ist eine erhöhte Mortalität mit einem sehr geringen Körpermassenindex assoziiert.<sup>5</sup> Jedoch können kachektische Patienten anfänglich auch adipös sein, wobei der Muskelverlust durch die übermäßige Fettmasse zunächst verborgen bleiben kann und eine Diagnose erschwert.<sup>27, 28</sup> Somit dienen zur Diagnose nicht nur das Körpergewicht sondern auch die Analyse der Körperzusammensetzung (Fettmasse, Skelettmuskulatur,

Wasseranteil).<sup>29</sup> Paradoxe Weise führt Adipositas bei chronisch erkrankten Patienten wie zum Beispiel chronischer Herzinsuffizienz zu einem besseren Überleben des Patienten.<sup>30</sup>

Anorexie äußert sich durch Symptome wie zum Beispiel ein beim Essen sehr schnell einsetzendes Sättigungsgefühl, Geschmacks- und Geruchsveränderungen sowie Übelkeit.<sup>8, 31</sup> Weiterhin können Merkmale wie Malabsorption des Darmes oder Verstopfung auftreten.<sup>8, 26</sup> Desweiteren ist die sorgfältige Untersuchung des Patienten auf Ödeme oder Aszites (Wasseransammlungen in der Bauchhöhle), die bei Neoplasien auftreten können, notwendig, da sie die eigentliche Atrophie des Körpergewebes verbergen können.<sup>26</sup> Als weitere Diagnosemarker werden Plasmaalbumin und inflammatorische Werte bestimmt.<sup>32</sup>

### 1.2.5 Pathogenese und Pathophysiologie

Die Pathogenese tumorinduzierter Kachexie, dargestellt in Abbildung 2, ist komplex und nicht vollständig geklärt. Bekannt ist jedoch, dass eine übermäßige Produktion proinflammatorischer Cytokine, Neuropeptide und Hormone sowie die vom Tumor sezernierten Faktoren wesentlich zur Entstehung der Kachexie beitragen.<sup>33-36</sup>

Proinflammatorische Cytokine, zu denen TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 und INF- $\gamma$  gehören, werden vom Immunsystem des Patienten oder vom Tumor gebildet und induzieren die hepatische, bei Kachexie chronisch vorhandene Akute-Phase-Reaktion (APR).<sup>16, 37</sup> Laut O'Riordain *et al.* sezernieren mononukleäre Zellen des peripheren Blutes IL-6, wodurch die APR ausgelöst wird.<sup>38</sup> Die Akute-Phase-Reaktion ist eine akute Entzündungsreaktion des Körpers, die der Eingrenzung von Gewebeschäden, verursacht durch systemische Erkrankungen, dient und eine massive Produktion von Akut-Phase-Proteinen (APP) in der Leber bewirkt.<sup>7, 29, 39</sup> Zu den APP's gehören unter anderem Protease-Inhibitoren, Proteine des Komplementsystems, Fibrinogen und C-reaktives Protein (CRP).<sup>29</sup> Dabei wird die massive Bildung der Akut-Phase-Proteine aus essentiellen Aminosäuren bewirkt, so dass die Leber vergrößert wird.<sup>40</sup> Die Aminosäuren entstehen aus dem kontinuierlichem Abbau der Skelettmuskulatur, die die größte Proteinreserve des Körpers darstellt, wodurch sich der bei Kachexie typische Gewebeschwund begründen lässt.<sup>29</sup> Unter normalen Bedingungen ist die Entzündungsreaktion von kurzer Dauer, so dass nach deren Abklingen die fehlende Skelettmuskulatur sofort ersetzt wird. Bei Kachexie hingegen ist dieser Zustand chronisch und führt zu einer schweren Atrophie des Muskelgewebes.<sup>29</sup>

Desweiteren hat die chronische Inflammation einen vielfältigen Einfluss auf die Organe sowie auf das Fettgewebe und die Skelettmuskulatur.<sup>41</sup> Die APR wird jedoch auch durch anti-inflammatorische Cytokine wie IL-4 und IL-10 modifiziert.<sup>42</sup>

Die APR wird durch erhöhte Serumlevel des Proteins CRP nachgewiesen, äußert sich jedoch auch durch die Bildung von Fibrinogen und  $\alpha$ 1-Antitrypsin.<sup>16, 43</sup> Erhöhte CRP-Level sind mit einem größeren Verlust von Körpergewicht bei Patienten mit Lungen- und gastrointestinalem Karzinom assoziiert.<sup>44</sup> Dabei korrelieren CRP-Werte über 80mg/L mit einer erhöhten Mortalitätsrate bei Tumorpatienten.<sup>45</sup> Um Aussagen über die Überlebenschancen eines kachektischen Tumorpatienten treffen zu können, wird der *modified Glasgow prognostic Score* (mGPS), der CRP und Albuminkonzentrationen angibt, analysiert.<sup>46, 47</sup> Normalerweise wird Albumin in der Leber produziert, bei Kachexie jedoch stoppt diese Synthese aufgrund der Herstellung der APPs, so dass folglich die Albuminkonzentration bei Kachexie reduziert ist.<sup>36</sup>

Aus Tierexperimenten ist bekannt, dass Cytokine sowohl synergistisch als auch antagonistisch wirken und unterschiedlich, abhängig von der Tumorart, an der Entstehung von Kachexie beteiligt sind.<sup>16, 48</sup> Bei Experimenten mit dem Lewis Lungenkarzinom an Mäusen konnten die Cytokine IL-6, IL-11 und Oncostatin M nachgewiesen werden und bei kachektischen Krebspatienten sind IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  vorhanden.<sup>49, 50</sup> Mit Fortschreiten der Neoplasie steigt die Konzentration der Cytokine im Serum an, wobei der Nachweis von TNF- $\alpha$  aufgrund seiner sehr kurzen Halbwertszeit schwierig sein kann.<sup>16, 50</sup> Hingegen hat IL-6 die längste Halbwertszeit im Serum.<sup>29</sup> Desweiteren gibt es gegenläufige Ergebnisse bezüglich des Zusammenhanges zwischen der Cytokinkonzentration und dem Gewichtsverlust. Während eine Studie über das Pankreaskarzinom beim Menschen zeigte, dass die vermehrte Bildung von Cytokinen mit einer Abnahme des Körpergewichts assoziiert ist, wurde dies in anderen Studien mit schwer kachektischen Tumorpatienten (Lungen- oder Pankreaskarzinome, gastrointestinale Karzinome) widerlegt.<sup>51, 52</sup> Dies zeigt, dass abgesehen von den Cytokinen, noch andere Faktoren an der Induktion der Kachexie beteiligt sein müssen und die Pathogenese somit tumorspezifisch ist.

Cytokine aktivieren zentrale und peripher wirkende Mechanismen, die einen Teil der für Kachexie typischen Symptome induzieren, wie zum Beispiel Anorexie, Störungen des Gastrointestinaltrakts und den über TNF- $\alpha$  vermittelten proteolytischen Muskelabbau.<sup>53-55</sup> Zusätzlich kommt es durch Veränderungen im Fett-, Kohlenhydrat- und Proteinstoffwechsel zu einer Reduzierung des Anabolismus und zu einer Erhöhung des Katabolismus.<sup>29</sup> Die detaillierten pathophysiologischen Vorgänge sowie die weiteren am Kachexiesyndrom beteiligten Mediatoren werden in den nächsten Abschnitten beschrieben.

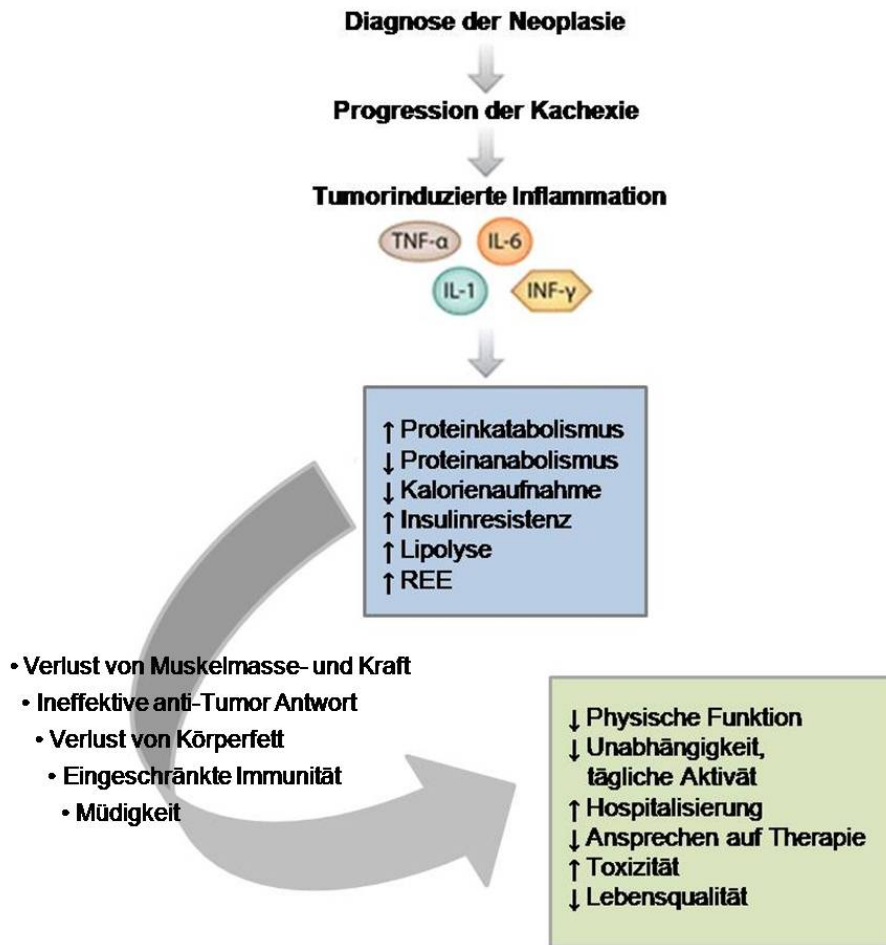


Abbildung 2. Pathophysiologie von Tumorkachexie nach Dodson *et al.*<sup>56</sup> Cytokine sind hauptverantwortlich an der Pathophysiologie von Tumorkachexie beteiligt. TNF=Tumornekrosefaktor, IL=Interleukin, INF=Interferon.

### 1.2.5.1 Mediatoren

Bei tumorassoziiertes Kachexie vermitteln Faktoren des Wirtes und des Tumors katabole Effekte und bewirken somit ein Voranschreiten der Pathophysiologie der Kachexie. Dazu zählen *Proteolysis-inducing factor* (PIF) und *lipid mobilizing factor* (LMF), die einen direkten Abbau von Fett- und Skelettmuskelgewebe vermitteln.<sup>57</sup> Desweiteren induzieren proinflammatorische Cytokine im Hypothalamus die Synthese des *Corticotropin-releasing Hormone*, welches wiederum über das Adrenokortikotrope Hormon die Produktion von Cortisol (Glukokortikoid) bewirkt.<sup>33</sup> Cortisol veranlasst eine Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems, wodurch es zum Proteinabbau kommt.<sup>7</sup> Ferner wird durch die Cytokine die Bildung und Freisetzung von Katecholaminen verstärkt.<sup>33</sup>

### 1.2.5.2 Neuroendokrine Mechanismen

Es ist bekannt, dass neuronale Signalwege im Gehirn, speziell im Hirnstamm und Hypothalamus, die Nahrungsaufnahme kontrollieren.<sup>58, 59</sup> Dabei wirken sowohl periphere Signale als auch zentrale Faktoren auf das Gehirn.<sup>41</sup> Periphere Regulatoren können Leptin, Insulin, Peptid YY, Ghrelin, Cytokine und Fettmediatoren sein, die vom Darm, der Leber oder dem Fettgewebe produziert werden, über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn gelangen und über die Bindung an spezifische Rezeptoren ihre Wirkung vermitteln.<sup>59-62</sup> Zentral wirkende Faktoren sind Neuropeptid Y (NPY), Serotonin und Peptide des Melanocortin Systems.<sup>62, 63</sup> Die neuronalen Anorexie regulierenden Mechanismen erfolgen über das Neuropeptid Y System oder das Melanocortin System.<sup>64</sup> Kachexie muss nicht von Anorexie begleitet sein, ist jedoch sehr häufig bei kachektischen Tumorpatienten nachweisbar und deswegen von großer Bedeutung.<sup>17, 36</sup>

### 1.2.5.3 Metabolische Veränderungen

Bei tumorinduzierter Kachexie kommt es zu einer Verlagerung des Stoffwechsel hin zum Katabolismus.<sup>56</sup> Ferner erhöht sich der Ruheenergiebedarf (REE – *Resting energy expenditure*), der normalerweise ca. 70% des Gesamtenergieumsatzes ausmacht.<sup>29, 40</sup> Desweiteren machen 25% spontaner Energieaufwand (zum Beispiel Bewegung) und 5% Energieverbrauch durch die Verdauung davon aus.<sup>29</sup> Da kachektische Patienten durch die Muskelatrophie physisch eingeschränkt sind, kommt es zu einem verringerten spontanen Energieaufwand, der jedoch den gesteigerten REE nicht ausgleicht und somit zum Hypermetabolismus führt.<sup>24, 29</sup> Bei Patienten mit Lungenkarzinom und Pankreaskarzinom wurde ein erhöhter REE nachgewiesen, bei Patienten mit kolorektaler Neoplasie jedoch nicht.<sup>65</sup> Dies kann auf die verschiedenen Neoplasien und ihrem möglicherweise unterschiedlichen Einfluss auf den Energiebedarf zurückgeführt werden.<sup>65, 66</sup> Somit führt der anhaltende gesteigerte Ruheenergieumsatz zum Verlust von Körpergewicht. Als Ursachen dafür werden die Veränderungen im Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinmetabolismus sowie eine erhöhte Thermogenese betrachtet.<sup>33</sup> Hinzuzufügen ist, dass die energieaufwendige Akute-Phase-Reaktion zum erhöhten Ruheenergiebedarf beiträgt.<sup>33</sup> Außerdem verursachen Katecholamine einen Anstieg des Ruheenergiebedarfes.<sup>7</sup>

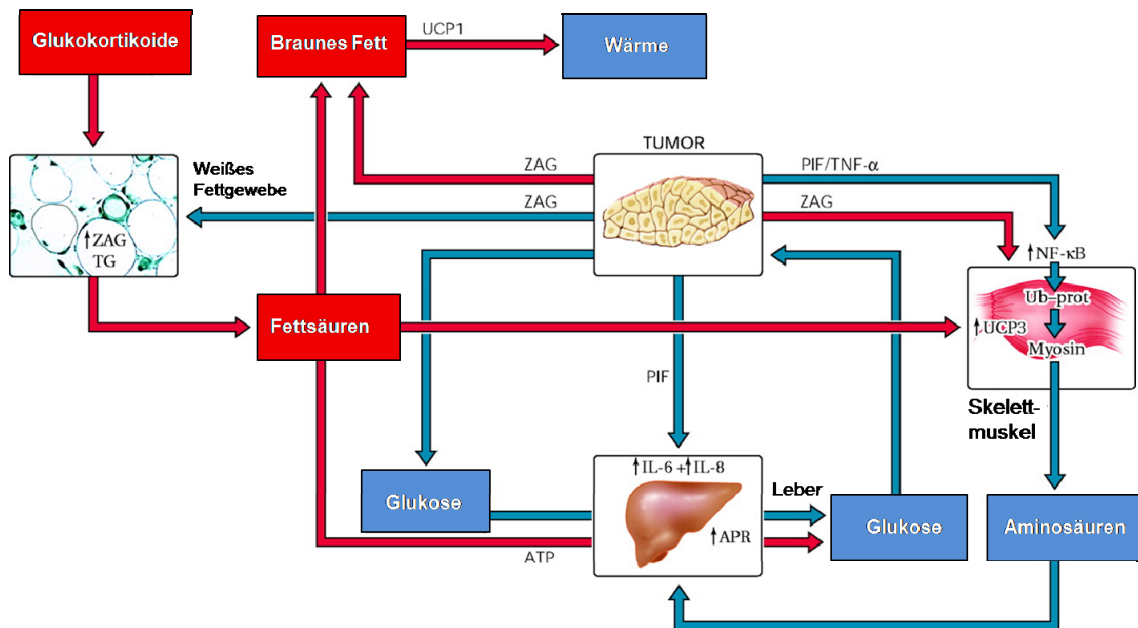


Abbildung 3. Veränderungen des Stoffwechsels bei tumorassoziiertem Kachexie nach Tisdale et al.<sup>16</sup> Bei Tumorkachexie erfolgt ein Abbau von weißem Fettgewebe und die Freisetzung von Wärme im braunen Fettgewebe. Desweiteren erfolgen ein Abbau von Skelettmuskeln zur Gewinnung von Aminosäuren und die anhaltende Herstellung von Glukose für den Tumor.

#### 1.2.5.3.1 Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel

Tumorzellen nutzen als Hauptenergiequelle Glukose.<sup>11</sup> Dazu baut der Tumor Glukose aus dem Muskel anaerob über Pyruvat zu Milchsäure um, wodurch 2 Moleküle ATP entstehen (Glykolyse).<sup>33</sup> Die Milchsäure wird dann in Form von Laktat in den Blutkreislauf abgegeben und zur Leber transportiert, wo es unter Verbrauch von 6 Molekülen ATP wieder zu Glukose umgewandelt wird (Cori-Zyklus) und anschließend erneut dem Tumor als Energiequelle dient (Abbildung 3).<sup>67</sup> Weitere Substrate für die Glukoneogenese sind sowohl aus der Lipolyse von Fettgewebe stammendes Glycerol als auch aus dem Skelettmuskel proteolytisch hervorgegangene Aminosäuren.<sup>11</sup> Der sich für den Patienten wiederholende, energieineffiziente Cori-Zyklus trägt wesentlich zum, bei Kachexie vorhandenen, gesteigerten Ruheenergieumsatz bei.<sup>16</sup> Aufgrund einer gestörten Funktion der Mitochondrien ist der normalerweise stattfindende Abbau von Pyruvat zur Gewinnung von Energie im Krebszyklus nicht möglich.<sup>33</sup> Als Auslöser für die gesteigerte Glukoneogenese werden erneut die proinflammatorischen Cytokine IL-6 und TNF-α angesehen.<sup>68</sup> Desweiteren wurde eine erhöhte Expression von Glukose Transportproteinen (GLUT 1 und 3) sowie eine vermehrte Synthese des Enzyms Hexokinase, das Glukose für den Eintritt in die anaeroben Glykolyse phosphorylieren muss, bei Tumorerkrankungen nachgewiesen.<sup>69-71</sup>

Außerdem kommt es bei Kachexie zu einer Cytokin-induzierten Insulinresistenz mit einer daraus resultierenden Hyperinsulinämie.<sup>29</sup> Die Insulinresistenz bedingt eine verringerte Glukoseaufnahme in Skelettmuskelzellen und Fettzellen bis hin zur Entwicklung einer Glukoseintoleranz, die bei 37% der Krebspatienten auftritt.<sup>72, 73</sup> Ferner erfolgt eine anhaltende Neusynthese von Glukose in der Leber.<sup>72</sup> Die Insulinresistenz trägt somit wesentlich zum kachektischen Zustand von Patienten bei.

#### 1.2.5.3.2 Thermogenese

Bei Kachexie kommt es zu einem Verlust von Energie in Form von Wärme.<sup>16</sup> Diese Thermogenese findet im braunen Fettgewebe (BAT) oder im Skelettmuskel statt.<sup>19</sup> Die Ursache dafür ist eine vermehrte Expression von Transmembranproteinen (*Uncoupling Protein*), die sich in der inneren Membran der Mitochondrien befinden.<sup>11</sup> Diese Proteine erhöhen die Membranpermeabilität für Protonen aus dem Intermembranraum, wodurch die Protonen in die Matrix der Mitochondrien strömen können und deren Membranpotential reduziert wird.<sup>16</sup> Dies bewirkt, dass die Oxidation von der Phosphorylierung in der Atmungskette entkoppelt und keine Energie in Form von ATP hergestellt wird, sondern Energie in Form von Wärme frei wird.<sup>33</sup> Dies trägt wesentlich zum erhöhten Ruheenergieumsatz bei Kachexie bei.<sup>19, 33</sup>

Hauptverantwortlich für diese verstärkte Thermogenese ist UCP-1, das nur im braunen Fettgewebe exprimiert wird<sup>11</sup>. UCP-2 ist ubiquitär in fast allen Geweben nachweisbar, wohingegen UCP-3 nur im Muskelgewebe und braunem Fettgewebe vorkommt.<sup>11</sup> Das braune Fettgewebe ist normalerweise bei Erwachsenen kaum vorhanden, konnte jedoch bei 80% der kachektischen Tumorpatienten nachgewiesen werden.<sup>74</sup> Deswegen wird vermutet, dass die bei Kachexie entstehende Thermogenese durch UCP-1 im BAT oder durch UCP-3 im Skelettmuskel ausgelöst wird. UCP-2 hingegen kontrolliert die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in den Mitochondrien.<sup>75</sup>

Im Tierversuch mit dem MAC16 Kolon Adenokarzinom konnten höhere mRNA Level für UCP-1 im BAT sowie für UCP-2 und UCP-3 im Skelettmuskel nachgewiesen werden, nachdem die Mäuse 24% ihres Ausgangsgewichtes verloren hatten.<sup>76</sup> Bei Experimenten an Ratten, die mit Yoshida Hepatoma-Zellen inokuliert wurden und kurze Zeit später kachektisch wurden, konnten ebenso erhöhte mRNA-Werte für UCP-2 und UCP-3 im Skelettmuskel gezeigt werden.<sup>77</sup> Bei kachektischen Patienten mit gastrointestinalem Karzinom war die mRNA für UCP-3 im Muskelgewebe erhöht, jedoch war die Menge an UCP-2 mRNA unverändert im Vergleich zu gesunden Kontrollen.<sup>78</sup> Die erhöhte Expression der UCPs scheint TNF- $\alpha$  und LMF induziert zu sein.<sup>19, 79</sup> *In vitro* konnte eine Cytokin-induzierte Expression von PGC-1 $\alpha$  über die

Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges in Muskelzellen gezeigt werden. Zusätzlich konnte die gleiche Arbeitsgruppe eine durch PGC-1 $\alpha$  ausgelöste Expression von UCP-3 in Muskelgewebe nachweisen, weshalb vermutet wird, dass Cytokine einen direkten Einfluss auf die Erhöhung des Energiebedarfes bei Kachexie haben.<sup>80</sup>

#### 1.2.5.3.3 Veränderungen im Fettstoffwechsel

Die bei Kachexie auftretende Atrophie betrifft hauptsächlich den Skelettmuskel und das weiße Fettgewebe (WAT).<sup>81</sup> Letzteres Gewebe speichert Energie in Form von Triacylglyceriden in den Adipozyten (Lipogenese) und wird sowohl durch proinflammatorische Cytokine als auch durch vom Tumor stammende Faktoren zum Abbau dieser Lipide zu freien Fettsäuren und Glycerol (Lipolyse) angeregt (Abbildung 4).<sup>81, 82</sup> Die entstandenen Fettsäuren werden entweder sofort durch die  $\beta$ -Oxidation abgebaut oder dienen zur Wärmeproduktion, wobei die  $\beta$ -Oxidation bei Tumorkachexie um 20% erhöht ist.<sup>16</sup> Es ist weiterhin bekannt, dass bei tumorassoziierte Kachexie der Verlust von Fettmasse durch eine vermehrte Lipolyse bewirkt wird und die Lipogenese nicht reduziert ist.<sup>83</sup> Dabei weisen Patienten mit Lungenkarzinom einen bis zu 85%igen Verlust von Körperfettmasse auf.<sup>84</sup> Desweiteren ereignet sich der Abbau des weißen Fettgewebes schneller als der des Muskelgewebes, beginnend mit dem Abbau von viszeralem Fettgewebe und fortschreitend zum subkutanen Fettgewebe.<sup>81, 85, 86</sup> Das bei der Lipolyse entstandene Glycerol wird zur Leber transportiert und für die Herstellung von Glukose durch die Glukoneogenese genutzt.<sup>33</sup>

Zusätzlich zur Lipolyse entstehen normalerweise die freien Fettsäuren auch durch die Spaltung von Lipoproteinen (z.B. *Very Low Density Protein* - VLDL) durch die Aktivität der Lipoproteinlipase (LPL).<sup>33</sup> Diese Fettsäuren werden dann von den Adipozyten aufgenommen und als Triacylglycerol gespeichert.<sup>33</sup> Bei Kachexie jedoch wurde eine verringerte Expression und Aktivität der LPL nachgewiesen, wodurch es zu einer Hyperlipidämie kommt, die sich durch erhöhte VLDL-Konzentrationen im Plasma äußert.<sup>33, 57, 82, 87</sup>

Die Lipolyse wird bei Kachexie u.a. durch Katecholamine durch die Aktivierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren stimuliert.<sup>88</sup> Dadurch erfolgt die Aktivierung der Adenylatzyklase, die unter Verwendung von ATP zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) herstellt.<sup>89</sup> Daraus resultiert die Aktivierung der Proteinkinase A und die anschließende Phosphorylierung der Hormon-sensitiven Lipase (HSL), die wiederum die Hydrolyse der Diglyzeride zu Monoglyzeriden katalysiert.<sup>16, 90</sup> Die Spaltung von Triglyzeriden zu Diglyzeriden wird durch die Adipozyten-Triglyzerid Lipase (ATGL) bewirkt.<sup>91, 92</sup> Dabei wurde erst vor kurzem bekannt, dass ATGL-Knockout Mäuse mit induziertem Tumor



weder Verlust von Fettgewebe noch von Gastrocnemius-Muskel aufwiesen, da keine Apoptose sowie Ubiquitin-Proteasom-System vermittelte Proteindegradation stattfindet.<sup>92</sup> Da die gleichen Kachexiemodelle mit einem HSL- Knockout einen geringeren antikachektischen Effekt zeigten, wird vermutet, dass der ATGL eine größere Bedeutung als der HSL bei der Pathogenese von Kachexie zukommt.<sup>92</sup>

Kachektische Tumorpatienten weisen hohe Plasmakonzentrationen von Katecholaminen, Glycerol und freien Fettsäuren auf.<sup>93</sup> Im Fettgewebe dieser Patienten wurden 50-100% höhere mRNA-Level für die HSL nachgewiesen, ohne dass die Expression von LPL verändert war.<sup>94</sup> Durch Tumorversuche mit Mäusen konnte wiederum eine verringerte LPL-Aktivität im Fettgewebe gezeigt werden.<sup>82</sup> Als Mediatoren der Lipolyse wurden Interferon- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und Zink- $\alpha$ 2-Glycoprotein identifiziert.<sup>40, 95</sup>

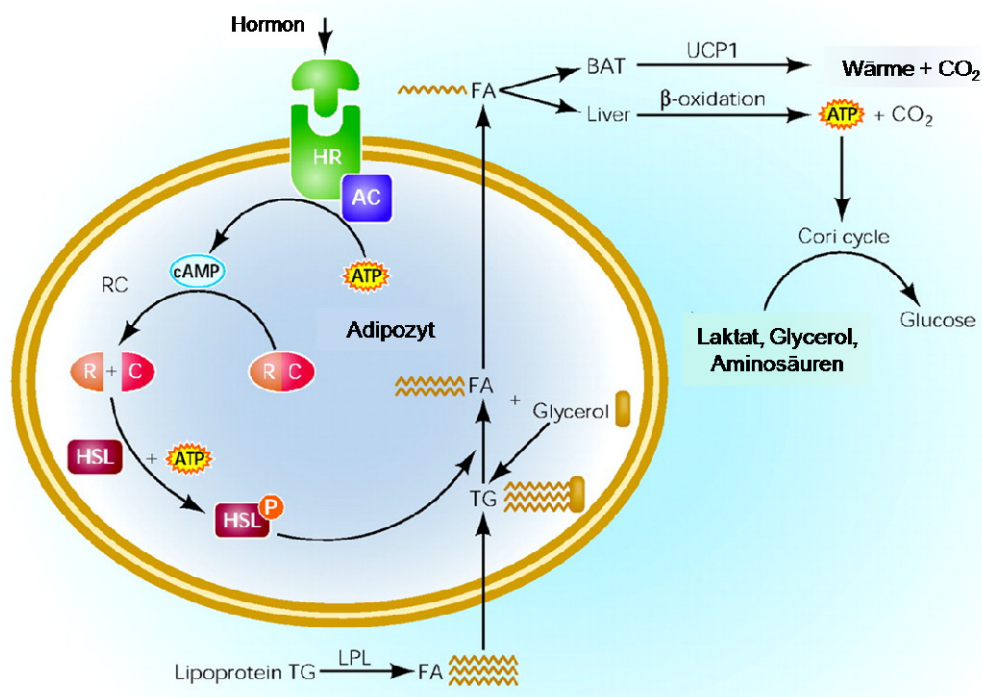


Abbildung 4. Fettstoffwechsel in Adipozyten nach Tisdale *et al.*<sup>16</sup> Bei Tumorkachexie erfolgt ein vermehrter Abbau von Lipiden in Adipozyten und die Aktivität der Lipoproteinlipase ist reduziert.

#### 1.2.5.4 Veränderungen des Proteinstoffwechsels im Muskel

Die Skelettmuskelmass bleibt normalerweise durch ein gleichbleibendes Verhältnis von Proteinsynthese zu Proteinabbau konstant erhalten.<sup>19</sup> Erfolgen jedoch äußere Einflüsse wie zum Beispiel Muskeltraining, kann die Muskelmasse hypertrophieren.<sup>19</sup> Dies geschieht durch die Vergrößerung der Zellen durch einen verstärkten Anabolismus.<sup>96</sup> Gegensätzlich dazu ist atrophisches Gewebe durch eine Verkleinerung

von Zellen u.a. durch Verlust von Organellen und Proteinen gekennzeichnet.<sup>97</sup> Bei Kachexie kommt es zu einem erhöhten Katabolismus bei gleichzeitiger Reduzierung des Anabolismus, wodurch Muskelmasse abgebaut wird.<sup>57, 98</sup> Dies betrifft den ganzen Körper, vor allem aber die Skelettmuskulatur und auch die Atemmuskulatur.<sup>57, 99</sup> Dabei wird der Proteingehalt des Muskelgewebes verringert und der Faserdurchmesser sowie die Kraft nehmen ab.<sup>100</sup> Ferner erfolgt ein Abbau der Myofibrillen, wodurch die Kontraktion des Muskels abnimmt. Desweiteren wurde festgestellt, dass bei Kachexie Typ-II Muskelfasern (*Fast-Twitch*) schneller atrophieren als Typ-I Muskelfasern (*Slow-Twitch*).<sup>101,102</sup> Außerdem wird die Produktion von Cortisol und Katecholaminen aus den Nebennieren induziert, wodurch die proteolytische Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems vorangetrieben sowie der Energieverbrauch erhöht wird.<sup>7, 103, 104</sup>

#### 1.2.5.4.1 Katabolismus

Im Muskel wurden fünf proteolytische Systeme nachgewiesen, die Atrophie vermitteln können: Calcium-abhängige Calpaine im Zytosol, lysosomale Proteine, Caspasen, das ATP-abhängige Ubiquitin-Proteasom-System und Matrix Metalloproteinasen.<sup>105</sup> Bei Kachexie-induzierter Atrophie interagieren diese Systeme teilweise miteinander und bewirken somit einen massiven Proteinabbau im Muskel.<sup>106</sup> Jedoch kommt dem Ubiquitin-Proteasom-System die größte Bedeutung beim Kachexie induziertem Proteinabbau zu.<sup>107</sup> Es ist bekannt, dass das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) keine intakten Myofibrillen degradieren kann.<sup>108</sup> Deswegen schneiden Caspasen, die normalerweise *downstream* vom Ubiquitin-Proteasom-System aktiviert werden, in einem ersten Schritt Actomyosin, um es dann dem UPS zugänglich zu machen.<sup>109</sup>

##### 1.2.5.4.1.1 Apoptose

Apoptose ist ein von der Zelle eingeleiteter Zelltod, dem u.a. bei der Aufrechterhaltung der Zellzahl in proliferierenden Geweben eine wichtige Bedeutung zukommt.<sup>110</sup> Desweiteren ist dieser Vorgang zum Entfernen von defekten, malignen oder mit Viren infizierten Zellen notwendig.<sup>110, 111</sup> Nach Einleitung der Apoptose kommt es zur DNA Fragmentation und Kondensation des Chromatins, Auflösung der Kernhülle und dem Schrumpfen der Zelle.<sup>112, 113</sup> Desweiteren lösen sich die zytoplasmatischen Strukturen wie zum Beispiel der Golgi-Apparat und die Mitochondrien auf.<sup>114, 115</sup> Das Proteom wird durch spezielle Cysteinproteasen (Caspasen), aber auch durch den Apoptose-induzierender Faktor (AIF) oder Endonuklease G degradiert.<sup>116-118</sup>

Danach erfolgt das Abschnüren von einzelnen Vesikeln, auch „Blebbing“ genannt. Diese apoptotischen Körperchen werden schließlich von umgebenden Zellen oder Makrophagen aufgenommen und verdaut.<sup>110</sup> Dabei verlaufen alle Schritte bis zum Verdau der Zelle ohne die Induktion von Inflammation.<sup>113</sup>

Caspasen sind Proteasen, deren Aktivierung durch andere Caspasen oder durch Autoproteolyse erfolgt<sup>119</sup>. Allgemein werden die Caspasen in inflammatorische (Caspase-1, 4, 5), Initiator- und Effektorcaspasen eingeteilt, die sich strukturell als auch funktionell voneinander unterscheiden.<sup>120</sup> Initiatorcaspasen, zu denen Caspase-2, 8, 9 und 10 gehören, besitzen eine zusätzliche DED- oder CARD-Domäne in ihrer Prodomäne am N-Terminus. Zusätzlich schneiden sie die Effektorcaspasen (Caspase-3, 6 und 7), wodurch diese aktiviert werden und die Apoptose einleiten können.<sup>110</sup> Substrate werden spezifisch an einem Aspartatrest geschnitten, was durch das Vorhandensein eines Cysteins im katalytischen Zentrum bewirkt wird.<sup>110</sup>

Die Aktivierung der Caspasen kann u.a. über den extrinsischen oder intrinsischen Weg erfolgen (Abbildung 5).<sup>121</sup> Der extrinsische Weg wird durch Bindung von Liganden (z.B. TNF- $\alpha$ , FasL, TRAIL) an Todesrezeptoren induziert, die zur TNF Rezeptor (TNFR) Superfamilie gehören und eine Todesdomäne im zytoplasmatischen Teil besitzen.<sup>122</sup> Dadurch wird die Oligomerisierung des Rezeptors ausgelöst und sofort ein DISC-Komplex (*death inducing signaling complex*) durch Rekrutierung von FADD (*Fas associated death domain protein*) gebildet.<sup>123</sup> FADD kann durch die eigene DED-Domäne an die von Caspase-8 binden und somit mit dem Protein interagieren. Nach Aktivierung von Caspase-8 kann diese weitere Effektorcaspasen aktivieren oder den intrinsischen Weg durch Aktivierung des pro-apoptotischen Proteins Bid induzieren.<sup>113</sup><sup>124</sup> Antiapoptotische Proteine wie cFlip, ARC, cIAP und Bcl-2 können die Apoptose inhibieren.<sup>121, 125</sup> Der intrinsische Signaltransduktionsweg wird durch Reize wie zum Beispiel zytotoxische Medikamente, Hitze oder Strahlung induziert und führt zur Schädigung der Mitochondrienmembran, ausgelöst durch pro-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie (z.B. Bid, Bad) und resultiert in der dadurch verursachten Ausschüttung von Cytochrom C ins Zytoplasma. Danach erfolgt die Bildung eines Apoptosom-Komplexes, der aus Cytochrom C, Procaspase-9, Apaf-1 (*Apoptosis protease activating factor-1*) und dATP gebildet wird.<sup>126, 127</sup> Dadurch wird Caspase-9 autoproteolysiert und kann anschließend Caspase-7 und Caspase-3 aktivieren und somit Apoptose auslösen.

In kachektischen Tumortieren konnte bereits ein Apoptose-bedingter Verlust von Skelettmuskelmasse durch Aktivierung mehrerer Caspasen nachgewiesen werden.<sup>128</sup><sup>129</sup> Ferner wurde eine Erhöhung der Apoptose im Muskel von Patienten mit Herzinsuffizienz- oder muskulärer Dystrophie bedingter Kachexie gezeigt.<sup>130, 131</sup>

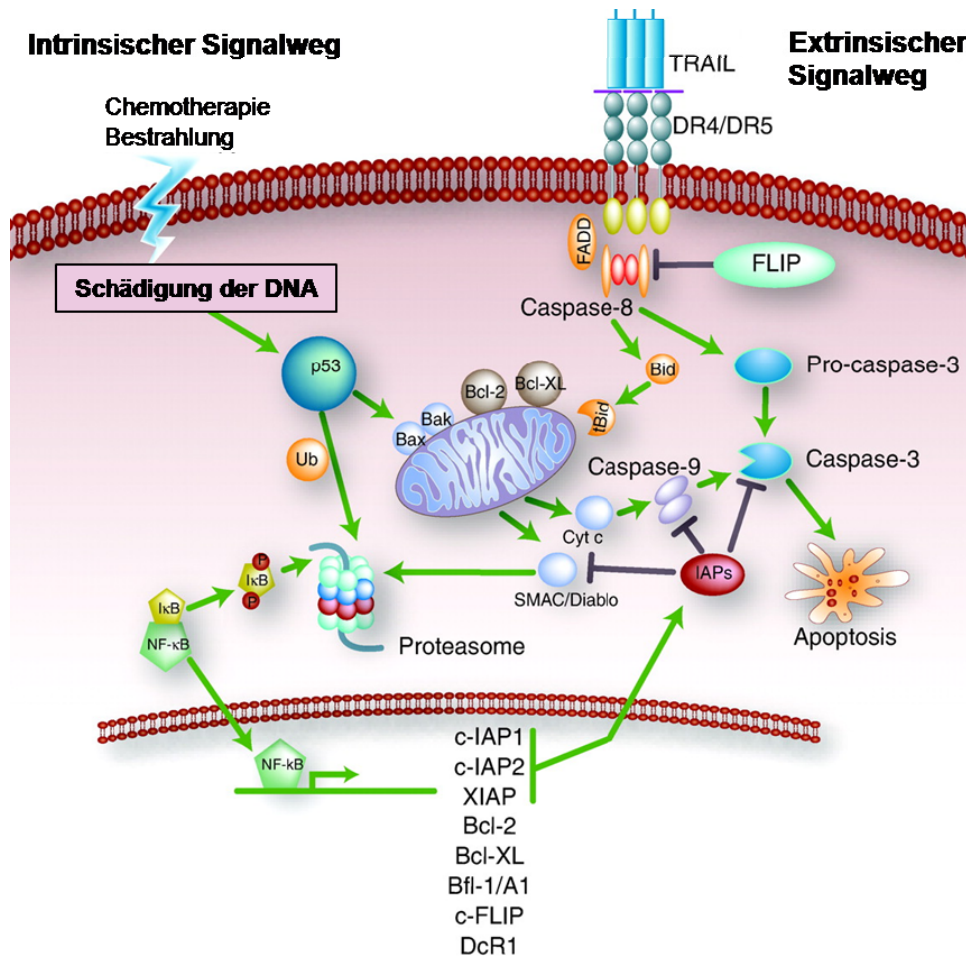


Abbildung 5. Induktion von Apoptose nach de Vries *et al.*<sup>132</sup> Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Signaltransduktionsweges.

#### 1.2.5.4.1.2 Ubiquitin-Proteasom-System

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) ist ein kataboler Mechanismus der Zelle zur Degradation von Proteinen in kurze Peptide.<sup>33</sup> Dieses System sorgt für die Entfernung regulatorischer und fehlgefalteter Proteine, damit ein intaktes Genom bewahrt wird.<sup>133</sup> Bei Kachexie wird das UPS durch proinflammatorische Cytokine wie zum Beispiel TNF- $\alpha$  und IL-6 im Skelettmuskel induziert.<sup>37, 134</sup> Der Abbau der Proteine findet durch die 26S-Proteasomen, die proteolytische Aktivität besitzen und sich sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern befinden, statt.<sup>135</sup> Dabei werden jedoch nur Proteine für den Abbau rekrutiert, die vorher mit mehreren Ubiquitinmolekülen markiert wurden. 26S-Proteasomen (ca. 2000 kDa), dargestellt in Abbildung 6, bestehen aus je zwei regulatorischen 19S-Komplexen und aus einem 20S-Kernkomplex, der katalytische Funktion besitzt.<sup>136</sup> Die 19S-Einheit wird aus einem Deckel (Lid) und einer Basis (Base) gebildet, die aus Rpn- und Rpt-Proteinen zusammengesetzt sind. Dabei erkennen die Rpn-Proteine die für den Abbau markierten Substrate anhand der Ubiquitinmoleküle

und binden diese. Anschließend sorgen die Rpt-Proteine für die Hydrolyse von ATP, so dass die für die Entfaltung der Proteine notwendige Energie bereitgestellt wird. Danach erfolgt der Transport der Polypeptidketten ins Innere der 20S-Einheit zu den proteolytisch aktiven Zentren.<sup>137</sup> Der 20S-Komplex bildet die Form eines hohlen Zylinders und besteht aus vier Ringen, die aus zahlreichen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Einheiten zusammengesetzt sind.<sup>138</sup> Die katalytische Proteaseaktivität wird von den  $\beta$ 1-,  $\beta$ 2- und  $\beta$ 5-Einheiten übernommen, wobei jede Einheit eine spezifische Endopeptidaseaktivität aufweist. Die Spaltung der Proteine erfolgt hierbei nach basischen, sauren oder hydrophoben Aminosäuren. Die  $\beta$ 1-Untereinheit besitzt PGPH-Aktivität (Peptidyl-Glutamyl-Protein-Hydrolysierende Aktivität). Die anderen Untereinheiten zeigen Trypsin-like Aktivität ( $\beta$ 2) und Chymotrypsin-like Aktivität ( $\beta$ 5).<sup>135</sup> Die Proteine werden in kurze Peptide zerlegt und die Ubiquitinmoleküle durch Deubiquitinierungsenzyme freigesetzt. Anschließend erfolgt die Spaltung der Peptide in Aminosäuren von zytoplasmatischen Proteasen. Bei Sepsis-induzierter Muskelatrophie wurde eine höhere Expression der Tripeptidyl-Peptidase II (TPP II) im Muskel nachgewiesen, von der bekannt ist, dass sie Peptide in Tripeptide spaltet.<sup>139</sup> Desweiteren konnte eine höhere Aktivität der TPPII in dem atrophierten Muskelgewebe im MAC16-Kachexiemodell gezeigt werden.<sup>140</sup>

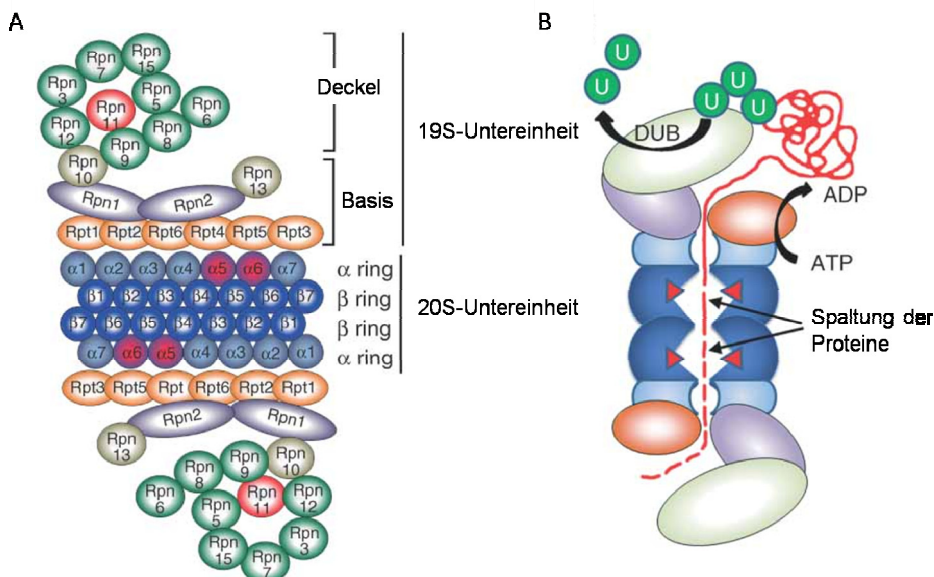


Abbildung 6. Struktur der 26S-Proteasomen nach Brooks *et al.*<sup>141</sup>. a) Aufbau der 19S- und 20S-Untereinheit aus Rpn- und Rpt-Proteinen. b) Spaltung eines Proteins im 26S-Proteasom und Freisetzung der Ubiquitinmoleküle durch das Deubiquitinierungsenzym (DUB).

Die Biochemie der Ubiquitinbindung (Abbildung 7) kann anhand von drei Enzymen gekennzeichnet werden: E1- (Ubiquitin aktivierendes), E2- (Ubiquitin konjugierendes) und E3- (Ubiquitin übertragendes) Enzym.<sup>106</sup> Das Enzym E1 bildet dabei unter ATP-

Verbrauch einen Thioester mit Ubiquitin, das von E2 weiterhin als Thioester übernommen wird. Dieser Konjugationsschritt durch E2 bildet den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt. Die Ubiquitin-E3-Ligase erkennt spezifische Sequenzen/Strukturen des Substrats und erzeugt eine Isopeptidbindung zwischen dem C-Terminus von Ubiquitin und der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin. Desweiteren bewirkt es die Bindung von weiteren Ubiquitinmolekülen zur Polyubiquitinkette (meist an Lysin 48 des vorherigen Ubiquitins). Ein ausreichendes Signal für den Abbau liegt bei einer Kettenlänge von vier bis fünf Ubiquitinmolekülen vor.<sup>142</sup>

Innerhalb der Eukaryonten konnte nur ein einziges E1-Enzym nachgewiesen werden. Wohingegen mehrere E2- und E3-Enzyme auftreten können. Das E3-Enzym ist dabei vor allem für die Substratspezifität der Ubiquitinübertragung verantwortlich.<sup>143</sup> Es wurden bereits über 100 E3-Ligasen gefunden (z.B. MuRF-1, MAFbx, Nedd4, E3 $\alpha$ -II), wovon jedoch nur wenige bei Kachexie hochreguliert sind.<sup>144-146</sup> Davon waren MuRF-1, MAFbx und E3 $\alpha$ -II im Skelettmuskel kachektischer Tumortiere hochreguliert.<sup>147</sup> Sie unterscheiden sich durch den Besitz von verschiedenen Domänen, z.B. Hect-Domäne, RING-Finger-Domäne oder F-Box-Domäne.<sup>146</sup>

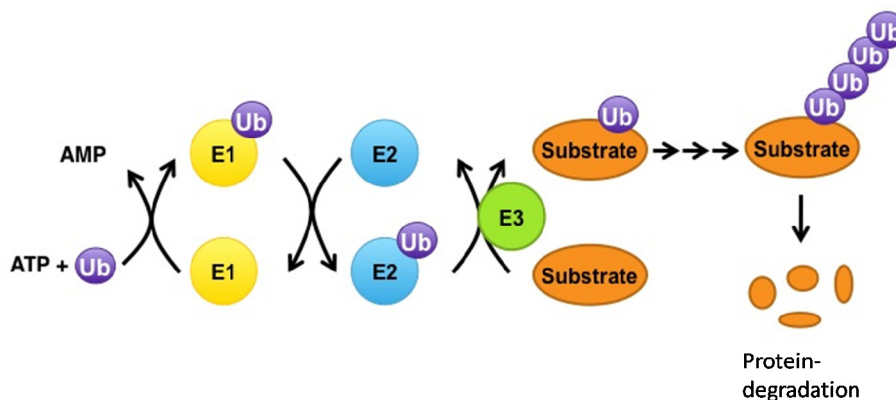


Abbildung 7. Mechanismus der Ubiquitinierung und anschließenden Proteindegradation nach Benanti *et al.*<sup>148</sup> Übertragung von Ubiquitin vom E1- auf das E2-Enzym und anschließende Bindung von Ubiquitin an das Substrat, vermittelt durch die E3-Ligase. Ub=Ubiquitin.

#### 1.2.5.4.1.3 Autophagie

Autophagie ist ein Mechanismus, durch den Zellen zytoplasmatische Komponenten wie zum Beispiel Proteine und Organellen abbauen können.<sup>149, 150</sup> Dabei kann zwischen Makro-, Mikro- und Chaperon-vermittelter Autophagie unterschieden werden.<sup>149</sup> Makroautophagie ist ein Degradationsprozess, bei dem die Zellstrukturen zuerst in ein von einer Doppelmembran gebildetes Autophagosom aufgenommen und nach Fusion mit dem Lysosom abgebaut werden.<sup>150</sup> Bei der Mikroautophagie erfolgt die Aufnahme

und der Abbau sofort im Lysosom und bei der Chaperon-vermittelten Autophagie sind Chaperone beteiligt.<sup>151, 152</sup> Autophagische Prozesse führen zum Freisetzen von Aminosäuren und Lipiden, die als Energiequelle oder zur Neusynthese anderer Moleküle dienen können.<sup>149</sup> Bei Kachexie wurde Autophagie im atrophierenden Muskelgewebe nachgewiesen, wodurch die gewonnenen Aminosäuren für die Akut-Phase-Reaktion zur Verfügung stehen.<sup>153-155</sup>

Der Prozess der Makroautophagie (Abbildung 8) beginnt mit der Bildung der prä-autophagosomalen Struktur (PAS).<sup>156, 157</sup> Danach bildet sich eine Isolationsmembran, die die abzubauenen Strukturen umgibt und nach Verlängerung umschließt.<sup>149, 158</sup> Nach Fusion mit einem Lysosom erfolgt der Abbau der beinhaltenden Strukturen durch hydrolytisch wirksame Enzyme.<sup>159</sup> Dabei sind bei allen Schritten ATG-Proteine (*Autophagy-related genes*), von denen bisher 31 identifiziert wurden, beteiligt.<sup>157</sup> Zusätzlich dazu dienen die Proteine LC3 und p62/SQSTM1 als Marker für Autophagie. LC3-I (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) befindet sich im Zytosol und wird durch Bildung des Autophagosoms zu LC3-II konvertiert, das sich an der Innen- oder Außenseite der Membran befindet.<sup>160</sup> p62/SQSTM1 bindet bei Autophagie an LC3 und wird daraufhin abgebaut.<sup>161</sup>

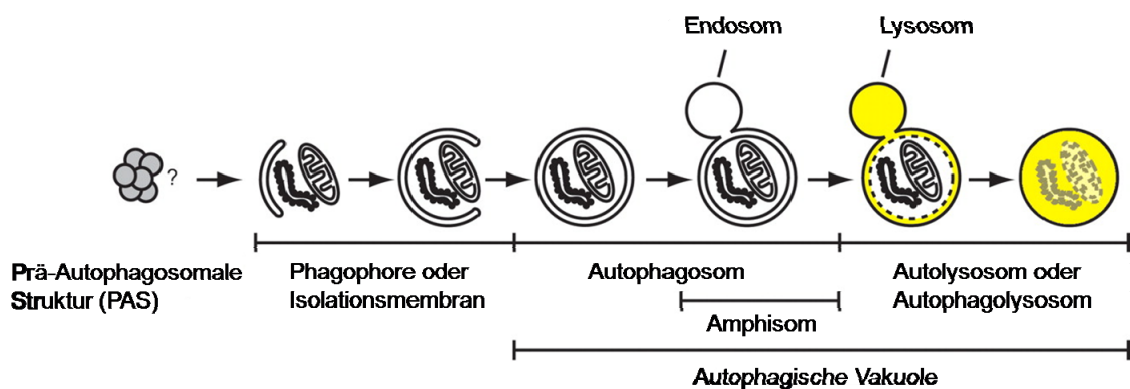


Abbildung 8. Bildung des Autophagolysosoms nach Mizushima *et al.*<sup>157</sup> Nach Bildung der Prä-Autophagosomalen Struktur bildet sich das Autophagosom. Nach Fusion mit dem Lysosom werden sich in dem Autophagosom befindliche Strukturen hydrolytisch abgebaut.

#### 1.2.5.4.2 Anabolismus und Katabolismus im Skelettmuskel- Signaltransduktion

Der IGF1/IRS1/PI3K/Akt-Signalweg kann eine Hypertrophie-vermittelnde Signalkaskade im Muskel auslösen.<sup>162</sup> *Downstream* von Akt befinden sich Proteine wie mTOR und p70S6 Kinase, die die Proteinsynthese regulieren.<sup>163</sup> Gleichzeitig erfolgt die Inhibition von Signalwegen, die zur Proteindegradation führen (Abbildung 9).<sup>164</sup>

IGF-1 oder Insulin aktivieren PI3K durch Phosphorylierung, die wiederum durch Phosphorylierung von Akt zu dessen Aktivierung führt.<sup>165</sup> Folglich kann Akt Tsc2 phosphorylieren, wodurch der Komplex aus Tsc-1 und Tsc-2 gelöst wird und keine Inhibition von mTOR (*mammalian target of rapamycin*) erfolgen kann.<sup>166</sup> Danach kann mTOR die S6-Kinase (p70S6K) und 4E-BP-1 phosphorylieren, wodurch die Proteinsynthese erhöht wird.<sup>97</sup> Bisher ist nicht klar, wie p70S6K die Translation reguliert.<sup>19</sup> Von 4E-BP-1 bindet im unphosphorylierten Zustand an den eukaryontischen Initiationsfaktor (eIF)-4E, wodurch die Translation inhibiert wird. Phosphoryliertes 4E-BP-1 kann keinen Komplex mehr mit eIF-4E eingehen, wodurch dieser Faktor die Translation vermitteln kann.<sup>19</sup>

Bei Kachexie konnte eine reduzierte Aktivität des Insulin/IGF-1-Signalweges nachgewiesen werden, der zu einer Inaktivierung von Akt und somit zur Induktion von Atrophie führt.<sup>167</sup> Desweiteren induziert Angiotensin II über die Hemmung von Akt und die Aktivierung von Caspase-3 Muskelabbau.<sup>168</sup> Auch Änderungen im Dystrophin-Glykoprotein-Komplex bei Kachexie konnten nachgewiesen werden.<sup>169</sup>

Weitere Atrophie-vermittelnde Signalwege erfolgen über GSK-3 $\beta$  (Glykogen Kinase 3 $\beta$ ) oder FoxO (*Forkhead box O*), die sich downstream von Akt befinden. GSK-3 $\beta$  kann im aktiven nicht-phosphorylierten Zustand den eukaryontischen Initiationsfaktor 2B (eIF-2B) inhibieren.<sup>144</sup> Desweiteren kann der Transkriptionsfaktor FoxO, der nur bei Nichtphosphorylierung von Akt aktiv ist, die Transkription der Ubiquitin-E3-Ligasen MuRF-1 und MAFbx sowie der ATG-Proteine LC3 und Bnip3 induzieren.<sup>153, 170</sup> Somit kann GSK-3 $\beta$  eine Reduktion der Proteinsynthese vermitteln, während FoxO Atrophie-vermittelnde Signalwege induziert.

MAFbx sorgt für die Ubiquitinierung des eukaryontischen Initiationfaktors eIF3-f, wodurch dieser abgebaut wird und nicht die Bindung der Met tRNA an die 40S ribosomale Untereinheit bei der Translation vermitteln kann.<sup>171</sup> Myosin Heavy Chain (MHC) konnte als Target von MuRF-1 identifiziert werden.<sup>172</sup>

Der Myostatin/TGF- $\beta$ -Signalweg kann über mehrere Rezeptoren (Activin Rezeptor II B, Alk4) agieren und die Phosphorylierung von Smad-2 und Smad-3 bewirken, wodurch diese Proteine wiederum Akt inhibieren können. Andererseits kann mTOR inhibierend auf Smad-2/-3 wirken.<sup>166</sup>

NF $\kappa$ B liegt normalerweise an seinen Inhibitor I $\kappa$ B gebunden im Zytoplasma vor. Durch vermehrte Synthese von TNF- $\alpha$  wird die Phosphorylierung und daraus resultierende Degradierung von I $\kappa$ B bewirkt, so dass NF $\kappa$ B in den Nukleus wandern und dort u.a. die Expression von MuRF-1 induzieren kann.<sup>97</sup>



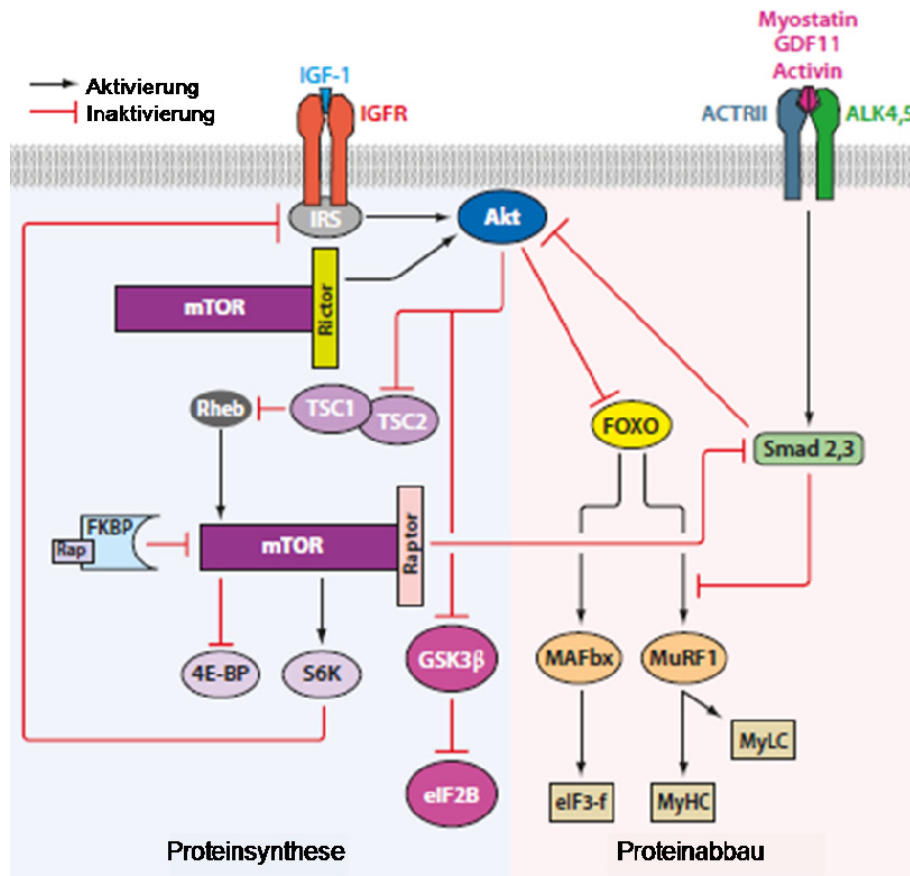


Abbildung 9. Übersicht der Signalwege im Skelettmuskel, die Atrophie und Hypertrophie vermitteln, nach Rüegg *et al.*<sup>166</sup> Aktivierung des IGF-1/Akt-Signalweges führt zur Proteinsynthese, während u.a. vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors FoxO die Expression von Ubiquitin-E3-Ligasen vermittelt und somit zum Proteinabbau führt.

#### 1.2.5.5 Effekte auf das Herz

Es ist bekannt, dass Chemotherapeutika, die bei kachektischen Krebspatienten verwendet werden, einen zytotoxischen Effekt auf das Herz vermitteln und es dadurch in seiner Struktur und Funktion schädigen.<sup>173, 174</sup> Jedoch war lange Zeit nicht bekannt, ob das Vorhandensein einer Neoplasie induzierten Kachexie die Atrophie des Herzens und daraus resultierend eine Kardiomyopathie bewirkt.

1967 und 1986 konnten zwei Arbeitsgruppen zeigen, dass das Gewicht des Herzens sowohl bei Tumorpatienten als auch bei Mäusen aus Tumorversuchen reduziert war.<sup>175, 176</sup> Im Dezember 2010 und im Jahr 2011 folgten Publikationen von verschiedenen Arbeitsgruppen über die Atrophie des Herzens und dessen funktionelle Einschränkung bei experimenteller tumorassoziierter Kachexie. Alle Arbeitsgruppen analysierten Mäuse, denen Kolon-26 Adenokarzinomzellen injiziert wurden.<sup>177-182</sup> Bei den Tumortieren konnte eine Reduktion des Herzgewichtes, im Speziellen der linksventrikulären Masse sowie u.a. eine Verringerung der Wandstärken in den

Tumortieren nachgewiesen werden.<sup>179, 180, 182</sup> Desweiteren konnten fibrotische Veränderungen des Herzens gezeigt werden.<sup>178, 181</sup> Über die molekularen Mechanismen, die den Verlust von kardialer Masse verursachen, wurde noch nicht viel publiziert. Cospes *et al.* vermuten, dass Apoptose und UPS-vermittelter Proteinabbau im Herzen bei tumorassoziierter Kachexie nicht von Bedeutung sind, sondern Autophagie.<sup>181</sup> Desweiteren gibt es eine Veröffentlichung zur Herzstruktur und -funktion im Lewis Lungenkarzinom Modell.<sup>183</sup> Im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell wurde bisher der Einfluss der Tumorkachexie auf das Herz noch nicht untersucht.

### **1.3 Kardiale Kachexie als Folge von Herzinsuffizienz**

#### **1.3.1 Definition**

Für die kardiale Kachexie, die bei fortgeschrittener Herzinsuffizienz auftritt, gilt auch die von Evans *et al.* beschriebene Definition.<sup>1</sup> Sie äußert sich demnach durch einen Verlust von fettfreier Masse und Fettgewebe sowie durch Veränderungen der Körperzusammensetzung.<sup>184, 185</sup> Die chronische Herzinsuffizienz wiederum ist gekennzeichnet durch eine eingeschränkte Myokardfunktion, wodurch die Gewebe des Körpers nicht mehr ausreichend mit oxygeniertem Blut versorgt werden<sup>186</sup>.

#### **1.3.2 Epidemiologie**

Die Prävalenz von chronischer Herzinsuffizienz liegt bei 0,3-2,4% der amerikanischen Bevölkerung, wobei die Inzidenz bei 10 von 1000 Leuten bei einem Alter über 65 Jahren liegt.<sup>187</sup> Dabei ist die Prävalenz jedoch aufgrund der Zunahme der älteren Bevölkerung und dem besseren Überleben bei chronischer Herzinsuffizienz (CHI) durch kardiovaskuläre Medikamente steigend.<sup>188</sup> Wenn chronische Herzinsuffizienzpatienten Kachexie entwickeln, verschlechtert sich die Prognose und die Mortalität steigt nach einem Zeitraum von 18 Monaten auf 50% gegenüber 17% bei nicht kachektischen CHI-Patienten an.<sup>189</sup> Dabei weisen bis zu 68% der CHI-Patienten Muskelatrophie auf.<sup>190</sup> Zusätzlich dazu erhöht die kardiale Kachexie die Morbidität und schränkt die Lebensqualität von Patienten ein.<sup>191, 192</sup>

### 1.3.3 Klinische Diagnose

Patienten mit kardialer Kachexie zeigen vordergründig Symptome der Herzinsuffizienz wie zum Beispiel Müdigkeit und Dyspnoe, leiden jedoch auch unter einer Gewebeatrophie-bedingten Schwäche sowie unter Verlust des Fettgewebes und Osteoporose.<sup>192, 193</sup> Dabei muss in Betracht gezogen werden, dass Herzinsuffizienzpatienten oft Ödeme aufweisen, die den kachektischen Zustand des Patienten verbergen können.<sup>185</sup> Deswegen dient als Referenzgewicht das Ausgangsgewicht des Patienten vor Beginn der Erkrankung an Herzinsuffizienz. Weiterhin muss der Schweregrad der kardialen Kachexie nicht mit der Schwere der Herzinsuffizienz, ausgedrückt durch die NYHA-Klasse (*New York Heart Association*) oder die linksventrikuläre Auswurfsfraktion, korrelieren.<sup>186, 189</sup> Desweiteren muss die kardiale Kachexie nicht mit strukturellen Veränderungen des myokardialen Gewebes verbunden sein, jedoch zeigt sich ein Verlust myokardialer Masse.<sup>194, 195</sup>

Zur Diagnose kardialer Kachexie dienen Analysen des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung, inflammatorische (IL-6, IL-1, Harnsäure) und kardiovaskuläre Biomarker (BNP, Troponine) sowie echokardiographische und hämodynamische Messungen.<sup>196, 197</sup>

### 1.3.4 Pathogenese und Pathophysiologie

Die Ursachen kardialer Kachexie sind vielfältig, jedoch ist bekannt, dass es zu multi-systemischen Veränderungen aufgrund der Aktivierung inflammatorischer, neuroendokriner, renaler und muskulärer Signaltransduktionswege kommt.<sup>184, 185</sup> Diese Mechanismen agieren zum Teil kompensatorisch, um die durch den verursachten Myokardschaden eingeschränkte Durchblutung zu den Organen wiederherzustellen.<sup>198</sup> Durch Ausschüttung von Neurohormonen und natriuretischen Peptiden (z.B. BNP) kommt es zu einer gesteigerten sympathischen Aktivität.<sup>199</sup> Dadurch wird im Endothel der Blutgefäße die Bildung von Endothelin-1 bewirkt, was wiederum die Vasokonstriktion bewirkt.<sup>200</sup> Ferner wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System durch oxidativen Stress, Inflammation und Stickstoffmonoxid induziert.<sup>201</sup> Diese Mechanismen können kurzzeitig den Blutdruck erhöhen und somit die Perfusion der Organe bewirken.<sup>202</sup> Langfristig verschlechtert sich jedoch der Zustand des Herzens durch Dilatation der Ventrikel und ventrikuläres Remodelling.<sup>201</sup>

Bei der kardialen Kachexie liegt eine Verlagerung des Metabolismus hin zum verstärkten Katabolismus und reduzierten Anabolismus vor.<sup>203</sup> Katabole Mechanismen, wie z.B. Apoptose und das UPS-System, führen zur Atrophie der Skelettmuskulatur.<sup>204</sup>

Der gesteigerte Energiebedarf des Körpers bei Herzinsuffizienz, verursacht durch einen verstärkten kardialen und respiratorischen Arbeitsaufwand, trägt zur Progression der Kachexie bei.<sup>205</sup> Dabei konnte ein gesteigerter Ruheenergieumsatz bei CHI-Patienten nachgewiesen werden.<sup>206</sup> Ferner wurde die Entwicklung einer Insulinresistenz gezeigt<sup>185</sup>.

#### 1.3.4.1 Proinflammatorische Cytokine

Chronische Herzinsuffizienzpatienten haben erhöhte Plasma-Konzentrationen von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 und IL-8.<sup>207-210</sup> Dabei konnten TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 auch in den Patienten nachgewiesen werden, die Kachexie aufwiesen.<sup>185, 211</sup> Da proinflammatorische Cytokine (u.a. TNF- $\alpha$ ) eine wesentliche Rolle bei der Pathophysiologie kardialer Kachexie spielen, ist von Bedeutung, durch welche Auslöser es zur Aktivierung des Immunsystems kommt. Mehrere Hypothesen versuchen, den Ursprung dieser Immunaktivierung zu erklären.<sup>212</sup> Es wird vermutet, dass sowohl Monozyten als auch das geschädigte Myokard TNF- $\alpha$  produzieren.<sup>213-215</sup> Weiterhin wird angenommen, dass Katecholamine, die bei kardialer Kachexie vermehrt vorhanden sind, die Synthese von TNF- $\alpha$  induzieren.<sup>216</sup> Außerdem wird davon ausgegangen, dass durch die Schädigung des myokardialen Gewebes und der peripher auftretenden Hypoxie des Gewebes die Produktion proinflammatorischer Cytokine ausgelöst wird.<sup>217, 218</sup> Eine veränderte Darmpermeabilität führt zur Translokation von bakteriellem Endotoxin in die Zirkulation und führt dort zur Aktivierung des Immunsystems.<sup>219</sup> TNF- $\alpha$  induziert Apoptose und die Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems.<sup>6</sup> Desweiteren bewirkt TNF- $\alpha$  die Expression von Matrix Metalloproteinasen, die einen Einfluss auf den Umbau der extrazellulären Matrix haben und somit die Bildung von Fibrose begünstigen.<sup>220, 221</sup>

#### 1.3.4.2 Neurohumorale Aktivierung

##### 1.3.4.2.1 Aktivierung des Sympathikus durch Neurohormone

Es ist bekannt, dass die Aktivierung des Sympathikus durch Neurohormone mit der Mortalität korreliert und dass diese Aktivierung auch bei kardialer Kachexie erfolgt.<sup>222-224</sup> Dabei bewirkt die Aktivierung des sympathisch-adrenergen Systems die Freisetzung der Hormone Noradrenalin und Adrenalin aus den Nebennieren und

sympathischen Ganglien.<sup>225</sup> Diese auch als Katecholamine bezeichneten Hormone bewirken u.a. über die Bindung an  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren im Herzen eine schnellere elektrische Erregungsleitung sowie eine gesteigerte Kontraktilität des Herzens, wodurch eine erhöhte Herzfrequenz bewirkt wird.<sup>226, 227</sup> Über die Bindung an  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren, die sich überwiegend in Blutgefäßen befinden, wird eine durch Vasokonstriktion vermittelte Blutdruckerhöhung bedingt.<sup>228</sup>

Bei kardialer Kachexie sind sowohl Noradrenalin als auch Adrenalin erhöht.<sup>204</sup> Desweiteren ist Cortisol in kachektischen CHF-Patienten hochreguliert, während die anabolen Hormone Dehydroepiandrosteron und Testosteron reduziert sind.<sup>204, 229</sup>

#### 1.3.4.2.2 Orexigene und anorexigene Hormone

Unveränderte Leptin-Konzentrationen in CHI-Patienten sprechen gegen eine Beteiligung von Anorexie bei der Pathophysiologie kardialer Kachexie.<sup>185</sup> Erhöhte Ghrelin-Konzentrationen konnten hingegen bei kachektischen CHI-Patienten gemessen werden und korrelierten auch mit der Menge an Wachstumshormon.<sup>230</sup>

#### 1.3.4.2.3 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) steuert den Wasser- und Salzhaushalt, stimuliert das sympathische Nervensystem und bewirkt die Vasokonstriktion.<sup>199</sup> Das RAAS wird durch oxidativen Stress und durch das Immunsystem aktiviert.<sup>231</sup> Durch die Aktivierung der  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren durch Katecholaminen in der Niere kann direkt die Sekretion von Renin bewirkt werden.<sup>232</sup> Dabei wird als Erstes das Enzym Renin aus den juxtaglomerulären Zellen der Nieren in die Blutzirkulation freigesetzt.<sup>233</sup> Dort spaltet es das aus der Leber stammende Angiotensinogen zu Angiotensin I.<sup>234</sup> Letztes wird anschließend durch das sich an der Membran des Endothels befindliche Angiotensin-konvertierende-Enzym (ACE) zu Angiotensin II umgewandelt, das die Vasokonstriktion induziert.<sup>235</sup> Zusätzlich bewirkt Angiotensin II die Freisetzung des Mineralkortikoids Aldosteron aus den Nieren, wodurch Aldosteron die Natrium- und Wasserretention in der Niere bewirken kann. Desweiteren wird ein Verlust von Magnesium und Kalium verursacht.<sup>236</sup> Angiotensin II und Aldosteron stimulieren auch das Wachstum von Fibroblasten und die Bildung von Kollagenfasern und somit die Entstehung von Bindegewebe (Fibrose).<sup>237</sup> Hohe Plasma-Konzentrationen von Renin und Aldosteron wurden bei kachektischen CHI-Patienten nachgewiesen.<sup>204</sup>

### 1.3.4.3 Kardiales Remodelling

Kardiales Remodelling ist ein langfristiger Umbauprozess des Herzens, der durch dessen Schädigung ausgelöst wird und sich auf dessen Struktur und Funktion auswirkt.<sup>238</sup> Dabei wird speziell die Größe, Form und Funktion von Kardiomyozyten verändert.<sup>239</sup> Es kann zwischen frühem (bis 72h nach Myokardschädigung) und spätem Remodelling (ab 72h) unterschieden werden.<sup>240</sup> Hierbei sind nekrotische, apoptotische und fibrotische Vorgänge von Bedeutung, jedoch auch die Vergrößerung des Zellvolumens von Kardiomyozyten um bis zu 70%.<sup>241, 242</sup> Nekrose führt zum Absterben von Kardiomyozyten und Zellgewebe, wobei u.a. das Sarkomer der Myofibrillen degradiert wird und kardiale Troponine (Troponin I, Troponin T) freigesetzt werden.<sup>196, 243</sup> Fibrose bewirkt eine enorme Vermehrung des Bindegewebes, vor allem von Kollagenfasern.<sup>238</sup> Dadurch wird das Gewebe vernarbt und verhärtet und schließlich die Kontraktilität, Relaxation und elektrische Erregungsweiterleitung des Herzens massiv verschlechtert.<sup>244</sup> Zusammenfassend bewirken diese Veränderungen eine Verschlechterung der Herzfunktion.

## 1.4 Kardiovaskuläre Medikamente

### 1.4.1 β-Blocker (Bisoprolol, Carvedilol)

Bisoprolol und Carvedilol gehören pharmakologisch gesehen zu den β-Blockern, die mit verschiedener Spezifität β-Adrenorezeptoren (AR) blockieren und somit die durch Katecholamine vermittelte Wirkung, vor allem am Herz, verhindern.<sup>245, 246</sup> Dabei befinden sich β<sub>1</sub>- und β<sub>2</sub>-ARs im Myokard (vor allem β<sub>1</sub>-ARs), der Niere und den Blutgefäßen. Zusätzlich dazu sind β<sub>2</sub>-ARs in der Atemmuskulatur, im Skelettmuskel und dem Gehirn zu finden.<sup>245, 247</sup> β<sub>3</sub>-ARs wurden hauptsächlich im Fettgewebe nachgewiesen.<sup>248</sup> Somit bewirkt die Inhibierung der β-ARs hauptsächlich die reduzierte Aktivität des sympathisch-adrenergen Systems und die verhinderte Sekretion von Renin.<sup>249</sup>

Durch Bindung von Katecholaminen oder pharmakologischer β-Agonisten werden β-AR, die zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören, aktiviert. Dadurch erfolgt die Umwandlung von ATP zu cAMP durch die Adenylatzyklase und die anschließende Aktivierung der Proteinkinase A (PKA).<sup>250</sup> Folglich werden *downstream* der PKA Proteine phosphoryliert, die u.a. den Energiestoffwechsel und die kardiale Kontraktion regulieren.<sup>251</sup>

Bisoprolol ist ein selektiver  $\beta_1$ -Antagonist, der auch bei hohen Konzentrationen nicht an den  $\beta_2$ -AR bindet.<sup>252</sup> Es wird in der Leber in seine inaktiven Metaboliten umgewandelt, die renal ausgeschieden werden. Die Halbwertszeit im Plasma beträgt 10-12 Stunden.<sup>252</sup> Ergebnisse der klinischen Studie CIBIS-II zeigten, dass Bisoprolol bei chronischen Herzinsuffizienzpatienten das Überleben im Vergleich zur Placebogruppe verlängerte.<sup>253</sup> Desweiteren zeigte sich in weiteren Studien eine Reduktion der Herzrate und eine Verbesserung der linksventrikulären Auswurfsfraktion.<sup>254, 255</sup> Es konnte auch gezeigt werden, dass Bisoprolol die Remodellingprozesse am Herzen umkehrt.<sup>255</sup>

Carvedilol blockiert unspezifisch  $\beta_1$  und  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren und wirkt zudem antagonistisch auf  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren, wodurch die Vasodilatation ausgelöst wird.<sup>256</sup>

#### 1.4.2 Spironolacton

Spironolacton gehört zur Gruppe der kaliumsparenden Diuretika und wirkt als Aldosteronantagonist.<sup>257</sup> Dementsprechend bindet es an den Mineralkortikoidrezeptor (MR), so dass Aldosteron nicht mehr seine Wirkung vermitteln kann.<sup>236</sup> Folglich kommt es zur Wasser und Natriumausscheidung, zum Erhalt von Kalium und zur Inhibition kardialer Fibrose.<sup>258</sup> Diese Wirkung wird dadurch vermittelt, dass sich die MRs im Herz, den Blutgefäßen, der Niere und im Darm befinden. Zusätzlich dazu bindet Spironolacton auch an Androgen- und Progesteronrezeptoren, wodurch sich Nebenwirkungen wie zum Beispiel Impotenz, Störung des Menstruationszyklus oder Gynäkomastie beim Mann ergeben.<sup>236</sup>

#### 1.4.3 Imidapril

Imidapril ist ein ACE-Inhibitor, der die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II inhibiert.<sup>259</sup> Folglich erfolgt keine Synthese von Angiotensin II sowie von Aldosteron. Desweiteren verhindert Imidapril den Abbau von Bradykinin, das vasodilatatorisch wirkt, so dass diese Mechanismen eine Senkung des Blutdruckes bewirken.<sup>260</sup> Außerdem wird die Produktion von Noradrenalin unterdrückt, da Angiotensin II dessen Synthese bewirkt. Imidapril wird in der Leber in seinen aktiven Metaboliten Imidaprilat umgewandelt.<sup>260</sup> Dieser ACE-Inhibitor wird bei CHI- und Bluthochdruckpatienten verwendet.<sup>261</sup>

## 1.5 Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Untersuchung verschiedener Kachexiemodelle (Tumorkachexie vs. kardiale Kachexie) und deren Einfluss auf die Körperzusammensetzung, vordergründig auf die Herzstruktur und –funktion. Desweiteren sollte das Herzgewebe auf anabole und katabole Signalwege untersucht werden. In einer weiteren Studie sollte eine präventive pharmakologische Behandlung von Tumortieren erfolgen. In dem letzten Teil der Dissertation sollte analysiert werden, ob auch bei kachektischen Tumorpatienten eine Veränderung der kardialen Struktur im Vergleich zu nicht kachektischen Patienten erfolgt. Dabei ergaben sich folgende Fragestellungen:

1) Vergleich von tumorassoziierter Kachexie (AH-130 Yoshida Hepatoma Modell) mit kardialer Kachexie (Myokardinfarktmodell):

- Wie und wann erfolgt die Induktion und Progression der Kachexie im AH-130 Modell und Infarktmodell? Wie verändern sich Parameter wie Körpergewicht und Körperzusammensetzung in den Kachexiemodellen?
- Hat die Kachexie einen Einfluss auf die Herzstruktur und -funktion? Gibt es Anzeichen für eine kardiale Dysfunktion anhand von hämodynamischen und echokardiographischen Werten und Biomarkern?
- Welche katabolen und anabolen Mechanismen werden im Herz aktiviert? Wie findet der Proteinabbau im Herzen statt? Gibt es Proteine, die als Marker für die Pathogenese Kachexie induzierter Kardiomyopathie dienen?

2) Behandlung von Tumortieren (AH-130 Modell) mit kardiovaskulären Medikamenten:

- Wie wirkt sich die Behandlung auf das Überleben von Tumortieren aus?
- Welchen Einfluss haben die Medikamente auf die Induktion und Stärke der Kachexie?
- Wie werden die Herzstrukturen und –funktion durch Medikation verändert?

3) Analyse von humanen Daten:

- Gibt es kardiale strukturelle Unterschiede zwischen kachektischen und nicht kachektischen Tumorpatienten?



## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Tiere

Tabelle 1. Tierstämme

<b>Versuchsbezeichnung</b>	<b>Tierstamm</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter/ Gewicht bei Versuchsbeginn</b>	<b>Firma</b>
Verlaufsstudie der tumorassoziierten Kachexie	Wistar-Han	männlich	ca. 7 Wochen, 200g	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
Tumorassoziierte Kachexieprävention	Wistar-Han	männlich	ca. 7 Wochen, 200g	Charles River
Akuter Herzinfarktversuch	Sprague-Dawley	männlich	ca. 7 Wochen, 220g	Harlan® Winkelmann, Rossdorf, Deutschland
Chronischer Herzinfarktversuch	Sprague-Dawley	männlich	ca. 7 Wochen, 220g	Harlan® Winkelmann

#### 2.1.2 Tierhaltung

- Futter: ssniff R/M-H (Firma: ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland)
- Makrolon-Standardkäfige Typ I und III

#### 2.1.3 Operationsmaterial

- Ethibond-Nahtmaterial 7/0, Vicryl-Nahtmaterial 3/0, Prolene-Nahtmaterial 3/0, 5-0 Perma-Hand Seide (Firma: Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland)
- Katheterspitzenmanometer (Firma: Millar Instruments, Inc., Modell SPR838 und Modell SPR-407, Houston, Texas, USA)

#### 2.1.4 Verbrauchsmaterial für Tiere

- *Animal Feeding Needles* (Firma: Popper & son, New Hyde Park, New Jersey, USA)
- 1-, 3- und 10ml Spritzen (BD Plastipak™, Firma: B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- Veet®-Enthaarungscreme (Firma: Reckitt Benckiser, Hull, Großbritannien)
- *Ultrasound Transmission Gel* (Firma: GE Healthcare, München, Deutschland)

#### 2.1.5 Tumorzellen

Die Tumorzellen AH-130 Yoshida Hepatoma (*Hepatoma Cell Line*) wurden von Prof. J.M. Argiles zur Verfügung gestellt (Cancer Research Group, Departement de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spanien).

#### 2.1.6 Medikamente

Tabelle 2. Medikamente

<b>Medikament</b>	<b>Handelsname</b>	<b>Hersteller</b>
Buprenorphin	Temgesic	Essex Pharma GmbH, München, Deutschland
Heparin		Rotexmedica®, Trittau, Deutschland
Isofluran	Forene® 100% v/v	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	Ketamin (10%)	WDT Beta Pharm Arzneimittel GmbH, Augsburg, Deutschland
Xylazinhydrochlorid	Rompun® (2%)	BAYER®, Leverkusen, Deutschland

#### 2.1.7 Chemikalien

Tabelle 3. Chemikalien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
30% Acrylamid/ Bis Solution, 29:1	Bio-Rad®, München, Deutschland
APS	SERVA®, Heidelberg, Deutschland
ATP	SIGMA-ALDRICH®, München, Deutschland
<i>Bromphenol Blue Na-salt</i>	SERVA®, Heidelberg, Deutschland

BSA (Cohn Fraktion V)	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
CHAPS	SERVA <sup>®</sup> , Heidelberg, Deutschland
<i>CDP-Star</i> <sup>®</sup>	Applied Biosystems <sup>™</sup> , Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe, Deutschland
<i>Densi-Stain Blue G (2x)</i>	SERVA <sup>®</sup> , Heidelberg, Deutschland
Deoxycholsäure	Fluka <sup>®</sup> , SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
DMF	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
DMSO	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe, Deutschland
DTT (1M)	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
EDTA (0,5M)	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe, Deutschland
EGTA	SERVA <sup>®</sup> , Heidelberg, Deutschland
Ethanol ≥99,8%, p.a.	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100% v/v denaturiert mit Methylethylketon	Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland
Glycerol	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe, Deutschland
Glycin	SERVA <sup>®</sup> , Heidelberg, Deutschland
IGEPAL <sup>®</sup> CA-630	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe, Deutschland
Isotone Kochsalzlösung (0,9%)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
KCl	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Fluka <sup>®</sup> , SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methanol	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Natriumchlorid	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe, Deutschland
<i>Quick Start</i> <sup>™</sup> <i>Bradford Dye Reagent</i> , 1x	Bio-Rad <sup>®</sup> , München, Deutschland
<i>Quick Start</i> <sup>™</sup> BSA (2mg/ml)	Bio-Rad <sup>®</sup> , München, Deutschland
SDS-Pellets	SERVA <sup>®</sup> , Heidelberg, Deutschland
Sucrose	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
TEMED	SERVA <sup>®</sup> , Heidelberg, Deutschland
TRIS-Pufferan <sup>®</sup>	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	SERVA <sup>®</sup> , Heidelberg, Deutschland
Trizol <sup>®</sup>	Invitrogen <sup>™</sup> , Darmstadt, Deutschland
<i>Trypan Blue Solution</i>	Fluka <sup>®</sup> , SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Tween <sup>®</sup> -20	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland

2.1.8 Inhibitoren

Tabelle 4. Inhibitoren

Inhibitor	Hemmung von	Hersteller
Ac-DEVD-CHO	Caspase-3	Enzo <sup>®</sup> Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Ac-VEID-CHO	Caspase-6	Enzo <sup>®</sup> Life Sciences GmbH
Aprotinin	Serinprotease Plasmin	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Complete Mini, Protease Inhibitor Cocktail	Proteasen	Roche <sup>®</sup> , Grenzach-Wyhlen, Deutschland
β-Glycerophosphat	Serin-/Threonin-Phosphatasen	MERCK KGaA, Darmstadt, Deutschland
Leupeptin	Cystein-, Serin- und Threoninpeptidasen	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
MG-132	UPS	Enzo <sup>®</sup> Life Sciences GmbH, Lörrach, Deutschland
Natriumfluorid (NaF)	Saure Phosphatasen	Fluka <sup>®</sup> , SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Natriumpyrophosphat (Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> )	Phosphatasen	Fluka <sup>®</sup> , SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Natriumvanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Tyrosin- und alkaline Phosphatasen	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Phosphatase Inhibitor (p2850)	Alkaline Phosphatasen, Serine/Threonin-Phosphatasen	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
PMSF	Serinproteasen, Protease Papain	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Protease Inhibitor (p8340)	Serin-, Cystein-, Asparaginsäure-Proteasen und Aminopeptidasen	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland

2.1.9 Enzyme

Tabelle 5. Enzyme

Enzym	Hersteller
Pankreatin (Ursprung: Pankreas vom Schwein)	Fluka <sup>®</sup> , SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Kollagenase Typ 2	Worthington Biochemical Corporation, Lakewood, USA

2.1.10 Puffer

Tabelle 6. Puffer und Pufferzusammensetzung

<b>Puffer</b>	<b>Hersteller/ Zusammensetzung</b>
<i>Antibody Stripping Buffer</i>	Gene Bio Application Ltd. <sup>®</sup> , Kfar Hanagide, Israel
APS (10%; w/v)	10g APS auf 100ml dH <sub>2</sub> O
Assay-Puffer (Immundetektion, 10x)	200mM Tris/HCl (pH 9,8); 10mM MgCl <sub>2</sub>
Blockpuffer (Western Blot)	5% (w/v) BSA/TBST
Caspase-Lysispuffer	100mM HEPES (pH 7,5); 10% (w/v) Sucrose; 0,1% (v/v) IGEPAL <sup>®</sup> CA-630; 10mM DTT; 1 Tablette Complete Mini
Elektrophoresepuffer (Western Blot, 10x)	250mM Tris/HCl (pH 8,3); 2,5M Glycin; 1% (w/v) SDS
HEPES Buffer (1M, pH 7,5)	GIBCO <sup>®</sup> , Deutschland
PBS	137mM NaCl; 2,7mM KCl; 10mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 1,76mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Puffer für Caspase- Aktivitätsmessung	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
Proteasom-Lysispuffer	10mM Tris (pH 7,5); 1mM EDTA; 2mM ATP; 20% (v/v) Glycerin; 4mM DTT
Puffer für Proteasomaktivitätsmessung	50mM Tris (pH 8,0); 0,5mM EDTA; 40µM fluorogenes Proteasom-Substrat; ± 40µM MG-132
RIPA-Puffer	20mM Tris (pH 7,5); 2,5mM EDTA; 0,1% SDS; 1% Triton X-100; 10% Glycerol; 50mM NaF; 1% Deoxycholsäure; 10mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ; 1mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 1mM PMSF; 10µg/µl Leupeptin; 10µg/µl Aprotinin
SDS-Puffer (10%, w/v)	10g SDS auf 100ml dH <sub>2</sub> O
SDS-Probenpuffer (6x)	4x Tris/HCl (= 500mM, pH 6,8); 30% (v/v) Glycerol; 10% (w/v) SDS; 5% (v/v) β-ME; 0,024% (w/v) Bromphenolblau
SDS-Probenpuffer (2x)	10ml 6x SDS-Probenpuffer + 20ml dH <sub>2</sub> O
TBS (10x)	0,2M Tris (pH 7,6); 0,74M NaCl
TBST (1x)	1x TBS (pH 7,6); 0,1% (v/v) Tween <sup>®</sup> -20
Transfer-Puffer (Western Blot, 4x)	0,1M Tris; 0,74M Glycin
Transfer-Puffer (Western Blot, 1x)	100ml 4x Transferpuffer; 100ml Methanol; 300ml dH <sub>2</sub> O
Tris/HCl (1M, pH 6,8)	12,1g Tris in 80ml dH <sub>2</sub> O auflösen; pH von 6,8 mit 1N HCl einstellen; mit dH <sub>2</sub> O auf Gesamtvolumen von 100ml auffüllen
Tris/HCl (1,5M, pH 8,8)	18,17g Tris in 80ml dH <sub>2</sub> O auflösen; pH von 8,8 mit 1N HCl einstellen;

	mit dH <sub>2</sub> O auf Gesamtvolumen von 100ml auffüllen
Tris/HCl (4x = 500mM, pH 6,8)	6,06g Tris in 70ml dH <sub>2</sub> O auflösen, pH von 6,8 mit 1N HCl einstellen; mit dH <sub>2</sub> O auf Gesamtvolumen von 100ml auffüllen
Western Blot Lysispuffer	20mM Tris (pH 7,5); 150mM NaCl; 1mM EDTA; 1mM EGTA; 1% Triton X-100; 2,5mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> ; 10µl/ml Phosphatase Inhibitor (p2850); 10µl/ml Protease Inhibitor (p8340); 20mM NaF; 1mM DTT; 1mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 1mM β-Glycerophosphat

### 2.1.11 Fluorogene Substrate

Tabelle 7. Fluorogene Substrate

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

### 2.1.12 SDS-Polyacrylamidgele

Tabelle 8. Rezept für Trenngel/Sammelgel, 25ml für 2 Gele (20x10cm)

Reagenz	Endkonzentration im Trenngel	Endkonzentration im Sammelgel
H <sub>2</sub> O		
30% Polyacrylamid	8-15%	5%
1,5M Tris pH 8,8	0,38M	
1,0M Tris pH 6,8	/	0,125M
10% SDS	0,1%	0,1%
10% APS	0,1%	0,1%
TEMED (fertig, 99%)	0,04%	0,1%

### 2.1.13 Marker

Als Proteinmarker wurden der *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* sowie der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* (Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) benutzt.

2.1.14 Antikörper

Tabelle 9. Primärantikörper

<b>Primärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
AMPK $\alpha$ (23A3)	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
pAMPK $\alpha$ (Thr172)	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
Akt	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
pAkt (Ser473) (587F11)	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
pAkt (Thr308)	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
Fox03a (75D8)	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
pFox03a (Ser253)	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
GSK-3 $\alpha$	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
GSK-3 $\beta$ (27C10)	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
pGSK-3 $\alpha/\beta$ (Ser21/9) (37F11)	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
GAPDH	1:12000	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
LC3	1:1000	Novus <sup>®</sup> Biologicals, Littleton, USA
MURF1	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
MHC	1:2000	Abcam <sup>®</sup> , Cambridge, England
Myostatin/GDF-8	1:1000	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
SQSTM1/p62	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
4E-BPI (53H11)	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
p-4E-BPI (Thr37/46)	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
p-4E-BPI (Ser65)	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
pSmad2 (Ser465/467)	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
Tropomyosin	1:1000	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Troponin T	1:1000	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
p70 S6 Kinase	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA
p-p70 S6 Kinase (Thr389)	1:1000	Cell Signaling Technology <sup>®</sup> , Boston, USA

Tabelle 10. Sekundärantikörper

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>
Polyclonal Goat anti-Rabbit Immunglobulins/ AP	1:1000	Dako Cytomation <sup>®</sup> , Glostrup, Dänemark
Goat anti-Mouse Polyvalent Immunglobulins (G,A,M)- Alkaline Phosphatase	1:10000	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Rabbit anti-Goat IgG-h+l Alkaline Phosphatase	1:2000	BETHYL <sup>®</sup> , Texas, USA

2.1.15 Multiplex Kits

Tabelle 11. Multiplex Kits

<b>Multiplex-Kit</b>	<b>Targets</b>	<b>Hersteller</b>
MILLIPLEX MAP Rat Cardiovascular Disease (CVD) Panel 3	Fibrinogen	Millipore Corporation, Massachusetts, USA
Rat Cardiocascular Panel	BNP, Troponin-I, Troponin-T, MCP-1, TIMP-1	Millipore Corporation, Massachusetts, USA

2.1.16 Real-time PCR

- TaqMan Universal PCR Master Mix (Firma: Applied Biosystems/Ambion, Foster City, USA)
- Primer für miR-199a-5p (Firma: Applied Biosystems/Ambion, Foster City, USA; Primersequenz: CCCAGUGUUCAGACUACCUGUU)

2.1.17 Zellkultur

- 6-well Zellkulturplatten (VWR, Darmstadt, Deutschland)
- Percoll™ (GE Healthcare, München, Deutschland)

Tabelle 12. Zellkulturmedium

<b>Bestandteile des Zellkulturmediums</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Hersteller</b>
DMEM	80%	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Medium 199	20%	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	1%	Biochrom AG Berlin, Deutschland
L-Glutamin	1%	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Pferdeserum	10%	Biochrom AG Berlin, Deutschland
Fetales Kälberserum	5%	Biochrom AG Berlin, Deutschland



2.1.18 Geräte

Tabelle 13. Geräte

<b>Gerät</b>	<b>Typ</b>	<b>Hersteller</b>
Acuson-Sequoia	C256	Siemens, München, Deutschland
Benchmark Plus microplate spectrophotometer		Bio-Rad <sup>®</sup> , München, Deutschland
CO <sub>2</sub> -Zellkulturinkubator mit N <sub>2</sub> /O <sub>2</sub> -Regulierung	CB210	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Dispergiergerät	PT 2100	POLYTRON <sup>®</sup> , Kinematica, Inc, Bohemia, USA
Echo MRI-700		Echo Medical Systems, Houston, Texas, USA
iCycler IQ	3.1.7050	Bio-Rad <sup>®</sup> , München, Deutschland
Laborwaage	CS 2000	Ohaus Corporation, Pine Brook, NY, USA
Luminex	200	Luminex <sup>®</sup> Corporation <sup>™</sup> , Austin, USA
Minishaker	MS1	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland
Mikroskop	DM LB-2; DMIL	Leica, Bensheim, Deutschland
<i>Modular tissue embedding center</i>	EC 350-1/ EC 350-2	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Superior, (Tiefe 0,1mm, 0,0025mm <sup>2</sup> )	Marienfeld GmbH & Co.KG, Königshofen, Deutschland
pH-Meter (calibration check microprocessor pH meter MSH basic)	HI221	HANNA instruments <sup>®</sup> , Kehl am Rhein, Deutschland
Power Supply	Blue Power 500; 10-500V	SERVA <sup>®</sup> , Heidelberg, Deutschland
Power Supply	Peqpower 300; 2-300V	peqlab Biotechnology GmbH <sup>®</sup> , Erlangen, Deutschland
Präzisionswaage	CP225D	Sartorius <sup>®</sup> AG, Göttingen, Deutschland
<i>Rodent Respirator</i>	UB 7025-10	Föhr Medical Instruments GmbH, Seeheim/OB, Deutschland
Rotationsmikrotom	Cool Cut, HM 325	Microm International GmbH, Walldorf, Deutschland
<i>Shandon Citadel Tissue Processor</i>	1000	Thermo Electron Corporation, Massachusetts, USA

Sonifizierer	HD 2070 MS 72	BANDELIN SONOPLUS <sup>®</sup> , Berlin, Deutschland
„Supermex“-Lokomotor-System		Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan
Thermomixer	comfort	Eppendorf <sup>®</sup> , Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge	SD 220 VAC; 6rpm	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe, Deutschland
Titramax	100	VWR, Darmstadt, Deutschland
<i>Trans-Blot<sup>®</sup> SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell</i>		Bio-Rad <sup>®</sup> , München, Deutschland
Twinkle-Fluorometer	LB970	BERTHOLD Technologies GmbH & Co. KG, Wildbad, Deutschland
<i>Twin-Plate Wide Format</i>	Mini-Gel	Carl Roth <sup>®</sup> , Karlsruhe, Deutschland
Ultra-Turrax mit Netzgerät und Dispersionswerkzeug	T8 / T8.01 / S8N-5G	IKA <sup>®</sup> Werke GmbH & Co.KG, Staufen, Deutschland
<i>Univentor 400 Anaesthesia Unit</i>		Agn Tho's AB, Lidingö, Schweden
<i>Vevo 770 High-Resolution Imaging System</i>		VisualSonics, Toronto, Kanada
Wärmeschrank	INCO2	Memmert GmbH, Schwabach, Deutschland
Wasserbad		Störk Tronic, Mikrotome GmbH, Wiesmoor, Deutschland
Zentrifuge	5804R	Eppendorf <sup>®</sup> , Hamburg, Deutschland

### 2.1.19 Computerprogramme

Tabelle 14. Computerprogramme

<b>Programm</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Aquisitionsoftware IOX	Auswertung der Haemodynamik	Emka Technologies, Paris, Frankreich
Chart	Erfassen von EKG-Daten; Version 5	ADInstruments, Sprechbach, Germany
compact AMS	Erfassen von Lokomotordaten Version 3	Muromachi Kikai Co., Ltd., Tokyo, Japan
iCycler™ iQ	Erfassen und Auswerten der Real- time PCR; Version 3.1	Bio-Rad <sup>®</sup> , München, Deutschland
eMOUSE	Auswertung von EKG-Daten	Mouse Specifics, Quincy, MA, USA
EndNote 9.0	Literaturverwaltung	Thomson Reuters
GraphPad Prism	Statistikprogramm, Version 5.0	Graph Pad Software

ImageJ	Quantifizieren von Proteinbanden	<i>National Institute of Health</i>
Microplate Manager	Quantifizieren der Optischen Dichte von Proteinproben Version 5.2	Bio-Rad®, München, Deutschland
Microwin 2000	Quantifizieren von Fluoreszenz	BERTHOLD Technologies GmbH & Co. KG, Wildbad, Deutschland
NCBI	Literaturrecherche	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
Optimas 6.5	planimetrische Bestimmung von Herzinfarktgrößen	Stemmer Imaging, München, Deutschland
VEVO 770 V3.0.0	Erfassung und Analyse echokardiographischer Daten	VisualSonics, Toronto, Kanada
xPONENT	Erfassen und Analyse von Luminex®200™ Daten	Luminex® Corporation™, Austin, USA

### 2.1.20 Sonstiges

- Amersham Hybond™–P, PVDF-Transfer Membran, 0,45µM (GE Healthcare, München, Deutschland)
- Amersham Hyperfilm™ ECL, 18x24cm (GE Healthcare)
- Elektrodengel (GE Medical Systems, München, Deutschland)
- *Extra thick blotting paper* (Protean XL Size, 18,5x19cm; Bio-Rad®, München, Deutschland)
- Rasierer (Firma: AESCULAP®, Typ: GT104, Melsungen, Deutschland)
- Röntgenkassette (Typ G 24x30cm; peqlab Biotechnology GmbH®, Erlangen, Deutschland)
- 36er Well-Kamm, 1,0 mm (Carl Roth®, Karlsruhe, Deutschland)
- *iScript™ cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad®, München, Deutschland)
- Einbettkassetten (Tissue-Tec, Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Tierexperimenteller Teil

Es wurden verschiedene Tierexperimente zur Untersuchung der Kachexie bei Ratten durchgeführt. Alle Versuche erfolgten randomisiert und doppelt verblindet. In einem ersten Versuch wurde durch ein Tumormodell die Induktion und Progression der Kachexie analysiert und in einem zweiten größeren Versuch des gleichen Modells wurde der Präventionseffekt verschiedener Medikamente getestet. Zusätzlich erfolgten zwei weitere Tierexperimente, bei denen die Kachexie durch ein Modell der Herzinsuffizienz induziert wurde und in denen die Tiere eine kurze und lange Regenerationsphase erhielten.

#### 2.2.1.1 Tiere und Tierhaltung

Die Tiere wurden im klimatisierten SPF-Bereich des *Center for Cardiovascular Research* der Charité Universitätsmedizin Berlin in Makrolon-Standardkäfigen Typ I (Einzelhaltung) oder III (bis zu 4 Tiere) gehalten. Zur Anreicherung der Käfige dienten Kunststoffröhren. Wasser sowie Nahrung wurden *ad libitum* verabreicht. Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug je 12 Stunden (7-19 Uhr), die Temperatur in den Räumen lag konstant bei 22° Celsius. Alle Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LAGetSi) genehmigt und gemäß den Tierschutzrichtlinien durchgeführt. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde zweimal täglich durch Veterinärmediziner kontrolliert und anhand der Empfehlungen der Gesellschaft für Versuchstierkunde – *Society for Laboratory Animal Science* (GV-SOLAS) und des *United Kingdom Co-ordinating Committee on Cancer Research* (UKCCCR) beurteilt. Sobald ein Tier erhebliches Leiden aufwies, wurde der Tierversuch vorzeitig abgebrochen und das Tier euthanasiert. Als Abbruchkriterien dienten Apathie, eine reduzierte Körpertemperatur, Durchblutungsstörungen oder massive Störungen der Motorik.

## 2.2.1.2 Modell der Tumorkachexie

## 2.2.1.2.1 Studiendesign

Zur Untersuchung der tumorassoziierten Kachexie wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Anfangsgewicht von 200g verwendet. In einer ersten Studie (Abbildung 10) wurde der Verlauf der Kachexie untersucht (n= 60). Dazu wurde zu Beginn der Studie (Tag -1) das Gewicht der Tiere, die Körperzusammensetzung, die Aktivität sowie die Futter- und Wasseraufnahme bestimmt. Zusätzlich erfolgte die echokardiographische, elektrokardiographische und hämodynamische Untersuchung der Tiere. Am Tag 0 erfolgte die intraperitoneale Inokulation der Ratten mit  $10^8$  AH-130 Yoshida Hepatoma Zellen. Die Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung. Am Tag 5, 7, 9, 11 und 13 nach Tumoringokulation wurde erneut das Gewicht, die Körperzusammensetzung, die Aktivität und die Nahrungsaufnahme protokolliert. An diesen Tagen erfolgten zusätzlich eine echokardiographische Untersuchung des Herzens, die Anfertigung eines Elektrokardiogramms und eine invasive hämodynamische Analyse mit anschließender Tötung, Organ- und Blutentnahme.

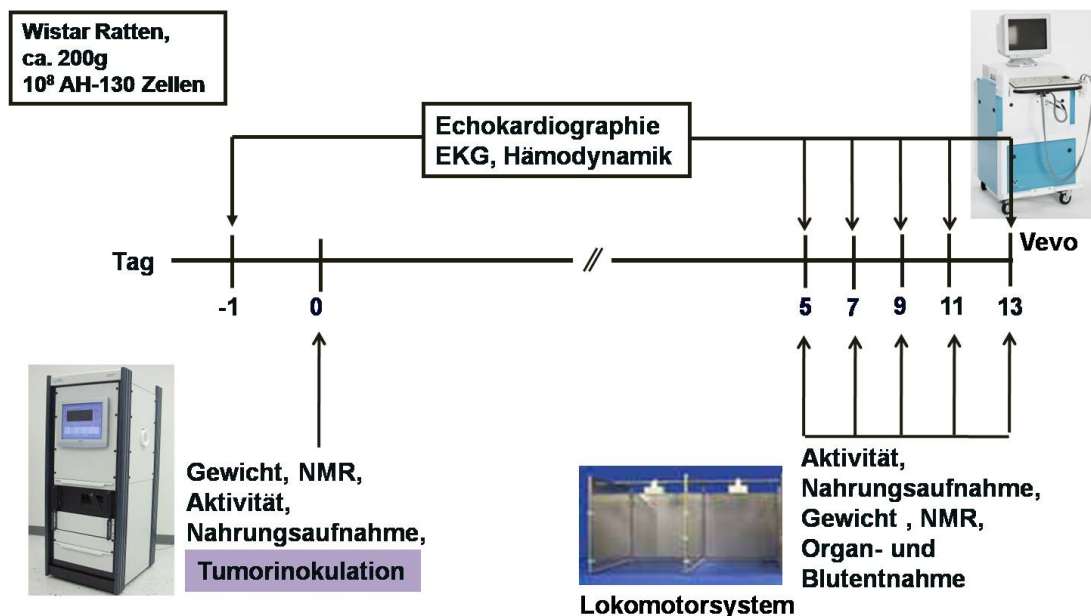


Abbildung 10. Studiendesign der tumorassoziierten Kachexie

In einer zweiten Studie (Abbildung 11) wurde der Präventionseffekt verschiedener Medikamente auf die Tumorkachexie untersucht. Vor der Tumoringokulation der Ratten (n=248) mit  $10^8$  AH-130 Yoshida Hepatoma Zellen am Tag 0 erfolgte die Messung des Gewichtes, der Körperzusammensetzung, der Aktivität, der Futter- und

Wasseraufnahme und eine echokardiographische Untersuchung. Ab Tag 1 erfolgte täglich die Behandlung mit Medikamenten. Nach erneuter Untersuchung der Herzfunktion, der Aktivität und der Nahrungsaufnahme der Tiere am Tag 10/11 wurde wiederholt die Körperzusammensetzung und das Gewicht am Tag 16 gemessen. Anschließend erfolgte die Tötung der Tiere mit Organ- und Blutentnahme.

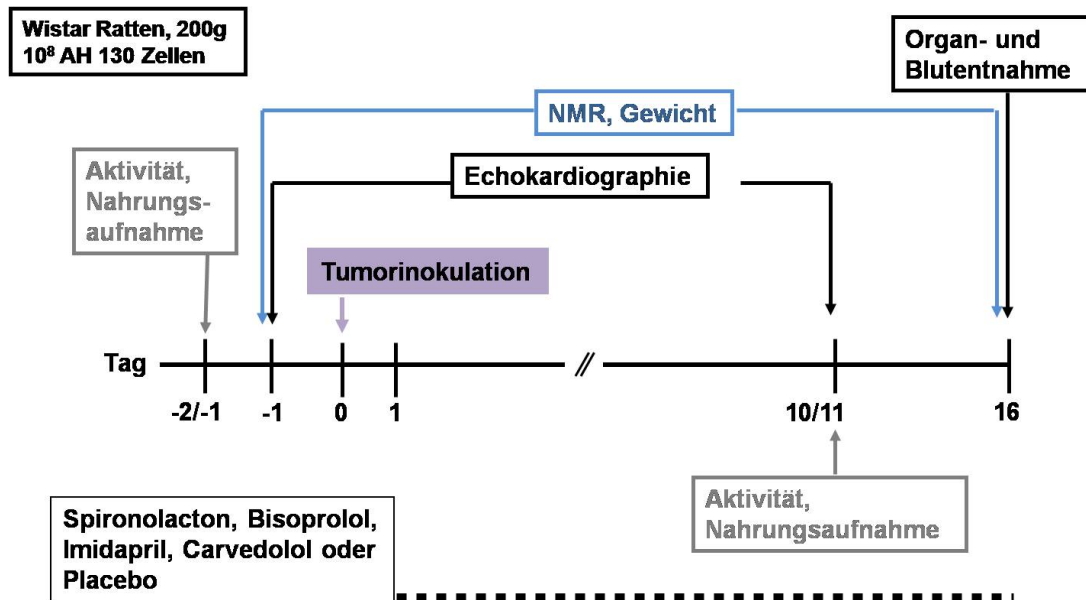


Abbildung 11. Studiendesign der tumorassoziierten Kachexieprävention.

#### 2.2.1.2.2 Tumorzellen

Zur Induktion des Tumors wurden sich schnell vermehrende leicht transplantierbare AH-130 Yoshida Hepatoma Zellen verwendet, die nach intraperitonealer Inokulation die Bildung eines Aszites verursachen.<sup>262</sup> Die Tumorzellen verhalten sich nicht-metastasierend und müssen mehrmals in vivo kultiviert werden, um eine stabile sich exponentiell vermehrende Zelllinie zu erhalten.<sup>263</sup>

#### 2.2.1.2.3 Tumordinokulation und Tumorwachstum

Für die Induktion des Tumors wurden 10<sup>8</sup> AH-130 Yoshida Hepatoma Zellen verwendet, die zuvor aus einem Passagetier isoliert wurden und die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden. Nach intraperitonealer Inokulation der Tumorzellen vermehrten sie sich exponentiell bis Tag 8 und gingen dann in die stationäre Phase über.<sup>264</sup> Nach 14-16 Tagen führte der Tumor zum Tod des Tieres, so dass zu diesem Zeitpunkt auch der Versuch beendet werden musste.<sup>264</sup>

### 2.2.1.2.4 Tumorpassage

Vor Beginn des Tumorversuches war das Mehrfache Passagieren der Tumorzellen erforderlich, um eine stabile nicht alternde Zelllinie zu erhalten. Dazu wurden dem Passagetier  $10^8$  Zellen gespritzt und nach sieben Tagen Wachstum unter finaler Narkose wieder aus dem Bauchraum entnommen. 25 $\mu$ l Tumorflüssigkeit wurden mit 875 $\mu$ l Natriumchlorid und 100 $\mu$ l Tryphanblau 1:40 gemischt und in die Neubauer-Zählkammer überführt.

Das Zählen der ungefärbten vitalen als auch der blauen toten Zellen erfolgte bei einer 200-fachen Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop. Die Zellzahl (Zellen/ml) ergab sich nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl (Zellen/ml)} = \frac{\text{Gesamtzellzahl} \cdot \text{Verdünnungsfaktor (40)} \cdot \text{Kammerfaktor (10}^4\text{)}}{\text{Anzahl der Großquadrate (4)}}$$

### 2.2.1.2.5 Medikamente und Gruppeneinteilung

Zur Kachexieprävention wurden die Tumortiere, die Symptome von Herzinsuffizienz zeigten, mit kardiovaskulären Medikamenten (Tabelle 15) behandelt. Die Medikamente wurden präventiv ab Tag 1 bis maximal Tag 16 per Gavage verabreicht. Die Placebogruppe erhielt physiologische Kochsalzlösung (n=73).

Tabelle 15. Medikamente und Gruppeneinteilung

Gruppe/ Behandlung	Wirkung	Benutzte Dosis (mg/kg/d)	n-Zahl	Hersteller
Bisoprolol	selektiver $\beta_1$ - Adrenorezeptor- blocker	0,5	13	Merck Pharma GmbH, Darmstadt, Deutschland
		2	14	
		5	23	
		50	20	
Carvedilol	Unspezifischer $\beta$ -Blocker	1,2	9	SIGMA, München, Deutschland
		3	10	
		30	9	
Imidapril	ACE-Inhibitor	0,4mg/kg/d	10	SIGMA, München, Deutschland
		1	14	
		10	15	
Spironolacton	Aldosteron- antagonist	2	6	HEXAL, Holzkirchen Deutschland
		5	16	
		50	16	

### 2.2.1.2.6 Tötung und Organentnahme

Zuerst wurde das Gewicht der Tiere protokolliert und anschließend erfolgte die intraperitoneale Narkose mit Ketamin (90mg/kg) und Xylazin (10mg/kg). Nachdem die Tiere keinen Lid- und Zwischenzehenreflex mehr aufwiesen, wurde die Bauchdecke im Bereich der *Linea alba* eröffnet und die gesamte Aszitesflüssigkeit mit einer Pasteurpipette entfernt und sowohl das Volumen als auch die Zellzahl des Tumors ermittelt. Es folgte die erneute Messung des Gewichtes ohne Tumorflüssigkeit und ein NMR-Scan. Zusätzlich dazu wurde auch die Zusammensetzung des isolierten Tumors per NMR analysiert. Dann wurde der Brustkorb eröffnet, Blut aus dem linken Ventrikel mit Hilfe einer EDTA-Spritze entnommen und in ein EDTA-Gefäß transferiert. Nach zervikaler Translokation erfolgte die Entnahme der Organe (Herz, Lunge, Milz, Leber, Niere, Nebennieren), des Fettgewebes (braunes und weißes Fett) als auch der Beinmuskulatur (*M. gastrocnemicus*, *M. extensor digitorum longus*, *M. tibialis*, *M. soleus*). Zusätzlich dazu wurde zum Bestimmen des Längenwachstums die Tibia entnommen und vermessen. Alle entnommenen Organe wurden gewogen, ihre Gewichte protokolliert und bis auf weiteres bei -80°C eingefroren.

### 2.2.1.3 Modell der kardialen Kachexie

#### 2.2.1.3.1 Studiendesign

Für das Modell der kardialen Kachexie (Abbildung 12) wurden Herzinfarkte oder Sham-Operationen bei männlichen Spague-Dawley-Ratten mit einem Anfangsgewicht von ca. 200g induziert.

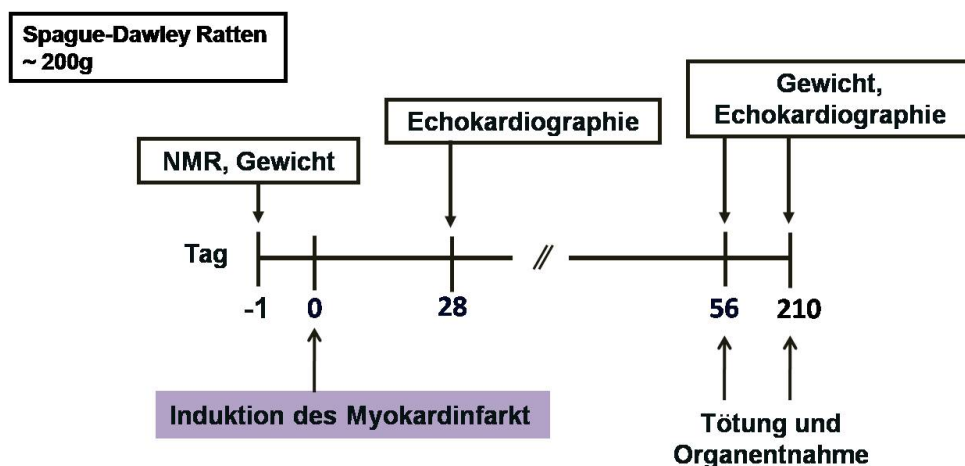


Abbildung 12. Studiendesign akuter und chronischer Herzinfarktversuch



Ein Tag vor der Herzinfarktoperation wurde das Gewicht und die Körperzusammensetzung analysiert. Am Tag 28 erfolgte die echokardiographische Untersuchung der Herzen. 56 und 210 Tage nach Beginn des Versuches wurde erneut das Gewicht der Tiere und die Herzfunktion untersucht. Der Versuch endete mit der Tötung des Tieres und der Organentnahme.

#### 2.2.1.3.2 Induktion des Herzinfarktes

Die Tiere erhielten eine intraperitoneale Narkose mit Isofluran, wurden anschließend mit einem Polyethylen-Katheter intubiert und an die Beatmungsmaschine (*Rodent Respirator*) angeschlossen. Ketamin und Medetomidin wurden als Sedativa während der Operation benutzt. Der Thorax wurde eröffnet und anhand der Lage des Herzens und der Koronarvenen erfolgte die Ligatur der linken Koronararterie mit Ethibond-Nahtmaterial 7/0 oder die Sham-Operation. Der Infarkt des betroffenen Gewebes äußerte sich durch eine sichtbare Zyanose des Herzareals und durch eine eingeschränkte Myokardbewegung. Die Muskulatur des Brustkorbes wurde mit 3/0 Vicryl-Nahtmaterial und die Haut mit 3/0 Prolene verschlossen. Die Tiere wurden 3 Tage analgetisch mit Buprenorphin behandelt.

#### 2.2.1.3.3 Tötung und Organentnahme

56 und 150 Tage nach der Herzinfarktinduktion erfolgte die Tötung der Tiere und die anschließende Entnahme der Lunge, der linken Niere, des Herzens sowie der Muskeln (*M. gastrocnemius*, *M. soleus*, *M. quadrizeps*, *M. extensor digitorum longus*). Nachdem die Infarktgröße des Herzens notiert wurde, konnte dieses in die jeweiligen Bestandteile Atrien, Ventrikel und Septum zerlegt werden. Die Organe wurden bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

#### 2.2.1.3.4 Infarktgrößenplanimetrie

Nach Entnahme des Herzens wurde sowohl die Gesamt- als auch Infarktfläche des linken Ventrikels planimetrisch analysiert (Optimas 6.5). Die Infarktgröße ergab sich aus dem prozentualen Anteil der Infarktfläche von der Gesamtfläche des linken Ventrikels.

#### 2.2.1.4 Gewichtsanalyse

Das Gewicht der Tiere wurde immer zwischen 9 bis 10 Uhr morgens mit einer Präzisionswaage gemessen und in Gramm angegeben.

#### 2.2.1.5 Aktivitätsmessung

Beim Tumorversuch wurde die spontane Bewegungsaktivität der Tiere, die ein Indikator für Lebensqualität ist, mit Hilfe des „Supermex“-Lokomotor-Systems gemessen.<sup>265</sup> Die Tiere befanden sich dafür einzeln in Makrolonkäfigen Typ I. Die Wassermenge sowie 100g Futter wurden vor der Messung abgewogen und protokolliert. Die Käfige wurden nicht angereichert, da die Mobilität der Tiere für 24h durch einen Infrarot-Bewegungssensor alle 10 Minuten gemessen werden sollte. Das Funktionsprinzip basiert auf der Registrierung des Sensors auf die vom Tier abgestrahlte Körpertemperatur.<sup>266</sup> Nach 24h wurden die Bewegungen als Summe aller 10 Minutenmessungen ausgewertet und als counts/24h angegeben. Das restliche Futter sowie Wasser wurde erneut abgewogen und somit konnten Rückschlüsse auf die Verbrauchsmenge (g/24h) gezogen werden.

#### 2.2.1.6 Messung der Körperzusammensetzung mittels NMR

Die Analyse der Körperzusammensetzung erfolgte mit dem Echo MRI-500. NMR steht für *Nuclear Magnetic Resonance* (Kernspinresonanzspektroskopie) und ermöglicht die Messung des Körperfettanteils, der Muskel- und Organmasse, der Körperflüssigkeiten sowie des Wassergehalts. Dazu wurde die Ratte so in eine Messröhre gesetzt, dass sie sich während der 1,5minütigen NMR-Messung nicht bewegen konnte. Die Analyse der Körperstrukturen basiert auf der Untersuchung der Resonanz magnetisch aktiver Atomkerne in einem Magnetfeld. Verschiedene Radiowellensequenzen bewirken die Rotation von Wasserstoffkernen im Gewebe, so dass die entstehende Radiostrahlung gemessen werden kann.<sup>267</sup>

#### 2.2.1.7 Untersuchung des Herzens

Die Herzstrukturen und -funktion wurden mittels Elektrokardiogramm, Echokardiographie und invasiver Hämodynamik untersucht.

### 2.2.1.7.1 Elektrokardiogramm

Das Elektrokardiogramm (EKG) ermöglicht das Registrieren, Aufzeichnen und die Analyse elektrischer Herzpotenziale, die Aufschluss über die Herzfunktion geben. Dazu wurden die Elektroden am Körper der mit Isofluran (1,5%) narkotisierten Ratte angebracht und dann mit Hilfe der Chart 5 Software aufgezeichnet und mit dem Programm eMouse ausgewertet. Als wichtige Parameter des EKGs dienen die P-Welle (Erregung der Atrien), der QRS-Komplex (Kammererregung) und die ST-Strecke (Beginn der Erregungsrückbildung der Kammern).

### 2.2.1.7.2 Echokardiographie

Die echokardiographische Untersuchung diente der nicht-invasiven Analyse der Herzstrukturen und Herzfunktion der Tiere. Sie erfolgte mit dem *Vevo 770 High-Resolution Imaging System*, das von Gewebestrukturen reflektierte Ultraschallwellen mittels einem *Transducer* in ein-, zwei oder dreidimensionale Bilder umwandelt. Als erstes wurden die Tiere in einer mit Isofluran/Sauerstoff gefluteten Inhalationskammer narkotisiert, anschließend auf einer 38°C warmen Heizplatte fixiert, rasiert und zusätzlich mit Veet<sup>®</sup> enthaart. Nach dem Aufbringen von Ultraschallgel auf die Brust des Tieres wurde das Herz parasternal und apikal mit dem Ultraschallkopf 710B im B- und M-Modus untersucht. Im B-Modus (*brightness modulation*) werden zweidimensionale Bilder des Herzens in Echtzeit erstellt. Dazu wurden die Flächen (LV Area (d/s)) und die längsten Achsen (LV Major (d/s)) des linken Ventrikels (LV) in der Diastole und Systole gemessen. Der Durchmesser der Aorta wurde auch ermittelt. Anschließend erfolgte die Analyse der Herzwandstärken und der Herzrate im M-Modus (*motion modulation*). Dazu erfolgten ein virtueller Querschnitt des Herzens vor dem Papillarmuskel im B-Modus und die Umwandlung dieses Querschnittes in eindimensionale Bilder. Dadurch konnten das interventrikuläre Septum (IVS) und die posteriore Wandstärke (PW) sowie die innere Dimension (ID) in der Diastole als auch in der Systole vermessen werden. Zum Schluss sollte die Geschwindigkeit des Blutflusses im Bereich der Mitralklappen mittels PW-Doppler (*Pulsed-Wave*) dargestellt werden (MV, Mitral valve E/A).

Aus diesen Parametern wurden u.a. die linksventrikuläre Ejektionsfraktion (EF), die prozentuale Flächenveränderung (FS), das Schlagvolumen (SV) und das Herzzeitvolumen (CO) berechnet.<sup>268</sup>

### 2.2.1.7.3 Hämodynamik

Die invasive Hämodynamik erfolgte unter Isofluran-Narkose (1,5%) mittels Einführen des Millar-Katheters in die rechte Halsschlagader (Arteria carotis). Nach der Messung des Blutdrucks erfolgte die Messung von  $dP/dt_{min}$  and  $dP/dt_{max}$  im linken Ventrikel. Die Aufnahme und Analyse der Daten erfolgte durch das Computerprogramm Chart 5.

### 2.2.2 Aufarbeitung und Analyse des Plasma

Das mit EDTA versetzte Blut wurde bei 3000xg bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert, um die Blutzellen zu pelletieren und schließlich Plasma zu erhalten. Cholesterin (Gesamtcholesterin, *High-Density*-Lipoprotein Cholesterin, *Low-Density*-Lipoprotein Cholesterin), Triglyzeride und Albumin wurden in dem Labor 28 gemessen (Labor28, Berlin, Germany). Die Aldosteronmenge im Plasma wurden mittels selbst entwickeltem ELISA bestimmt.

### 2.2.3 Zellkultur

#### 2.2.3.1 Isolierung und *in vitro* Kultivierung neonataler Rattenkardiomyozyten

Das Herz von ein bis drei Tage alten Ratten wurde entnommen und mit den Enzymen Pankreatin sowie Kollagenase Typ 2 verdaut. Die durch den Verdau entstandenen Zellfraktionen wurden mit Hilfe eines Dichtegradienten (Percoll) voneinander getrennt, so dass nur die Kardiomyozyten übrig blieben. Von den Kardiomyozyten wurde die Zellzahl bestimmt und diese mit jeweils 1,5 Mio. Zellen pro well in eine 6-well-Zellkulturplatte ausgesät. Als Medium diente 80% DMEM, 20% Medium 199, 1% Penizillin/Streptomycin, 1% L-Glutamin, 10% Pferdeserum und 5% fetales Kälberserum. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit serumfreiem Medium behandelt. Danach konnte die Behandlung mit Medikamenten erfolgen.

#### 2.2.3.2 *In vitro* Behandlung neonataler Rattenkardiomyozyten

Die neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden einen Tag nach dem Waschen fünf Tage lang täglich mit kardiovaskulären Medikamenten (Tabelle 16) behandelt.

Tabelle 16. Behandlung der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit Medikamenten

Gruppenbezeichnung/ Medikament	Benutzte Dosis (in $\mu\text{M}$ )	n-Zahl	Hersteller
Aldosteron	1	3	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Bisoprolol	10	3	Merck Pharma GmbH, Darmstadt, Deutschland
Carvedilol	1	3	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
GSK-Inhibitor	10	3	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Isoproterenol	10	3	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Metroprolol	0,1	3	SIGMA-ALDRICH <sup>®</sup> , München, Deutschland
Spironolacton	1	3	HEXAL, Holzkirchen, Deutschland

## 2.2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.4.1 RNA-Isolierung mit Trizol<sup>®</sup>

Zuerst erfolgte die Zugabe von jeweils 1 ml *Trizol<sup>®</sup> Reagent* zu den Zellen einer 6-Well-Platte, dann das Abarnten und eine 5minutige Inkubation bei Raumtemperatur. Dann wurden 200  $\mu\text{l}$  Chloroform zu jeder Probe gegeben, alles 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und schließlich bei 12000 x *g* bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand, der die RNA enthielt, wurde mit 500  $\mu\text{l}$  Isopropanol versetzt, 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und erneut zentrifugiert (12000 x *g*, 4°C, 10 Minuten). Das Pellet wurde mit Ethanol gewaschen, zentrifugiert, getrocknet und in DNase/RNase-freiem Wasser gelöst. Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.4.2 Quantifizieren von Nukleinsäuren

Die Quantifizierung der RNA erfolgte durch Messung der optischen Dichte bei 260 nm, wobei  $\text{OD}_{260} = 1,0$  einer Konzentration von 40  $\mu\text{g/ml}$  RNA entsprach. Zusätzlich konnten von dem Verhältnis  $\text{OD}_{260/280}$  Rückschlüsse auf die Reinheit der RNA geschlossen werden.

### 2.2.4.3 Reverse Transkription und Taqman-miR-q-RT-PCR

Die Umschreibung der RNA in cDNA erfolgte mit dem *iScript™ cDNA Synthesis Kit* nach dem *iScript™ cDNA Synthesis Kit* Protokoll (Bio-Rad). Mit der Taqman-miR-q-RT-PCR konnte das miRNA-Expressionslevel gemessen werden. Nach Herstellung einer Standardreihe wurde die cDNA jeder Probe mit dem TaqMan® Universal PCR Master Mix, dem Fluoreszenzfarbstoff Fam-490 markierten Primer für miR-199a-5p und Wasser versetzt und dann als Duplikate mit dem iCycler IQ gemessen. Von der erhaltenen Fluoreszenz konnte auf das Expressionslevel des eingesetzten Templates geschlossen werden. Die Auswertung der Ergebnisse der Real-time PCR erfolgte mit dem Programm iCycler™ iQ (Version 3.1). Die Menge der RNA in den Proben wurde mit Hilfe der Standardreihe quantifiziert und im Verhältnis zur Menge der  $\beta$ -Aktin mRNA angegeben.

### 2.2.5 Proteinbiochemie

Alle Experimente erfolgten in Duplikaten.

#### 2.2.5.1 Proteinextraktion aus Gewebe

Die Organe wurden vor der Proteinextraktion pulverisiert und dann mit dem entsprechenden Puffer lysiert und weiterbearbeitet. Die Lyse erfolgte dabei immer mit dem Dispergiergerät PT 2100 (POLYTRON®).

##### 2.2.5.1.1 Extraktion mit Proteasom-Lysispuffer

50-100mg Gewebepulver wurden mit 500µl Proteasom-Lysispuffer versetzt und mit dem Dispergiergerät bei 4°C zerkleinert. Das Homogenat wurde anschließend mit dem Sonifier für 20 Sekunden bei 4°C beschallt, um noch verbliebene Zellen zu zerstören und mit Proteasomen gefüllte Vesikel zu öffnen. Danach erfolgte die Zentrifugation der Proben bei 13000 x g für 15 min bei 4°C und eine erneute Ultraschallbehandlung des Überstandes. Nach der wiederholten Zentrifugation wurde der Überstand bei -80°C aufbewahrt.

#### 2.2.5.1.2 Extraktion mit Caspase-Lysispuffer

Zu 50 mg Gewebepulver erfolgte die Zugabe von 300µl Caspase-Lysispuffer und die anschließende Dispergierung bei 4°C. Danach wurden die Homogenate 3mal abwechselnd bei 37°C kurz aufgetaut und im flüssigen Stickstoff eingefroren, um restliche intakte Zellen aufzuspalten. Nach der Zentrifugation bei 20000 xg bei 4°C für 30 Minuten wurde der Überstand erneut zentrifugiert (20000 xg bei 4°C für 20 Minuten). Die Lysate wurden bis zur Caspaseaktivitätsmessung bei -80°C aufbewahrt.

#### 2.2.5.1.3 Extraktion mit Western Blot-Lysispuffer

50mg Gewebepulver wurden mit 500µl Lysispuffer versetzt, 1 Minute bei 4°C dispergiert, anschließend 20 Minuten bei 20800 xg und 4°C zentrifugiert und der Überstand, der den zytoplasmatischen Inhalt enthielt, in ein neues Gefäß transferiert. Von dem Überstand wurden 20µl für den Bradford-Assay abgenommen. 150µl Überstand wurden mit 30µl 6x Laemmli-Puffer gemischt und bei 95°C für 5 Minuten erhitzt, um Sekundär- als auch Tertiärstrukturen der Proteine zu zerstören. Die Proben wurden bis zur Western Blot-Analyse bei -20°C aufbewahrt.

#### 2.2.5.2 Proteinextraktion aus Zellkultur (für Western Blot)

Die Zellen wurden zuerst trypsiniert, zentrifugiert (290 x g, 3 min, 4°C), und das Pellet mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Nach der erneuten Zentrifugation (290 x g, 3 min, 4°C) wurde das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen, 5 min bei 290 x g und 4°C zentrifugiert und im 5-fachen Volumen an RIPA-Puffer resuspendiert. Es folgte eine 30minütige Inkubation bei 4°C und die Zentrifugation bei 20800 x g bei 4°C für 10 Minuten. Der Überstand enthielt den Ganzzellproteinextrakt und wurde bei -20°C gelagert.

#### 2.2.5.3 Quantifizierung von Proteinen

Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford Assay bestimmt. Die Proben wurden hierfür 1:10 oder 1:20 verdünnt, dann mit 1x *Quick Start™ Bradford Dye Reagent* versetzt und nach einer Inkubation von mindestens 15 Minuten bei 595nm photometrisch mit dem *Benchmark Plus Microplate Spectrophotometer* gemessen.

Die Messung wird dadurch ermöglicht, dass das Bradford Reagenz an die Proteine bindet und die Optische Dichte (OD) proportional zum Proteingehalt der Probe zunimmt. Anhand des Vergleiches der optischen Dichte eines bekannten Proteingemisches (BSA) mit der OD der unbekanntenen Proben war die Berechnung der exakten Proteinmenge möglich.

#### 2.2.5.4 Ubiquitin-Proteasomaktivitätsassay

Zur Bestimmung der Ubiquitin-Proteasomaktivität wurden drei proteolytische Aktivitäten, die Chymotrypsin-artige, Trypsin-artige und Peptidyl-Glutamyl-hydrolysierende Aktivität gemessen (Tabelle 17). Dazu wurden ca. 100µg Protein mit einem Amidomethylcoumarin (AMC) gebundenen fluorogenem Substrat (40µM) und einem Tris/EDTA-Puffer gemischt und sowohl mit und ohne Proteasominhibitor (MG132, 40µM) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert und bei 360ex/460em nm im Twinkle-Fluorometer gemessen. Die Daten wurden mit Hilfe des Programms MicroWin2000 ermittelt. Beim Vorhandensein einer Proteasomaktivität wurde das Substrat von den Proteasomen so gespalten, dass das AMC freigesetzt und Fluoreszenz messbar wurde. Die fluorogenen Messwerte korrelierten hierbei mit der proteolytischen Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems. Die Messung mit Inhibitor spiegelte die unspezifische Aktivität des Proteasoms wieder und wurde von den Messwerten ohne Inhibitor abgezogen. Die Aktivität wurde mittels Vergleich der Fluoreszenz von AMC bekannter Konzentration ermittelt und in nmol/mg Protein/min angegeben.

Tabelle 17. Proteolytische Aktivitäten des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Fluorogenes Substrat	Aktivität	Spaltung von
LLVY-AMC	Chymotrypsin-artige Aktivität	hydrophoben Aminosäuren
Bz-VGR-AMC	Trypsin-artige Aktivität	basischen Aminosäuren
ZLLE-AMC	Peptidyl-Glutamyl-hydrolysierende Aktivität	sauren Aminosäuren

#### 2.2.5.5 Caspaseaktivitätsassay

Als Apoptosemarker diente der fluorogene Nachweis der Caspase-3 und Caspase-6 Aktivität. Dazu wurden 100µg Protein mit dem Caspase-Assaypuffer gemischt und mit den AMC gebundenen fluorogenen Substraten (50µM) mit und ohne Inhibitor (100µM) für die jeweilige Caspasmessung versetzt.



Die Messung erfolgte 1h bei 37°C bei 360ex/460em im Twinkle-Fluorometer. Durch die erhaltenen Fluoreszenzwerte konnte die Caspaseaktivität ermittelt werden. Die Ergebnisse wurden in nmol/mg Protein/min angegeben.

### 2.2.5.6 SDS-PAGE

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) erfolgte mit 8-15%igen Polyacrylamidgelen, wobei 40-80µg Protein verwendet wurden. Die Elektrophorese wurde denaturierend und diskontinuierlich in einem Tris-Glycin-Puffersystem bei 70-110 V bei 4°C durchgeführt. Als Proteinmarker dienten der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* und der *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder*.

### 2.2.5.7 Western Blot

Nach der SDS-Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran durch *Semi-Dry Blotting*. Dazu wurde die Membran zuvor in Methanol äquilibriert und genau wie das Filterpapier in kaltem Transferpuffer inkubiert. Der Western Blot wurde wie in der Abbildung 13 dargestellt aufgebaut und bei 5 V und 4°C für 18 h geblottet. Nach dem Blotten wurde die Membran beschriftet, 1h in 5% BSA/1xTBST geblockt und bis zur Immundetektion in 1x TBS aufbewahrt.

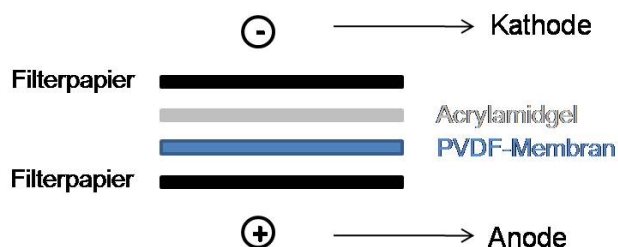


Abbildung 13. Aufbau des Western Blots, Transfer von einem Gel

### 2.2.5.8 Immundetektion

Die Immunodetektion erfolgte zum Nachweis der auf die Membran transferierten Proteine mit Hilfe von Antikörpern. Die Inkubation mit dem Primärantikörper, der mit 5%BSA/TBST versetzt wurde, erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran 3x 10 Minuten mit 1x TBST gewaschen, 1h mit dem Alkalinen Phosphatase gekoppelten Sekundärantikörper bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 3x jeweils

10 Minuten mit 1x TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Detektion der Proteine mit *CDP-Star*<sup>®</sup> (0,4mM im 1x Assaypuffer). Die erhaltenen Banden wurden mit dem Programm ImageJ quantifiziert und in *Arbitrary Units* (AU) angegeben, nachdem sie auf GAPDH normalisiert wurden.

#### 2.2.5.9 Luminex-Assay

Der Luminex-Assay ermöglichte die schnelle Quantifizierung vieler Proteine in einem sehr geringen Probenvolumen mit Hilfe von Antikörper-gekoppelten *Beads*. Das Plasma wurde gemäß den Empfehlungen des Herstellers verdünnt und dann mit den *Beads*, dem Biotin-markierten Sekundärantikörper und Streptavidin-Phycoerythrin inkubiert. Zusätzlich wurden als Kontrollen ein Standard bekannter Konzentrationen sowie eine Positiv- als auch eine Negativkontrolle aufgetragen. Durch verschiedene Farbcodes der *Beads* ist die Messung mehrerer Proteine im Luminex-200 System möglich. Es wurden kardiovaskuläre Marker wie Fibrinogen, Troponin-I, Troponin-T, BNP, MCP-1 und TIMP-1 nach Protokoll des Herstellers gemessen und mit dem Programm xPONENT ausgewertet.

#### 2.2.5.10 Histologische Aufarbeitung und Färbung

Als erstes wurde das frisch entnommene Gewebe mit 4% Formalin/PBS bei 4°C für 24h fixiert. Dabei gelangte das Formalin in das Gewebe und vernetzte die Strukturen so, dass das Gewebe in seiner Form und seinem Zustand stabilisiert wurde. Danach wurden die Proben durch Zugabe einer aufsteigenden Alkoholreihe (70-100% Ethanol) entwässert, in Einbettungskassetten überführt und in flüssiges Paraffin bei 60°C eingebettet (*Modular tissue embedding center, Shandon Citadel Tissue Processor 1000*). Dann folgte die Überführung der Proben in Ausgussformen und die anschließende Abkühlung auf der Kühlplatte (*Microm EC-351*). Mit dem Rotationsmikrotom wurden 1,5µm starke Gewebsschnitte angefertigt und auf Objektträger überführt. Nach einer 30minütigen Inkubation im 60°C warmen Wärmeschrank waren die Gewebsschnitte für die anschließende Färbung vorbereitet. Für die histologische Analyse des Herzgewebes wurde eine Azan-Färbung, Sirius Rot-Färbung und die Masson Goldner Trichromfärbung durchgeführt.

#### 2.2.5.11 Humane Daten

Die humanen Daten (Alter, Gewicht, BMI) wurden in der Angewandten Kachexieabteilung des Virchow-Klinikums erhoben. Zusätzlich wurden Aldosteron und BNP im Plasma dieser Patienten (Kontrollen, nicht kachektische und kachektische Tumorpatienten) bestimmt. Die Biopsieproben der linksventrikulären Hinterwand stammen aus der Pathologie der Charité. Die Kontrollen sind weder an Tumorerkrankungen noch an Erkrankungen des kardiovaskulären Systems gestorben. Dies waren Ausschlusskriterien. Die Daten und die Todesursache entstammen dem Arztbrief oder aus der Pathologie.

#### 2.2.5.12 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit dem Programm GraphPad PRISM 5.0 analysiert. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt und wurden mit dem Kolmogorov Smirnov Test auf Normalverteilung getestet. Normalverteilte Daten wurden mit ANOVA gefolgt von Student T-Test analysiert, während nicht normalverteilte Daten mit Kruskal-Wallis und Mann Whitney U-Test untersucht wurden. Die Überlebenskurven wurden mittels Cox-Regression ausgewertet. Ein p-Wert  $<0,05$  wurde als signifikant betrachtet.

### 3 ERGEBNISSE

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Induktion und Progression der Kachexie und ihre Auswirkungen auf das Herz in dem AH-130 Yoshida Hepatoma Modell und dem Infarktmodell in Ratten untersucht und miteinander verglichen. Anschließend wurde der Einfluss pharmakologischer Medikamente auf die Kachexie und Herzfunktion in dem AH-130 Yoshida Hepatoma Modell analysiert. Zum Schluss erfolgte die Ermittlung humaner Daten zur Herzmorphologie von Tumorpatienten.

#### 3.1 Vergleich tumorassoziierter mit kardialer Kachexie

Die Untersuchung der Kachexie im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell erfolgte in Zusammenarbeit mit Karoline von Websky, weswegen bereits Daten in ihrer Arbeit mit dem Titel: „Einfluss der Tumorkachexie auf Herzfunktion und Herzmorphologie im Yoshida AH-130 Hepatoma Modell der Ratte“ veröffentlicht wurden.<sup>269</sup> An den entsprechenden Stellen wird auf ihre Doktorarbeit verwiesen. *Baseline*-Werte stellen die Ausgangsdaten vor Studienbeginn dar.

##### 3.1.1 Tumorzellen und Tumorzellzahl in der Tumorstudie

In Abbildung 14-A sind ein Sham- und ein Tumortier am Tag 13 der Studie dargestellt. Bei dem Tumortier zeigt sich deutlich der mit Tumorzellen gefüllte Bauchraum (Ascites). Abbildung 14-B zeigt die AH-130 Yoshida Hepatoma Zellen. Die am Ende der Studie für jede Tumorgruppe ermittelten mittleren Tumorzellzahlen sind in Abbildung 14-C zu erkennen. Die Tumorzellen, deren Anzahl am Tag 5  $3,09 \pm 0,45 \times 10^9$  betrug, stieg bis auf  $6,04 \pm 0,46 \times 10^9$  am Tag 9 an und war am Tag 11 und 13 etwas geringer. Desweiteren erhöhte sich mit dem Wachstum der Zellen auch kontinuierlich das Tumorzellvolumen (Tabelle 18), das am Tag 13  $109 \pm 3,39$  ml erreicht hatte.

Tabelle 18. Tumorzellvolumen. Angaben als Mittelwert  $\pm$ SEM.

	Tumor Tag 5	Tumor Tag 7	Tumor Tag 9	Tumor Tag 11	Tumor Tag 13
n-Zahl	6	10	9	8	12
Tumorzellvolumen in ml	$14,83 \pm 2,10$	$47,3 \pm 2,26$	$70,3 \pm 3,88$	$82,4 \pm 9,05$	$109 \pm 3,39$

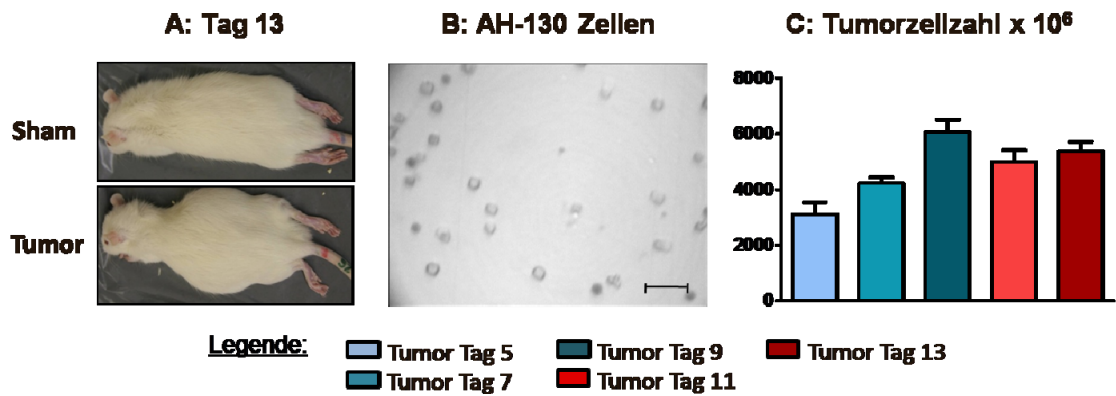


Abbildung 14. **Darstellung der Ratten und Zellen aus der Tumorstudie.** A) Sham- und Tumorratte am Tag 13. B) AH-130 Yoshida Hepatoma Zellen bei einer 200fachen Vergrößerung. Maßstabsbalken: 100µm. C) Durchschnittlich ermittelte Tumorzellzahlen.

### 3.1.2 Mortalität und Infarktgrößen in der Herzinfarktstudie

In dem ersten Versuch starben nach der Infarktoperation 9 von insgesamt 29 Tieren. Dies entspricht einer Mortalitätsrate von 32,0%. Am Ende der Studie (Tag 56) wurde eine durchschnittliche Infarktgröße von 48,1% ermittelt (Abbildung 15-B). In dem zweiten Versuch (Tag 210) waren die Infarkte nur 34,2% groß, wodurch sich eine geringere Mortalität von 9,1% ergab. Bei beiden Versuchen wurden Tiere mit einem unter 25%igem Infarktareal aus den Analysen herausgenommen (n=3 für beide Versuche). In Abbildung 15-A sind die Herzen von Sham- und Infarkttieren dargestellt. Dabei ist deutlich die entstandene Narbe nach Infarktoperation zu erkennen.

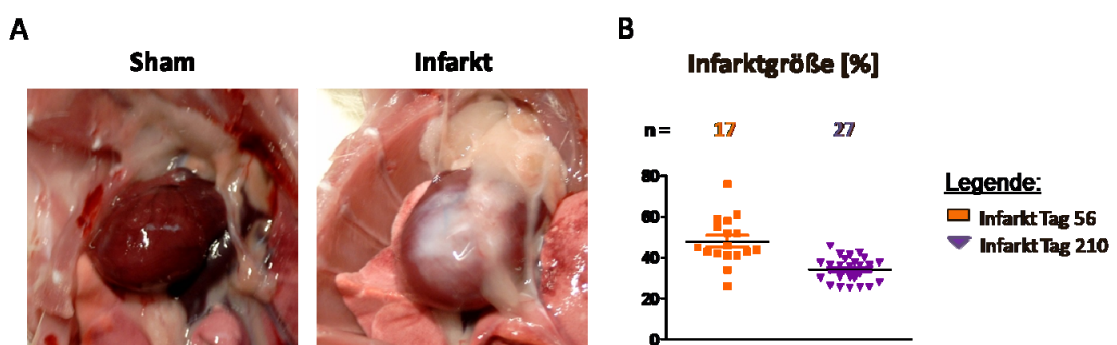


Abbildung 15. **Infarktstudie.** A) Vergleich der Herzen nach Sham- oder Infarktoperation. B) Mittlere Infarktgröße am Tag 56 und Tag 210 nach myokardialer Infarktinduktion.

### 3.1.3 Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Organgewichte

Vor Beginn der Tumorstudie und Infarktstudien hatten alle Tiere innerhalb eines Versuches ein ähnliches Körpergewicht, fettfreie Masse und Fettmasse (Tabelle 19, Tabelle 20). Lediglich die Tiere, die nach Tumorinokulation 13 Tage in der Studie verbleiben sollten, waren etwas leichter. Deswegen wurde für jedes einzelne Tier die Änderung des Körpergewichts, der fettfreien Masse als auch Fettmasse aus den Werten am Studienende und den Anfangsdaten berechnet und daraus der Mittelwert für die Gruppen ermittelt.

Tabelle 19. Körpergewicht, fettfreie Masse und Fettmasse vor Beginn der Tumorstudie (*Baseline*). Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM.

Gruppe	Sham			Tumor				
	Tag 5	Tag 11	Tag 13	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 11	Tag 13
<b>Baseline Körpergewicht [g]</b>	196 $\pm 1,91$	191 $\pm 1,16$	194 $\pm 2,12$	185 $\pm 2,01$	184 $\pm 2,30$	187 $\pm 1,99$	193 $\pm 0,95$	177 $\pm 2,11$
<b>Baseline Fettfreie Masse [g]</b>	149 $\pm 1,57$	145 $\pm 1,83$	153 $\pm 2,72$	148 $\pm 1,91$	139 $\pm 1,17$	152 $\pm 3,01$	146 $\pm 1,09$	144 $\pm 1,76$
<b>Baseline Fettmasse [g]</b>	15,44 $\pm 1,44$	14,99 $\pm 1,47$	17,34 $\pm 0,76$	16,47 $\pm 0,74$	15,06 $\pm 0,57$	14,62 $\pm 1,17$	14,01 $\pm 0,70$	15,08 $\pm 0,74$

Tabelle 20. Körpergewicht, fettfreie Masse und Fettmasse vor Beginn der Infarktstudien (*Baseline*). Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. NA= nicht verfügbar

Gruppe	Tag 56		Tag 210	
	Sham	Infarkt	Sham	Infarkt
	Tag 56	Tag 56	Tag 210	Tag 210
<b>Baseline Körpergewicht [g]</b>	225 $\pm$ 1,68	230 $\pm$ 2,84	220 $\pm$ 1,00	220 $\pm$ 0,74
<b>Baseline Fettfreie Masse [g]</b>	163 $\pm$ 3,45	165 $\pm$ 3,82	NA	NA
<b>Baseline Fettmasse [g]</b>	40,4 $\pm$ 1,04	39,5 $\pm$ 1,16	NA	NA

Das Körpergewicht der Shamtiere hatte 56 als auch 210 Tage nach der Operation im Vergleich zum Studienbeginn um 72% (Sham Tag 56) bzw. 142% (Sham Tag 210) zugenommen (Abbildung 16-B und C). Dabei unterschied sich die Änderung des Körpergewichtes der Sham- von den Infarkttieren am Tag 56 nicht voneinander, jedoch war es signifikant am Tag 210 in den Infarkttieren erhöht ( $p=0,0001$  Sham gegen Infarkt Tag 210). Das zeigt, dass die Tiere durch die Infarktoperation nicht kachektisch wurden. Im Tumorversuch nahm das Körpergewicht der Shamtiere, dargestellt in Abbildung 16-A, mit der steigenden Anzahl der Versuchstage zu, wodurch das normale Wachstum der Tiere deutlich wurde. Das Körpergewicht der Tumorgruppen hingegen war am Tag 7 signifikant um 5% reduziert und stieg bis auf -23% in der Tumorgruppe am Tag 13 an (Tag 13:  $p=0,0026$  Sham vs. Tumor). Demzufolge wurden die Tiere am Tag 7 nach Tumorinokulation laut klinischer Definition kachektisch und der Grad der Kachexie nahm bis Tag 13 stetig zu.<sup>1</sup>

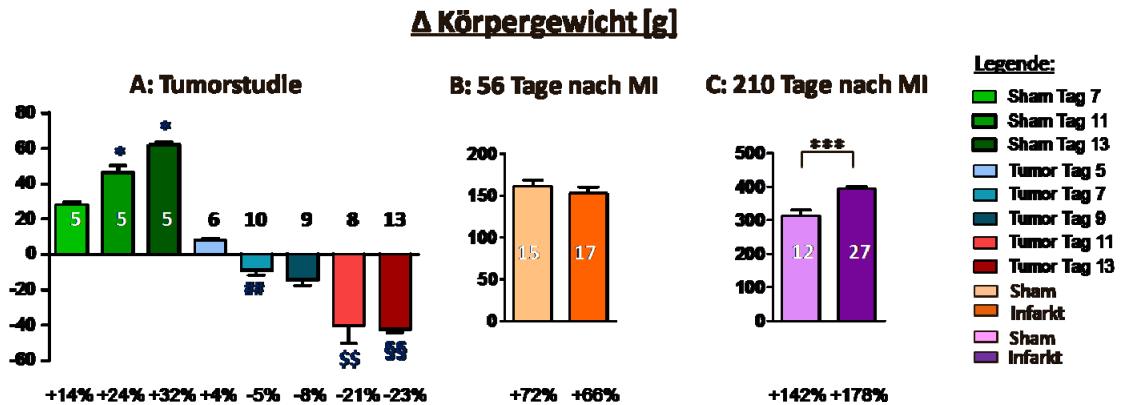


Abbildung 16. **Veränderung des Körpergewichts [g] in der Tumorstudie (A, ohne Tumor) sowie 56 (B) und 210 Tage (C) nach myokardialer Infarktoperation.** Die Daten aus Abbildung A wurden bereits in der Dissertation von Karoline von Websky veröffentlicht.<sup>269</sup> Angaben als Mittelwert ± SEM. Unter den Graphen ist die Änderung des Körpergewichts im Vergleich zur Baseline in % angegeben. \*: p<0,05 vs. Sham Tag 7, ##: p<0,01 vs. Sham Tag 7, \$\$: p<0,01 vs. Sham Tag 11, \$\$\$: p<0,01 vs. Sham Tag 13, \*\*\*: p<0,001 vs. Sham Tag 210. MI= Myokardialer Infarkt.

Die fettfreie Masse (Abbildung 17), die das gesamte Muskelgewebe und die Organe widerspiegelt, konnte nur in dem Tumorversuch und dem kurzen Infarktversuch ermittelt werden. Dabei zeigte sich, dass sich der Anteil der fettfreien Masse bei den Sham- und Infarkttieren am Tag 56 sowie bei den Shamtieren aus dem Tumorversuch erhöhte. Im Gegensatz dazu nahmen die Tumortiere am Tag 7 im Vergleich zur Shamgruppe von Tag 7 weniger fettfreie Masse zu und ab Tag 9 verloren die Tumortiere 3% fettfreie Masse, was sich am Tag 11 und 13 auf -17% bzw. -25% steigerte.

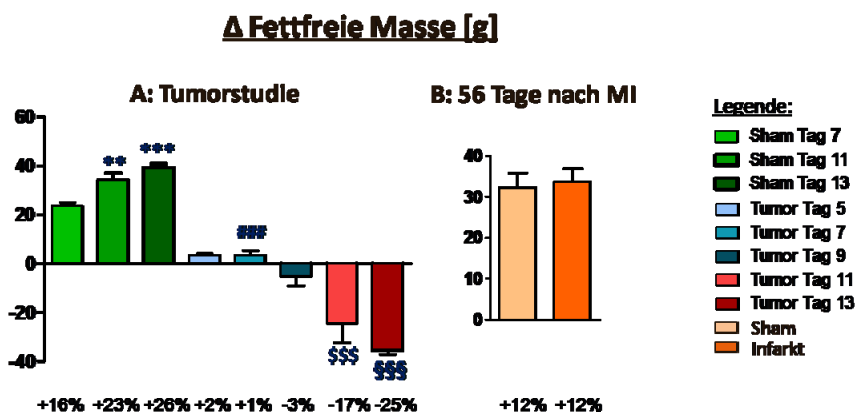


Abbildung 17. **Veränderung der fettfreien Masse [g] in der Tumorstudie (A) sowie 56 Tage nach myokardialer Infarktoperation (B).** Die Daten aus Abbildung A wurden bereits in der Dissertation von Karoline von Websky veröffentlicht.<sup>269</sup> Angaben als Mittelwert ± SEM. Unter den Graphen ist die Änderung des Körpergewichts im Vergleich zur Baseline in % angegeben. \*\*: p<0,01 vs Sham Tag 7, \*\*\*: p<0,001 vs Sham Tag 7, ####: p<0,001 vs Sham Tag 7, \$\$\$: p<0,001 vs Sham Tag 11, \$\$\$\$: p<0,001 vs Sham Tag 13. MI= Myokardialer Infarkt.

Die Daten zur Änderung der Fettmasse (Abbildung 18) waren erneut nur für den Tumorversuch und den kurzen Infarktversuch verfügbar. Die Infarkttiere hatten im Vergleich zur Shamgruppe am Tag 56 weniger Fettmasse zugenommen, jedoch war dieses Ergebnis nicht signifikant ( $p=0,065$  Infarkt gegen Sham am Tag 56). In der Tumorstudie erhöhte sich die Fettmasse bei den Shamtieren um 23% (Tag 7), 57% (Tag 11) und 46% (Tag 13). Die Tumortiere hatten am Tag 5 9% weniger Fettmasse im Vergleich zum Studienbeginn. Im Verlauf von Tag 7 bis Tag 13 erhöhte sich der Verlust der Fettmasse von 28% auf bis zu 78%.

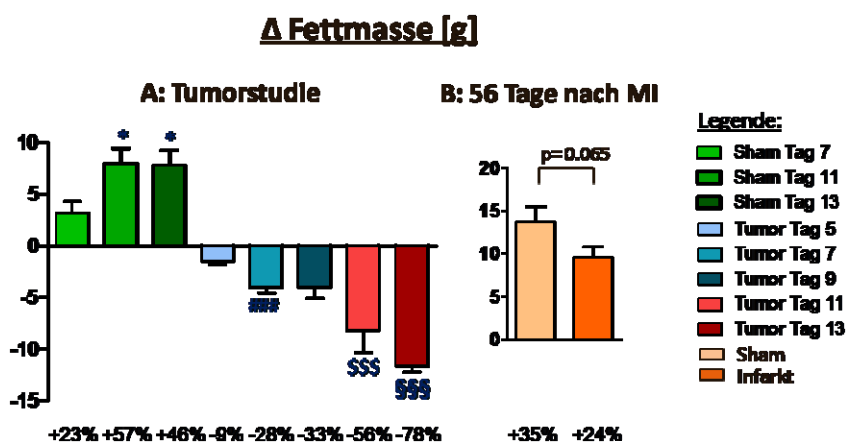


Abbildung 18. **Veränderung der Fettmasse [g] in der Tumorstudie (A) sowie 56 Tage nach myokardialer Infarktoperation (B).** Die Daten aus Abbildung A wurden bereits in der Dissertation von Karoline von Websky veröffentlicht.<sup>269</sup> Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. Unter den Graphen ist die Änderung des Körpergewichts im Vergleich zur Baseline in % angegeben. \*:  $p<0,05$  vs Sham Tag 7, ###:  $p<0,001$  vs Sham Tag 7, \$\$\$:  $p<0,001$  vs Sham Tag 11, \$\$\$:  $p<0,001$  vs Sham Tag 13. MI= Myokardialer Infarkt

Nach Analyse der Körpergewichte und Körperzusammensetzung erfolgte die Untersuchung der Organgewichte aus allen drei Versuchen, deren Werte für die Shamgruppen in Tabelle 21 ersichtlich sind. Es ist erkennbar, dass sich die Organgewichte als auch Muskelgewichte bei den Shamtieren abhängig von dem Versuchstag deutlich voneinander unterschieden, was auf das unterschiedliche Versuchsalter und das Wachstum der Tiere zurückzuführen war.



Tabelle 21. Organgewichte der Shamtiere in der Tumorstudie und den Infarktstudien. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs Sham Tag 7. WAT=Weißes Fettgewebe, BAT = Braunes Fettgewebe, Mm. GC=Gastrocnemius-Muskel, Mm. EDL= Muskel *Extensor digitorum longus*.

	Tumorstudie			Infarktstudie	
	Sham Tag 7	Sham Tag 11	Sham Tag 13	Sham Tag 56	Sham Tag 210
<b>n-Anzahl</b>	5	5	5	15	
<b>Leber [g]</b>	8,76 $\pm$ 0,31	9,38 $\pm$ 0,44	10,23 $\pm$ 0,20**	NA	NA
<b>Milz [mg]</b>	526 $\pm$ 13,31	545 $\pm$ 18,31	667 $\pm$ 28,8**	NA	NA
<b>Niere [mg]</b>	907 $\pm$ 30,2	989 $\pm$ 27,3	1.041 $\pm$ 23,2**	1.187 $\pm$ 15,86	1.340 $\pm$ 35,7
<b>Lunge [mg]</b>	NA	NA	NA	1.517 $\pm$ 36,0	1.718 $\pm$ 32,3
<b>WAT [mg]</b>	1.250 $\pm$ 64,7	1.604 $\pm$ 26,1***	1.825 $\pm$ 68,0***	NA	NA
<b>BAT [mg]</b>	209 $\pm$ 11,58	248 $\pm$ 30,9	348 $\pm$ 12,67***	NA	NA
<b>Mm. GC [mg]</b>	1.063 $\pm$ 24,6	1.128 $\pm$ 35,2	1.218 $\pm$ 21,6**	2.141 $\pm$ 36,0	2.309 $\pm$ 37,4
<b>Mm. tibialis [mg]</b>	423 $\pm$ 3,56	420 $\pm$ 15,73	434 $\pm$ 9,36	NA	NA
<b>Mm. soleus [mg]</b>	98,4 $\pm$ 6,53	101 $\pm$ 6,34	107 $\pm$ 3,96	157 $\pm$ 5,67	NA
<b>Mm. EDL [mg]</b>	93,8 $\pm$ 2,50	100 $\pm$ 2,55	109 $\pm$ 3,33**	152 $\pm$ 2,68	NA

Um die Organ- und Muskelgewichte aller Versuche miteinander vergleichbar zu machen, wurden die Werte für die Shamtiere gleich 100 Prozent gesetzt und die Werte für alle anderen Gruppen prozentual von Sham berechnet. Die Shamtiere aus der Tumorstudie wurden miteinander kombiniert, um die Darstellung zu vereinfachen und alle Tumorgruppen mit den Shamtieren vergleichen zu können. Die Ergebnisse aus der Tumorstudie sind in Tabelle 22 und die Daten aus den Infarktversuchen in Tabelle 23 zu sehen. Es wird deutlich, dass das Gewicht aller Organe, Fettgewebe und Muskeln durch den Tumor am Tag 5 reduziert waren und spätestens am Tag 13 alle Werte im Vergleich zu Sham hochsignifikant verringert waren. Das braune und weiße Fettgewebe sowie die Milz hatten über 60% Gewicht gegenüber Sham am Tag 13 verloren, wohingegen der Gewichtsverlust der Leber, linken Niere und den Muskeln zwischen 20% und 40% betrug. Dagegen gab es keine Unterschiede für alle erhobenen Organ- und Muskelgewichte am Tag 56 für die Sham- und Infarkttiere. Am Tag 210 wiesen die Infarkttiere ein signifikant erhöhtes Gewicht für die Lunge und Muskeln (Mm. gastrocnemius und Mm. quadrizeps) auf.

Tabelle 22. Organgewichte in der Tumorstudie. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs Sham. WAT=Weißes Fettgewebe, BAT=Braunes Fettgewebe, Mm. GC=Gastrocnemius-Muskel, Mm. EDL=Muskel *Extensor digitorum longus*.

	Sham	% von Sham				
		Tumor Tag 5	Tumor Tag 7	Tumor Tag 9	Tumor Tag 11	Tumor Tag 13
<b>n- Anzahl</b>	15	6	10	6	8	12
<b>Leber</b>	100 $\pm 2,53$	91,4 $\pm 1,21$	92,8 $\pm 2,59$	95,9 $\pm 2,53$	71,5 $\pm 4,99^{***}$	66,9 $\pm 2,59^{***}$
<b>Milz</b>	100 $\pm 3,49$	84,6 $\pm 4,17^*$	93,0 $\pm 4,06$	83,6 $\pm 7,26^*$	47,3 $\pm 9,28^{**}$	32,4 $\pm 1,86^{***}$
<b>Linke Niere</b>	100 $\pm 2,11$	84,4 $\pm 3,18^{**}$	82,7 $\pm 2,00^{***}$	86,3 $\pm 2,41^{**}$	74,3 $\pm 2,82^{***}$	76,6 $\pm 2,24^{***}$
<b>WAT</b>	100 $\pm 4,49$	116 $\pm 9,77$	82,4 $\pm 2,17^{**}$	81,2 $\pm 5,62^*$	45,3 $\pm 15,24^{***}$	24,1 $\pm 3,81^{***}$
<b>BAT</b>	100 $\pm 7,10$	75,3 $\pm 5,79$	65,3 $\pm 3,47^{**}$	49,0 $\pm 4,59^{***}$	29,2 $\pm 4,56^{***}$	38,8 $\pm 2,01^{***}$
<b>Mm. GC</b>	100 $\pm 1,98$	79,5 $\pm 1,50^{***}$	75,5 $\pm 1,48^{***}$	79,9 $\pm 1,53^{***}$	67,1 $\pm 3,86^{***}$	59,1 $\pm 1,95^{***}$
<b>Mm. tibialis</b>	100 $\pm 1,41$	76,7 $\pm 3,39^{***}$	79,2 $\pm 1,59^{***}$	82,2 $\pm 1,86^{***}$	66,2 $\pm 4,15^{***}$	60,3 $\pm 1,72^{***}$
<b>Mm. soleus</b>	100 $\pm 3,16$	75,7 $\pm 8,96^{**}$	78,6 $\pm 2,35^{***}$	78,7 $\pm 1,96^{***}$	59,3 $\pm 5,51^{***}$	70,3 $\pm 3,86^{***}$
<b>Mm. EDL</b>	100 $\pm 2,19$	75,9 $\pm 9,28^*$	77,0 $\pm 2,11^{***}$	82,9 $\pm 1,64^{***}$	58,1 $\pm 6,27^{***}$	62,7 $\pm 3,21^{***}$

Tabelle 23. Organgewichte 56 und 210 Tage nach myokardialem Infarkt. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs Sham. Mm. EDL=Muskel *Extensor digitorum longus*.

	Tag 56		Tag 210	
	Sham in %	Myokardialer Infarkt [% von Sham]	Sham in %	Myokardialer Infarkt [% von Sham]
<b>n-Anzahl</b>	15	17	12	27
<b>Linke Niere</b>	100 $\pm 1,34$	96,5 $\pm 2,71$	100 $\pm 2,66$	105,1 $\pm 2,41$
<b>Lunge</b>	100 $\pm 2,37$	136 $\pm 16,4$	100 $\pm 1,88$	125,8 $\pm 8,34^{**}$
<b>Mm. gastrocnemius</b>	100 $\pm 1,68$	97,9 $\pm 1,84$	100 $\pm 1,62$	115,5 $\pm 2,61^{***}$
<b>Mm. soleus</b>	100 $\pm 3,61$	93,2 $\pm 3,22$	NA	NA
<b>Mm. EDL</b>	100 $\pm 1,76$	98,6 $\pm 2,98$	NA	NA
<b>Mm. quadrizeps</b>	NA	NA	100 $\pm 2,25$	117,5 $\pm 2,65^{***}$

Zusammengefasst kann geschlussfolgert werden, dass die Inokulation der Ratten mit AH-130 Tumorzellen ab Tag 7 einen kachektischen Zustand induzierte, wohingegen die Tiere 56 und 210 Tage nach Infarktoperation keine Kachexie aufwiesen. Diese Ergebnisse konnten durch die Gewichtsanalyse der Organe, Muskeln und des Fettgewebes bestätigt werden.

### 3.1.4 Parameter für Lebensqualität

Die Daten für die Nahrungsaufnahme und die Aktivität der Tiere wurden nur im Tumorversuch erhoben. Die *Baseline*-Werte in Tabelle 24 verdeutlichen, dass die Tiere vor Studienbeginn im Schnitt 20g Nahrung aufnahmen und eine Bewegung von 62.000 bis 77.100 *counts* innerhalb von 24 Stunden aufwiesen. Die Änderung beider Parameter wurde als  $\Delta$ -Wert berechnet und für alle Gruppen in der Abbildung 19 angegeben.

Tabelle 24. Nahrungsaufnahme und Aktivität vor Beginn der Tumorstudie (*Baseline*). Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM.

Gruppe	Sham			Tumor				
	Tag 7	Tag 11	Tag 13	Tag 5	Tag 7	Tag 9	Tag 11	Tag 13
<b>n-Anzahl</b>	5	5	5	6	10	9	8	7
<b>Baseline Nahrungsaufnahme [g/24h]</b>	18,92 $\pm 0,55$	21,5 $\pm 0,66$	21,8 $\pm 1,17$	24,3 $\pm 0,64$	18,80 $\pm 0,49$	23,1 $\pm 0,54$	20,5 $\pm 0,42$	21,2 $\pm 0,62$
<b>Baseline Aktivität [counts/24h]</b>	77.103 $\pm 5.049$	68.848 $\pm 2.752$	62.199 $\pm 3.884$	76.134 $\pm 4.208$	74.834 $\pm 2.568$	63.933 $\pm 2.434$	72.854 $\pm 3.162$	62.874 $\pm 3.501$

Die Tumortiere nahmen ab Tag 5 20% weniger Nahrung auf und diese verringerte Nahrungsaufnahme steigerte sich bis Tag 11 auf -87% und lag bei -76% am Tag 13 nach Tumorinokulation. Dies zeigt, dass die Tiere anorektisch wurden. Die Aktivität war in der Shamgruppe am Tag 5 um 18% verringert, wohingegen die anderen Shamgruppen keine veränderte Bewegung gegenüber den Ausgangswerten zeigten. Mit Auftreten der Kachexie am Tag 7 bewegten sich die Tumortiere um 41% weniger, kurz davor am Tag 5 war die Mobilität bereits um 16% reduziert. Am Tag 13 war die Bewegung der Tumortiere um 80% herabgesetzt (Tag 13:  $p=0,0019$  Sham vs. Tumor Tag 13).

Dies verdeutlicht, dass die Tiere mit Fortschreiten der Kachexie anorektisch wurden und in ihrer Lebensqualität, die sich durch eine verringerte Bewegung zeigte, sehr eingeschränkt wurden.

### Tumorstudie

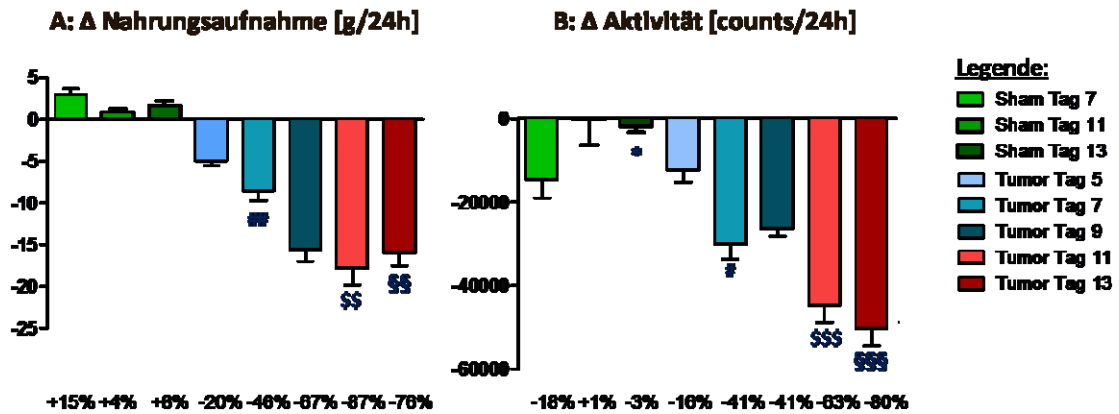


Abbildung 19. Veränderung der Nahrungsaufnahme [g/24h] (A) und Aktivität [counts/24h] (B) in der Tumorstudie. Angaben als Mittelwert ± SEM. Unter den Graphen ist die Änderung der Nahrungsaufnahme und der Aktivität im Vergleich zur *Baseline* in % angegeben. \*: p<0,05 vs. Sham Tag 7, #: p<0,05 vs. Sham Tag 7, ##: p<0,01 vs. Sham Tag 7, \$\$: p<0,01 vs Sham Tag 11, \$\$\$: p<0,001 vs. Sham Tag 11, \$\$\$: p<0,01 vs. Sham Tag 13, \$\$\$\$: p<0,001 vs. Sham Tag 13.

#### 3.1.5 Analyse des Plasma

Dann sollte die Messung von Albumin als Marker für Kachexie sowie die Analyse von Cholesterol, HDL, LDL und der Triglyzeride im Plasma erfolgen (Abbildung 20).

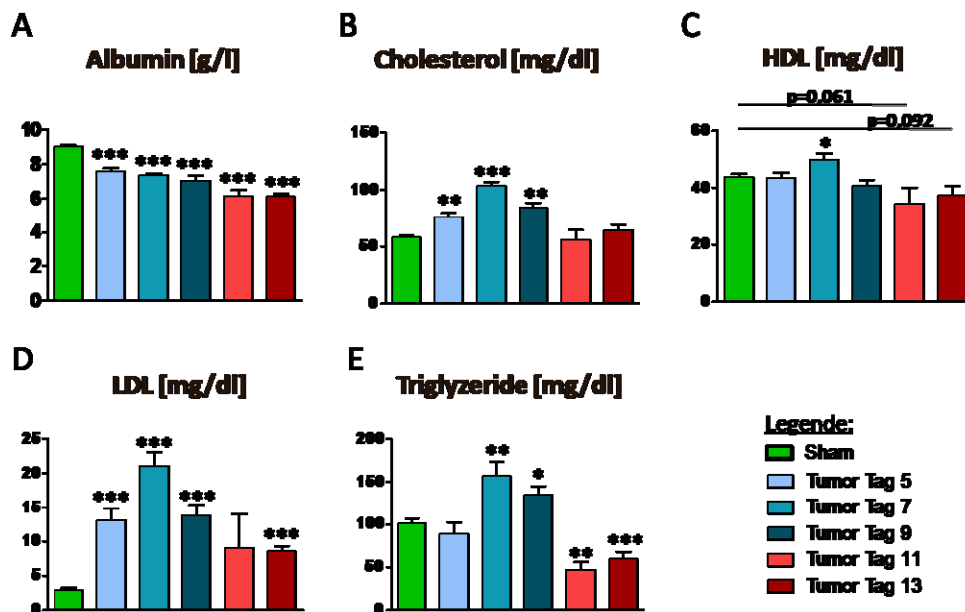


Abbildung 20. Plasma-Messung von Albumin (A), Cholesterol (B), HDL (C), LDL (D), und von Triglyzeriden (E) in der Tumorstudie. Angaben als Mittelwert ± SEM. \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001 vs. Sham. HDL = *High Density Lipoprotein* , LDL = *Low Density Lipoprotein*.

Die im Plasma gemessene Albuminkonzentration zeigte eine kontinuierliche Abnahme bei fortschreitender Tumorentwicklung, was der Kachexiedefinition entsprach.<sup>1</sup> Cholesterol, im Speziellen *High Density Lipoprotein* (HDL) und *Low Density Lipoprotein* (LDL), erreichten die höchste Konzentration im Plasma am Tag 7 nach Tumorinduktion und fielen danach wieder ab. Es fiel jedoch auf, dass HDL nur leicht anstieg, während LDL in großem Maße anstieg. Weiterhin waren die Triglyzeride am Tag 7 in den Tumortieren signifikant erhöht und am Tag 11 und 13 gegenüber Sham signifikant reduziert.

### 3.1.6 Herzgewicht und Herzfunktion

#### 3.1.6.1 Herzgewicht

Das mittlere Herzgewicht, das in Abbildung 21 zu sehen ist, unterschied sich nicht signifikant in den Shamgruppen des Tumorversuches ( $p=0,4206$  Sham Tag 7 vs. Sham Tag 13). Deswegen wurden die Shams zur Analyse weiterer Herzparameter miteinander kombiniert und mit den Tumorgruppen verglichen. Das Herzgewicht war signifikant um 15% am Tag 7 nach Tumordinokulation gegenüber der Shamgruppe von Tag 7 reduziert ( $p=0,0027$  Sham vs Tumor Tag 7). Der Verlust myokardialer Masse bei den Tumortieren steigerte sich signifikant auf -33% am Tag 11 ( $p=0,0062$  Sham vs. Tumor Tag 11) und -43% am Tag 13 ( $p=0,0019$  Sham vs. Tumor Tag 13) gegenüber der jeweiligen Shamgruppe. Nach myokardialer Infarktoperation war das Herzgewicht von Infarkttieren am Tag 56 um 13% ( $p=0,0072$  Sham vs. Infarkt Tag 56) und am Tag 210 um 30% gegenüber der Shamgruppe erhöht ( $p<0,0001$  Sham vs. Infarkt Tag 210).

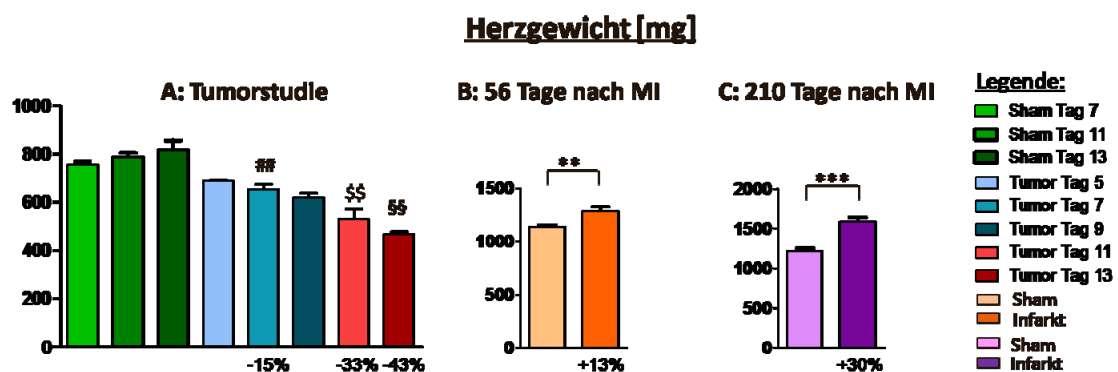


Abbildung 21. **Herzgewicht [mg]** in der Tumorstudie (A) sowie 56 (B) und 210 Tage (C) nach myokardialer Infarktoperation. Die Daten aus Abbildung A wurden bereits in der Dissertation von Karoline von Websky veröffentlicht.<sup>269</sup> Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. Unter den Graphen ist die prozentuale Veränderung gegenüber der entsprechenden Shamgruppe angegeben. \*\*:  $p<0,01$  vs. Sham Tag 56, \*\*\*:  $p<0,001$  vs. Sham Tag 210, ##:  $p<0,01$  vs. Sham Tag 7, \$\$:  $p<0,01$  vs. Sham Tag 11, \$\$:  $p<0,01$  vs. Sham Tag 13. MI=Myokardialer Infarkt.

Bei Analyse der Herzkompimente (Tabelle 25) im Infarktversuch zeigte sich, dass nur die Atrien und der rechte Ventrikel 56 Tage nach myokardialem Infarkt an Gewicht zunahmen, jedoch das Gewicht des linken Ventrikels und des Septums unverändert blieben. Am Tag 210 war das Gewicht aller Herzkammern erhöht, nur das Gewicht des Septums nicht.

Somit kam es im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell nach Tumorinokulation zu einem signifikanten Verlust myokardialer Masse, während im Infarktmodell die Herzen nach Induktion des Infarktes schwerer wurden.

Tabelle 25. Gewicht der Herzkompimente 56 und 210 Tage nach myokardialem Infarkt. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  vs. Sham.

	Tag 56		Tag 210	
	Sham	Myokardialer Infarkt [% von Sham]	Sham	Myokardialer Infarkt [% von Sham]
<b>n-Anzahl</b>	15	17	12	27
<b>Linkes Atrium</b>	100 $\pm$ 4,36	205 $\pm$ 25,7***	100 $\pm$ 5,20	237 $\pm$ 22,8***
<b>Rechtes Atrium</b>	100 $\pm$ 6,41	159 $\pm$ 15,76**	100 $\pm$ 9,45	176 $\pm$ 13,99***
<b>Linker Ventrikel</b>	100 $\pm$ 2,85	97,8 $\pm$ 3,48	100 $\pm$ 3,36	114 $\pm$ 2,37**
<b>Rechter Ventrikel</b>	100 $\pm$ 3,08	128 $\pm$ 10,21*	100 $\pm$ 6,42	144 $\pm$ 11,98**
<b>Septum</b>	100 $\pm$ 5,50	106 $\pm$ 4,73	100 $\pm$ 4,95	109 $\pm$ 2,66

### 3.1.6.2 Herzfunktion

Die Herzfunktion wurde mittels echokardiographischer Untersuchung analysiert (Tabelle 26 und Tabelle 27). Da die Herzen der Tiere aus dem langen Infarktversuch nur final echokardiographisch dargestellt wurden, konnte keine prozentuale Veränderung zum Ausgangswert berechnet werden. Die finalen Werte der Auswurfsfraktion, der Verkürzungsfraktion und des Schlagvolumens aus der Tumorstudie wurden bereits in der Dissertation von Karoline von Websky veröffentlicht.<sup>269</sup>

Die aus dem Unterschall errechnete linksventrikuläre Masse bestätigte das Ergebnis der Gewichtsanalysen des Herzens. Dabei ergab sich ein 58%iger Verlust der linksventrikulären Masse am Tag 13 bei den Tumortieren ( $p < 0,0003$  Sham vs. Tumor Tag 13) und kein Unterschied zwischen den Sham- und Infarkttieren am Tag 56, obgleich beide Gruppen gegenüber den Ausgangswerten an Myokardmasse zunahmen. Die Auswurfsfraktion verschlechterte sich im Tumorversuch nicht in dem Maße wie in den Infarktstudien und lag am Tag 13 in der Tumorgruppe bei 50,5%.

In der Infarktstudie hatten die Tiere kurz nach der myokardialen Infarktoperation eine Auswurfsfraktion von 33%, die sich gegenüber Tag 56 nur noch um 5% verringerte. Da die Infarkte in den Tieren vom Tag 210 geringer induziert wurden, hatten diese final auch eine etwas höhere Auswurfsfraktion als die Tiere vom Tag 56. Die verschlechterte Herzfunktion im Tumormodell äußerte sich auch anhand einer Beeinträchtigung der linksventrikulären Verkürzungsfraktion und dem Schlagvolumen. Beide Parameter verschlechterten sich um 5 bzw. 32% in der Tumorgruppe von Tag 9, wobei sich das Schlagvolumen signifikant zu den Shamtieren unterschied. Die Verkürzungsfraktion war um 40% ( $p < 0,0001$  Sham vs. Tumor Tag 13) und das Schlagvolumen um 83% in der Tumorgruppe von Tag 13 eingeschränkt ( $p < 0,0001$  Sham vs. Tumor Tag 13). Im Gegensatz dazu waren beide Parameter bei den Tieren nach der Infarktoperation sofort signifikant zu den Shamtieren reduziert und veränderten sich nur minimal bis Tag 56.

Tabelle 26. Parameter der Herzfunktion in der Tumorstudie. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Sham. LV= linksventrikulär, EF= Auswurfsfraktion, FS=Verkürzungsfraktion (*Fractional Shortening*), SV= Schlagvolumen, EDD=Enddiastolischer Durchmesser, ESD=Endsystolischer Durchmesser.

		Sham	Tumor Tag 5	Tumor Tag 7	Tumor Tag 9	Tumor Tag 11	Tumor Tag 13
<b>n-Anzahl</b>		15	6	10	6	8	12
<b>LV Masse</b>	Baseline [mg]	589 $\pm 35,2$	477 $\pm 27,1$	573 $\pm 34,9$	523 $\pm 28,1$	624 $\pm 36,6$	546 $\pm 29,0$
	Final [mg]	645 $\pm 21,2$	474 $\pm 25,1^{***}$	495 $\pm 23,1^{***}$	447 $\pm 47,9^{***}$	481 $\pm 77,0^*$	220 $\pm 29,8^{***}$
	$\Delta$ [mg]	55,8 $\pm 39,6$	-3,21 $\pm 32,5$	-78,0 $\pm 57,6$	-76,1 $\pm 28,8^*$	-145 $\pm 61,8^*$	-326 $\pm 42,4^{***}$
	% von Baseline	<b>15,00</b> <b><math>\pm 7,76</math></b>	<b>0,67</b> <b><math>\pm 6,95</math></b>	<b>-10,00</b> <b><math>\pm 8,30</math></b>	<b>-16,00</b> <b><math>\pm 5,54</math></b>	<b>-23,7</b> <b><math>\pm 9,76</math></b>	<b>-58,2</b> <b><math>\pm 5,96</math></b>
<b>LV EF</b>	Baseline [%]	76,0 $\pm 1,54$	85,7 $\pm 0,95^{**}$	74,2 $\pm 2,41$	85,4 $\pm 0,92^{***}$	77,3 $\pm 1,70$	80,9 $\pm 0,86^*$
	Final [%]	79,7 $\pm 1,49$	85,8 $\pm 0,58^*$	75,9 $\pm 2,06$	80,1 $\pm 1,45$	53,4 $\pm 1,61^{***}$	50,5 $\pm 1,39^{***}$
	$\Delta$ [%]	3,64 $\pm 1,44$	0,13 $\pm 1,03$	0,21 $\pm 1,74$	-5,31 $\pm 2,19^{**}$	-23,9 $\pm 2,69^{***}$	-30,4 $\pm 1,87^{***}$
	% von Baseline	<b>5,08</b> <b><math>\pm 1,94</math></b>	<b>0,21</b> <b><math>\pm 1,22</math></b>	<b>0,47</b> <b><math>\pm 2,32</math></b>	<b>-6,08</b> <b><math>\pm 2,46</math></b>	<b>-30,7</b> <b><math>\pm 2,92</math></b>	<b>-37,5</b> <b><math>\pm 2,04</math></b>
<b>LV FS</b>	Baseline [%]	49,6 $\pm 1,72$	52,0 $\pm 1,45$	50,7 $\pm 2,18$	49,2 $\pm 1,74$	50,9 $\pm 2,69$	50,7 $\pm 1,46$
	Final [%]	50,5 $\pm 1,34$	52,7 $\pm 1,54$	43,0 $\pm 1,54^{**}$	47,8 $\pm 2,16$	26,5 $\pm 0,71^{***}$	30,3 $\pm 0,93^{***}$
	$\Delta$ [%]	0,92 $\pm 2,49$	0,71 $\pm 2,57$	-6,82 $\pm 1,81^*$	-2,73 $\pm 1,68$	-24,5 $\pm 2,71^{***}$	-20,4 $\pm 1,66^{***}$
	% von Baseline	<b>4,03</b> <b><math>\pm 5,17</math></b>	<b>1,98</b> <b><math>\pm 5,07</math></b>	<b>-12,9</b> <b><math>\pm 3,42</math></b>	<b>-5,29</b> <b><math>\pm 3,12</math></b>	<b>-47,2</b> <b><math>\pm 3,00</math></b>	<b>-39,9</b> <b><math>\pm 2,27</math></b>

<b>LV SV</b>	Baseline [μl]	175 ±9,64	233 ±10,10**	162 ±8,24	224 ±4,17**	186 ±24,2	199 ±6,93**
	Final [μl]	202 ±12,47	221 ±8,46	157 ±10,52*	151 ±9,30*	55,0 ±8,30***	34,4 ±1,84***
	Δ [μl]	27,6 ±10,21	-11,90 ±11,45*	-5,17 ±12,75	-73,2 ±12,77***	-131 ±26,9***	-165 ±7,09***
	% von Baseline	<b>17,40</b> <b>±6,22</b>	<b>-4,36</b> <b>±5,05</b>	<b>-7,88</b> <b>±7,37</b>	<b>-32,3</b> <b>±4,90</b>	<b>-67,5</b> <b>±5,56</b>	<b>-82,6</b> <b>±1,08</b>
<b>LV EDD</b>	Baseline [mm]	6,28 ±0,12	6,59 ±0,12	6,23 ±0,46	6,59 ±0,19	6,31 ±0,17	6,42 ±0,06
	Final [mm]	6,50 ±0,13	7,02 ±0,17*	6,43 ±0,18	6,04 ±0,36	4,94 ±0,49***	4,05 ±0,33***
	Δ [mm]	0,22 ±0,20	0,43 ±0,12	0,20 ±0,47	-0,55 ±0,25*	-1,37 ±0,56*	-2,37 ±0,33***
	% von Baseline	<b>4,16</b> <b>±3,34</b>	<b>6,49</b> <b>±1,89</b>	<b>6,57</b> <b>±7,63</b>	<b>-8,65</b> <b>±3,99</b>	<b>-20,9</b> <b>±9,17</b>	<b>-36,8</b> <b>±5,19</b>
<b>LV ESD</b>	Baseline [mm]	3,17 ±0,13	3,16 ±0,07	3,10 ±0,30	3,26 ±0,11	3,11 ±0,22	3,17 ±0,10
	Final [mm]	3,22 ±0,12	3,33 ±0,17	3,61 ±0,13	2,99 ±0,28	3,63 ±0,36	2,84 ±0,24
	Δ [mm]	0,05 ±0,20	0,17 ±0,20	0,51 ±0,28	-0,27 ±0,21	0,52 ±0,43	-0,33 ±0,22
	% von Baseline	<b>4,89</b> <b>±7,07</b>	<b>5,76</b> <b>±6,34</b>	<b>23,3</b> <b>±11,96</b>	<b>-9,25</b> <b>±6,53</b>	<b>22,5</b> <b>±20,0</b>	<b>-10,6</b> <b>±6,93</b>

Tabelle 27. Parameter der Herzfunktion 56 und 210 Tage nach myokardialen Infarkt. Angaben als Mittelwert ± SEM. \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001 vs. Sham. LV= linksventrikulär, EF=Auswurfsfraktion, FS=Verkürzungsfraktion (*Fractional Shortening*), SV=Schlagvolumen, EDD=Enddiastolischer Durchmesser, ESD=Endsystolischer Durchmesser.

		Tag 56		Tag 210	
		Sham	Myokardialer Infarkt	Sham	Myokardialer Infarkt
<b>n-Anzahl</b>		15	17	12	27
<b>LV Masse</b>	Baseline [mg]	648±39,4	781±48,9*	NA	NA
	Final [mg]	781±36,1	889±53,3	NA	NA
	Δ [mg]	133±42,7	108±37,0	NA	NA
	% von Baseline	<b>26,4±8,32</b>	<b>16,13±5,64</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>
<b>LV EF</b>	Baseline [%]	61,0±1,32	32,6±1,49***	NA	NA
	Final [%]	63,3±1,18	30,7±1,86***	72,9±4,85	37,1±1,52***
	Δ [%]	2,36±1,95	-1,90±1,42	NA	NA
	% von Baseline	<b>4,67±3,25</b>	<b>-5,38±4,39</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>
<b>LV FS</b>	Baseline [%]	36,3±1,03	16,83±1,00***	NA	NA
	Final [%]	39,1±1,10	15,89±1,06***	39,2±3,49	15,84±0,75***
	Δ [%]	2,81±1,50	-0,94±0,80*	NA	NA
	% von Baseline	<b>9,00±4,51</b>	<b>-4,35±4,67</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>
<b>LV SV</b>	Baseline [μl]	329±17,85	255±14,72**	NA	NA
	Final [μl]	338±13,10	257±9,06***	NA	NA
	Δ [μl]	9,00±22,7	2,43±15,21	NA	NA
	% von Baseline	<b>6,63±6,61</b>	<b>6,35±7,51</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>



<b>LV EDD</b>	Baseline [mm]	8,43±0,16	10,17±0,27***	NA	NA
	Final [mm]	8,61±0,20	10,81±0,26***	7,63±0,74	10,57±0,18***
	Δ [mm]	0,18±0,17	0,64±0,18	NA	NA
	% von Baseline	<b>2,27±2,01</b>	<b>6,68±1,94</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>
<b>LV ESD</b>	Baseline [mm]	5,38±0,17	8,48±0,28***	NA	NA
	Final [mm]	5,25±0,19	9,13±0,31***	5,14±0,49	8,92±0,20***
	Δ [mm]	-0,13±0,19	0,65±0,15**	NA	NA
	% von Baseline	<b>-1,72±3,54</b>	<b>7,88±1,92</b>	<b>NA</b>	<b>NA</b>

Der Diameter des linken Ventrikels nahm im Tumorversuch durch Tumorinokulation sowohl in der Diastole als auch in der Systole ab. Er war um 37% in der Diastole und um 11% in der Systole in den Tumortieren am Tag 13 reduziert. Dadurch ergaben sich hochsignifikante Unterschiede zu den Werten der Shamtiere in der Diastole ( $p < 0,0001$  Sham vs. Tumor Tag 13). Die Infarktinduktion führte sofort zu einer Vergrößerung des linksventrikulären Durchmessers, der sich bis Tag 56 nochmal um 7% in der Diastole bzw. signifikant um 8% in der Systole verlängerte ( $p = 0,0031$  Sham vs. Infarkt Tag 56). Die vor Studienbeginn gemessene Herzrate lag zwischen 400-450bpm. Durch Tumorinokulation nahm die Herzrate ab, während sie im Infarktversuch am Tag 56 nicht signifikant zunahm (Abbildung 22). Auch das Herzminutenvolumen nahm sowohl im Tumorversuch als auch im Infarktversuch ab.

Diese Ergebnisse zeigen, dass sich die Herzfunktion im Tumorversuch verschlechterte während das Herz an Masse und Größe abnahm und der Infarkt zu einer Dilatation des Herzens mit eingeschränkter Herzfunktion führte.

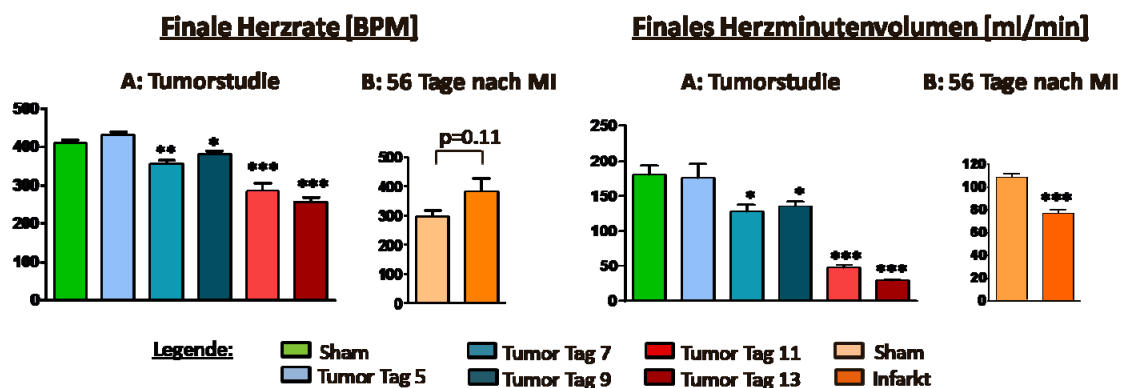


Abbildung 22. Herzrate [bpm] und Herzminutenvolumen in der Tumorstudie (A) sowie 56 Tage (B) nach myokardialer Infarktoperation. Angaben als Mittelwert ± SEM. \*:  $p < 0,05$  vs. Sham, \*\*:  $p < 0,01$  vs. Sham, \*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Sham. MI= Myokardialer Infarkt.

### 3.1.6.3 Linksventrikuläre Wandstärken

Die Wandstärken des linken Ventrikels wurden durch Auswertung echokardiographischer M-Mode Bilder (Abbildung 23) ermittelt. Die Bilder weisen auf eine Verringerung der Septum- als auch der Hinterwandstärke nach Tumorinokulation und myokardialer Infarktoperation hin.

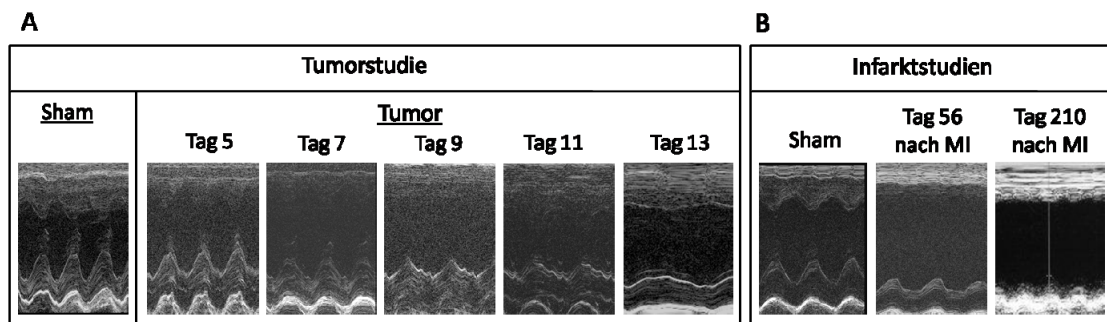


Abbildung 23. Echokardiographische M-Mode-Darstellung des linken Ventrikels in der Tumorstudie (A) und 56 Tage und 210 Tage nach myokardialen Infarkt (B). MI=Myokardialer Infarkt.

Um dies nachzuprüfen, wurden zuerst die Ausgangswerte für die Wandstärken des linken Ventrikels in der Diastole und Systole in die Tumorstudie und in der Infarktstudie ermittelt (Tabelle 28). Innerhalb der Studien waren die Werte gleich.

Tabelle 28. Stärke der Hinterwand und des Septums in der Diastole und Systole (Baseline) in der Tumorstudie und 56 Tage nach myokardialen Infarkt. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. HW=Hinterwand, Sept.=Septum, dia=Diastole, sys=Systole.

Gruppe	Tumorstudie						Infarktstudie	
	Sham	Tumor Tag 5	Tumor Tag 7	Tumor Tag 9	Tumor Tag 11	Tumor Tag 13	Sham Tag 56	Infarkt Tag 56
<b>n-Anzahl</b>	15	6	8	9	8	12	15	17
<b>Baseline HW in dia [mm]</b>	2,65 $\pm 0,16$	2,12 $\pm 0,12$	2,62 $\pm 0,18$	2,24 $\pm 0,14$	2,76 $\pm 0,11$	2,46 $\pm 0,11$	0,68 $\pm 0,04$	0,55 $\pm 0,05$
<b>Baseline HW in sys [mm]</b>	3,76 $\pm 0,22$	2,93 $\pm 0,17$	3,77 $\pm 0,32$	3,24 $\pm 0,20$	3,56 $\pm 0,19$	3,77 $\pm 0,23$	0,95 $\pm 0,06$	0,53 $\pm 0,06$
<b>Baseline Sept. in dia [mm]</b>	0,87 $\pm 0,05$	0,77 $\pm 0,04$	0,92 $\pm 0,06$	0,85 $\pm 0,05$	0,87 $\pm 0,05$	0,81 $\pm 0,04$	1,06 $\pm 0,06$	0,82 $\pm 0,05$
<b>Baseline Sept. in sys [mm]</b>	2,19 $\pm 0,11$	2,46 $\pm 0,09$	2,40 $\pm 0,13$	2,56 $\pm 0,14$	2,34 $\pm 0,12$	2,17 $\pm 0,09$	1,94 $\pm 0,08$	1,02 $\pm 0,09$

Am Studienende wurden für die Hinterwand und das Septum die Veränderung gegenüber den Ausgangswerten berechnet. In der diastolischen Phase war die Veränderung der Hinterwand (Abbildung 24-A) in den Tumor- und Infarkttieren nicht signifikant gegenüber den Shamtieren verändert.

Jedoch zeigte sich in der Systole (Abbildung 24-B) eine Abnahme der Hinterwand ab Tag 5 in den Tumortieren, die bei 8% lag, und sich signifikant auf -40% am Tag 13 in der Tumorgruppe reduzierte. Im Infarktversuch nahm die systolische Wandstärke bei den Shamtieren im Vergleich zur *Baseline* um 24% zu und betrug nur noch eine 8%ige Zunahme in den Infaktieren, die signifikant zu Sham reduziert war.

Desweiteren war die Größe des Septums (Abbildung 25) in der Systole und nur am Tag 13 in der Diastole signifikant verringert. Am Tag 7 hatten die Tumortiere ein um 13% und am Tag 13 ein um 42% verkleinertes Septum in der Systole. Die Größe des Septums der Infaktiere vergrößerte sich um 7% in der Systole, was wiederum ein zu Sham signifikant verringertes Ergebnis darstellte.

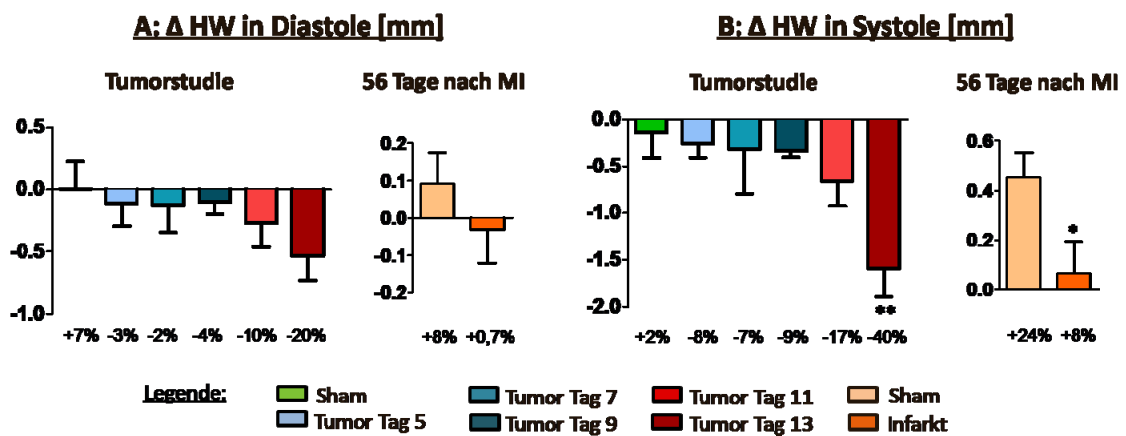


Abbildung 24. Veränderung der Hinterwandstärke [mm] in der Diastole (A) und Systole (B) in der Tumorstudie sowie 56 Tage nach myokardialer Infarktoperation. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. Unter den Graphen ist die prozentuale Veränderung im Vergleich zur *Baseline* in % angegeben. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$  vs. Sham. MI=Myokardialer Infarkt.

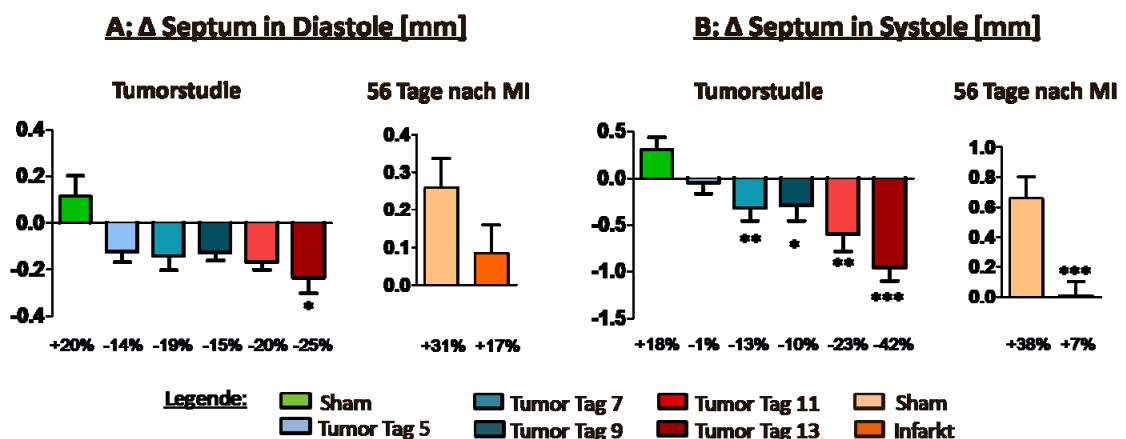


Abbildung 25. Veränderung der Septumstärke [mm] in der Diastole (A) und in der Systole (B) in der Tumorstudie sowie 56 Tage nach myokardialer Infarktoperation. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. Unter den Graphen ist die prozentuale Veränderung im Vergleich zum *Baseline* in % angegeben. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Sham. MI=Myokardialer Infarkt.

Somit zeigen diese Ergebnisse, dass die Stärke der Hinterwand und des Septums in beiden Versuchen hauptsächlich in der Systole signifikant zu Sham reduziert waren und dass die Stärken im Tumorversuch stärker als im Infarktversuch abnahmen.

### 3.1.6.4 Elektrokardiogramm und hämodynamische Untersuchung

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse des Elektrokardiogramms aus der Tumorstudie dargestellt. Die Analyse des Elektrokardiogrammes im Tumorversuch ergab, dass das PQ-, QT- und QRS-Interval signifikant am Tag 11 und 13 in den Tumortieren gegenüber Sham verlängert war. Dies zeigt, dass die Erregungsweiterleitung vom Atrium zum Ventrikel als auch innerhalb des Ventrikels länger dauerte. Desweiteren zeigt es eine Verschlechterung der Depolarisation des Herzens.

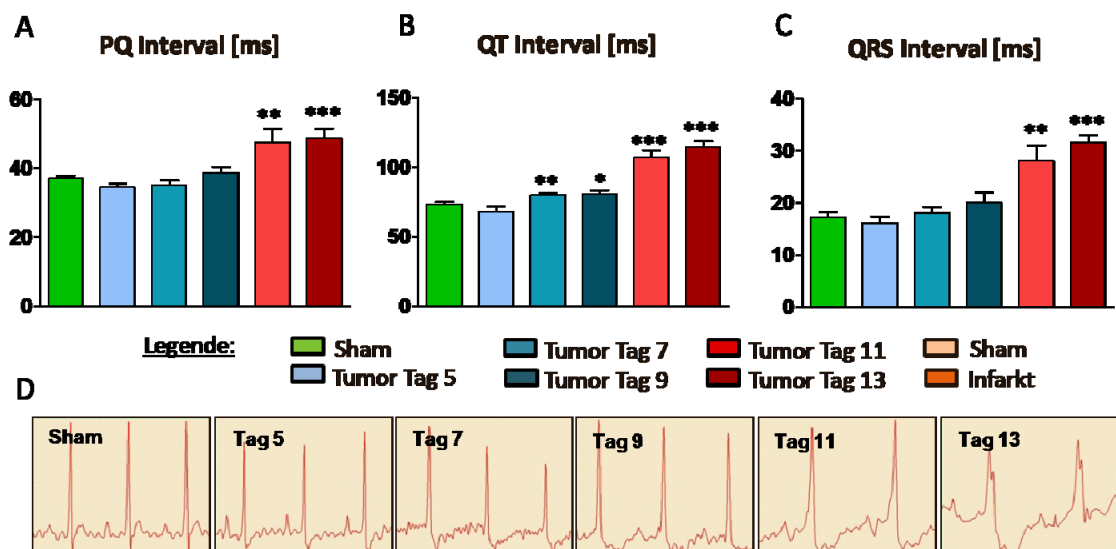


Abbildung 26. **Elektrokardiogramm der Tiere aus dem Tumorversuch.** Darstellung der mittleren Werte für das PQ-, (A) QT- (B) und QRS-Interval (C) sowie schematischer Kurvenverlauf (D). \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Sham.

Danach wurde anhand des Mitralflusses der Füllungszustand des Herzens analysiert. Die in Tabelle 29 dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass die Füllung des Herzens mit Blut nach Tumorinokulation ab Tag 7 progressiv bis Tag 13 abnahm, erkennbar an MV E (frühe Füllung des Ventrikels) und MV A (vom systolischen Atrium in den Ventrikel einströmendes Blut). Dabei war MV E um 48% und MV A um 32% am Tag 13 nach Tumorinokulation gegenüber den Ausgangswerten reduziert ( $\Delta$ MV E und  $\Delta$ MV A:  $p < 0,0001$  Sham vs. Tumor Tag 13). Die Füllung des Ventrikels war nach Infarktinduktion unverändert gegenüber Sham.

Tabelle 29. Messung des Füllungszustandes des Herzens anhand des Mitralflusses in der Tumorstudie und 56 Tage nach myokardialen Infarkt. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. MV=Mitral valve

	Gruppe	Tumorstudie						Infarktstudie	
		Sham	Tumor Tag 5	Tumor Tag 7	Tumor Tag 9	Tumor Tag 11	Tumor Tag 13	Sham Tag 56	Infarkt Tag 56
<b>n</b>		15	6	7	7	9	11		
<b>MV E</b>	<b>Baseline [cm/s]</b>	616 $\pm$ 15,95	668 $\pm$ 27,9	714 $\pm$ 35,0**	610 $\pm$ 23,0	732 $\pm$ 24,4***	600 $\pm$ 24,8	982 $\pm$ 61,0	864 $\pm$ 51,1
	<b>Final [cm/s]</b>	675 $\pm$ 15,45	719 $\pm$ 33,3	590 $\pm$ 35,0*	460 $\pm$ 27,7***	410 $\pm$ 39,0***	297 $\pm$ 18,2***	1056 $\pm$ 58,6	916 $\pm$ 56,8
	<b><math>\Delta</math> [cm/s]</b>	58,2 $\pm$ 21,8	50,7 $\pm$ 26,9	-125 $\pm$ 42,4***	-150 $\pm$ 41,7***	-322 $\pm$ 36,0***	-303 $\pm$ 33,1***	74,3 $\pm$ 35,2	51,7 $\pm$ 78,4
	<b>% of Baseline</b>	<b>10,42 <math>\pm</math>3,80</b>	<b>7,88 <math>\pm</math>4,12</b>	<b>-16,64 <math>\pm</math>5,66</b>	<b>-23,7 <math>\pm</math>6,16</b>	<b>-44,1 <math>\pm</math>4,78</b>	<b>-47,5 <math>\pm</math>3,68</b>	<b>9,49 <math>\pm</math>4,11</b>	<b>15,34 <math>\pm</math>13,53</b>
<b>MV A</b>	<b>Baseline [cm/s]</b>	310 $\pm$ 11,59	323 $\pm$ 19,73	344 $\pm$ 31,6	317 $\pm$ 23,9	482 $\pm$ 39,9***	314 $\pm$ 31,1	711 $\pm$ 40,7	535 $\pm$ 50,7*
	<b>Final [cm/s]</b>	335 $\pm$ 13,74	357 $\pm$ 51,4	330 $\pm$ 33,0	279 $\pm$ 23,8*	248 $\pm$ 24,4**	191 $\pm$ 11,40***	822 $\pm$ 48,9	535 $\pm$ 47,8***
	<b><math>\Delta</math> [cm/s]</b>	24,4 $\pm$ 13,38	34,0 $\pm$ 63,3	-13,76 $\pm$ 39,4	-38,5 $\pm$ 18,43*	-234 $\pm$ 36,4***	-117 $\pm$ 38,5***	111 $\pm$ 45,3	0,84 $\pm$ 65,5
	<b>% of Baseline</b>	<b>9,11 <math>\pm</math>4,87</b>	<b>15,21 <math>\pm</math>19,66</b>	<b>0,57 <math>\pm</math>12,48</b>	<b>-11,58 <math>\pm</math>5,02</b>	<b>-47,6 <math>\pm</math>4,81</b>	<b>-31,6 <math>\pm</math>6,99</b>	<b>18,01 <math>\pm</math>6,41</b>	<b>14,77 <math>\pm</math>17,32</b>

In Abbildung 27 sind die hämodynamischen Druckkurven aus dem Tumorversuch zu erkennen, die deutlich machen, dass der Blutdruck in den Tumortieren von Tag 5 bis Tag 13 gegenüber der Shamgruppe abnahm.

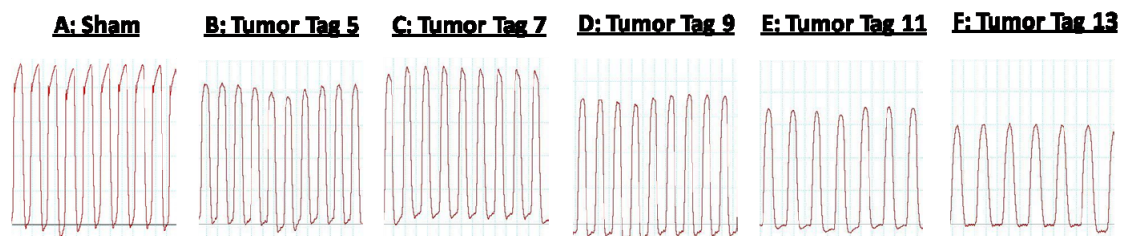


Abbildung 27. Hämodynamische Druckkurven von Sham- (A) und Tumortieren (B-F).

Dieses Ergebnis wurde durch die Werte der hämodynamischen Messung bestätigt (Tabelle 30). Dabei verringerte sich der enddiastolische als auch endsystolische Blutdruck hoch signifikant in den Tumortieren bis Tag 13 verglichen mit Sham.

Als Maß für die Kontraktilität der linken Herzkammer wurde die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ( $dP/dt_{max}$ ) gemessen, welche bei den Sham gemittelt  $7.757 \pm 1.019$  mmHG/s und bei den Tumortieren  $2.789 \pm 206$  mm HG/s am Tag 13 betrug. Desweiteren nahm auch die minimale Veränderung des Ventrikeldruckes durch den Tumor ab Tag 9 signifikant ab und verschlechterte sich zunehmend bis Tag 13. Als weiterer Parameter wurde Tau als Zeiteinheit für die Relaxation des linken Ventrikels in der Diastole analysiert. Es zeigte sich, dass mit fortschreitender Tumorentwicklung sich diese Relaxationszeit ab Tag 11 statistisch signifikant in den Tumortieren verlängerte und bis auf 25 ms am Tag 13 anstieg ( $p < 0,0001$  Sham vs. Tumor Tag 13).

Tabelle 30. Bestimmung von hämodynamischen Parameter im Tumorversuch. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs Sham. LV=linksventrikulär, EDP=Enddiastolischer Blutdruck, ESP=Endsystolischer Blutdruck,  $dP/dt$ =Druckerhöhungsgeschwindigkeit.

	Sham	Tumor Tag 5	Tumor Tag 7	Tumor Tag 9	Tumor Tag 11	Tumor Tag 13
<b>n-Anzahl</b>	13	6	10	6	8	12
<b>LV EDP [mm HG]</b>	10,65 $\pm 3,29$	8,03 $\pm 3,00$	14,28 $\pm 2,68$	-2,99 $\pm 0,35^{***}$	1,49 $\pm 1,55^*$	-2,31 $\pm 0,44^{***}$
<b>LV ESP [mm HG]</b>	111 $\pm 5,44$	108 $\pm 3,95$	117 $\pm 4,47$	104 $\pm 2,88$	83 $\pm 6,17^*$	67 $\pm 3,72^{***}$
<b><math>dP/dt_{max}</math> [mm HG/s]</b>	7.757 $\pm 1.019$	8.789 $\pm 712$	6.975 $\pm 574$	7.867 $\pm 611$	4.236 $\pm 822^*$	2.789 $\pm 206^{***}$
<b><math>dP/dt_{min}</math> [mm HG/s]</b>	-7.144 $\pm 823$	-8.894 $\pm 680$	-7.973 $\pm 830$	-9.479 $\pm 679^*$	-4.303 $\pm 713^*$	-2.800 $\pm 279^{***}$
<b>Tau [ms]</b>	10,75 $\pm 0,41$	9,70 $\pm 0,64$	11,95 $\pm 1,32$	9,48 $\pm 0,48$	19,47 $\pm 2,47^{***}$	25,0 $\pm 2,59^{***}$

### 3.1.6.5 Biomarker für Herzinsuffizienz

Nachdem eine funktionelle Beeinträchtigung des Herzens im Tumormodell festgestellt wurde, sollte diese durch Analyse des Plasmas auf Biomarker, die auf eine myokardiale Schädigung hinweisen, genauer untersucht werden. Hierzu wurden BNP (*Brain Natriuretic Peptide*), Troponin I und Troponin T in den Sham- und Tumortieren bestimmt (Abbildung 28). BNP war am Tag 7 in den Tumortieren gegenüber Shamtieren signifikant erhöht und am Tag 11 und 13 signifikant reduziert. Troponin-I und T, die bei myokardialer Nekrose aus dem Gewebe freigesetzt werden, waren im Tumorversuch am Tag 11 gegenüber der Shamgruppe erhöht, erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (Troponin T:  $p = 0,06$  Tumor Tag 11 vs. Sham). Dieses Ergebnis bestätigte die durch vorangegangene Experimente hervorgegangene Verschlechterung der Herzfunktion durch tumorinduzierte Kachexie.

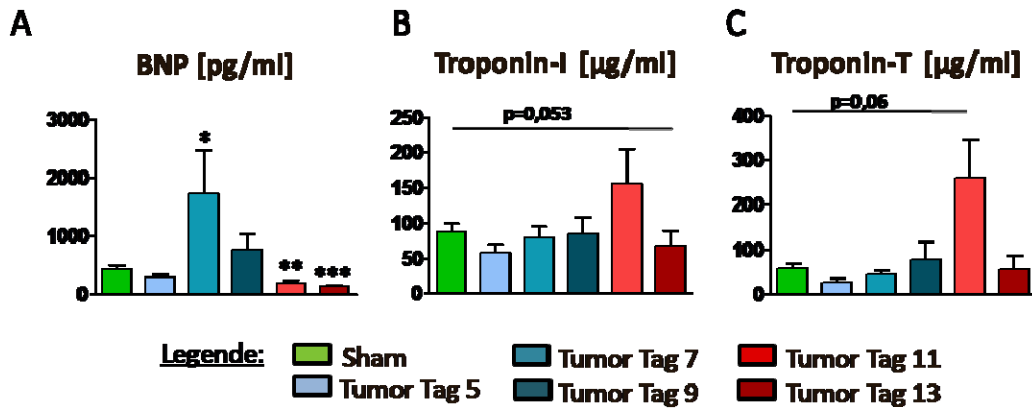


Abbildung 28. **Messung von Biomarkern für Herzinsuffizienz im Tumorversuch.** BNP (A), Troponin-I (B) und Troponin-T (C) wurden im Plasma gemessen. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Sham.

### 3.1.6.6 Fibrose

Aufgrund der festgestellten Tumorkachexie-induzierten Schädigung des Myokards sollte das Gewebe mittels Masson Goldner Trichromfärbung auf vermehrtes Bindegewebe und somit auf Fibrose untersucht werden (Abbildung 29). Dabei wurden das Muskelgewebe rot und das Bindegewebe, das Kollagenfasern beinhaltet, blau gefärbt. Mit fortschreitender Tumorentwicklung nahm die Bildung von Bindegewebe zu.

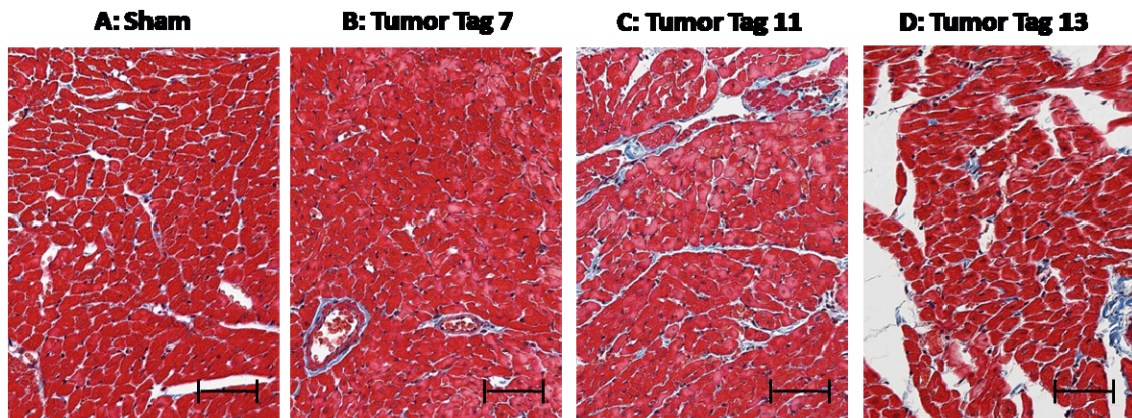


Abbildung 29. **Masson Goldner Trichromfärbung des linksventrikulären Gewebe in der Tumorstudie.** Darstellung einer Shamprobe (A) und von Tumorproben vom Tag 7 (B), 11 (C) und 13 (D). Muskelgewebe ist rot und Bindegewebe blau angefärbt. Maßstabsbalken:  $1\mu\text{m}$ .

Weiterhin wurden Fibrinogen, MCP-1 und TIMP-1 im Plasma untersucht (Abbildung 30). Fibrinogen war signifikant am Tag 7, 9, 11 und 13 in den Tumortieren erhöht, was auch auf die Bildung von Fibrose hindeutet. MCP-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*) und TIMP-1 waren ebenso mit fortschreitender Tumorkachexie signifikant im Plasma erhöht.

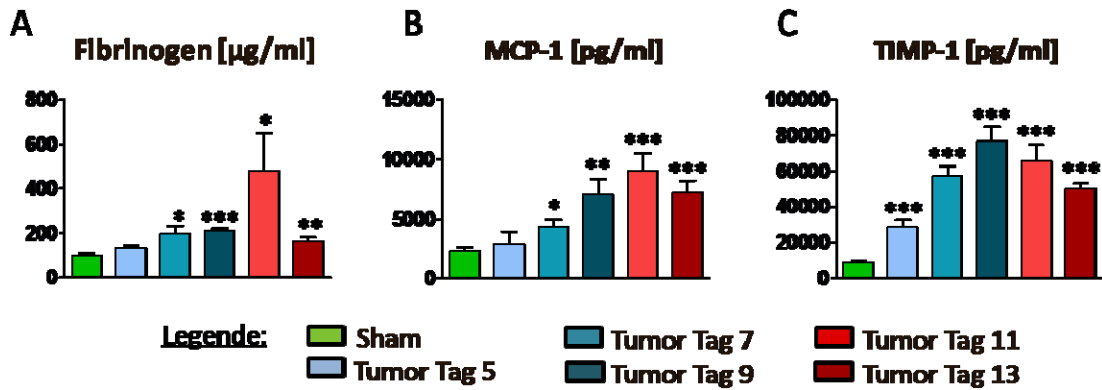


Abbildung 30. Plasma-Messung von Fibrinogen, MCP-1 und TIMP-1 im Tumorversuch. Angaben als Mittelwert ± SEM. \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001 vs. Sham.

### 3.1.7 Katabole Mechanismen im Herzen

Da das Herz im Tumorkachexiemodell gegenüber den Kontrolltieren an Gewicht verlor und im Infarktmodell an Masse zunahm, wurden Atrophie- und Hypertrophie-vermittelnde Signalwege analysiert.

#### 3.1.7.1 Apoptose

Zuerst wurde die Aktivität der Caspase-3 und Caspase-6 als Marker für Apoptose im Herzgewebe gemessen (Abbildung 31 und Abbildung 32). Die Aktivität beider Caspasen war 56 und 210 Tage nach Infarktinduktion unverändert. Im Yoshida Hepatoma Modell wurde die höchste Aktivität von Caspase-3 und Caspase-6 am Tag 11 nach Tumorinokulation festgestellt (Caspase-3: p=0,0008 Sham vs. Tumor Tag 11). Dies zeigt, dass es im Tumormodell vermehrt zu Apoptose kam, während sie im Infarktmodell unverändert war.

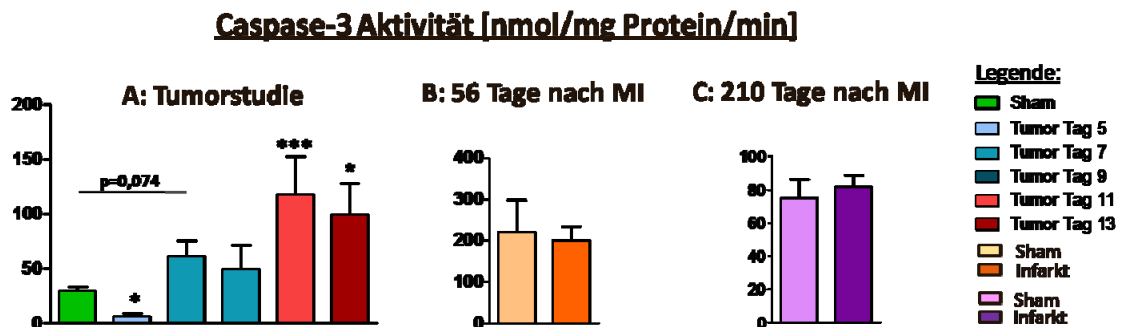


Abbildung 31. Caspase-3 Aktivität [nmol/mg Protein/min] im Herzgewebe im Tumorversuch (A) und 56 (B) und 210 Tage (C) nach myokardialen Infarkt. Angaben als Mittelwert ± SEM. \*: p<0,05, \*\*\*: p<0,001 vs. Sham. MI=Myokardialer Infarkt.



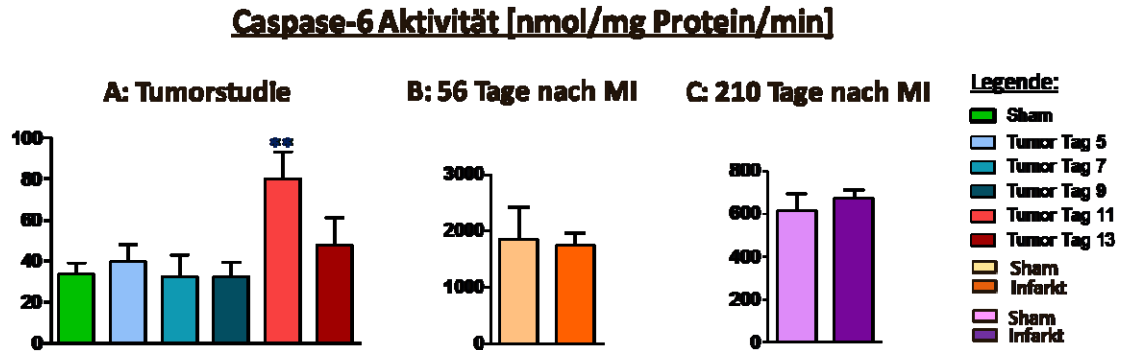


Abbildung 32. Caspase-6 Aktivität [nmol/mg Protein/min] im Herzgewebe im Tumorversuch (A) und 56 (B) und 210 Tage (C) nach myokardialen Infarkt. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*:  $p < 0,01$  vs. Sham. MI=Myokardialer Infarkt.

### 3.1.7.2 Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Die Analyse des Ubiquitin-Proteasom-Systems (Abbildung 33) diente zur Untersuchung von Proteindegradation. 56 Tage nach Infarktinduktion war die Aktivität signifikant um 38,4% verringert ( $p = 0,0428$  Sham vs. Infarkt Tag 56). Bei den Infarktieren von Tag 210 war die *Trypsin-like*-Aktivität gegenüber Shamtieren unverändert. Durch Tumorinokulation verringerte sich die Ubiquitin-Proteasom-Aktivität am Tag 5 ohne Erreichen statistischer Signifikanz und hatte ihre höchste Aktivität am Tag 11 verglichen mit den gesunden Tieren ( $p = 0,0427$  Sham vs. Tumor Tag 11). Am Tag 13 nach Tumorinokulation war die *Trypsin-like*-Aktivität signifikant verringert ( $p = 0,0442$  Sham vs. Tumor Tag 13).

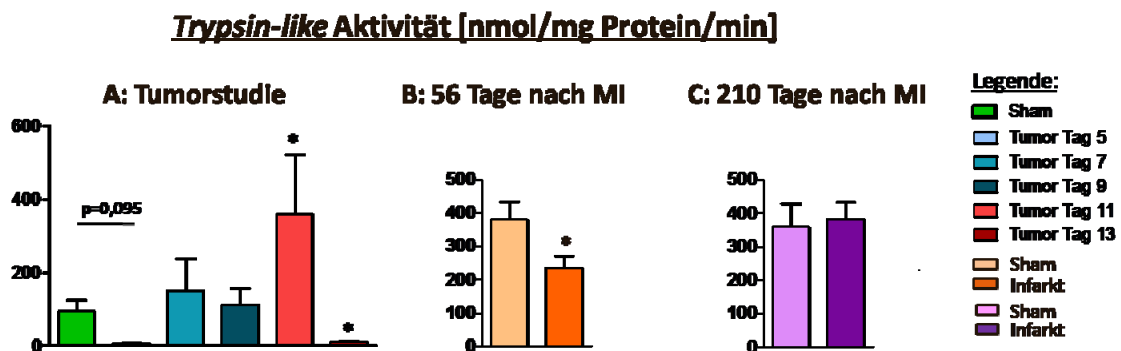


Abbildung 33. *Trypsin-like* Aktivität [nmol/mg Protein/min] im Herzgewebe im Tumorversuch (A) und 56 (B) und 210 Tage (C) nach myokardialen Infarkt. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$  vs. Sham. MI=Myokardialer Infarkt.

Die Messung von miR-199a, die u.a. die Expression von den Ubiquitin-konjugierenden Enzymen Ube2i und Ube2g1 inhibiert, zeigte eine signifikante Reduzierung mit fortschreitender Tumorentwicklung (Abbildung 34).

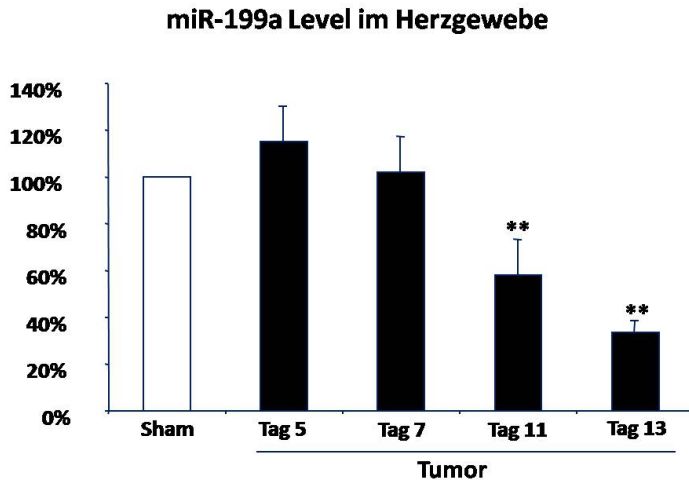


Abbildung 34. miR-199a im Herzgewebe von Sham- und Tumortieren. Angaben als Mittelwert ± SEM. \*\*: p<0,01 vs Sham.

### 3.1.7.3 Foxo3α und MuRF-1

In Abbildung 35 sind die Ergebnisse der Proteinanalyse von MuRF-1, Foxo3α und pFoxo3α dargestellt.

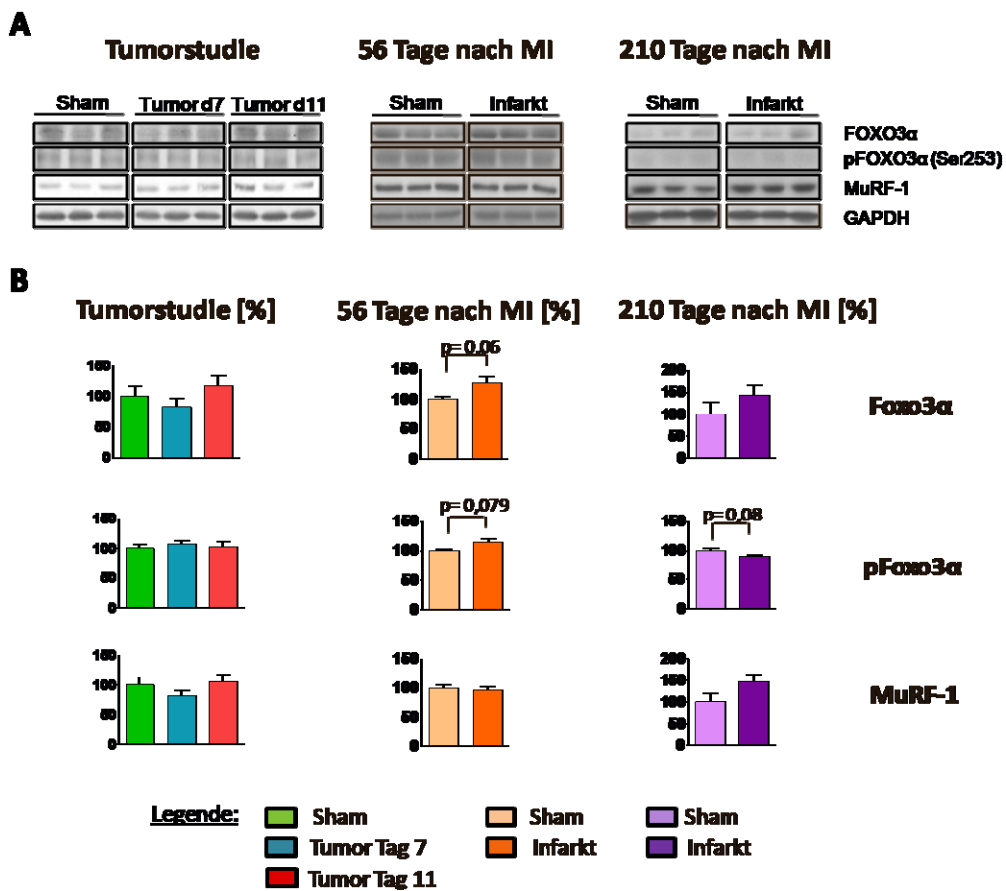


Abbildung 35. Western Blot Analyse von Foxo3α, pFoxo3α und MuRF-1 im Herzgewebe im Tumorversuch und 56 und 210 Tage nach myokardialen Infarkt. Darstellung der Western Blots (A) und Ergebnisse in % von der Shamgruppe (B). MI=Myokardialer Infarkt.

Die Signalproteine wurden im Tumorversuch nur von den Shamtieren und den Tumortieren von Tag 7 und Tag 11 analysiert, da die Tumortiere ab Tag 7 kachektisch wurden und am Tag 11 die höchste Caspase-3, -6 als auch Ubiquitin-Proteasom-Aktivität gemessen wurde.

Die Western Blot-Analyse der Ubiquitin-E3-Ligase MuRF-1 war im Tumorversuch und in beiden Infarktversuchen unverändert. Die Proteinexpression von Foxo3 $\alpha$  und pFoxo3 $\alpha$  zeigte weder im Tumorversuch noch in den Infarktstudien eine signifikante Änderung.

### 3.1.7.4 Autophagie

Der Autophagie-Marker p62 (Abbildung 36), der im Autophagosom abgebaut wird, war im Herzgewebe der Tumortiere am Tag 7 und Tag 11 gegenüber Sham signifikant reduziert ( $p=0,0064$  Sham vs. Tumor Tag 7;  $p=0,0002$  Sham vs. Tumor Tag 11). p62 lag in den Infarktstudien unverändert vor. Somit konnte im Yoshida Hepatoma Modell eine Erhöhung der Autophagie nachgewiesen werden.

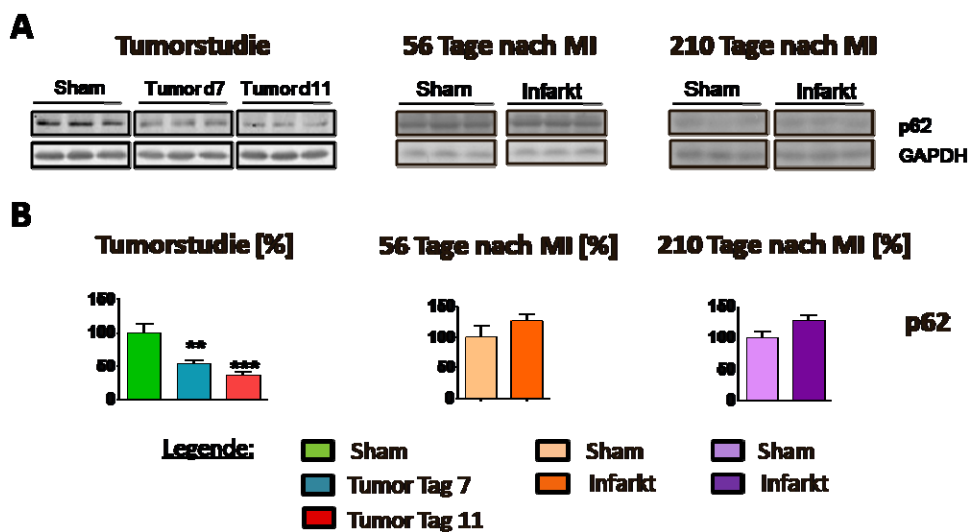


Abbildung 36. **Western Blot Analyse von p62 im Herzgewebe im Tumorversuch und 56 und 210 Tage nach myokardialen Infarkt.** Darstellung der Western Blots (A) und Ergebnisse in % von der Shamgruppe (B). Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*:  $p<0,01$ , \*\*\*:  $p<0,001$  vs. Sham. MI=Myokardialer Infarkt.

### 3.1.8 Anabole Signalwege im Herzen

Akt, dargestellt in Abbildung 37, war 7 Tage nach Tumorinokulation gegenüber Sham nicht signifikant leicht erhöht und erreichte am Tag 11 wieder Shamniveau. Die Phosphorylierungen von Akt an den Aminosäuren Serin 473 und Threonin 308 waren durch Tumorinokulation am Tag 11 hochsignifikant reduziert. Im Infarktmodell gab es keine Änderung der Menge von Akt oder der Phosphorylierung von Akt an Serin 473. 56 Tage nach der Infarktoperation erhöhte sich die Phosphorylierung von Akt an Threonin 308 um 110% verglichen mit der Shamgruppe. Am Tag 210 zeigt sich keine Veränderung dieser Phosphorylierung von Akt bei den Sham- und Infarkttieren.

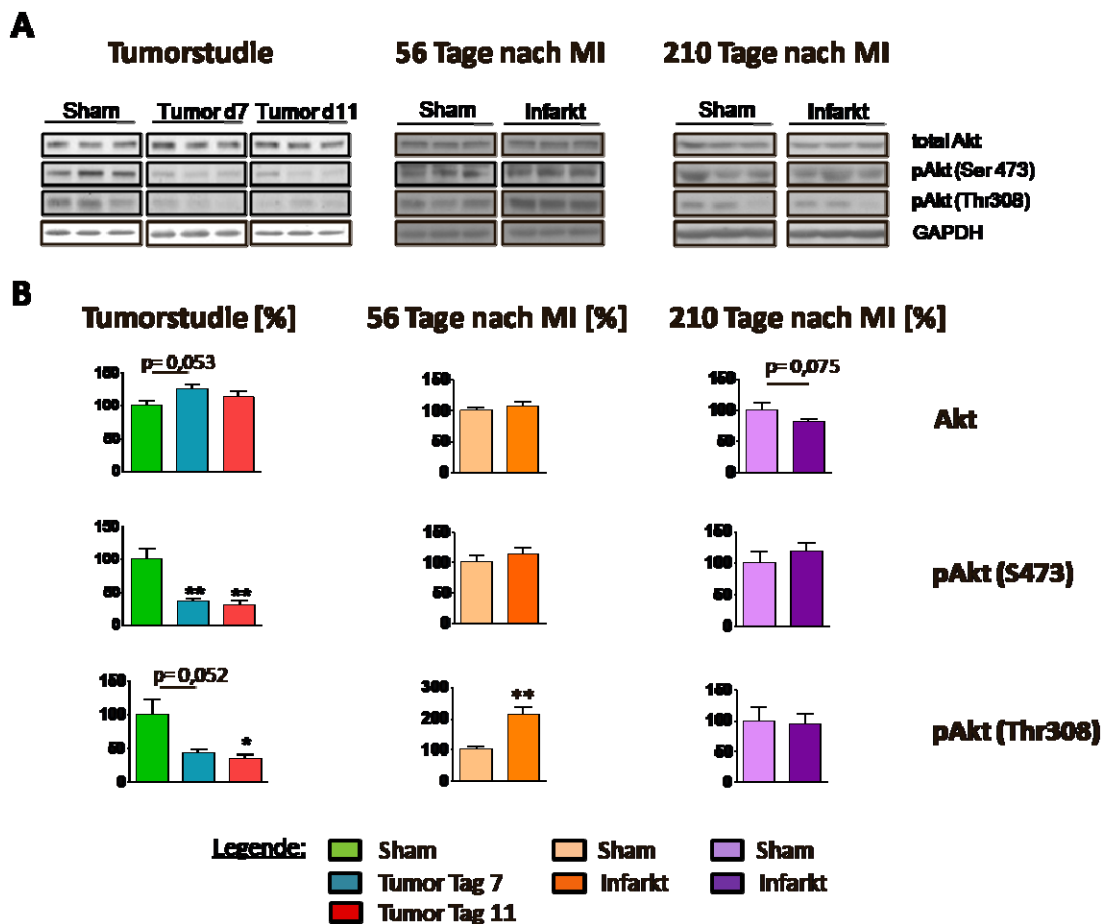


Abbildung 37. Western Blot Analyse von Akt im Herzgewebe im Tumorversuch und 56 und 210 Tage nach myokardialen Infarkt. Darstellung der Western Blots (A) und Ergebnisse in % von der Shamgruppe (B). Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$  vs. Sham. MI=Myokardialer Infarkt.

Die Western Blot Ergebnisse der restlichen Proteine sind in Abbildung 38 und Tabelle 31 zu sehen. Die Menge der anabolen Signalproteine p70S6K und p4EBP1 Serin 65 und Threonin 37/46 nahm durch Tumorinokulation signifikant ab.

Der Translationsinhibitor 4EBP1 konnte vermehrt in den Tumortieren am Tag 7 und 11 nachgewiesen werden. Die Phosphorylierungen von GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  waren auch signifikant durch Tumoringokulation verringert, während unphosphoryliertes GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  zunahmen und somit inhibierend auf die Glykogensynthese wirken konnten. Die Menge vom aktiven und inaktiven AMPK änderte sich im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell nicht. Myostatin, das Atrophie vermittelnde Signalwege induziert, konnte in größeren Mengen mit fortschreitender Tumorentwicklung gezeigt werden. Hingegen war pSmad-2, das sich downstream von Myostatin befindet, signifikant durch Tumoringokulation reduziert.

p70S6K war vermehrt am Tag 56 und Tag 210 nach Infarktoperation vorhanden, gleichzeitig blieb dessen Phosphorylierung unverändert. Die Menge an 4EBP1 veränderte sich nicht durch Infarktoperation, jedoch zeigte sich eine Reduktion der Phosphorylierung von 4EBP1 an Serin 65 am Tag 210 und eine gesteigerte Phosphorylierung an Threonin 37/46 am Tag 56 und Tag 210 nach Infarktoperation. Unphosphoryliertes und phosphoryliertes GSK-3 $\alpha$  und GSK-3 $\beta$  nahmen 56 Tage nach Infarzierung von myokardialelem Gewebe im gleichen Maß um ca. 50% gegenüber Sham zu. Am Tag 210 lag GSK-3 $\alpha$  unverändert vor, während unphosphoryliertes GSK-3 $\beta$  in der Infarktgruppe verringert vorlag und der Anteil von dem phosphoryliertem GSK-3 $\beta$  signifikant gesteigert wurde. Myostatin und pSmad-2 lagen unverändert in den Infarkttieren gegenüber Sham vor.

Zusammengefasst zeigen die Western Blot Ergebnisse, dass die Proteinsynthese im Yoshida Hepatoma Modell inhibiert wurde und durch Infarktoperation leicht durch die Inhibition von GSK-3 $\beta$  gesteigert wurde.

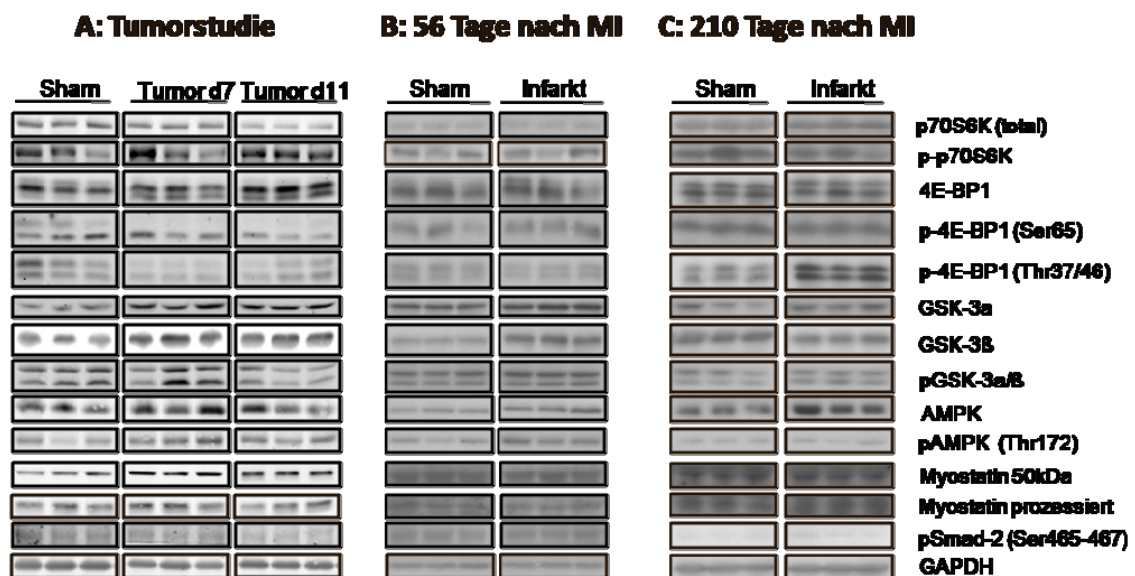


Abbildung 38. Western Blot Analyse des Herzgewebe im Tumorversuch (A) und 56 (B) und 210 Tage (C) nach myokardialelem Infarkt. MI=Myokardialer Infarkt.

Tabelle 31. Ergebnisse der Western Blot Analyse des Herzgewebes im Tumorversuch und 56 und 210 Tage nach myokardialem Infarkt. Ergebnisse sind in % von der Shamgruppe angegeben. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Sham. MI=Myokardialer Infarkt.

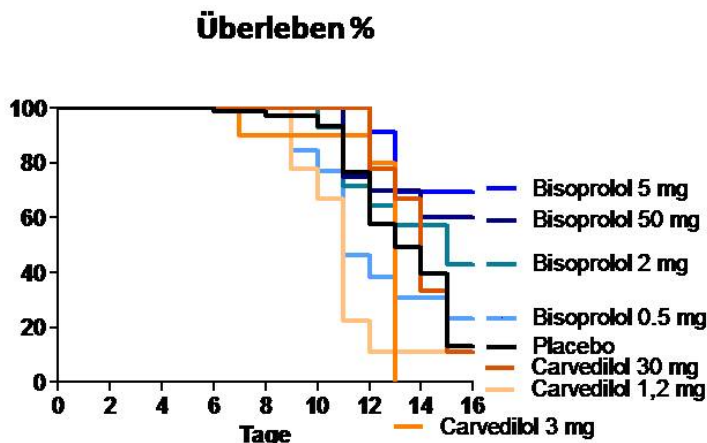
	Tumorversuch			Tag 56 nach MI		Tag 210 nach MI	
	Sham	Tumor Tag 7	Tumor Tag11	Sham	MI	Sham	MI
n-Anzahl	5	6	6	9	12	7	17
p70S6K [%]	100 $\pm 10,25$	61,8 $\pm 14,58$	31,4 $\pm 7,50^{**}$	100 $\pm 11,41$	145 $\pm 11,12^*$	100 $\pm 11,30$	154 $\pm 9,47^{**}$
p-p70S6K [%]	100 $\pm 36,8$	232 $\pm 57,9$	95,0 $\pm 28,3$	100 $\pm 21,9$	87,9 $\pm 15,35$	100 $\pm 33,4$	48,7 $\pm 7,72$
4E-BP1 [%]	100 $\pm 5,19$	131 $\pm 9,50$	292 $\pm 55,8^{**}$	100 $\pm 6,31$	105 $\pm 6,27$	100 $\pm 8,43$	105 $\pm 5,99$
p-4E-BP1 (Ser65) [%]	100 $\pm 12,83$	52,7 $\pm 6,35^{**}$	46,1 $\pm 6,08^{**}$	100 $\pm 15,10$	130 $\pm 11,62$	100 $\pm 8,42$	62,2 $\pm 4,28^{***}$
p-4E-BP1 (Thr37/46) [%]	100 $\pm 14,38$	48,5 $\pm 4,69^{**}$	48,2 $\pm 9,99^*$	100 $\pm 6,75$	197 $\pm 31,3^*$	100 $\pm 10,27$	245 $\pm 31,0^{***}$
GSK-3 $\alpha$ [%]	100 $\pm 22,3$	302 $\pm 70,0^*$	330 $\pm 15,9^*$	100 $\pm 5,97$	166 $\pm 10,11^{***}$	100 $\pm 16,40$	121 $\pm 11,78$
p-GSK-3 $\alpha$ (Ser21) [%]	100 $\pm 14,30$	97,8 $\pm 21,1$	55,0 $\pm 8,57^*$	100 $\pm 7,63$	168 $\pm 11,64^{***}$	100 $\pm 14,52$	109 $\pm 11,94$
GSK-3 $\beta$ [%]	100 $\pm 19,64$	211 $\pm 27,8^*$	238 $\pm 28,4^{**}$	100 $\pm 8,57$	153 $\pm 13,06^{**}$	100 $\pm 13,55$	66,9 $\pm 4,03^{**}$
pGSK-3 $\beta$ (Ser9) [%]	100 $\pm 21,6$	144 $\pm 49,7$	47,5 $\pm 5,76^*$	100 $\pm 2,63$	174 $\pm 12,88^{***}$	100 $\pm 19,08$	138 $\pm 12,38^*$
AMPK $\alpha$ [%]	100 $\pm 16,01$	174 $\pm 30,5$	137 $\pm 21,3$	100 $\pm 11,02$	295 $\pm 39,4^{***}$	100 $\pm 16,15$	201 $\pm 14,71^{***}$
p-AMPK $\alpha$ (Thr172) [%]	100 $\pm 15,59$	145 $\pm 24,9$	130 $\pm 19,06$	100 $\pm 21,8$	256 $\pm 30,3^{**}$	100 $\pm 12,17$	90,3 $\pm 9,68$
Myostatin 50kDa [%]	100 $\pm 20,5$	160 $\pm 26,7$	148 $\pm 78,1$	100 $\pm 16,14$	93,0 $\pm 9,14$	100 $\pm 23,6$	152 $\pm 25,3$
Myostatin prozessiert [%]	100 $\pm 6,88$	167 $\pm 16,3^{**}$	159 $\pm 22,3^*$	100 $\pm 17,25$	111 $\pm 15,87$	100 $\pm 89,3$	173 $\pm 98,8$
p-Smad-2 (Ser465/467) [%]	100 $\pm 29,3$	74,9 $\pm 7,48$	35,0 $\pm 7,09^{**}$	100 $\pm 8,59$	111 $\pm 11,88$	100 $\pm 14,71$	111 $\pm 13,62$

### 3.2 Pharmakologische Behandlung tumorinduzierter Kardiomyopathie

In diesem Abschnitt sollte der Effekt kardiovaskulärer Medikamente auf die tumorinduzierte Kachexie (AH-130 Modell) und deren verursachte Kardiomyopathie in Ratten untersucht werden.

#### 3.2.1 Überleben

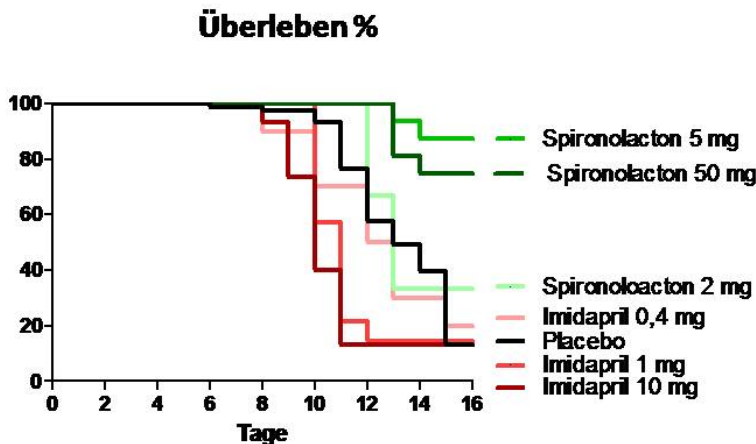
Die Überlebensanalysen erfolgten mittels Kaplan-Meier-Darstellung (Abbildung 39, Abbildung 40). Die Überlebensrate für die mit Tumor inokulierten Tiere (Placebo) bis Tag 16 betrug 13% und somit lag die Mortalität bei 87%. Behandlung der Tumortiere mit verschiedenen Dosen Bisoprolol erhöhte das Überleben auf 43% bis 69%, wobei 5mg/kg/d Bisoprolol die beste Dosis mit einer Überlebensrate von 69% war (HR:0,32, 95%CI: 0,18-0,60, p=0,0003). Die niedrigste Dosis Bisoprolol hatte keinen positiven Effekt auf das Überleben.



Biso 0,5 vs Placebo:	HR: 1,34, 95%CI: 0,58-3,14, p=0,49
Biso 2 vs Placebo:	HR: 0,54, 95%CI: 0,26-1,13, p=0,10
<b>Biso 5 vs Placebo:</b>	<b>HR: 0,32, 95%CI: 0,18-0,60, p=0,0003</b>
Biso 50 vs Placebo:	HR: 0,43, 95%CI: 0,23-0,83, p=0,0118
Carv 1,2 vs Placebo:	HR: 5,71, 95%CI: 1,67-19,6, p=0,0004
Carv 3 vs Placebo:	HR: 2,24, 95%CI: 0,89-5,68, p=0,09
Carv 30 vs Placebo:	HR: 0,89, 95%CI: 0,38-2,09, p=0,79

Abbildung 39. Kaplan-Meier- Überlebensanalyse von Placebo, Bisoprolol (0,5mg/kg/d, 2mg/kg/d, 5mg/kg/d und 50mg/kg/d) und Carvedilol (1,2mg/kg/d, 3mg/kg/d und 30mg/kg/d).

5mg/kg/d und 50mg/kg/d Spironolacton verbesserten das Überleben der Tiere auf 87% bzw. 75%. Dabei zeigte sich jedoch, dass Tumortiere, die mit 5mg/kg/d Spironolacton behandelt wurden, keine verbesserte Herzfunktion hatten, so dass die beste Dosis für Spironolacton bei 50mg/kg/d lag. Alle anderen Dosen sowie Carvedilol (1,2mg/kg/d, 3mg/kg/d oder 30mg/kg/d) und Imidapril (0,4mg/kg/d, 1mg/kg/d oder 10mg/kg/d) hatten keinen positiven Effekt auf das Überleben der Tumortiere.



Spiro 2 vs Placebo: HR: 0,72, 95%CI: 0,25-2,06, p=0,54  
 Spiro 5 vs Placebo: HR: 0,31, 95%CI: 0,16-0,60, p=0,0007  
**Spiro 50 vs Placebo: HR: 0,26, 95%CI: 0,19-0,53, p=0,0002**  
 Imida 0,4 vs Placebo: HR: 1,23, 95%CI: 0,49-3,09, p=0,66  
 Imida 1 vs Placebo: HR: 4,03, 95%CI: 1,54-10,5, p=0,0044  
 Imida 10 vs Placebo: HR: 6,35, 95%CI: 2,37-17,0, p=0,0002

Abbildung 40. Kaplan-Meier- Überlebensanalyse von Placebo, Spironolacton (2mg/kg/d, 5mg/kg/d oder 50mg/kg/d) und Imidapril (0,4mg/kg/d, 1mg/kg/d oder 10mg/kg/d).

### 3.2.2 Tumorzellzahl und Tumolvolumen

Für die folgenden Analysen wurden nur 5mg/kg/d Bisoprolol und 50mg/kg/d Spironolacton mit einbezogen, da sie das beste Überleben in dem Yoshida Hepatoma Modell bewirkten. Zusätzlich dazu wurden die Ergebnisse für 30mg/kg/d Carvedilol und 0,4mg/kg/d Imidapril gezeigt, da sie sich nicht positiv auf das Überleben der Tumortiere auswirkten.

Placebotiere hatten ein durchschnittliches Tumolvolumen von  $130 \pm 2,57$ ml entwickelt (Abbildung 41). Behandlung der Tumortiere mit 5mg/kg/d Bisoprolol oder 0,4mg/kg/d Imidapril konnte das Zellvolumen signifikant auf  $92,7 \pm 10,54$ ml bzw.  $110 \pm 3,68$ ml reduzieren. Desweiteren führten 5mg/kg/d Bisoprolol und 50mg/kg/d Spironolacton zu einer gegenüber Sham signifikant erhöhten Zellzahl. Carvedilol veränderte weder das Zellvolumen noch die Zellzahl.



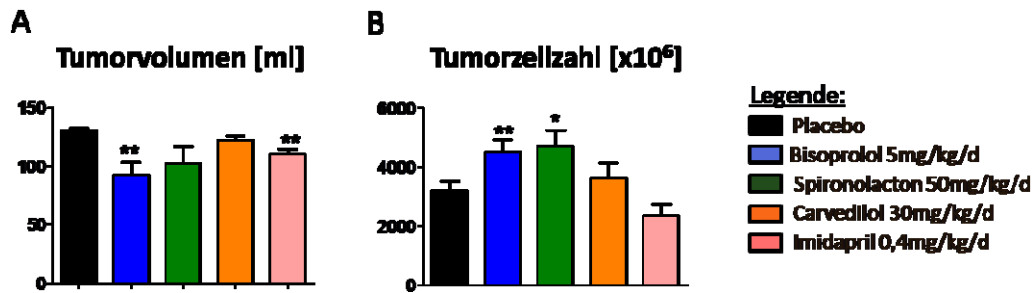


Abbildung 41. Tumorvolumen [ml] (A) und Tumorzellzahl [x10<sup>6</sup>] (B) in der Interventionsstudie. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$  vs. Placebo.

### 3.2.3 Körpergewicht und Körperzusammensetzung

Zur Analyse des Körpergewichts und der Körperzusammensetzung wurden zuerst die Ausgangswerte ermittelt (Tabelle 32). Dabei zeigte sich, dass alle Werte gleich waren, bis auf eine leicht höhere Fettmasse in der Placebogruppe.

Tabelle 32. Baseline-Werte für das Körpergewicht, fettfreie Masse und Fettmasse in der Interventionsstudie. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. KG=Körpergewicht, Basiso=Bisoprolol, Spiro= Spironolacton

Gruppe	Sham	Placebo	5mg/kg/d Basiso	50mg/kg/d Spiro	30mg/kg/d Carvedilol	0,4mg/kg/d Imidapril
n-Anzahl	16	78	23	16	9	10
Baseline KG [g]	203 $\pm 3,53$	206 $\pm 1,37$	204 $\pm 2,34$	200 $\pm 4,13$	204 $\pm 1,86$	204 $\pm 2,06$
Baseline Fettfreie Masse [g]	158 $\pm 2,89$	158 $\pm 1,03$	158 $\pm 1,78$	155 $\pm 2,98$	156 $\pm 2,04$	159 $\pm 1,62$
Baseline Fettmasse [g]	15,61 $\pm 0,61$	18,77 $\pm 0,38$	16,72 $\pm 0,62$	15,44 $\pm 0,96$	16,89 $\pm 0,96$	17,46 $\pm 0,73$

Am Ende dieser Studie hatten die gesunden Tiere 29% Körpergewicht, 26% fettfreie Masse und 58% Fettmasse zugenommen (Abbildung 42). Placebotiere entwickelten Kachexie, die sich durch einen Verlust von 26% Körpergewicht, 25% fettfreie Masse und 66% Fettmasse äußerte. Tiere, die mit 5mg/kg/d Bisoprolol und 50mg/kg/d Spironolacton behandelt wurden, verloren nicht soviel Körpergewicht wie die Placebotiere. Desweiteren wiesen diese Behandlungsgruppen einen geringeren Verlust der fettfreien Masse und des Fettgewebes auf. Diese Gewichtsunterschiede waren signifikant zu den Placebotieren und bewiesen eine Verbesserung des kachektischen Zustands der Tumortiere durch Bisoprolol oder Spironolacton ( $p < 0,0001$  Bisoprolol vs. Placebo;  $p < 0,0001$  Spironolacton vs. Placebo). Carvedilol veränderte weder das Körpergewicht, noch die fettfreie Masse und das Fettgewebe. Imidapril konnte den Gewichtsverlust aller drei Parameter signifikant verringern ( $p = 0,001$  Imidapril vs. Placebo).

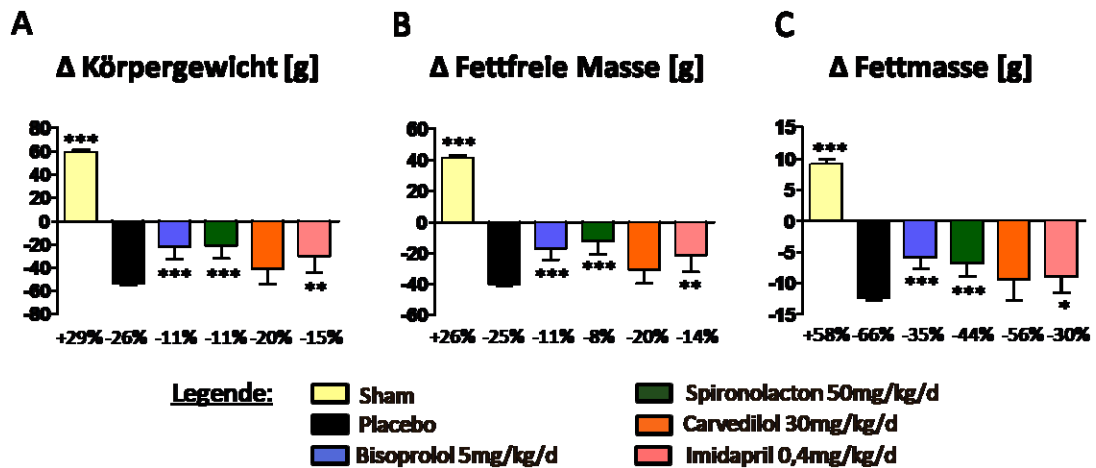


Abbildung 42. Veränderung des Körpergewichtes [g] (A, ohne Tumor), der fettfreien Masse [g] (B) und des Fettgewebes [g] (C) in der Interventionsstudie. Unter den Graphen ist die Änderung des jeweiligen Parameters im Vergleich zur Baseline in % angegeben. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Placebo.

### 3.2.4 Lebensqualität

Vor Beginn der Studie betrug die Nahrungsaufnahme der Tiere zwischen  $17,89 \pm 0,31$ g bis  $20,4 \pm 0,50$ g und die Aktivität lag zwischen  $74.232 \pm 3.134$  counts/24h und  $80.486 \pm 1.391$  counts/24h. Die Placebotiere entwickelten Anorexie, was sich durch die Messung der Nahrungsaufnahme zeigte (Abbildung 43). Sie nahmen 79% weniger Futter auf und reduzierten ihre Bewegung um 62%. Mit Bisoprolol und Spironolacton behandelte Tiere erhöhten signifikant die Nahrungsaufnahme und Lokomotoraktivität gegenüber Placebo, während Carvedilol und Imidapril die Anorexie nicht verringern konnten. Carvedilol konnte die Bewegung der Tiere auf -46% gegenüber Placebo verbessern.

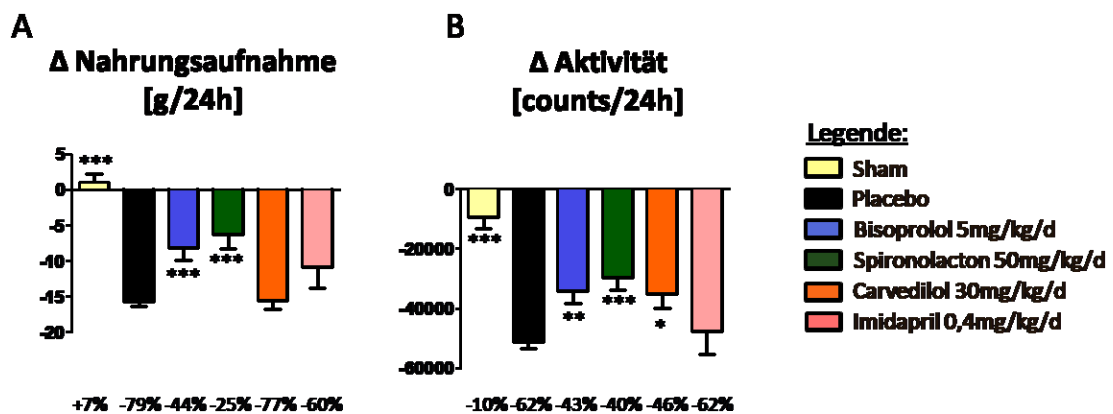


Abbildung 43. Veränderung der Nahrungsaufnahme [g/24h] (A) und Aktivität [counts/24h] (B) in der Interventionsstudie. Unter den Graphen ist die Änderung des Parameters im Vergleich zur Baseline in % angegeben. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Placebo.

### 3.2.5 Herzfunktion

In Tabelle 33 sind die echokardiographischen Ausgangsdaten abgebildet, aus denen zusammen mit den finalen Werten erneut die Veränderungen für jeden Parameter für jede Gruppe berechnet wurden.

Tabelle 33. Echokardiographische Baseline-Werte für die Interventionsstudie. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. LV=linksventrikulär, EF=Auswurfsfraktion, FS=Verkürzungsfraktion, SV=Schlagvolumen, EDD=enddiastolischer Diameter, ESD=endsystolischer Diameter, HW=Hinterwandstärke.

Gruppe	Sham	Placebo	5mg/kg/d Bisoprolol	50mg/kg/d Spironolacton	30mg/kg/d Carvedilol	0,4mg/kg/d Imidapril
<b>n-Anzahl</b>	12	54	23	16	9	10
<b>Baseline LV Masse [mg]</b>	537 $\pm 33,6$	519 $\pm 11,87$	470 $\pm 14,83$	436 $\pm 12,94$	456 $\pm 15,01$	565 $\pm 29,0$
<b>Baseline LV EF [%]</b>	72,2 $\pm 2,39$	75,5 $\pm 1,10$	74,7 $\pm 1,79$	72,2 $\pm 1,60$	64,7 $\pm 2,12$	62,0 $\pm 2,94$
<b>Baseline LV FS [%]</b>	48,0 $\pm 1,70$	49,7 $\pm 0,92$	48,0 $\pm 1,41$	49,3 $\pm 1,18$	45,1 $\pm 1,79$	46,4 $\pm 1,86$
<b>Baseline LV SV [<math>\mu</math>l]</b>	177 $\pm 12,82$	190 $\pm 5,28$	199 $\pm 8,94$	199 $\pm 9,81$	171 $\pm 8,52$	144 $\pm 16,28$
<b>Baseline LV EDD [mm]</b>	6,22 $\pm 0,13$	6,23 $\pm 0,06$	6,45 $\pm 0,10$	6,36 $\pm 0,11$	6,53 $\pm 0,16$	6,12 $\pm 0,19$
<b>Baseline LV ESD [mm]</b>	3,23 $\pm 0,13$	3,13 $\pm 0,07$	3,30 $\pm 0,12$	3,23 $\pm 0,09$	3,59 $\pm 0,15$	3,30 $\pm 0,18$
<b>Baseline HW Diastole [mm]</b>	1,82 $\pm 0,08$	1,75 $\pm 0,04$	1,54 $\pm 0,05$	1,56 $\pm 0,04$	1,50 $\pm 0,05$	1,96 $\pm 0,11$
<b>Baseline HW Systole [mm]</b>	2,76 $\pm 0,11$	2,77 $\pm 0,05$	2,60 $\pm 0,06$	2,60 $\pm 0,06$	2,46 $\pm 0,05$	3,01 $\pm 0,11$

Die Ergebnis der zweiten echokardiographischen Messung sind in Abbildung 44, Abbildung 45 und Abbildung 46 zu sehen. Die linksventrikuläre Masse wurde um 18% nach Tumorinokulation reduziert. Desweiteren waren alle gemessenen Parameter wie zum Beispiel die linksventrikuläre Auswurfsfraktion, Verkürzungsfraktion und das Schlagvolumen in den Tumortieren signifikant gegenüber Sham verschlechtert. Die Gabe von 5mg/kg/d Bisoprolol bewirkte, dass die Tumortiere 2% linksventrikuläre Masse zunahmen (LV Masse:  $p=0,0027$  Bisoprolol vs. Placebo) und sich das Schlagvolumen (SV:  $p=0,0139$  Bisoprolol vs. Placebo) sowie der enddiastolische Diameter (EDD:  $p=0,0349$  Bisoprolol vs. Placebo) verbessert wurden. Diese Dose Bisoprolol hatte keinen positiven Einfluss auf die tumorinduzierte verschlechterte Auswurfsfraktion und Verkürzungsfraktion. 50mg/kg/d Spironolacton verbesserte signifikant die Auswurfsfraktion, die Verkürzungsfraktion und das Schlagvolumen und führte dazu, dass die Tumortiere ihre linksventrikuläre Masse um 9% steigerten (LV Masse:  $p<0,0001$  Spironolacton vs. Placebo).

Imidapril und Carvedilol konnten nur statistisch signifikant das Schlagvolumen gegenüber den Placebotieren verbessern, alle anderen Parameter der Herzfunktion blieben unverändert.

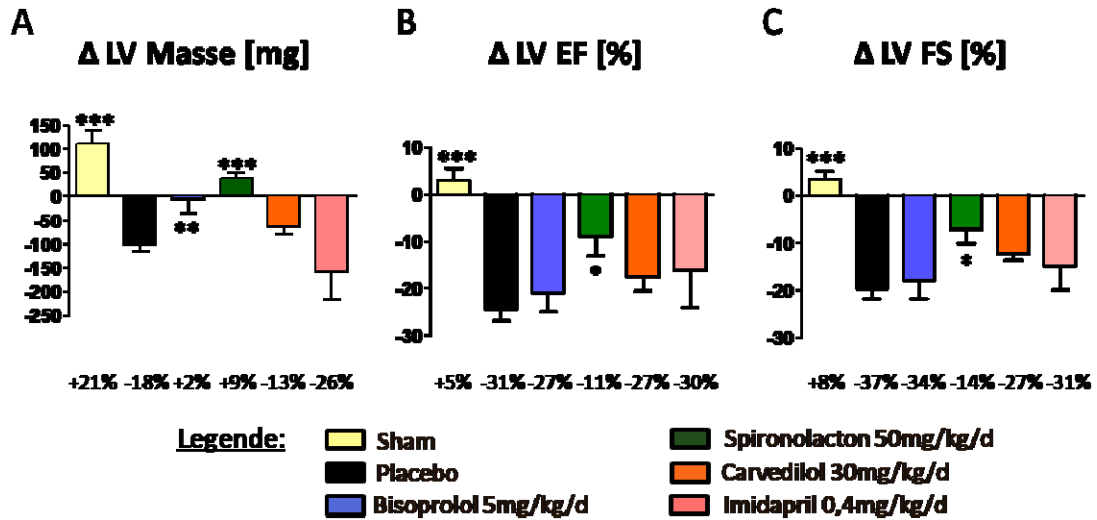


Abbildung 44. Veränderung der Parameter der Herzfunktion in der Interventionsstudie. Dargestellt sind ΔLV Masse (A), ΔLV EF (B) und ΔLV FS (C). Unter den Graphen ist die Änderung des Parameters im Vergleich zur Baseline in % angegeben. Angaben als Mittelwert ± SEM. \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001 vs. Placebo. LV=linksventrikulär, EF=Auswurfsfraktion, FS = Verkürzungsfraktion (*Fractional Shortening*).

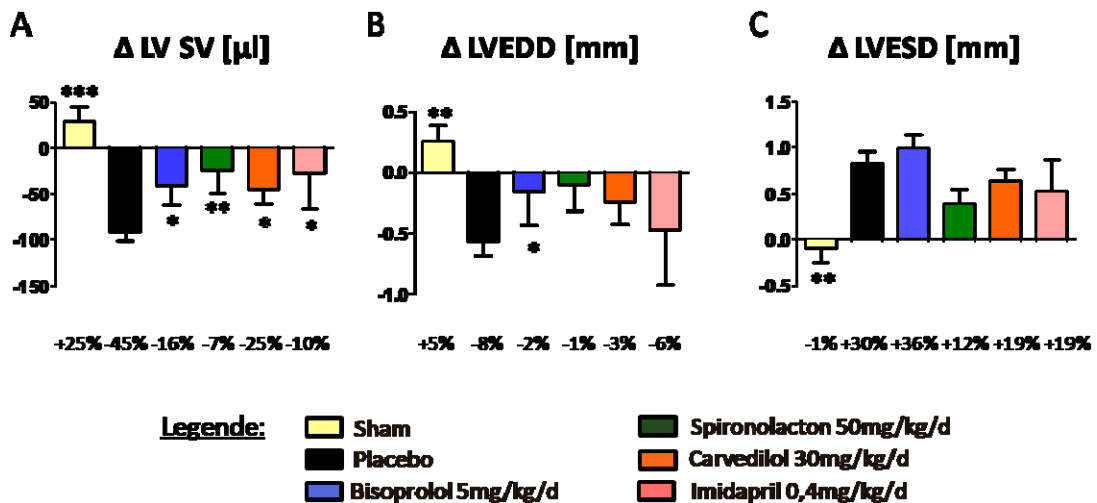


Abbildung 45. Veränderung der Parameter der Herzfunktion in der Interventionsstudie. Dargestellt sind ΔLV SV (A), ΔLV EDD (B) und ΔLV ESD (C). Unter den Graphen ist die Änderung des Parameters im Vergleich zur Baseline in % angegeben. Angaben als Mittelwert ± SEM. \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001 vs. Placebo. LV=linksventrikulär, SV=Schlagvolumen, EDD=Enddiastolischer Durchmesser, ESD=Endsystolischer Durchmesser.

Die Analyse der Hinterwandstärke in der Diastole (Abbildung 46) zeigte keine Veränderung durch kardiovaskuläre Behandlung gegenüber der Tumorgruppe. In der Systole kam es zu einer signifikanten Verbesserung der Hinterwandstärke durch Spironolacton gegenüber unbehandelten Tumortieren.

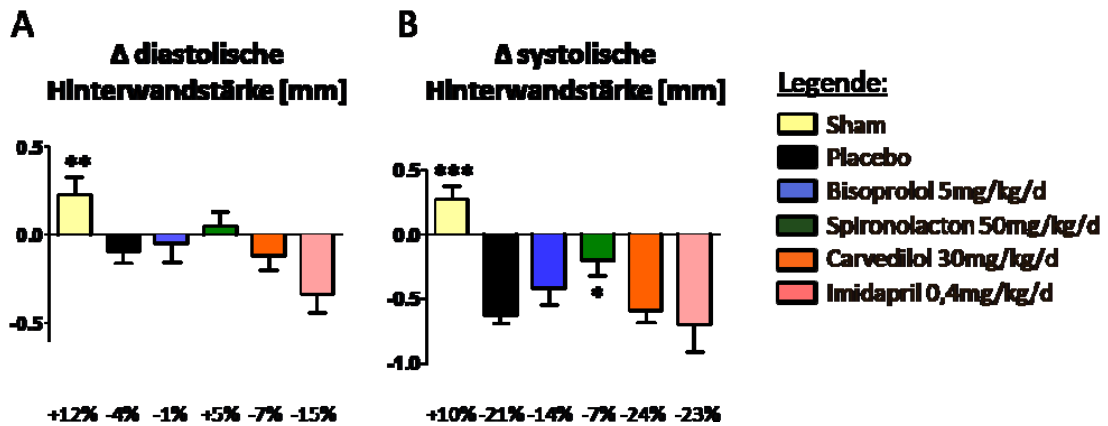


Abbildung 46. Veränderung der Hinterwandstärke [mm] in der Diastole und Systole in der Interventionsstudie. Unter den Graphen ist die Änderung des Parameters im Vergleich zur Baseline in % angegeben. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Placebo.

### 3.2.6 Korrelation

Die Korrelation der linksventrikulären Masse mit den Überlebenstagen (Abbildung 47) ergab, dass eine höhere Masse signifikant das Überleben der Tumortiere verlängerte (Pearson  $r: 0,34$ ,  $p=0,0029$ ).

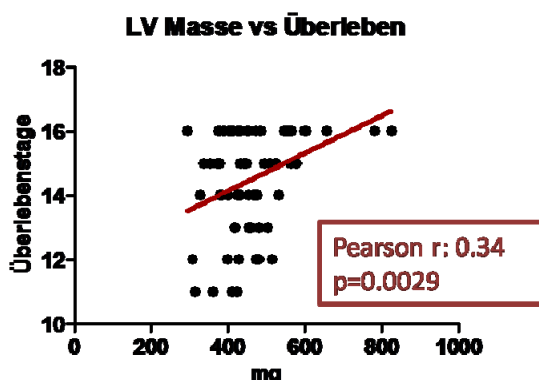


Abbildung 47. Korrelation zwischen der linksventrikulären Masse und den Überlebenstagen nach Pearson.

### 3.2.7 Biomarker

Die Messung von Aldosteron (Abbildung 48) aller kombinierten Tumortiere ergab eine 1,75fache Erhöhung der Konzentration im Plasma gegenüber den Shamtieren ( $p=0,0003$  Tumor vs. Sham). Auch die Werte für NGAL, Kalium, Kreatinin und Kreatinin Kinase, die als Marker für die renale Funktion dienen, waren signifikant gegenüber Shamtieren erhöht. Hingegen war die Konzentration von Natrium in den Tumortieren gegenüber Sham signifikant reduziert.

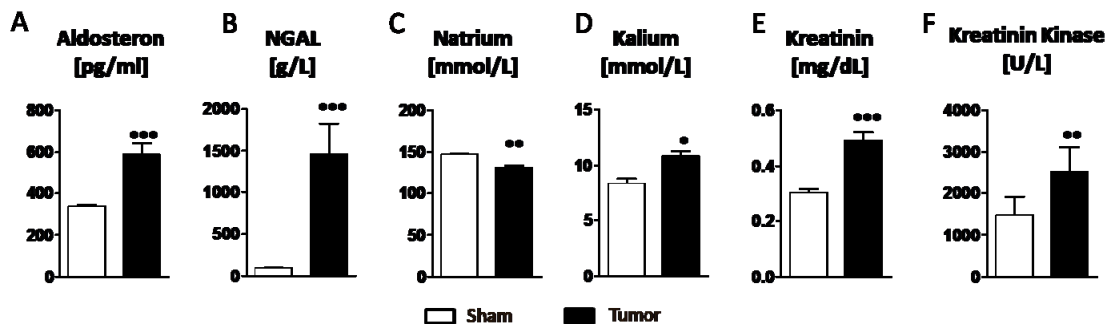


Abbildung 48. Plasma-Messung von Aldosteron (A), NGAL (B), Natrium (C), Kalium (D), Kreatinin (E) und von der Kreatinin Kinase (F) von Sham- und Tumortieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p<0,05$ , \*\*:  $p<0,01$ , \*\*\*:  $p<0,001$  vs. Placebo.

### 3.2.8 Katabole Abbauwege im Herzgewebe

#### 3.2.8.1 Apoptose

Die Messung der Aktivität der Caspase-3 (Abbildung 49) im Myokard ergab eine signifikante Erhöhung der Aktivität in den Tumortieren gegenüber Sham. Dieses Caspase-3 Aktivitätslevel konnte durch 50mg/kg/d Spironolacton signifikant auf das Niveau der gesunden Tiere gesenkt werden ( $p=0,0379$  Spironolacton vs. Placebo), während 5mg/kg/d Bisoprolol nicht signifikant verändert zu Placebo war. Carvedilol oder Imidapril behandelte Tiere zeigten zur Placebogruppe ähnliche Werte. Die Caspase-6-Aktivität wies keine Unterschiede zwischen allen Gruppen auf. Dies zeigt eine Verringerung der in Tumortieren vorhandenen Apoptose durch Spironolacton.

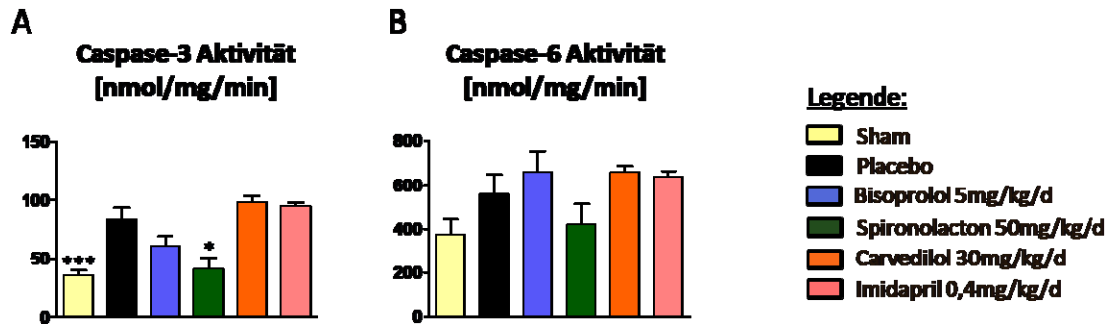


Abbildung 49. Effekte kardiovaskulärer Medikamente auf die Caspase-3 (A) und Caspase-6 (B) Aktivität [nmol/mg Protein/min] im Herzgewebe von Tumortieren. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs Placebo.

### 3.2.8.2 Ubiquitin-Proteasom-System

Die Analyse des Ubiquitin-Proteasom-Systems (Abbildung 50) zeigte eine >100%ige Steigerung aller drei Ubiquitin-Proteasom-Aktivitäten nach Tumoringulation. Die *Trypsin-like* Aktivität konnte durch 5mg/kg/d Bisoprolol oder 50mg/kg/d Spirolacton in den Tumortieren reduziert werden und deutete somit auf einen reduzierten Proteinabbau hin. Die Chymotrypsin- und PGPH-Aktivität waren in den behandelten und nicht behandelten Tumortieren erhöht. Carvedilol und Imidapril hatten keinen positiven Effekt auf die Senkung der Ubiquitin-Proteasom-Aktivität.

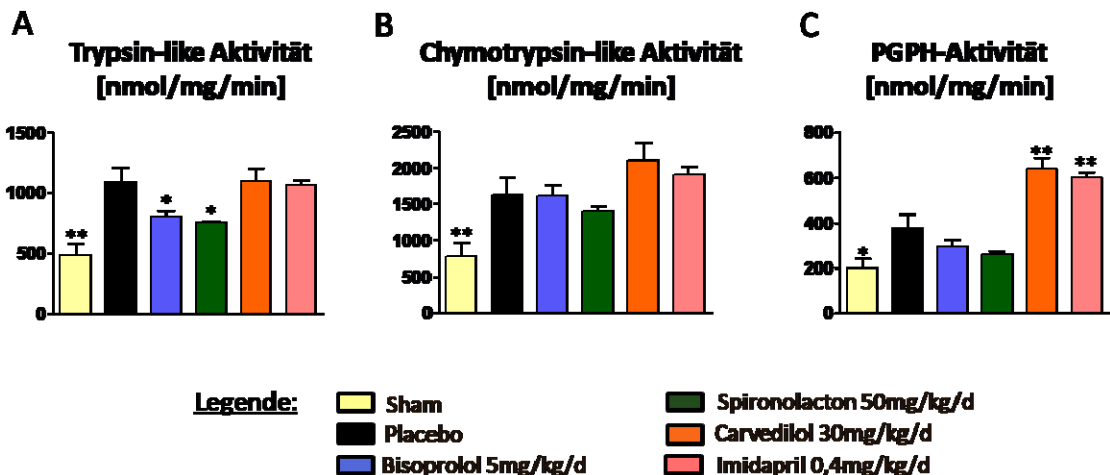


Abbildung 50. Effekte kardiovaskulärer Medikamente auf die Ubiquitin-Proteasom-Aktivität [nmol/mg Protein/min] im Herzgewebe von Tumortieren. Darstellung der *Trypsin-like* Aktivität (A), *Chymotrypsin-like* Aktivität (B) und Peptidyl-Glutamyl-Protein-Hydrolysierende (PGPH) Aktivität (C). Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$  vs. Placebo.

### 3.2.8.3 Autophagie

Durch Tumorinokulation wurde weniger p62 (Abbildung 51) nachgewiesen, das bei vorhandener Autophagie abgebaut wird. Auch eine Erhöhung der Menge von LC3-II, das bei Autophagie aus LC3-I entsteht, war in den Placebotieren zu vermerken. Dies bestätigt die Induktion von Autophagie im Tumormodell gegenüber Sham. Die Behandlung mit den Medikamenten hatte keinen Einfluss auf die Autophagie. Einzig 0,4mg/kg/d Imidapril erhöhte die Autophagie signifikant gegenüber den Placebotieren, nachgewiesen durch LC3.

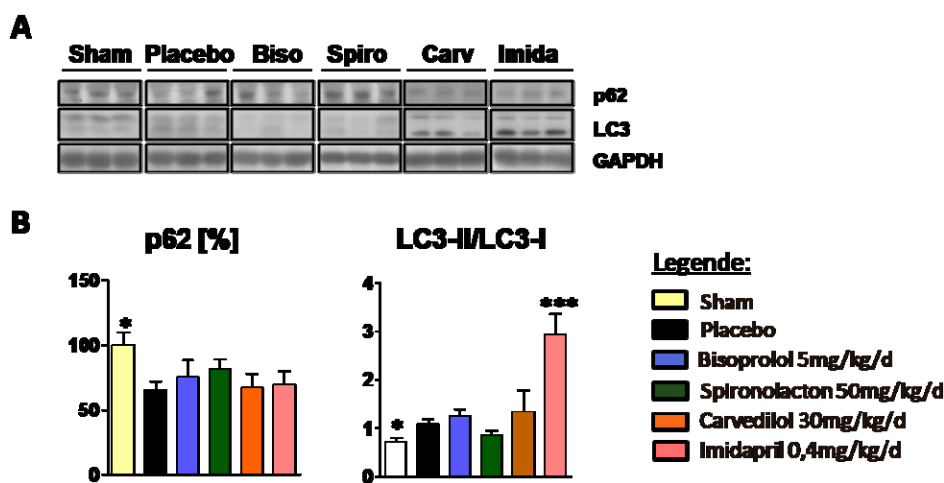


Abbildung 51. **Effekte kardiovaskulärer Medikamente auf die Autophagie im Herzgewebe von Tumortieren.** Darstellung der Western Blots (A) und der Ergebnisse (B) von p62 [%] und LC-3 (Ratio LC3-II/LC3-I). Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Placebo.

### 3.2.8.4 Foxo3 $\alpha$ und MuRF-1

Die Proteinexpression von Foxo3 $\alpha$  (Abbildung 52) war durch Tumorinokulation nicht verändert, jedoch nahm dessen Phosphorylierung signifikant ab. Dieser Effekt wurde noch durch Gabe von 50mg/kg/d Spironolacton verstärkt. Gegensätzlich dazu steigerte sich statistisch signifikant die Phosphorylierung von Foxo3 $\alpha$  durch 30mg/kg/d Carvedilol oder 0,4mg/kg/d Imidapril. MuRF-1 änderte sich nur in dem Herzgewebe der Tiere, die 30mg/kg/d Carvedilol erhielten.



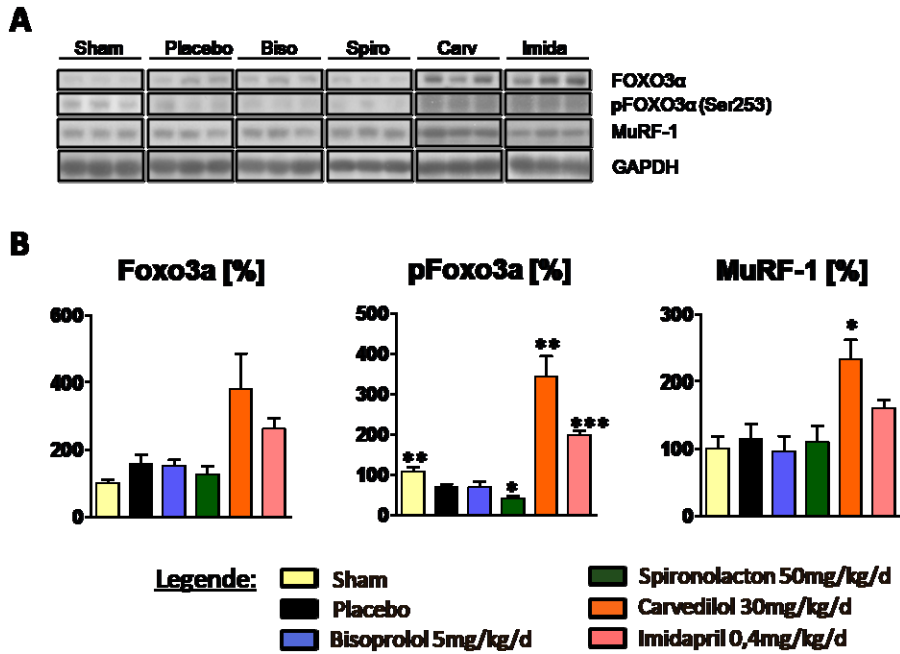


Abbildung 52. Effekte kardiovaskulärer Medikamente auf katabole Mediatoren im Herzgewebe von Tumortieren. Darstellung der Western Blots (A) und der Ergebnisse (B) von Foxo-3α, pFoxo3α und MuRF-1. Angaben als Mittelwert ± SEM. \*: p<0,05, \*\*: p<0,01, \*\*\*: p<0,001 vs. Placebo.

### 3.2.9 Anabole Signalwege

Die Ergebnisse der Western Blot Analysen des Myokards aller Gruppen sind in Abbildung 53 und in Tabelle 34 zu sehen.

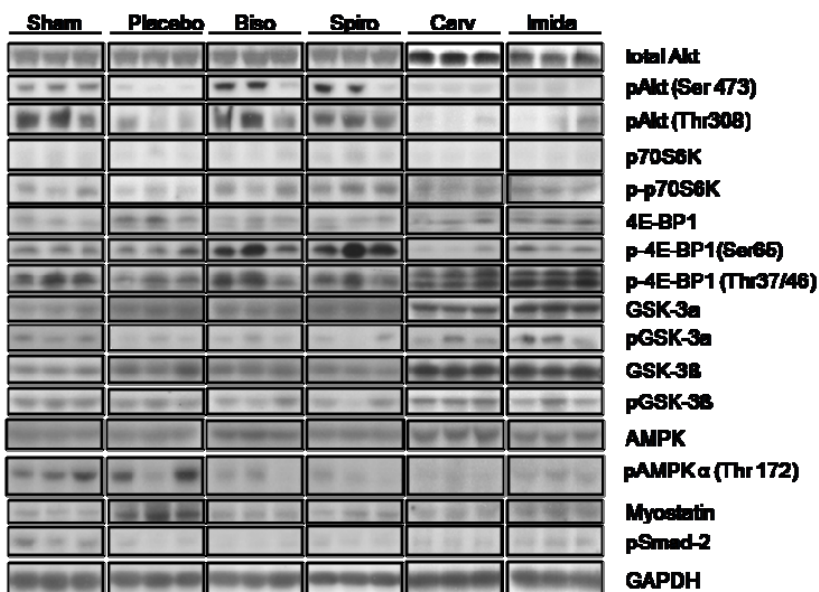


Abbildung 53. Effekte kardiovaskulärer Medikamente auf die anabole Proteinexpression im Herzgewebe von Sham- und Tumortieren. Darstellung der Western Blots der Gruppen Sham, Placebo, Bisoprolol (Biso), Spironolacton (Spiro), Carvedilol (Carv) und Imidapril (Imida).

Dabei zeigte sich, dass Placebotiere eine reduzierte Expression und verminderte Aktivität von Hypertrophie vermittelnden Proteinen aufwiesen. Die Behandlung der Tumortiere mit Bisoprolol oder Spironolacton konnte die anabolen Signalwege erhöhen, während Carvedilol oder Imidapril keinen Einfluss auf die Signalwege gegenüber Placebo hatten.

Tabelle 34. Ergebnisse der Western Blot Analyse des Herzgewebes in der Interventionsstudie. Ergebnisse sind in % von der Shamgruppe angegeben. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$ , \*\*:  $p < 0,01$ , \*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Placebo

	Sham	Placebo	5mg/kg/d Bisoprolol	50mg/kg/d Spironolacton	30mg/kg/d Carvedilol	0,4mg/kg/d Imidapril
n-Anzahl	8	8	7	8	5	13
Akt [%]	100 $\pm 7,85$	105 $\pm 11,71$	112 $\pm 14,93$	101 $\pm 9,76$	627 $\pm 45,1^{**}$	565 $\pm 40,5^{***}$
pAkt (Ser473) [%]	100 $\pm 8,09^{***}$	27,8 $\pm 5,85$	89,5 $\pm 35,7$	113 $\pm 36,8^*$	56,5 $\pm 4,89^*$	52,7 $\pm 1,81^{**}$
pAkt (Thr308) [%]	100 $\pm 20,9^{**}$	22,9 $\pm 9,39$	107 $\pm 31,9^*$	296 $\pm 89,5^{**}$	24,7 $\pm 9,36$	4,35 $\pm 1,83^*$
p70S6K [%]	100 $\pm 18,11$	101 $\pm 22,8$	99,9 $\pm 17,47$	166 $\pm 71,4$	62,5 $\pm 16,85$	74,5 $\pm 12,19$
p-p70S6K [%]	100 $\pm 29,1$	52,2 $\pm 11,47$	150 $\pm 80,0$	172 $\pm 136$	132 $\pm 61,9$	104 $\pm 32,7$
4E-BP1 [%]	100 $\pm 12,62^*$	134 $\pm 12,64$	141 $\pm 14,38$	128 $\pm 12,28$	164 $\pm 20,4$	169 $\pm 12,61$
p-4E-BP1 (Ser65) [%]	100 $\pm 15,47$	118 $\pm 21,7$	162 $\pm 12,02$	330 $\pm 68,0^*$	58,0 $\pm 19,8$	169 $\pm 24,6$
p-4E-BP1 (Thr37/46) [%]	100 $\pm 15,43$	75,1 $\pm 10,10$	91,6 $\pm 15,40$	86,6 $\pm 10,50$	112 $\pm 30,7$	135 $\pm 11,40^{**}$
GSK-3 $\alpha$ [%]	100 $\pm 5,96^*$	147 $\pm 12,26$	163 $\pm 6,92$	128 $\pm 7,22$	1107 $\pm 132^{***}$	1036 $\pm 66,3^{***}$
p-GSK-3 $\alpha$ (Ser21) [%]	100 $\pm 14,97^{**}$	40,3 $\pm 7,59$	24,5 $\pm 3,80$	28,5 $\pm 7,59$	63,1 $\pm 13,57$	153 $\pm 38,8^*$
GSK-3 $\beta$ [%]	100 $\pm 8,77^*$	128 $\pm 10,40$	132 $\pm 12,33$	103 $\pm 10,96$	453 $\pm 59,5^{***}$	248 $\pm 14,26^{***}$
pGSK-3 $\beta$ (Ser9) [%]	100 $\pm 9,43$	78,0 $\pm 10,8$	82,8 $\pm 14,63$	75,4 $\pm 13,62$	119 $\pm 14,80$	96,6 $\pm 9,19$
AMPK $\alpha$ [%]	100 $\pm 9,57$	104 $\pm 4,85$	96,0 $\pm 7,48$	77,4 $\pm 2,94^{***}$	246 $\pm 26,1^{***}$	175 $\pm 5,33^{***}$
p-AMPK $\alpha$ (Thr172) [%]	100 $\pm 25,6$	87,1 $\pm 32,3$	48,1 $\pm 20,4$	29,2 $\pm 8,72$	26,6 $\pm 4,33$	45,7 $\pm 6,61$
Myostatin [%]	100 $\pm 12,70^{**}$	307 $\pm 63,4$	102 $\pm 7,37^*$	120 $\pm 12,19^*$	138 $\pm 53,4$	148 $\pm 20,5^*$
p-Smad-2 (Ser465/467) [%]	100 $\pm 24,0^{***}$	23,4 $\pm 5,30$	17,70 $\pm 4,53$	12,28 $\pm 2,16$	38,3 $\pm 9,59$	51,1 $\pm 4,40^{**}$

### 3.2.10 Veränderung des Zytoskeletts

Da bekannt ist, dass bei Kachexie Kompartimente des Zytoskeletts im Skelettmuskel abgebaut werden, wollten wir *Myosin Heavy Chain* (MHC), Troponin T und Tropomyosin in dem myokardialen Gewebe der Shamtiere, Tumortiere und den behandelten Tumortieren untersuchen.

Bei den Tumortieren waren eine signifikant reduzierte mRNA- und Proteinexpression von MHC zu sehen (Abbildung 54). Behandlung der Tumortiere mit Bisoprolol oder Spironolacton konnte den Abbau von MHC verhindern, während das Herzgewebe von Imidapril oder Carvedilol behandelte Tumortiere sowohl Proteinabbau als auch verringerte mRNA-Level von MHC aufwies (Abbildung 55). Die Proteinexpression von Tropomyosin und Troponin wurde durch Tumoringokulation nicht reduziert.

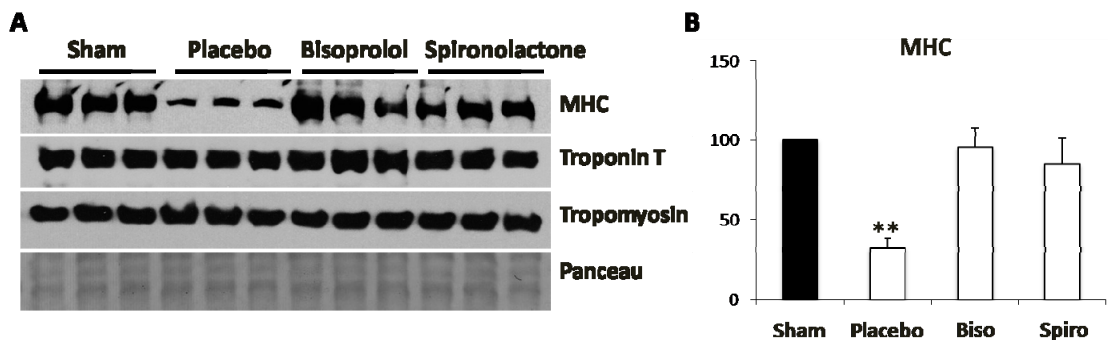


Abbildung 54. **Veränderung des Zytoskeletts im Herzgewebe des Yoshida Hepatoma Modell und der Einfluss von Bisoprolol und Spironolacton.** Western Blot Analyse von *Myosin Heavy Chain*, Troponin T und Tropomyosin (A) und mRNA-Level von *Myosin Heavy Chain* (B). Angaben als Mittelwert ± SEM. \*\*:  $p < 0,01$  vs. Sham.

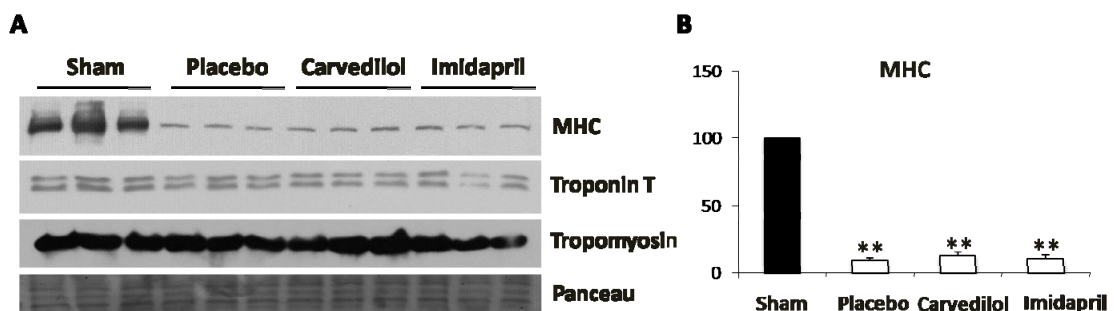


Abbildung 55. **Veränderung des Zytoskeletts im Herzgewebe des Yoshida Hepatoma Modell und der Einfluss von Carvedilol und Imidapril.** Western Blot Analyse von *Myosin Heavy Chain*, Troponin T und Tropomyosin (A) und mRNA-Level von *Myosin Heavy Chain* (B). Angaben als Mittelwert ± SEM. \*\*:  $p < 0,01$  vs. Sham.

### 3.3 *In vitro* Effekte kardiovaskulärer Medikamente

Um die direkten molekularen Mechanismen der Bisoprolol- oder Spironolacton-induzierten Effekte auf das Herz zu ermitteln, wurden *in vitro* Zellkulturversuche mit neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRKM) durchgeführt. Die verwendeten Dosen der Medikamente wurden anhand der Interventionsstudie berechnet.

Dazu wurden zuerst neonatale Kardiomyozyten mit der Substanz Isoproterenol stimuliert, die eine Aktivierung von  $\beta$ -Adrenorezeptoren bewirkt. Danach erfolgte die Behandlung der Zellen mit den  $\beta_1$ -Adrenorezeptorenblocker Bisoprolol oder Metoprolol (Abbildung 56). Isoproterenol bewirkte eine reduzierte mRNA Expression von MHC $\alpha$  sowie eine Abnahme der Phosphorylierung von GSK-3. Isoproterenol in Kombination mit Bisoprolol oder Metoprolol sowie alleinige Behandlung der Zellen mit Metoprolol bewirkte eine gegenüber der Kontrolle gleichbleibende MHC $\alpha$  mRNA-Expression und Phosphorylierung von GSK. Dies zeigte, dass die direkte Blockade von  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren den Abbau von MHC verhindert und GSK-3 inhibiert.

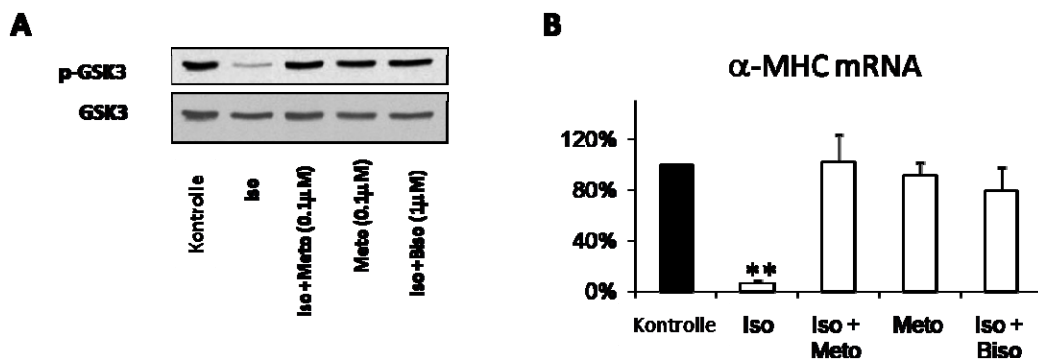


Abbildung 56. Effekte von  $\beta$ -Blockern auf die Proteinexpression von GSK-3 (A) und die mRNA Expression von MHC $\alpha$  (B) in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRKM). Nach Stimulierung von NRKM mit Isoproterenol (Iso) erfolgte die Behandlung mit Metoprolol oder Bisoprolol (Biso). Kontrollen wurden mit PBS behandelt und nur mit Metoprolol behandelte Zellen dienten auch als Kontrolle, da keine Stimulierung durch Isoproterenol erfolgte. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*:  $p < 0,01$  vs. Kontrolle.

In einem zweiten *in vitro*-Experiment wurden NRKM mit kardiovaskulären Medikamenten behandelt (Abbildung 57). Dabei zeigte sich, dass Aldosteron oder Spironolacton keinen direkten Einfluss auf die MHC mRNA oder die Phosphorylierung von GSK-3 in Kardiomyozyten hatten.

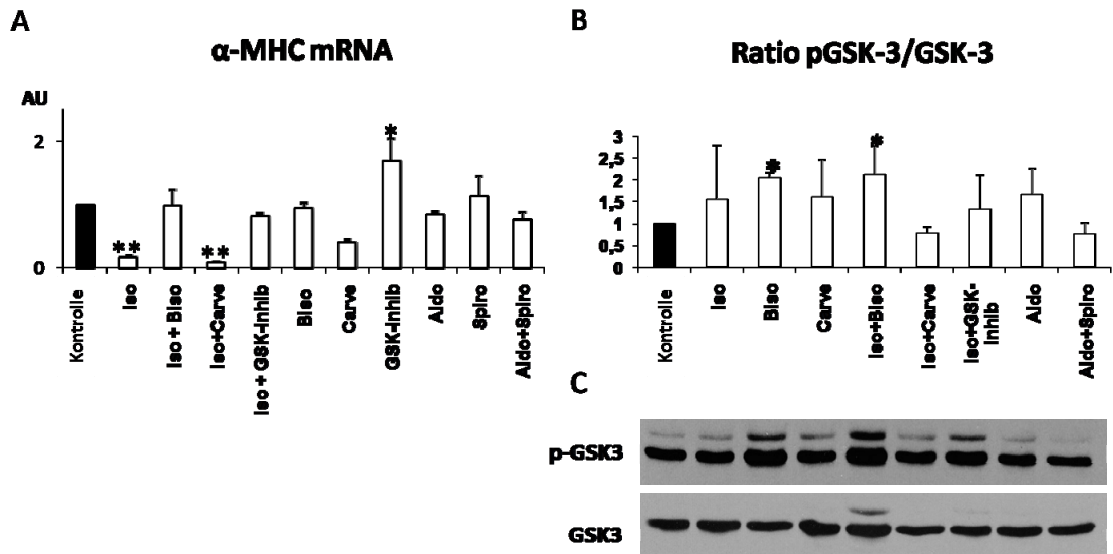


Abbildung 57. Effekte von kardiovaskulären Medikamenten auf die mRNA Expression von MHC $\alpha$  (A) und die Ratio pGSK-3/GSK-3 (B) in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRKM). Die Behandlung der NRKM erfolgte mit PBS (Kontrolle), Isoproterenol, Isoproterenol in Kombination mit Bisoprolol, Carvedilol oder einem GSK-Inhibitor, Bisoprolol, Carvedilol, GSK-Inhibitor, Aldosteron, Spironolacton oder Aldosteron in Kombination mit Spironolacton. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p < 0,05$  vs. Kontrolle.

### 3.4 Humane Daten

Als letztes sollten anhand von Biopsieproben und klinischen Daten Aussagen zur Myokardmorphologie von kachektischen Tumorpatienten getroffen werden.

#### 3.4.1 Klinische Daten von Tumorpatienten

Die klinischen Daten von Tumorpatienten wurden von der Angewandten Kachexieabteilung im Virchow-Klinikum Berlin erhoben. Es wurden männliche als auch weibliche Patienten bei der Datenerhebung eingeschlossen, welche den nicht-kleinzelligen Lungentumor oder Kolonkarzinome aufwiesen. Als Kontrollgruppe dienten gesunde Probanden. Weiterhin konnten die Tumorpatienten aufgrund von Laboranalysen als nicht-kachektisch und kachektisch eingeteilt werden. Das durchschnittliche Alter, Gewicht sowie der Körpermassenindex (BMI) aller Gruppen unterschied sich nicht. Der BMI der kachektischen Krebspatienten lag bei  $25,9 \pm 0,70$ . Die Daten können der Tabelle 35 entnommen werden.

Tabelle 35. Daten von lebenden Kontrollen und Tumorpatienten. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. NSCLC= nicht-kleinzelliger Lungentumor. BMI=Körpermassenindex.

		Tumorpatienten		
		Kontrolle	nicht kachektisch	kachektisch
<b>n-Anzahl</b>		22	32	20
<b>Krebsart</b>	NSCLC	/	25	13
	Kolonkarzinom	/	7	7
<b>Männlich</b>		9	18	11
<b>Weiblich</b>		13	14	9
<b>Alter [Jahre]</b>		63,0 $\pm$ 2,00	59,0 $\pm$ 2,00	60,0 $\pm$ 2,00
<b>Gewicht [kg]</b>		75,7 $\pm$ 3,50	70,5 $\pm$ 4,10	72,9 $\pm$ 1,80
<b>BMI</b>		26,1 $\pm$ 0,80	23,3 $\pm$ 1,20	25,9 $\pm$ 0,70

Von diesen Patienten wurden Aldosteron und BNP im Plasma gemessen (Abbildung 58), die kardiologischen Stress anzeigen. Es stellte sich heraus, dass Aldosteron im gleichen Maß bei den nicht-kachektischen (+114%) und kachektischen Tumorpatienten (+133%) signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht war ( $p=0,0494$  kachektische Tumorpatienten vs. Kontrolle). BNP war in den Tumorpatienten im Vergleich zu den gesunden Probanden signifikant um +198% erhöht und stieg um +709% in der kachektischen Gruppe an ( $p=0,0068$  kachektische Tumorpatienten vs. Kontrolle). Somit deuten diese Daten auf einen myokardialen Schaden mit vorhandener Fibrose hin.

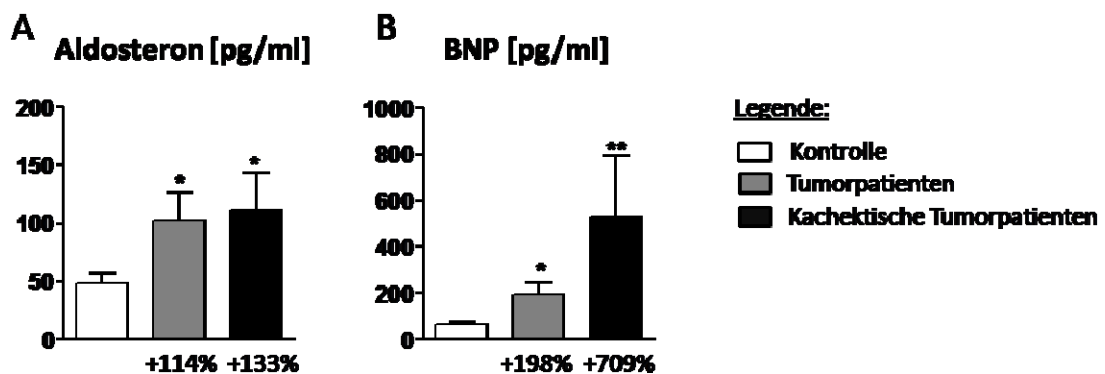


Abbildung 58. Aldosteron- (A) und BNP-Level (B) im Plasma von gesunden Probanden und Tumorpatienten mit und ohne Kachexie. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*:  $p<0,05$  vs. Sham, \*\* $<0,01$  vs. Sham.

### 3.4.2 Humane Daten *post mortem*

Um genauere Aussagen zum Herzgewicht und zu den Herzstrukturen kachektischer Krebspatienten machen zu können, wurden *post mortem* Daten von an Karzinomen verstorbenen Personen in der Pathologie der Charité erhoben (Tabelle 36). Die Verstorbenen wurden in die Kontrollgruppe oder als Tumorpatienten mit und ohne Kachexie eingeteilt.

Sie wiesen nicht-kleinzelliger Lungentumore, gastrointestinale oder Pankreaskarzinome auf. Das Alter unterschied sich nicht zwischen den einzelnen Gruppen, jedoch waren das Gewicht sowie der BMI bei den kachektischen Tumorpatienten gegenüber gesunden Personen und nicht kachektischen Tumorpatienten statistisch hoch signifikant reduziert.

Tabelle 36. Daten von verstorbenen Kontrollen und Tumorpatienten. Angaben als Mittelwert  $\pm$  SEM. \*\*\*:  $p < 0,001$  vs. Kontrolle, \$\$\$:  $p < 0,001$  vs. nicht kachektische Tumorpatienten. NSCLC= nicht-kleinzelliger Lungentumor

		Tumorpatienten		
		Kontrolle	nicht kachektisch	kachektisch
<b>N</b>		11	12	14
<b>Krebsart</b>	NSCLC	/	4	3
	Gastrointestinalkrebs	/	4	7
	Pankreaskarzinom	/	4	4
<b>Männlich</b>		8	7	6
<b>Weiblich</b>		3	5	8
<b>Alter [Jahre]</b>		56,4 $\pm$ 4,7	59,0 $\pm$ 2,0	60,0 $\pm$ 2,0
<b>Gewicht [kg]</b>		92,8 $\pm$ 5,8	79,6 $\pm$ 3,1	51,9 $\pm$ 2,7***.\$\$\$
<b>BMI</b>		30,5 $\pm$ 1,9	27,7 $\pm$ 0,8	17,8 $\pm$ 0,5***.\$\$\$

Das Herzgewicht (Abbildung 59) der verstorbenen kachektischen Krebspatienten betrug nur 313,5 $\pm$ 20,2g und war gegenüber dem Herzgewicht der Sham- als auch den Tumorpatienten, die keine Kachexie aufwiesen, signifikant reduziert ( $p=0,0005$  kachektische vs. nicht kachektische Tumorpatienten). Die Abnahme des Myokards zeigte sich auch durch eine Verringerung der links- und rechtsventrikulären Hinterwandstärke. Während die Stärke der Hinterwand zwischen der Kontrolle und den Tumorpatienten keine Veränderung zeigte, nahm ihre Stärke bei den kachektischen Tumorpatienten deutlich ab, wobei bei der rechtsventrikulären Hinterwand keine statistische Signifikanz erreicht wurde.

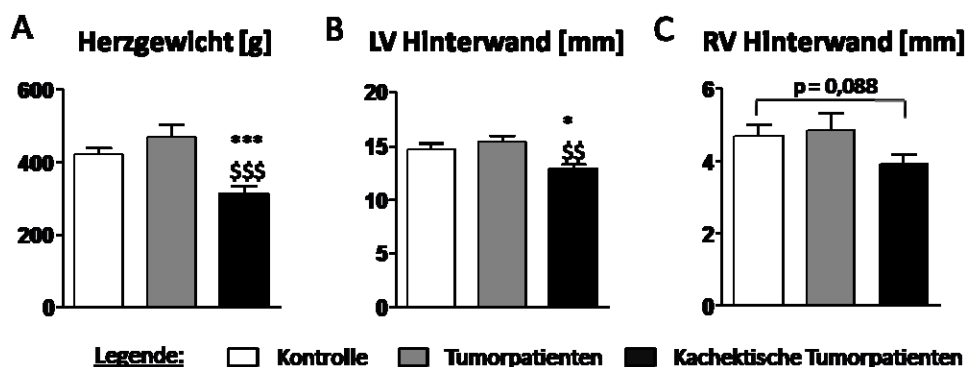


Abbildung 59. Herzgewicht (A) und Stärke der linksventrikulären (B) und rechtsventrikulären Hinterwand (C) in Kontrollen und Tumorpatienten mit und ohne Kachexie. \*:  $p < 0,05$  vs. Sham, \*\*\* $< 0,001$  vs. Sham, \$\$ $< 0,01$  vs. Tumorpatient, \$\$\$ $< 0,001$  vs. Tumorpatient. LV=linksventrikulär, RV=rechtsventrikulär.

Desweiteren wurde die linksventrikuläre Hinterwand der pathologischen Proben mit Azan oder Sirius Rot angefärbt und auf Bindegewebe, zu dem auch Kollagen gehört, untersucht (Abbildung 60). Beide Färbungen zeigten eine vermehrte Bildung von Bindegewebe in der linksventrikulären Hinterwand bei Vorhandensein einer Kachexie assoziierten Neoplasie.

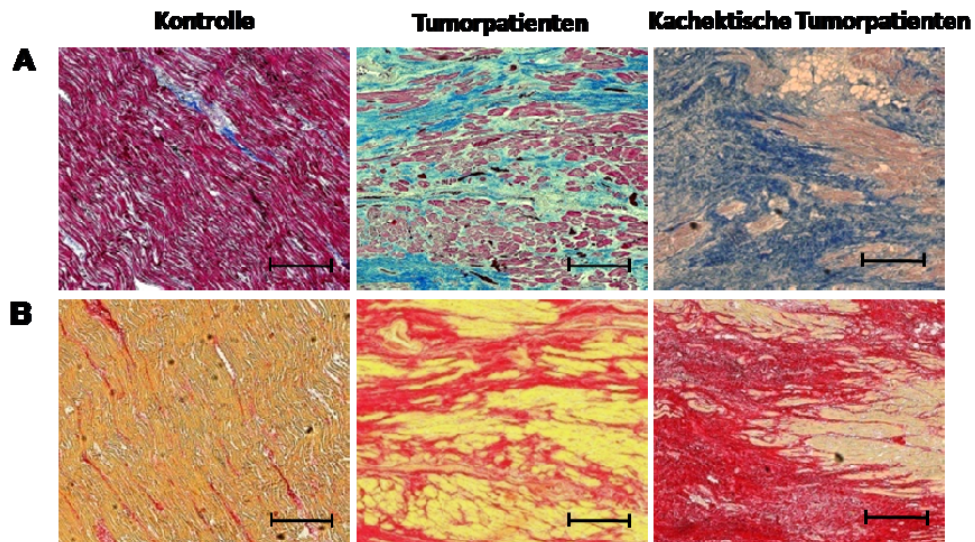


Abbildung 60. **Histologische Färbung der linksventrikulären Hinterwand von Kontrollen, nicht kachektischen und kachektischen Tumorpatienten mit Azan (A) oder Sirius Rot (B).** Alle Proben entstammen aus der Pathologie. Maßstabsbalken=1 $\mu$ m.

Zusammenfassend deuten die humanen Daten darauf hin, dass kachektische Tumorpatienten atrophisches und fibrotisch verändertes Myokardgewebe aufweisen, das zu einer verschlechterten Verkürzungsfraction und somit zu einer beeinträchtigten Kontraktilität des Ventrikels führen könnte. Da keine Daten zur Herzfunktion verfügbar waren, kann nicht beurteilt werden, ob eine Tumorkachexie induzierte Kardiomyopathie beim Menschen vorliegt.



## 4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde die tumorinduzierte Kachexie mittels des AH-130 Yoshida Hepatoma Modells mit dem kardiale Kachexie induzierenden LAD-Infarktmodell in Ratten verglichen. Dabei lag der besondere Schwerpunkt auf den Auswirkungen der Kachexien auf die Herzstruktur und –funktion sowie den ablaufenden Signaltransduktionswegen. Danach wurde die durch Tumorkachexie induzierte Kardiomyopathie im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell mit kardiovaskulären Medikamenten therapiert und deren Effekte ausgewertet. Anschließend wurden humane Daten zum Herz nicht-kachektischer und kachektischer Tumorpatienten analysiert.

### 4.1 Tumorinduzierte Kachexie im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell

Aus der Literatur ist bekannt, dass Yoshida Hepatoma Zellen des Stammes AH-130 Kachexie in Ratten durch eine Hyperkatabolismus vermittelnde Skelettatrophie induzieren.<sup>270</sup> Dabei wächst der Tumor nach Transplantation in die Bauchhöhle der Ratte zuerst exponentiell und erreicht dann die stationäre Phase bevor er den Tod des Tieres nach ca. 15 Tagen bewirkt.<sup>264</sup>

#### 4.1.1 Tumorzellzahl und Tumolvolumen

Anhand der Tumorzellzahlen aus dem Versuch ist erkennbar, dass die AH-130 Yoshida Hepatomazellen nach intraperitonealer Inokulation in den Ratten exponentiell bis Tag 9 ihre Zellzahl vermehrten. Nach diesem Zeitpunkt waren die Zellzahlen etwas geringer. Dies lässt sich damit erklären, dass sich die Zellen nach Tag 9 in der stationären Wachstumsphase befanden und wie schon von Tessitore *et al.* beschrieben, vermehrt Apoptose der Hepatomazellen in diesem Stadium auftritt.<sup>271</sup> Die durchschnittlich ermittelte Zellzahl von  $4208 \pm 227 \times 10^6$  am Tag 7 nach anfänglicher Inokulation von  $10^8$  Zellen deckt sich mit den Ergebnissen von Carbó *et al.*, die am Tag 7 im gleichen Tiermodell  $4608 \pm 352 \times 10^6$  Zellen errechneten.<sup>272</sup> Desweiteren ist die am Tag 4 vorhandene Zellzahl ähnlich zu den Ergebnissen von Costelli *et al.*<sup>273</sup> Hingegen haben Tessitore *et al.* im Jahr 1987 etwas geringere Zellzahlen in diesem Tumorkachexiemodell ermittelt, was zeigt, dass sich die Proliferationsrate der Zellen durch kontinuierliches Passagieren über einen längeren Zeitraum erhöht.<sup>262, 274</sup>

Desweiteren steigt mit dem Wachstum der Tumorzellen auch das Tumolvolumen und somit die Flüssigkeitsansammlung in der Bauchhöhle an, was sich darauf zurückführen lässt, dass durch die Erhöhung der Blutgefäßpermeabilität vermehrt Flüssigkeit aus den Blutgefäßen in den Bauchraum eindringt.<sup>275</sup> Es wird davon ausgegangen, dass die Gefäßdurchlässigkeit durch lokale Entzündungsgeschehnisse, ausgelöst durch den Tumor, verursacht werden, die im Yoshida Hepatoma Modell durch proinflammatorische Cytokine induziert werden können.<sup>275, 276</sup>

Die Tumortiere wiesen nach Inokulation von anfänglichen  $10^8$  Tumorzellen, was einem Volumen von 1-2ml entsprach, am Tag 7 durchschnittlich  $47,3 \pm 2,26$ ml auf. Dieses Ergebnis konnte von Lopez-Soriano *et al.*, deren Tumortiere ein Volumen von  $43 \pm 2$  ml beinhalteten, bestätigt werden.<sup>277</sup> Werden die Ergebnisse erneut mit der Arbeit von Tessitore *et al.* im Jahre 1987 verglichen, so fällt auf, dass die Zunahme des Tumolvolumens in Abhängigkeit der inokulierten Tage gleich geblieben ist.<sup>262</sup> Dies zeigt, dass sich nur die Proliferationsrate des Tumors, nicht jedoch seine Aggressivität, die sich durch eine schnellere Aszitesbildung ausdrücken könnte, verändert hat.

#### 4.1.2 Effekte auf das Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Organgewichte

Die Analyse des Körpergewichtes der Shamgruppen zeigte, dass sich die Tiere vom Tag 7 von denen vom Tag 13 durch Wachstum im Gewicht unterschieden. Im Speziellen nahmen sie kontinuierlich fettfreie Masse (Muskelmasse und Organmasse) zu und die Fettmasse erhöhte sich nur bis Tag 11 und stagnierte dann. Das gleiche Ergebnis konnte für die Organgewichte und die Skelettmuskeln gezeigt werden.

Durch Tumorinokulation zeigte sich eine 5%ige Abnahme des Körpergewichts ab Tag 7. Da dieser Gewichtsverlust nicht zur Diagnose eines kachektischen Zustandes ausreicht, wurde als weiteres Kriterium Albumin im Plasma bestimmt.<sup>1</sup> Die Konzentration von Albumin nahm kontinuierlich ab Tag 5 bis Tag 13 in den Tumortieren ab und deutete auf eine inflammatorisch ausgelöste Akute-Phase-Reaktion hin. Desweiteren konnte die Entwicklung von Anorexie ab Tag 7 nach Tumorinokulation nachgewiesen werden. Somit führte der Tumor per Definition nach Evans *et al.* zur Induktion eines kachektischen Zustands.<sup>1</sup>

Die Abnahme des Körpergewichtes in diesem Tumormodell konnte bereits von anderen Arbeitsgruppen gezeigt werden, wobei jedoch das Ausgangsgewicht der Ratten in den verschiedenen Studien zwischen 100-250g lag.<sup>273, 278-280</sup> Dabei wiesen die Ratten in den Studien von Mackenzie *et al.* und Costelli *et al.* am Tag 4 noch eine Gewichtszunahme nach Tumorinokulation auf.<sup>278, 280</sup> Am Tag 7 konnte eine Reduktion

des Körpergewichtes der Tumortiere um 7% bis 14% von Moore-Carrasco *et al.*, van Royen *et al.* und Costelli *et al.* gezeigt werden.<sup>280-282</sup> Dies zeigt, dass die Tumortiere zu diesem Zeitpunkt, wie in dieser Studie, bereits kachektisch waren. In der Studie von Dessi *et al.* betrug der Gewichtsverlust bereits 36% in der Tumorgruppe am Tag 10.<sup>283</sup> In dieser Studie lag der maximale Gewichtsverlust bei 23% am Tag 13 nach Tumorinokulation. Diese leicht schwankenden Angaben zum Gewichtsverlust lassen vermuten, dass die Schwere des Kachexiezustandes von mehreren Faktoren wie zum Beispiel dem Ausgangsgewicht der Ratten, dem Rattenstamm, dem Wachstum des Tumors und der folgenden Intensität der systemischen Inflammation abhängt, die die Atrophie des Gewebes bedingt.<sup>284</sup> Von Catalano *et al.* ist bekannt, dass es in dem Yoshida Hepatoma Modell zu einer vermehrten Synthese von TNF- $\alpha$  und IL-6 kommt, die als hauptverantwortliche Auslöser der Kachexie angesehen werden.<sup>48, 192, 285, 286</sup>

Desweiteren zeigte sich, dass zuerst die Fettmasse ab Tag 5 und danach erst die fettfreie Masse ab Tag 9 an Gewicht verlor. Diese zeitlich frühere Abnahme des Fettgewebes anstelle der Skelettmuskulatur ist unter anderem auf eine Anorexie bedingte verminderte Kalorienaufnahme zurückzuführen, wie sie bereits von Lang *et al.* im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell nachgewiesen wurde.<sup>287</sup> Die schnellere Abnahme des Fettgewebes konnte auch bei kachektischen Tumorpatienten gezeigt werden, beginnend beim Torso und dann in den Arm- und Beinbereich übergehend.<sup>86</sup>

Weiterhin ist die Reduktion der Fettmasse (-78% am Tag 13) nach Tumorinokulation, die auch in anderen Studien festgestellt wurde, auf eine höhere Aktivität von Lipolysevermittelnden Enzymen zurückzuführen (HSL), die einen Abbau der sich in Lipidtröpfchen befindlichen Triglyzeride und folglich ein Schrumpfen der Adipozyten bewirken.<sup>92, 282, 288, 289</sup> Desweiteren wurde in der Publikation von Lopez-Soriano *et al.* eine verminderte Aktivität der LPL im weißen Fettgewebe im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell beschrieben.<sup>290</sup> Dies hat zur Folge, dass es zu einer Akkumulation von Lipoproteinen (LDL), Cholesterin und Triglyzeriden im Blut kommt.<sup>291</sup> In dieser Studie konnte ein Anstieg der Hyperlipidproteinämie bis Tag 7 im Plasma nachgewiesen werden. Danach fielen sowohl Cholesterin, Triglyzeride und LDL wieder bis Tag 13 ab, dennoch war LDL immer noch gegenüber Sham signifikant erhöht.

Die Abnahme der fettfreien Masse begann am Tag 9 nach Tumorinokulation und betrug 23% am Tag 13. Dabei zeigten die Gewichte der Muskeln einen maximalen Verlust von 30% im Soleus und 40% im Gastrocnemius, Tibialis und EDL gegenüber Sham. Diese Muskelatrophie konnte auch von Busquets *et al.*, Moore-Carrasco *et al.* und Mackenzie *et al.* nachgewiesen werden.<sup>278, 279, 282</sup> Der Grund für die Abnahme der Skelettmuskeln im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell liegt in einer durch Cytokine

induzierten Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Systems.<sup>292-294</sup> Desweiteren wird der Gewebeverlust im Skelettmuskel durch Apoptose verstärkt.<sup>281, 295</sup>

Auch bei der Leber, Niere und der Milz war eine Gewichtsreduktion zu verzeichnen. Dies zeigt, dass dieses Tumormodell, wie schon von Noriki *et al.* beschrieben, ein sehr aggressives Tumormodell ist, das schnell zu einer Kachexie-bedingten Schädigung sämtlicher Organe führt.<sup>296</sup>

Zusammenfassend führte die Inokulation von Ratten mit AH-130 Yoshida Hepatoma Zellen zu einem Verlust von Fettmasse, Skelettmuskelmasse und der Organe, der sich mit fortschreitender Progression des Tumors verstärkte.

#### 4.1.3 Parameter der Lebensqualität

Bei kachektischen Tumorpatienten wurde aufgrund von Atrophie-bedingtem Verlust der physischen Kraft die Einschränkung der Lebensqualität, die durch die Mobilität charakterisiert wird, festgestellt.<sup>1, 297</sup> Bauhofer *et al.* haben nachgewiesen, dass diese Lebensqualität beim Menschen mit der „*sickness behavior*“ bei Tieren, die in dieser Studie durch die Lokomotoraktivität und die Nahrungsaufnahme bestimmt wurde, vergleichbar ist.<sup>265</sup>

Die Veränderung der Aktivität der Shamtiere, die über einen Zeitraum von 24 Stunden gemessen wurde, war bei den Tieren von Tag 7 gegenüber den Shamtieren von Tag 13 reduziert. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die mittlere Aktivität dieser Shamgruppe am Anfang der Studie signifikant höher ( $77103 \pm 5049$  counts/24h) als die der anderen Shamtiere ( $68848 \pm 2752$  count/24h;  $62199 \pm 3884$  counts/24h) war und sich somit ein negativer  $\Delta$ -Wert ergibt. Die erhöhte Basisaktivität der Tiere kann eventuell durch Stress bewirkt worden sein. Die Aktivität der Tumortiere war ab Tag 7 signifikant gegenüber der Shamgruppe von Tag 7 reduziert und nahm bis Tag 13 um 80% ab. Die Ursachen dafür können die Progression der Tumorerkrankung und die daraus nachgewiesene Atrophie der Skelettmuskulatur und des Fettgewebes sein. Zusätzlich dazu konnten Busquet *et al.* Inflammation für dieses Tumormodell in Ratten nachweisen, die sich systemisch auswirkt und die Ratten zusätzlich schwächt.<sup>276</sup> Ein anderer Grund dafür, dass sich die Tumortiere mit fortschreitender Neoplasie weniger bewegten, kann auch der an Volumen zunehmende Aszites gewesen sein, der am Tag 13 85% des eigentlichen Körpergewichts der Ratte entsprach. Zusätzlich dazu ist vom intraperitonealen Aszites bekannt, dass die Flüssigkeit auf die Organe und die unteren Extremitäten drückt.<sup>298</sup> Desweiteren ist vorstellbar, dass die Atmung der Tiere aufgrund der Volumeneinwirkung auf das Diaphragma und somit auf die Lunge erschwert war.<sup>299</sup>

Die Nahrungsaufnahme nahm von Tag 7 bis Tag 13 nach Tumorinokulation ab. Dies zeigt, dass die Tumortiere wie auch schon in den Studien anderer Arbeitsgruppen anorektisch wurden.<sup>278, 279, 300</sup> Jedoch ist die Anorexie nicht der Hauptgrund für die massive Induktion der Kachexie bei den Tieren, da „Pair-fed“-Experimente zeigten, dass die reduzierte Nahrungsaufnahme nur zu einem geringen Gewichtsverlust führt.<sup>301</sup> Somit ist die Kachexie die Ursache für den Gewichtsverlust und die metabolischen Veränderungen im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell.

#### 4.1.4 Effekte auf die Herzstruktur und -funktion

Aufgrund der im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell induzierten Kachexie in den Ratten, war auch vom Interesse, ob das Herz von der Atrophie betroffen war und ob dadurch eine Veränderung der Herzfunktion bewirkt wurde.

In den Shamtieren nahm das Herzgewicht zu, während es in den Tumortieren ab Tag 5 an Gewicht verlor und mit Fortschreiten der Tumorentwicklung um 43% am Tag 13 gegenüber der Shamgruppe leichter war. Die echokardiographisch ermittelte linksventrikuläre Masse zeigte sogar einen Verlust von 58% am Tag 13 nach Tumorinokulation. Desweiteren fiel beim Vergleich des Massenverlustes zwischen Skelettmuskeln und dem Myokard auf, dass der linke Ventrikel stärker als die Muskeln von der Atrophie betroffen waren. Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine Reduktion des Herzgewichtes in diesem Tumormodell zeigen, wobei der Gewichtsverlust des Herzens am Tag 4 nach Tumorinokulation bei 4 bis 18% und am Tag 7 bei 8% bis 35% gegenüber Sham lag.<sup>273, 279, 280, 282, 300, 302</sup>

Da ein massiver Verlust der linksventrikulären Masse im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell erfolgte, wurde vermutet, dass dieser Verlust sich in einer Abnahme der Wandstärken äußerte. Die Stärke des Septums und der Hinterwand waren minimal in der Diastole verringert, während sie in der Systole um 40% am Tag 13 in den Tumortieren vermindert waren. Dies wies zusammen mit der verschlechterten Verkürzungsfraktion auf eine eingeschränkte Kontraktilität des Ventrikels hin. Gegensätzlich dazu konnten Shadfar *et al.* und Wysong *et al.* kleinere linksventrikuläre Wandstärken in der Diastole im Kolon-26 Adenokarzinom-Modell (C26-Modell) zeigen.<sup>179, 180</sup> Dies kann daran liegen, dass die unterschiedlichen Tumormodelle Kachexien mit verschiedener Progression induzieren. Außerdem kann die verwendet Spezies (C26-Modell: Mäuse; AH-130: Ratten) und die Art des Tumors (liquider Tumor, Karzinom) einen Einfluss auf die tumorinduzierte kardiale Atrophie haben. Da Atrophie immer mit einer Reduktion der Zellgröße einher geht, kann vermutet werden, dass es

in unserem Tumormodell u.a. zu einem Gewichtsverlust des Herzens durch Atrophiebedingte Verkleinerung der Kardiomyozyten kam.<sup>97</sup>

Bei der Analyse der Herzfunktion zeigte sich in den Tumortiere ab Tag 7 eine verschlechterte Verkürzungsfraktion und ab Tag 9 eine reduziertes Schlagvolumen und eingeschränkte Auswurfsfraktion. Der Verlust kardialer Masse verschlechterte somit die Kontraktilität des Herzens. Wysong *et al.* und Tian *et al.* konnten in Versuchen mit dem C26-Modell in männlichen Mäusen auch eine durch die Tumorkachexie signifikant verschlechterte Auswurfsfraktion und Verkürzungsfraktion nachweisen.<sup>178, 179</sup> Hingegen zeigten Studien mit weiblichen Tieren im C26 und Lewis Lungenkarzinom-Modell (LLC-Modell), dass keine bzw. nur eine leichte myokardiale Dysfunktion vorlag.<sup>177, 183</sup> Desweiteren wiesen diese Tiere aufgrund eines unveränderten Körpergewichts und Herzgewichts keine Kachexie auf.<sup>177, 183</sup> Dies verdeutlicht, dass sich nur beim Vorhandensein einer Tumor-induzierten Kachexie eine myokardiale Atrophie entwickelt, die wiederum die Herzfunktion beeinträchtigt. Bei Kardiomyopathien entstehen Arrhythmien durch eine Störung des Calcium-Signalweges in Kardiomyozyten.<sup>303</sup> Ob diese Störung auf einer veränderten Expression oder Aktivität der Calcium/Natriumkanäle beruhte, ist unklar.<sup>304</sup>

Weiterhin zeigt die Arbeit von Cospes *et al.*, dass weibliche Tiere im Vergleich zu den männlichen Tieren erst später Gewichtsverlust und Verlust von Herzmasse im C26-Modell aufweisen.<sup>181</sup> Es ist nicht klar, ob diese geschlechtsspezifischen Unterschiede im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell auftreten und besonders die Atrophie des Herzens beeinflussen, da bisher nur männliche Ratten untersucht wurden.

Die Untersuchung des linksventrikulären Diameters sollte klären, ob die Tumorkachexie einen Einfluss auf die Größe des Herzens hat. Der diastolische Diameter war ab Tag 9 in den Tumortieren signifikant reduziert und beweist, dass das Herz nicht nur Gewicht verlor, sondern auch kleiner wurde. Dieses Ergebnis konnten Cospes *et al.* auch im C26-Modell zeigen.<sup>181</sup> Deswegen liegt die Vermutung nahe, dass sich die kardiale Atrophie nicht nur im linken Ventrikel äußert, sondern sich eventuell auch auf den rechten Ventrikel auswirkt, was zur kardialen Dysfunktion beitragen könnte. Dieser Aspekt bedarf weiterer Untersuchungen.

Das Elektrokardiogramm zeigte eine Verschlechterung der Erregungsleitung nach Tumorinokulation. Dies lässt sich dadurch erklären, dass eventuell durch die kardiale Atrophie Kardiomyozyten des Erregungsbildungs- und weiterleitenden Systems geschädigt wurden, woraus die verschlechterte und asynchrone Erregungsleitung des Herzens in den Tumortieren resultierte. Desweiteren ist vorstellbar, dass die Repolarisation des Herzens aufgrund eines zu hohen Verlustes von Kaliumkanälen verlängert war.<sup>305</sup>

Die reduzierte Füllung des Ventrikels kann eventuell auf die Bildung einer Anämie, wie sie bei Tumorkachexie nachgewiesen wurde, und auf die reduzierte Pumpleistung des Herzens zurückgeführt werden.<sup>306</sup> Auch die Abnahme des Blutdruckes und der Herzrate wiesen auf eine eingeschränkte Herzfunktion hin.

Zusammengefasst deuten alle Ergebnisse auf die Entwicklung einer progressiven myokardialen Dysfunktion aufgrund der durch den Tumor induzierten Kachexie hin. Da die Symptome nicht einer typischen Herzinsuffizienz entsprechen, bei der sich u.a. der Blutdruck und die Herzrate erhöhen, sollte von einer tumorinduzierten Kachexie und daraus resultierender Kardiomyopathie gesprochen werden.<sup>307</sup>

Da es bei Kardiomyopathien zur Ödembildung in der Lunge oder/und den Beinen kommen kann, wurde das Trockengewicht des Tibialis mit seinem Ausgangsgewicht verglichen (Daten nicht gezeigt) und keine Änderung festgestellt.<sup>308</sup> Auch die anderen Organgewichte ließen keine Ödeme vermuten.

Aufgrund des sehr starken Gewichtsverlustes des Herzens wurde das Plasma auf Biomarker für kardialen Stress und Nekrose untersucht.<sup>309</sup> BNP und kardiales Troponin T waren in den Tumortieren erhöht. Troponin T deutete auf eine Schädigung der Myofibrillen hin.<sup>310</sup> Somit erfolgte nicht nur eine Atrophie des Gewebes sondern auch ein Verlust von Kardiomyozyten durch Nekrose.

Desweiteren erfolgt bei allen Arten von Kardiomyopathien kardiales Remodelling, das wesentlich zur eingeschränkten Funktion des Herzens beiträgt.<sup>311, 312</sup> Aus zwei Publikationen ist bereits bekannt, dass kardiales Remodelling auch bei experimenteller Tumorkachexie erfolgt.<sup>178, 183</sup> Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnten Tian *et al.* vermehrt Fibrose im Herz von kachektischen Mäusen des C26-Modells nachweisen.<sup>178</sup> In dieser Studie wurden zusätzlich die Zunahme von Fibrinogen, MCP-1 und TIMP-1 gezeigt. Dabei nahm der Grad der Fibrose von Tag 7 bis Tag 13 zu und erklärt auch die progressiv schlechtere Kontraktilität des Herzens.

Somit kann zusammengefasst werden, dass die Tumorkachexie zu einer progressiven Atrophie und Dysfunktion des Herzens führte.

#### 4.1.5 Einfluss auf katabole und anabole Signalwege

Aufgrund des Tumor-induzierten Massenverlustes des Herzens sollte untersucht werden, welche katabolen Mechanismen für den vermehrten Proteinabbau verantwortlich waren. Da es zu dieser Thematik keine Publikationen zum AH-130 Modell gibt, soll das C26-Modell zum Vergleich dienen.

Es ist bekannt, dass der Verlust der Skelettmuskelmasse, gekennzeichnet durch Proteinabbau, im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell durch eine erhöhte Aktivität des

Ubiquitin-Proteasom-Systems und durch eine vermehrte Apoptose verursacht wird.<sup>281, 313</sup> Im Herzgewebe konnte sowohl eine erhöhte Aktivität der Caspase-3 und Caspase-6 als auch des Ubiquitin-Proteasom-Systems in den Tumortieren im Vergleich zu der Shamgruppe gezeigt werden. Diese Aktivität war in allen Messungen am Tag 11 nach Tumordinokulation am höchsten. Gegenätzlich dazu konnte im C26-Modell keine Änderung der Caspase-3 Aktivität im Herzen festgestellt werden.<sup>181</sup> Daraus wurde geschlussfolgert, dass im C26-Modell keine Apoptose für den Gewichtsverlust verantwortlich ist.<sup>181</sup> Desweiteren schließt die gleiche Arbeitsgruppe aus, dass das UPS in diesen Prozess involviert ist. Die mRNA-Level für die E3-Ligasen MuRF-1 und MAFbx sowie die Ubiquitinierung der Proteine waren in den Tumortieren im Vergleich zu den Shamtieren unverändert.<sup>181</sup> In dieser Studie war das Expressionslevel von MuRF-1 auf Proteinebene in den Sham- und Tumortieren auch gleich bleibend. Jedoch kann es sein, dass andere Ubiquitin-E3-Ligasen im Herz bei Atrophie aktiviert sind. Bisher wurden eine höhere Expression von MAFbx, E3 $\alpha$ -II und MuRF-1 im Skelettmuskel kachektischer Ratten, die mit AH-130 Yoshida Hepatoma Zellen inokuliert wurden, nachgewiesen.<sup>147, 313</sup> Im Herzen gibt es noch andere E3-Ligasen wie zum Beispiel MDM2 und CHIP, von denen bekannt ist, dass sie, wie MAFbx und MuRF-1, bei kardialer Hypertrophie aktiv sind, um diese abzuschwächen.<sup>314</sup> Desweiteren wurde herausgefunden, dass die Targets von MDM2 sarkomerische Proteine sind.<sup>314</sup> Auch einige Proteine der IAP-Familie, die normalerweise anti-apoptotisch wirken, besitzen eine Funktion als E3-Ligase.<sup>315</sup> Erst vor kurzem konnten Glass *et al.* die E3-Ligase Fbxo40 im Zusammenhang mit Atrophie im Skelettmuskel nachweisen.<sup>316</sup> Es ist also vorstellbar, dass auch andere E3-Ligasen im AH-130 Yoshida Hepatoma Tumorkachexiemodell zur vermehrten Ubiquitinierung von kardialen Proteinen und somit zur gesteigerten Aktivität des UPS beitragen.

Auch die Messung von miR199a deutet auf eine Beteiligung des UPS am Atrophiebedingten Verlust von kardialer Masse hin. miR199a hemmt durch Bindung an mRNAs deren Translation. Dabei werden genauer gesagt mRNAs inhibiert, die u.a. für die Ubiquitin-E2-Ligasen Ube2i und Ube2g1 codieren.<sup>317</sup> In diesem Versuch war die Expression von miR199a ab Tag 11 signifikant verringert, was dafür spricht, dass die E2-Ligasen vermehrt gebildet wurden und bei der Ubiquitinierung von Proteinen durch das UPS mitwirken konnten.

Die weitere Analyse der in unserem Kachexiemodell ablaufenden Signalwege zeigte, dass auch der Transkriptionsfaktor Foxo3 $\alpha$ , der die Expression von MAFbx im Muskel und damit Atrophie auslösen kann, in unserem Herzgewebe durch Tumordinokulation unverändert vorlag.<sup>170</sup> Die Detektion von Foxo3 $\alpha$  führte nach stundenlanger



Entwicklung nur zu sehr schwachen Banden und es kann sein, dass dieses Signal nicht aussagekräftig genug für die Auswertung war.

Das UPS und die Apoptose waren vor allem am Tag 11 hochreguliert, jedoch begann der Gewichtsverlust des Herzens bereits am Tag 7, was vermuten lässt, dass eventuell auch andere proteolytische Mechanismen (z.B. Calpaine und lysosomales System) bei der Initiation der Atrophie beteiligt sein könnten. Costelli *et al.* vermuten, dass Calpaine sowohl im Skelettmuskel als auch im Herzen zum Proteinabbau im AH-130-Modell beitragen.<sup>318</sup> Sie konnten im Herzen den Abbau von Calpainsubstraten bis Tag 6 nach Tumorinokulation nachweisen ohne jedoch die Calpainaktivität gemessen zu haben.<sup>318</sup> Desweiteren lag p62, das bei Autophagie abgebaut wird, im Herzgewebe der Tumortiere reduziert vor (-47% Tumor Tag 7 vs. Sham).<sup>319</sup> Somit deutet dies darauf hin, dass am Anfang der Kachexieinduktion Calpaine und Autophagie für den Gewichtsverlust im Herzen mitverantwortlich sind. Auch am Tag 11 war p62 um 63% geringer gegenüber Sham vorhanden. Dies lässt vermuten, dass Autophagie nicht nur bei der Induktion sondern auch bei der Progression der Kachexie im Herzgewebe von Bedeutung ist. Dieses Ergebnis konnten auch Cosper *et al.* im C26-Modell anhand des Autophagie-Markers LC-3II zeigen, der zu Beginn der Kachexie (Tag 15) und im Endstadium (Tag 27) erhöht war.<sup>181</sup>

Nachdem eine Zunahme kataboler Mechanismen im Herz durch tumorinduzierte Kachexie nachgewiesen wurde, sollten anabole Signalwege untersucht werden. Vom Skelettmuskel ist bekannt, dass der IGF-1-Signalweg, der normalerweise die Proteinsynthese aktiviert, im AH-130 Yoshida Modell herunterreguliert ist.<sup>167</sup> Desweiteren haben Penna *et al.* den Signalweg *downstream* von IGF-1 untersucht und widersprüchliche Ergebnisse erhalten.<sup>320</sup> Die Analyse unserer Herzproben zeigte eine reduzierte Phosphorylierung von Akt bereits am Tag 7 nach Tumorinokulation, was auf eine Inaktivierung von Akt schließen lässt.<sup>166</sup> Auch die Phosphorylierung von Proteinen, die sich *downstream* von Akt befinden, nahm signifikant ab. Die Phosphorylierung von 4EBP1 reduzierte sich an allen Phosphorylierungsstellen um ca. 50% am Tag 11 in den Tumortieren gegenüber der Shamgruppe. Der Proteinlevel des Translationsinitiationsfaktors 4E-BP-1 lag stark erhöht vor. 4E-BP-1 konnte somit die Translationsinitiation inhibieren.<sup>321</sup> Die Expression der p70S6-Kinase nahm ab, während ihre Phosphorylierung unverändert war. Dies lässt sich nicht erklären, jedoch erweis sich deren Detektion als sehr schwierig. Das Protein GSK-3 $\beta$ , das auch *downstream* von Akt liegt, lag in unseren Proben aktiv (unphosphoryliert) vor und konnte dementsprechend auch die Proteinsynthese hemmen. Die Proteinsynthese sowie die Phosphorylierung von AMPK veränderten sich nicht.

Myostatin war ab Tag 7 im Herzen hochreguliert, was auch schon Zhou *et al.* und Costelli *et al.* im Skelettmuskel des C26-Modells bzw. des AH-130 Modells zeigen konnten.<sup>182, 322</sup> Heineke *et al.* konnten eine Überexpression von Myostatin im Herz in einem Herzinsuffizienz-Modell nachweisen, die zur Atrophie der Skelettmuskeln und des Herzens führte.<sup>323</sup> Desweiteren konnten Zhou *et al.* zeigen, dass durch die Hemmung des Myostatin-Signalweges in dem C26-Modell der Prozess der Kachexie aufgehalten werden kann und die Tiere wieder an Körpergewicht, im Speziellen kardiale Masse und Muskelmasse, zunehmen.<sup>182</sup> Desweiteren kann Myostatin Smad-2 und Smad-3 phosphorylieren und über die resultierende Inhibition von Akt Atrophie bewirken.<sup>166</sup> In diesem Versuch jedoch nahm die phosphorylierte Menge an Smad-2 durch Tumorinokulation im Herz ab, was sich dadurch erklären lässt, dass Myostatin auch u.a. die Expression von Smad-7 induziert, dass Smad-2 inhibieren kann.<sup>324</sup>

Interessanterweise zeigte die Studie von Zhou *et al.*, dass die Behandlung von kachektischen Mäusen des C26-Modells mit einem Activin Rezeptor IIB Konstrukt auch deren Nahrungsaufnahme steigerte.<sup>182</sup> Daraus schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass der verstärkte Myostatin-Signalweg bei Tumorkachexie eventuell zur Anorexie beiträgt.<sup>182</sup> Somit könnte es sein, dass die Anorexie in diesem Tumormodell auch durch den Myostatin-Signalweg mitverursacht wurde.

Diese Ergebnisse beweisen, dass der Verlust myokardialer Masse durch Hypoplasie (Abnahme der Zellzahl) und Atrophie (Abnahme der Zellgröße) verursacht wurde. Von Websky *et al.* konnte in ihrer Dissertation einen verringerten Diameter der Kardiomyozyten in dem AH-130 Yoshida Hepatoma Modell nachweisen.<sup>269</sup> Die Hypoplasie wurde durch Apoptose und Nekrose verursacht. Die Atrophie wurde durch Hemmung anaboler Signalwege und durch Aktivierung kataboler Mechanismen (UPS) ausgelöst. Desweiteren trägt Autophagie zur Atrophie im Herzen sowohl bei der Induktion und Progression der Kachexie bei.

## 4.2 Kardiale Kachexie im LAD-Rattenmodell

Da Kachexie als Co-Morbidität von chronischer Herzinsuffizienz die Mortalität von Patienten stark erhöht, ist es von besonderem Interesse, pathophysiologische Prozesse kardialer Kachexie aufzuklären und dann bestmöglichst zu therapieren.<sup>189</sup>

Zur Induktion von kardialer Kachexie wurde das Modell der LAD-Ligation (*left anterior descending artery*) gewählt, durch das in Ratten oder Mäusen ein akuter myokardialer Infarkt induziert wird, der einen kachektischen Zustand bewirkt, der dem in Menschen sehr ähnlich ist.<sup>325-328</sup>

#### 4.2.1 Mortalität und Infarktgröße

Die experimentelle Ligatur der linken Koronararterie des Herzens führte zur Induktion eines myokardialen Infarktes. Aus der Literatur ist bekannt, dass das LAD-Modell eine Unterversorgung des Herzens mit Sauerstoff bedingt, wodurch myokardiales Gewebe durch Nekrose abstirbt und durch ventrikuläres Remodelling zu Narbengewebe wird.<sup>325</sup> Dieses Narbengewebe (Infarktareal) entsprach in dieser Studie 48,1% (MI-Studie bis Tag 56) bzw. 34,2% (MI-Studie bis Tag 210) vom linken Ventrikel. Die induzierten Infarktgrößen unterschieden sich deswegen voneinander, da in der zweiten Studie die Infarkte aufgrund der Mortalität kleiner gemacht wurden. In anderen Studien waren die Infarkte 25-45% groß, je nachdem, ob ein kleiner oder großer Infarkt induziert werden sollte.<sup>326, 329-331</sup> Weitere Gründe für die verschiedenen Infarktgrößen können in der Wahl des Rattenstammes (Spague-Dawley, Wistar Han, Lewis), deren Ausgangsgewicht und der Erfahrung des Operateurs, die sich durch die Qualität der Infarktoperation äußert, liegen. Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Infarktgrößen könnte an der Ungenauigkeit der Analyse der Infarktgrößen mittels Planimetrie liegen. Beim Vergleich der Ergebnisse aus der Planimetrie mit den Ergebnissen, die aus dem entnommenen Infarktgewebe prozentual vom Linken Ventrikel berechnet wurden (Daten nicht gezeigt), ergibt sich eine viel kleinere Infarktgröße für die Infarkttiere aus beiden Studien. Um eine einheitliche Infarktgröße mit geringerer Mortalität zu bekommen, bietet sich die von Hou *et al.* neu etablierte Methode der Färbung der Koronargefäße vor LAD-Ligation an.<sup>332</sup> Der Erfolg der myokardialen Infarktoperation hatte einen großen Einfluss auf das Überleben der Tiere.<sup>332</sup> Die Mortalität der Ratten, denen ein Myokardinfarkt induziert wurde, betrug 32% in dieser Studie (MI-Studie bis Tag 56) und 9,1% (MI-Studie bis Tag 210).

#### 4.2.2 Effekte auf das Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Organgewichte

Um Aussagen dazu treffen zu können, ob bei den Tieren nach Infarktinduktion ein kachektischer Zustand vorlag, wurde das Körpergewicht in beiden Studien sowie die fettfreie Masse als auch das Fettgewebe am Tag 56 (8 Wochen) bestimmt. Die Analyse des Körpergewichts zeigte, dass die Infarkttiere am Tag 56 genauso viel Gewicht zugenommen hatten wie die Shamtiere (ca. 150g). Dies zeigt das natürliche Wachstum der Shamtiere und lässt vermuten, dass an diesem Tag keine Kachexie in Form einer Gewichtsreduzierung in den Infarkttieren vorlag. Da junge Ratten

verwendet wurden, hätte auch eine Wachstumsverzögerung als Merkmal der Kachexie, wie sie bei Kindern nachgewiesen wurde, in Frage kommen können.<sup>333, 334</sup> Dies ist jedoch auch nicht der Fall. 210 Tage (30 Wochen) nach myokardialen Infarkt hatten die Infarkttiere sogar ein signifikant höheres Körpergewicht als die Shamtiere. Ein gleichbleibendes Körpergewicht zwischen Sham- und Infarktieren wurde auch von Delp *et al.* und Hinkle *et al.* nach 8 Wochen bzw. 12 Wochen nach Infarktinduktion publiziert.<sup>330, 335</sup> Dies kann daran liegen, dass in letzterer Studie als auch dieser Studie kein Diuretikum zur Beseitigung von Ödemen, wie sie bei Herzinsuffizienz auftreten, benutzt wurde.<sup>185</sup> Da Ödeme das Gewicht von Patienten bei kardialer Kachexie erhöhen, können sie die Kachexie verschleiern. Somit kann es sein, dass die Ratten dennoch kachektisch waren. Andere Arbeitsgruppen konnten eine Induktion kardialer Kachexie sowohl in Ratten als auch Mäusen, gekennzeichnet durch Gewichtsverlust und Muskelatrophie, zeigen.<sup>326, 336</sup>

Die Zunahme der fettfreien Masse in Sham- und Infarktieren am Tag 56 bestätigt den Verdacht, dass die Tiere nicht kachektisch wurden. Nur die Daten zur Fettmasse zeigen einen Trend dahingehend, dass die Infarkttiere nicht in dem Maße Fettgewebe zunahmten wie die Shamtiere. Da das LAD-Modell zur Analyse kardialer Kachexie noch nicht oft verwendet wurde, gibt es nicht viele Arbeitsgruppen, die die Fettmasse und fettfreie Masse nach myokardialen Infarkt analysiert haben. Einzig Palus *et al.* sowie Scarlett *et al.* konnten eine Abnahme der Fettmasse nach Infarktoperation in Ratten bzw. Mäusen zeigen.<sup>329, 336</sup> Diese Ergebnisse zeigen, dass das LAD-Rattenmodell nicht immer zur Induktion einer Kachexie führt.

Weiterhin wurden junge Ratten mit einem Gewicht von 200g verwendet, damit wir die gleichen Ausgangsbedingungen zu dem AH-130 Yoshida Hepatoma Modell hatten, um die Ergebnisse beider Modelle miteinander vergleichbar zu machen. Die Ergebnisse dieses Infarktmodells lassen jedoch vermuten, dass junge Ratten durch ihr Wachstum die durch den Myokardinfarkt verursachte systemische Inflammation mit der daraus resultierenden Kachexie kompensieren können. Wahrscheinlich liegt das auch daran, dass junge Tiere eine bessere physische Konstitution und somit eine bessere Wundheilung (kardiale Reparaturmechanismen) aufweisen als alte Tiere.<sup>337</sup> Dass alte Tiere besser geeignet zur Induktion kardialer Kachexie sind, konnte anhand von 14 Monate alten Mäusen und 12 Monate alten Ratten gezeigt werden.<sup>338, 339</sup> Die Ratten verloren 8% und die Mäuse 23% Körpergewicht innerhalb der ersten Wochen nach Infarktinduktion. Alte Labortiere eignen sich auch aus dem Grund besser, da sie das klinische Auftreten einer kardialen Kachexie, die insbesondere im fortgeschrittenen Alter von Patienten auftritt, widerspiegeln.<sup>340</sup>

Die Auswertung der Organgewichte der Shamtiere zeigte, dass diese von Tag 56 zu Tag 210 anstiegen. Dies verdeutlicht erneut, dass die Tiere gesund waren und durch ihr Wachstum an Gewicht zunahmen. Außerdem war ein signifikanter Anstieg des Lungengewichts (+26% Infarkt vs. Sham) am Tag 210 in den Infarkttieren zu verzeichnen. Dieser Ergebnis konnte auch von Scarlett *et al.*, Hinkle *et al.* und Delp *et al.* gezeigt werden, die in ihren Studien keine Diuretika verwendet haben.<sup>330, 335, 336</sup> Dies bestätigt das Vorhandensein eines pulmonalen Ödems, das auf eine fortgeschrittene Herzinsuffizienz infolge des myokardialen Infarktes hindeutet.<sup>185, 341, 342</sup> Das kann dadurch erklärt werden, dass aufgrund einer eingeschränkten linksventrikulären Herzfunktion ein Rückstau des Blutes in die Lunge erfolgt, wodurch es zu einem Druckanstieg mit Stauung von Wasser kommt.<sup>343</sup>

Die analysierten Muskeln waren erneut am Tag 56 nach Infarktoperation in den gesunden und Infarkttieren gleich schwer. Hingegen waren sie (Mm. gastrocnemius, Mm. soleus, Mm. quadrizeps) am Tag 210 durch den Infarkt signifikant schwerer. Dies spricht dafür, dass sich auch in den Gliedmaßen Ödeme gebildet haben. Die Ödembildung in den Skelettmuskeln lässt vermuten, dass aufgrund von kompensatorischer Maßnahmen auch eine rechtsventrikuläre Herzinsuffizienz vorlag, die die Wasserretention im Gewebe verursachte.<sup>344</sup> Wahrscheinlich kam es dadurch systemisch zur Bildung von Ödemen. Auch Hinkle *et al.* konnten ein Anstieg des Gewichtes der Skelettmuskeln bei nicht kachektischen MI-Ratten zeigen.<sup>330</sup> Ferner war in anderen Studien ein reduzierter Gastrocnemius-Muskel nach myokardialen Infarkt vorhanden, wenn die Tiere kachektisch waren.<sup>326, 331</sup>

Zusammenfassend betrachtet, hat die myokardiale Operation der Tiere, deren Erfolg durch das Narbengewebe bestätigt wurde, nicht zur Induktion einer Kachexie geführt. Der Grund für den schlechteren Zustand der Tiere am Tag 210 könnte sich darin begründen, dass aufgrund der langen Zeitspanne die Dilatation des Herzens und somit die Herzinsuffizienz vorangeschritten ist. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurde die Herzfunktion der Sham- und Infarkttiere, im nächsten Kapitel folgend, analysiert.

#### 4.2.3 Effekte auf die Herzstruktur und -funktion

Das ermittelte Herzgewicht war 56 Tage nach myokardialen Infarkt in den Infarkttieren gegenüber der Shamgruppe bereits signifikant schwerer, was sich bis Tag 210 noch verstärkte. Dies zeigte sich auch bei den einzelnen Herzkompartmenten. Auch andere Arbeitsgruppen konnten einen Anstieg des Herzgewichtes nach LAD-Ligatur zeigen. In der Studie von Silvestre *et al.* mit Wistar-Ratten hatten die Shamtiere 32 Tage nach der Operation ein Herzgewicht von  $1071 \pm 21$  mg, während die Infarkttiere ein mittleres

Herzgewicht von  $1300 \pm 63 \text{ mg}$  aufwiesen.<sup>345</sup> Auch Rubin *et al.* konnten eine Zunahme des Herzgewichtes um 16% in den Infarkttieren nach 35 Tagen zeigen, was ähnlich zu unserem Ergebnis für diesen Zeitpunkt war.<sup>346</sup> Desweiteren war in der Studie von Aimond *et al.* nach 4-6 Monaten das Herzgewicht von Infarkttieren um 40% gegenüber Shamtieren erhöht.<sup>347</sup>

Desweiteren sollte analysiert werden, ob es zu einer Abnahme der linksventrikulären Wandstärken als Zeichen einer Infarktausbreitung und Wandverdünnung oder bereits zu Hypertrophie kam. Deswegen wurden die Stärke der Hinterwand und des Septums am Tag 56 ausgewertet.<sup>348</sup> Das Ergebnis zeigte, dass die Stärke der Hinterwand und des Septums nur in der Systole signifikant durch myokardialen Infarkt gegenüber der Shamgruppe verringert waren. Dennoch zeigten die Wandstärken in den Infarktgruppen gegenüber den Ausgangswerten eine prozentuale Zunahme (+7% für die systolische Hinterwandstärke; +8% systolische Septumstärke), was dafür spricht, dass das Wachstum des Septums und der Hinterwand durch myokardialen Infarkt eingeschränkt war. Gegen ein eingeschränktes Wachstum des Septums spricht jedoch das unveränderte Gewicht des Septums nach der Sektion. Das Septum gehört anatomisch gesehen zum linken Ventrikel und es könnte sein, dass die beiden Herzkompartimente nicht richtig voneinander getrennt wurden. Zusätzlich dazu könnten die verringerte Wandstärke durch einen nekrotischen Verlust von Kardiomyozyten in der Infarktzone entstanden sein.<sup>349</sup>

Weiterhin erfolgte die Untersuchung des linken Ventrikels auf eine vorhandene Dilatation. Die Diameter in der Systole und Diastole waren signifikant durch myokardialen Infarkt vergrößert. Diese Baseline-Werte veränderten sich jedoch nicht bis Tag 56 als auch Tag 210. Diese Zunahme des linksventrikulären Durchmessers bestätigt die vermutete Dilatation des linken Ventrikels, wie sie auch von anderen Arbeitsgruppen nach myokardialen Infarkt in Ratten nachgewiesen werden konnten.<sup>326,</sup>

<sup>331, 350</sup> Ferner resultierte der vergrößerte systolische Diameter aus einer eingeschränkten linksventrikulären Verkürzungsfraktion. Desweiteren konnten wir eine verringerte Auswurfsfraktion und ein geringeres Schlagvolumen durch myokardialen Infarkt an beiden Zeitpunkten zeigen. Diese verschlechterte Herzfunktion, verursacht durch LAD-Ligation in Ratten, konnten auch von Sjaastad *et al.* und Morgan *et al.* gezeigt werden.<sup>351, 352</sup> Mögliche Ursachen für die verschlechterte Herzfunktion können eine reduzierte  $\beta$ -adrenogene Antwort sowie eine eingeschränkte Funktion des Sarkoplasmatischen Retikulum sein, die in einer verschlechterten Erregungsleitung des Herzens und somit in einer reduzierten Kontraktilität resultieren.<sup>348, 353</sup> Es zeigte sich auch ein Trend zur Erhöhung der Herzrate wie sie nach Myokardinfarkt in Ratten durch Aktivierung des sympathetisch-adrenergen Systems typisch ist.<sup>240</sup>

Zusammenfassend zeigte sich, dass die LAD-Ligation zur Dilatation und Hypertrophie des Myokards mit eingeschränkter Herzfunktion und somit zu einer chronischen Herzinsuffizienz führte. Bereits nach 3-4 Wochen kann eine die Ligatur der linken Koronararterie mittel- bis schwerwiegende chronische Herzinsuffizienz in Ratten verursachen.<sup>354-356</sup> Ferner kam es zu einer stärkeren Schädigung des Myokards 210 Tage nach myokardialen Infarkt, erkennbar dadurch, dass die Infarkttiere zu diesem Zeitpunkt eine stärkere Dilatation und Hypertrophie der Herzkompartimente aufwiesen.

#### 4.2.4 Einfluss auf katabole und anabole Signalwege

Myokardiale Ischämie in Ratten führt zur Induktion von Apoptose in Kardiomyozyten und trägt damit wesentlich zur Verschlechterung der Herzfunktion bei.<sup>241, 357</sup> In diesen Studien zeigte die Analyse des Herzgewebes keine vermehrte Apoptose 56 Tage und 210 Tage nach myokardialer Infarktoperation. Dafür gibt es mehrere Erklärungen. Apoptose findet direkt nach der Okklusion der linken Arterie in der Region des Infarktes statt und ist laut Kajstura *et al.* innerhalb der ersten 6 Stunden hauptsächlich für den myokardialen Schaden verantwortlich.<sup>358</sup> Danach erfolgen Nekrose und andere Remodellingprozesse bis die myokardiale Wunde am Tag 21 verheilt ist und sich eine Narbe gebildet hat.<sup>325, 359</sup> Hingegen konnten Ahmet *et al.* und Sia *et al.* Apoptose auch in späteren Phasen nach myokardialen Infarkt im Herzgewebe nachweisen.<sup>360, 361</sup>

Desweiteren war die Ubiquitin-Proteasom-Aktivität nicht durch den myokardialen Infarkt zu diesen Zeitpunkten im Herz gesteigert. Dieses Ergebnis konnte auch durch die Proteinexpression von pFoxo, Foxo und MuRF-1, die unverändert war, bestätigt werden. Gegensätzlich dazu konnten Adams *et al.* einen Anstieg der Proteinexpression von MuRF-1 und des mRNA-Levels von MAFbx 49 Tage nach myokardialer Infarktinduktion zeigen, obwohl die Ubiquitin-Proteasom-Aktivität unverändert war.<sup>362</sup> Auch Autophagie, als weiterer kataboler Mechanismus, wurde nicht durch den Infarkt am Tag 56 oder Tag 210 induziert.

Da bekannt ist, dass myokardiale Infarktinduktion zur Hypertrophie des Myokards führt, wurde vermutet, dass auch dementsprechend Hypertrophie-vermittelnde Signalwege im Herzen aktiviert waren.<sup>363</sup> Dies kann durch Aktivierung des mTor-Signalweges oder Inhibition des GSK-3 $\beta$ -Signalweges bewirkt werden.<sup>364</sup> In diesen Studien war Akt nur an einer Stelle (Thr308) 56 Tage nach Myokardinfarkt phosphoryliert. Dies deutet auf keine vermehrte Proteinsynthese hin, da für die Aktivierung von Akt beide Phosphorylierungen an den Aminosäuren Threonin 308 und Serin 473 erforderlich sind. Desweiteren war an beiden Zeitpunkten die Menge an p70S6K erhöht, jedoch

deren Phosphorylierung unverändert. 4E-BP-1 wurde an dem Threonin 37/46 vermehrt phosphoryliert. Diese Phosphorylierung verhindert nicht die Bindung von 4E-BP-1 zum Translationsinitiator eIF4E. Dies wäre nur bei einer zusätzlichen Phosphorylierung von 4E-BP-1 am Serin 65 der Fall gewesen. Auch die Abnahme letztgenannter Phosphorylierung am Tag 210 nach Infarktinduktion spricht gegen eine Aktivierung der Proteinsynthese durch diesen Signalweg. Es gab jedoch auch Probleme bei der Proteindetektion von Akt (Ser473), die zu falschnegativen Ergebnissen geführt haben könnten.

Wahrscheinlich wurde die Erhöhung des Herzgewichtes durch Suppression von GSK-3 $\beta$  und daraus resultierender Aktivierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2B bewirkt.<sup>365</sup> Auch der Myostatin-Signalweg war durch myokardiale Infarktoperation nicht induziert.

### 4.3 Pharmakologische Therapie im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell

Da sich im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell eine Tumorkachexie bedingte Kardiomyopathie entwickelte, wurde vermutet, dass eine pharmakologische Behandlung der Tumortiere mit kardiovaskulären Medikamenten eventuell die Herzfunktion verbessert, dadurch auch den Verlust der Fett- und Skelettmuskulatur abschwächt und sich das Überleben der Tiere verlängert. Bisher gibt es nur eine experimentelle Studie über die Behandlung von Tumorkachexie mit dem ACE-Inhibitor Imidapril, die jedoch mit dem MAC-16-Tumor in Mäusen durchgeführt wurde.<sup>366</sup> Imidapril befindet sich in der Phase III der klinischen Studie von *ARK Therapeutics* zur Behandlung von Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungentumor. Es gibt keine Daten bezüglich der Wirkung von  $\beta$ -Blockern oder Inhibitoren des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System im AH-130 Yoshida Hepatoma Modell. Lediglich wurden  $\beta$ -Agonisten zur Behandlung des Verlustes der Skelettmuskelmasse in diesem und anderen experimentellen Tumorkachexiemodellen verwendet.<sup>129, 270, 367</sup>

Als Medikamente wurden  $\beta$ -Blocker (Bisoprolol, Carvedilol), ein Aldosteronantagonist (Spironolacton) und ein ACE-Inhibitor (Imidapril) verwendet, da sie standardmäßig bei Herzinsuffizienz verwendet werden und auch bei kardialer Kachexie erfolgversprechend waren.<sup>368</sup> Alle Medikamente wurden bei Kontrolltieren angewendet und zeigten keinerlei Nebenwirkungen. Desweiteren wurden die Medikamente präventiv und nicht therapeutisch angewendet, da es sich bei dem AH-130 Modell um ein aggressives Tumormodell handelt.



#### 4.3.1 Einfluss auf das Überleben

Es wurden verschiedene Dosierungen für jedes Medikament benutzt. Dabei zeigte sich, dass 5mg/kg/d Bisoprolol und 50mg/kg/d Spironolacton das Überleben der Tumortiere signifikant verlängerten. Auch 50mg/kg/d Bisoprolol und 5mg/kg/d Spironolacton wirkten sich positiv auf das Überleben aus, hingegen brachten die geringeren Dosierungen keinen Erfolg. Aus klinischen Studien ist bekannt, dass Bisoprolol oder Spironolacton signifikant das Überleben von CHI-Patienten verlängern konnte.<sup>253, 369</sup> Auch Behandlung von Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz mit dem  $\beta$ -Blocker Carvedilol wirkte sich positiv auf die Mortalität aus (COPERNICUS-Studie).<sup>370</sup> Jedoch zeigte Carvedilol in allen Dosierungen in unserem experimentellen Modell der Tumorkachexie keinen lebensverlängernden Erfolg. Die Behandlung der Tumortiere mit 1mg/kg/d und 10mg/kg/d Imidapril oder Carvedilol in allen Dosierungen führte sogar zu einer Erhöhung der Mortalität gegenüber der Placebogruppe. Ob dieses Ergebnis bezüglich Imidapril im MAC16-Tumormodell übereinstimmt, ist nicht klar, da es keine Überlebensanalyse aus der Studie von Sanders *et al* gibt.<sup>366</sup> Die Ursachen für die verringerte oder erhöhte Mortalität durch pharmakologische Behandlung der Tumortiere hängt wahrscheinlich mit dem Therapieerfolg des jeweiligen Medikaments auf die Kachexie bedingte Kardiomyopathie zusammen. In die folgenden Analysen wurden nur 5mg/kg/d Bisoprolol, 50mg/kg/d Spironolacton, 30mg/kg/d Carvedilol und 0,4mg/kg/d Imidapril mit eingeschlossen.

#### 4.3.2 Tumorzellzahl und Tumolvolumen

5mg/kg/d Bisoprolol verringerte signifikant das Tumolvolumen, während die Tumorzellzahl in dieser Behandlungsgruppe oder durch Behandlung mit 50mg/kg/d Spironolacton signifikant anstieg. Eine Erklärung für das reduzierte Tumolvolumen könnte eventuell sein, dass Bisoprolol oder Spironolacton den inflammatorischen Zustand, der die Permeabilität der Gefäße begünstigt, in den Tumortieren reduziert haben, wodurch die Aszitesbildung verringert wurde.<sup>275</sup> Desweiteren konnten wir eine Korrelation zwischen dem Tumolvolumen und dem Proliferationsverhalten der Zellen feststellen. Je größer das Tumolvolumen war, desto weniger Zellen befanden sich in diesem. Folglich hatten wir in einem geringeren Volumen mehr Zellen. Es ist unklar, ob das Proliferationsverhalten der Zellen direkt durch die Medikamente beeinflusst wurde. Gegensätzlich dazu hatte der  $\beta$ -Blocker Carvedilol (30mg/kg/d) weder einen Einfluss auf die Tumorzellzahl noch auf das Tumolvolumen.

0,4mg/kg/d Imidapril senkte leicht das Tumolvolumen, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Tumorzellzahl. Sanders *et al.* konnten ein verringertes Wachstum des MAC-16 Tumors durch Behandlung der Tiere mit Imidapril bewirken. Jedoch war Imidapril nur in einer Dosierung von 30mg/kg/d erfolgreich. Da sich die hohen Dosierungen von Imidapril negativ auf das Überleben in dieser Studie auswirkten, hätte auch eine Dosierung von 30mg/kg/d keine Auswirkung auf die Tumorzellzahl gehabt. Der Unterschied in diesem Studienergebnis mit Imidapril kann auch aus den unterschiedlichen Tumormodellen resultieren (AH-130: liquider Tumor, MAC16: solider Tumor).

#### 4.3.3 Körpergewicht und Körperzusammensetzung

Placebotiere verloren 26% Körpergewicht, 25% fettfreie Masse und 66% Fettmasse, was den Ergebnissen aus dem Verlaufsversuch ähnelte und die Reproduzierbarkeit der Daten zeigte. Behandlung der Tumortiere mit Bisoprolol, Spironolacton oder Imidapril konnte den Verlust des Körpergewichtes reduzieren, wobei Bisoprolol und Spironolacton die besten Ergebnisse erzielten. Dies zeigte sich auch anhand eines geringeren Verlust von fettfreier Masse und Fettgewebe. Spironolacton könnte die positiven Effekte durch Senkung der Inflammation und Verbesserung der endothelialen und kardialen Dysfunktion vermittelt haben.<sup>257</sup>

Lainscak *et al.* konnte eine Zunahme des Körpergewichtes, hauptsächlich durch Erhöhung der Fettmasse, bei CHI-Patienten durch Bisoprolol zeigen.<sup>371</sup> Für den reduzierten Verlust von Fettgewebe und fettfreier Masse gibt es mehrere Gründe. Bei Tumorkachexiepatienten erfolgt eine vermehrte Expression der  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren in Adipozyten, die mit der Expression der Hormon-sensitiven Lipase korrelieren.<sup>372</sup> Außerdem ist bekannt, dass Katecholamine durch die Aktivierung von  $\beta_1$ -AR eine vermehrte Lipolyse in Kachexie verursachen.<sup>372, 373</sup> Somit kann die Reduzierung des Fettgewebeverlustes in den mit Bisoprolol behandelten Tumortieren durch eine Blockierung der  $\beta_1$ -AR in den Adipozyten erfolgt sein. Folglich würde daraus eine Verringerung der Lipolyse resultieren. Desweiteren wird eine Veränderung inflammatorischer Faktoren im weißen Fettgewebe als Ursache für die Lipolyse vermutet.<sup>374</sup> Eventuell konnte Bisoprolol auch die Inflammation in den Tumortieren reduzieren. Lamont *et al.* konnten auch eine Senkung des Ruheenergiebedarfs durch  $\beta$ -Blocker zeigen, jedoch an gesunden Probanden.<sup>375</sup>

Der Abbau der Skelettmuskulatur in diesem Tumorkachexiemodell resultiert aus einem vermehrten Katabolismus, vor allem gekennzeichnet durch eine höhere Aktivität des UPS, verursacht durch Katecholamine und proinflammatorische Cytokine.<sup>284, 293, 294</sup>

Hryniewicz *et al.* konnten eine Senkung der Katecholamine in kachektischen CHI-Patienten nach 6monatiger Behandlung mit  $\beta$ -Blockern zeigen.<sup>376</sup> Somit kann vermutet werden, dass Bisoprolol die Menge an Katecholaminen und eventuell auch an Cytokinen gesenkt hat, wodurch sie nicht mehr ihre katabolen, systemischen Effekte vermitteln konnten. Zusätzlich kann es sein, dass Bisoprolol die Katecholamin-induzierte Glykogenolyse hemmt, wie es für  $\beta$ -Blocker beschrieben wurde.<sup>246</sup>

Carvedilol konnte die Abnahme des Körpergewichtes durch Tumorinokulation nicht verhindern. Das ist gegensätzlich zu den Ergebnissen von Kovacic *et al.*, die eine Zunahme des Körpergewichtes in CHI-Patienten durch Carvedilol zeigen konnten.<sup>377</sup> Eventuell hat die zusätzliche  $\beta_2$ - und  $\alpha_1$ -antagonistische Aktivität von Carvedilol den negativen therapeutischen Effekt im AH-130-Modell bewirkt. Inhibition der  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren in der Lunge können zur Bronchokonstriktion geführt haben, die zusammen mit dem Aszites eine verschlechterte Atmung und daraus resultierend eine verschlechterte Sauerstoffversorgung des Körpers verursacht haben.<sup>246</sup> Auch die durch Hemmung der  $\alpha_1$ -AR in den Blutgefäßen vermittelte Vasodilatation kann zum schlechten Zustand der Tumortiere beigetragen haben.<sup>378</sup>

Imidapril konnte den Gewichtsverlust durch Tumorinokulation reduzieren, was mit Ergebnissen aus dem MAC16-Modell übereinstimmt, und sich dennoch nicht positiv auf die Überlebensanalyse auswirkte.<sup>366</sup> Das kann daran liegen, dass Imidapril eventuell den Proteinabbau im Skelettmuskelgewebe gehemmt hat und sich gleichzeitig negativ auf andere Organe ausgewirkt hat. Sanders *et al.* konnten zeigen, dass Angiotensin II direkt das UPS aktiviert und somit den Muskelabbau inhibiert.<sup>366</sup> Desweiteren ist bekannt, dass ACE-Inhibition wieder zur Sekretion von Aldosteron führen kann, da die Produktion von Aldosteron auch von Kalium oder Katecholaminen abhängt. Dieses Phänomen ist als „*Aldosteron breakthrough*“ bekannt.<sup>236</sup>

#### 4.3.4 Parameter der Lebensqualität

Placebotiere entwickelten Anorexie als Begleiterscheinung von Kachexie. Die 80%ige Reduzierung der Futteraufnahme am Tag 11 in dieser Studie entsprach dem Ergebnis aus dem Verlaufsversuch. Tumortiere, die mit Bisoprolol oder Spironolacton behandelt wurden, nahmen mehr Nahrung zu sich als unbehandelte Tumortiere. Behandlung mit Carvedilol oder Imidapril konnte die Anorexie nach Tumorinokulation nicht mildern.

Die Bewegung der Tumortiere war am Tag 11 nach Tumorinokulation um 60% reduziert und Bisoprolol, Spironolacton oder Carvedilol konnten die Bewegung gegenüber Placebo steigern. Eine Ursache dafür kann sein, dass die Tiere aus der Bisoprolol- oder Spironolactongruppe weniger Atrophie des Muskel- und Fettgewebes

als Placebotiere aufwiesen und somit mehr Kraft hatten, um sich zu bewegen. Desweiteren kann das in Bisoprolol behandelten Tumortieren geringere Tumorumfänge eine bessere Funktion des respiratorischen Systems bedingt haben. Die mit Imidapril behandelten Tumortiere bewegten sich gegenüber Placebo nicht mehr. Dies lässt sich damit erklären, dass sie zwar weniger Gewebeatrophie als unbehandelte Tumortiere aufwiesen, jedoch die Herzfunktion genauso verschlechtert wie in der Placebogruppe war.

#### 4.3.5 Einfluss auf die Herzfunktion

Der Verlust der linksventrikulären Masse der Placebotiere aus dieser Studie entspricht dem Verlust aus dem Verlaufsversuch. Bisoprolol konnte diesen Verlust vollständig verhindern und Spironolactone führte sogar zu einer Zunahme der linksventrikulären Masse. Die Placebotiere wiesen generell, wie schon im Verlaufsversuch festgestellt, eine verschlechterte Herzfunktion auf, die anhand einer reduzierter Auswurfsfraktion, Verkürzungsfraction, Schlagvolumen sowie einem schlechterem Herzminutenvolumen erkennbar war. Da von Tessitore *et al.* eine Erhöhung der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin im AH-130 Modell nachgewiesen wurde, kann vermutet werden, dass Katecholamine an der Pathophysiologie der Kardiomyopathie mitwirken.<sup>284</sup> Desweiteren zeigen die Ergebnisse der im Plasma gemessenen Biomarker für die Nierenfunktion in den Tumortieren eine Verschlechterung der renalen Funktion, die als Folge einer kardialen Dysfunktion entsteht.<sup>379</sup> Erhöhte Werte für NGAL, das auf einen Tubulusschaden hindeutet, sowie für Kreatinin in den Placebotieren sprechen für eine Nierenschädigung.<sup>380, 381</sup> Erhöhtes Aldosteron, das für den Verlust von Kalium und die verringerte Natriumkonzentration im Plasma verantwortlich war, lässt eine Beteiligung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems bei der Entstehung der Kardiomyopathie vermuten.<sup>236</sup>

Bisoprolol verbesserte nur das Schlagvolumen und den enddiastolischen Durchmesser. Das ergibt sich aus der  $\beta_1$ -antagonist vermittelten Funktion von Bisoprolol in den Kardiomyozyten und der Niere, wodurch die Aktivität des Sympathikus und des RAAS inhibiert wird.<sup>245, 252</sup> Folglich kann es sein, dass Remodellingvorgänge wie zum Beispiel Fibrose verhindert wurden. Dagegen spricht jedoch die nicht veränderte Verkürzungsfraction, die auf eine gleichbleibend schlechte Kontraktilität des Herzens hindeutet.  $\beta$ -Blocker verringern normalerweise den Blutdruck, die Herzrate und die myokardiale Kontraktilität.<sup>382</sup> Deswegen resultiert die verbesserte Schlagkraft des Herzens wahrscheinlich aus dem Erhalt der linksventrikulären Masse. Imidapril und

Carvedilol konnten nur das Schlagvolumen leicht verbessern und hatten ansonsten keinen positiven Effekt auf das Herz.

Die Herzfunktion wurde durch Spironolacton verbessert, erkennbar an einer gegenüber Placebo verbesserten Auswurfsfraktion und erhöhtem Schlagvolumen. Das Ergebnis für die Verkürzungsfraktion deutet auf eine bessere Kontraktilität des Herzens hin. Spironolacton bewirkt die Inhibition von Aldosteron, das zum kardialen Remodelling durch Fibrose beiträgt. Somit ist denkbar, dass die Aldosteroninhibition die Bildung von Fibrose verhindert hat.

Wir konnten eine Korrelation zwischen der linksventrikulären Masse und dem Überleben zeigen. Daraus folgt, dass eine Verringerung der kardialen Atrophie durch geeignete pharmakologische Medikamente das Überleben verlängern kann. Dies konnten wir durch Behandlung von Tumortieren mit Bisoprolol oder Spironolacton zeigen. Zhou *et al.* konnte diesen Zusammenhang in dem C26-Modell durch Verwendung eines Inhibitors für den Activin-Rezeptor IIB nachweisen.<sup>182</sup>

#### 4.3.6 Katabole und anabole Mechanismen

Wie auch im Verlaufsversuch konnte eine Zunahme der Apoptose, der Ubiquitin-Proteasom-Aktivität und der Autophagie in dem Herzgewebe der Placebotiere gezeigt werden. Diese Mechanismen waren zusammen mit einem reduzierten Anabolismus für den Verlust kardialer Masse, und im Besonderen für die linksventrikuläre Masse, verantwortlich.

Behandlung der Tumortiere mit Spironolacton konnte die kardiale Caspase-3 Aktivität und *Trypsin-like* Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems gegenüber Placebotieren reduzieren. Bisoprolol hatte keinen Einfluss auf die Apoptose, konnte jedoch die Ubiquitin-Proteasom-Aktivität signifikant verringern. Der Erhalt der kardialen Masse zeigte sich auch anhand einer Aktivierung des Akt-Signalweges. Die durch Tumorkonkulation induzierte Autophagie wurde nicht von Bisoprolol oder Spironolacton verändert.

Gegensätzlich dazu erhöhten Imidapril oder Carvedilol die Ubiquitin-Proteasom-Aktivität (PGPH) gegenüber der Placebogruppe. Desweiteren verstärkte Imidapril die Autophagie in den Tumortieren. Diese Ergebnisse bestätigen den Verlust der linksventrikulären Masse in diesen Gruppen. Auch die Analyse der Signalwege zeigte einen vermehrten Katabolismus und reduzierten Anabolismus in dem Herzgewebe beider Behandlungsgruppen. Die gesteigerte Expression von MuRF-1 ging mit der erhöhten UPS-Aktivität durch Carvedilol einher. Auch der Akt/mTor-Signalweg wies auf

eine Inhibition der Proteinsynthese hin. Jedoch konnten auch Carvedilol oder Imidapril die Myostatinexpression auf das Niveau der Shamtiere reduzieren.

Die gegensätzlichen induzierten Effekte von Bisoprolol und Carvedilol im Herzen lassen sich eventuell durch eine konträre Wirkungsweise der  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -ARs im Myokard erklären. Während Stimulation von  $\beta_1$ -ARs Apoptose in adulten Kardiomyozyten induziert, bewirkt eine Aktivierung der  $\beta_2$ -ARs antiapoptotisches Signaling<sup>383</sup>. Zhu *et al.* konnten die Induktion der Apoptose durch Aktivierung der Calcium/Calmodullin Kinase II zeigen, die nicht über den PKA-Signalweg erfolgt.<sup>384</sup> Dabei wird die antiapoptotische Wirkung über  $\beta_2$ -ARs durch Aktivierung von ERK, initiiert durch Gi-Protein/PKC $\epsilon$ -Signaling, vermittelt.<sup>385</sup> Somit würde bei einer Inhibition von  $\beta_1$ -ARs durch Bisoprolol eine Hemmung der Apoptose stattfinden. Carvedilol hingegen würde durch zusätzliche Blockade von  $\beta_2$ -ARs weiterhin Apoptose im Herzen induzieren.

Bei Kachexie-bedingter Atrophie des Skelettmuskels erfolgt ein Abbau sarkomerischer Bestandteile der Zelle.<sup>386</sup> In dem Herzgewebe von Tumortieren konnte kein Abbau von Troponin T und Tropomyosin nachgewiesen werden, jedoch fand ein Abbau der Myosin-Heavy-Chain statt, der auch im Herzgewebe von Carvedilol oder Imidapril behandelte Tumortiere zu finden war. Auch Cosper *et al.* und Tian *et al.* konnten einen Abbau von kardialem MHC- $\alpha$  nach Tumorinokulation im C26-Modell zeigen.<sup>178, 181</sup> Somit kann der Abbau von MHC zu der verschlechterten Kontraktilität beigetragen haben. Durch Behandlung der Tumortiere mit Bisoprolol oder Spironolacton konnte die Reduktion der kardialen MHC-mRNA Expression verhindert werden.

#### 4.3.7 *In vitro* Versuch zur Klärung des Wirkmechanismus von Bisoprolol und Spironolactone

Um den genauen Wirkungsmechanismus des  $\beta$ -Blockers Bisoprolol und des Aldosteronantagonist Spironolacton im Herzen des AH-130 Modells erklären zu können, wurden *in vitro* Versuche mit neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRKM) durchgeführt. Dabei wurden die Proteinexpression von GSK-3, pGSK-3 und Myosin analysiert.

In dem ersten Versuch erfolgte eine Stimulation von  $\beta$ -Adrenorezeptoren mit dem  $\beta$ -Sympathomimetikum Isoproterenol, das eine Abnahme der GSK-Phosphorylierung und der mRNA-Expression von MHC bewirkte. Zugabe der  $\beta$ -Blocker Bisoprolol oder Metroprolol konnten diese Effekte verhindern. Dies zeigt, dass die spezifische Inhibition der  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren eine Inhibition von GSK-3 bewirkte, wodurch die

Proteinsynthese aktiviert wurde. Auch die Expression der MHC-mRNA war nicht reduziert.

In einem zweiten Experiment konnte gezeigt werden, dass Aldosteron oder Spironolacton keinen direkten Einfluss auf MHC oder GSK-3 hatten. Dies lässt vermuten, dass Spironolacton durch Inhibition fibrotischer Prozesse die Herzfunktion im AH-130 Modell verbessert.

#### **4.4 Kardiale Kachexie bei Tumorpatienten**

Aufgrund der Ergebnisse aus den Studien mit dem AH-130 Yoshida Hepatoma Kachexie-Modell, war es von Interesse, zu erfahren, ob es auch Anzeichen einer Tumorkachexie-induzierten Kardiomyopathie beim Menschen gibt. Deswegen wurden Daten von lebenden und verstorbenen Tumorpatienten ohne und mit Kachexie erhoben.

Die Daten der lebenden Patienten zeigten, dass sich die Kontrollen weder von den nicht-kachektischen noch den kachektischen Patienten im Alter, Körpermassenindex oder Gewicht unterschieden. Jedoch wiesen alle Tumorpatienten signifikant mehr Aldosteron im Plasma auf, was auf Fibrose hindeuten könnte. Auch stark erhöhte BNP-Level (+709% kachektische Patienten vs. Kontrolle) von kachektischen Krebspatienten sprechen für eine Schädigung des Myokards.

Die verstorbenen Tumorpatienten, die an Kachexie litten, hatten ein deutlich verringertes Gewicht und Körpermassenindex gegenüber den gesunden und nicht kachektischen Patienten. Desweiteren war ihr Herzgewicht und die Stärke der linksventrikulären Hinterwand reduziert, was eventuell auf Kachexie bedingte Atrophie des Myokards hinweist. Die rechtsventrikuläre Hinterwand zeigte einen Trend hinsichtlich ihrer Reduktion. Es ist unklar, welche Mechanismen zu der Reduktion des Herzgewichtes führten, jedoch könnten Apoptose als auch Nekrose in Frage kommen. Weiterhin ist nicht bekannt, ob die Atrophie des Myokards eine eingeschränkte Herzfunktion bewirkte, da bei Krebspatienten die Herzfunktion nicht untersucht wird. Jedoch lässt die großflächig in der linksventrikulären Hinterwand nachgewiesene Fibrose eine myokardiale Dysfunktion mit eingeschränkter Kontraktilität erahnen. Es gibt somit mehrere Hinweise, dass der Tumor selber zuerst Kachexie und daraus resultierend eine Kardiomyopathie induziert. Folglich könnte es sein, dass nicht die Neoplasie sondern eine massive Schädigung des Myokards, verursacht durch Tumorkachexie-bedingte Kardiomyopathie, zum Tod von Patienten führt. Dementsprechend wäre es vorstellbar, dass eine Medikation mit kardiovaskulären

Medikamenten die Herzfunktion von kachektischen Tumorpatienten verbessern und sich positiv auf deren Überleben auswirken könnte.

In einer Studie mit 506 Tumorpatienten im Jahre 1970 wurde als Todesursache bei 19% der Patienten respiratorische Insuffizienz und bei 7% kardiovaskuläre Dysfunktion festgestellt.<sup>387</sup> Dyspnoe und Müdigkeit treten als Symptome bei Tumorpatienten auf und bereits Ripamonti *et al.* vermutete, dass Dyspnoe durch die Neoplasie ausgelöst wird und im Zusammenhang mit der Kachexie entsteht.<sup>388, 389</sup> Desweiteren haben Walsh *et al.* entdeckt, dass von 1000 untersuchten Tumorpatienten 70% Müdigkeit, 50% Dyspnoe und einen über 10%igen Gewichtsverlust aufwiesen und bei 30% der Patienten Ödeme auftraten.<sup>15</sup> Diese Symptome, die denen von Herzinsuffizienzpatienten ähneln, deuten auf eine Kachexie-induzierte Kardiomyopathie bei Krebspatienten hin.

In einem Patent von Anker *et al.* wurde die Erhöhung von Noradrenalin in kachektischen Tumorpatienten beschrieben.<sup>390</sup> Noradrenalin führt zu einer verstärkten Aktivierung des Sympathikus mit daraus resultierender gesteigerter Herztätigkeit und Hypertonie.<sup>391, 392</sup> Desweiteren konnten erhöhte Konzentrationen von Aldosteron und Angiotensin II nachgewiesen werden.

Diese Daten sprechen allgemein für eine Kachexie bedingte Schädigung des Herzens und daraus resultierender Kardiomyopathie. Jedoch bedarf es weiterer Untersuchungen des Herzens von Patienten mit verschiedenen Neoplasien, um Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Pathophysiologie der Herzatrophie herauszubekommen, um diese dann bestmöglich zu therapieren. Eventuell ist eine Involvierung des Herzens in den Atrophieprozess noch bei anderen Kachexie-assoziierten chronischen Erkrankungen von Bedeutung.



## 5 LITERATUR

1. Evans WJ, Morley JE, Argiles J, et al. Cachexia: a new definition. *Clin Nutr.* Dec 2008;27(6):793-799.
2. von Haehling S, Anker SD. Cachexia as a major underestimated and unmet medical need: facts and numbers. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2010;1(1):1-5.
3. MacDonald N, Easson AM, Mazurak VC, et al. Understanding and managing cancer cachexia. *J Am Coll Surg.* Jul 2003;197(1):143-161.
4. Muscaritoli M, Bossola M, Aversa Z, et al. Prevention and treatment of cancer cachexia: new insights into an old problem. *Eur J Cancer.* Jan 2006;42(1):31-41.
5. Tan BH, Fearon KC. Cachexia: prevalence and impact in medicine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* Jul 2008;11(4):400-407.
6. von Haehling S, Genth-Zotz S, Anker SD, et al. Cachexia: a therapeutic approach beyond cytokine antagonism. *Int J Cardiol.* Sep 2002;85(1):173-183.
7. Morley JE, Thomas DR, Wilson MM. Cachexia: pathophysiology and clinical relevance. *Am J Clin Nutr.* Apr 2006;83(4):735-743.
8. Fearon K, Strasser F, Anker SD, et al. Definition and classification of cancer cachexia: an international consensus. *Lancet Oncol.* May;12(5):489-495.
9. Fearon KC. The Sir David Cuthbertson Medal Lecture 1991. The mechanisms and treatment of weight loss in cancer. *Proc Nutr Soc.* Aug 1992;51(2):251-265.
10. Fearon KC, Voss AC, Hustead DS. Definition of cancer cachexia: effect of weight loss, reduced food intake, and systemic inflammation on functional status and prognosis. *Am J Clin Nutr.* Jun 2006;83(6):1345-1350.
11. Tisdale MJ. Cachexia in cancer patients. *Nat Rev Cancer.* Nov 2002;2(11):862-871.
12. Beck SA, Tisdale MJ. Production of lipolytic and proteolytic factors by a murine tumor-producing cachexia in the host. *Cancer Res.* Nov 15 1987;47(22):5919-5923.
13. Argiles JM, Lopez-Soriano FJ, Toledo M, et al. The cachexia score (CASCO): a new tool for staging cachectic cancer patients. *J Cachex Sarcopenia Muscle.* Jun;2(2):87-93.
14. Geels P, Eisenhauer E, Bezjak A, et al. Palliative effect of chemotherapy: objective tumor response is associated with symptom improvement in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* Jun 2000;18(12):2395-2405.
15. Walsh D, Donnelly S, Rybicki L. The symptoms of advanced cancer: relationship to age, gender, and performance status in 1,000 patients. *Support Care Cancer.* May 2000;8(3):175-179.
16. Tisdale MJ. Molecular pathways leading to cancer cachexia. *Physiology (Bethesda).* Oct 2005;20:340-348.
17. Dewys WD, Begg C, Lavin PT, et al. Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Med.* Oct 1980;69(4):491-497.
18. Teunissen SC, Wesker W, Kruitwagen C, et al. Symptom prevalence in patients with incurable cancer: a systematic review. *J Pain Symptom Manage.* Jul 2007;34(1):94-104.
19. Tisdale MJ. Mechanisms of cancer cachexia. *Physiol Rev.* Apr 2009;89(2):381-410.

20. Monitto CL, Berkowitz D, Lee KM, et al. Differential gene expression in a murine model of cancer cachexia. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Aug 2001;281(2):E289-297.
21. Donohoe CL, Ryan AM, Reynolds JV. Cancer cachexia: mechanisms and clinical implications. *Gastroenterol Res Pract.* 2011:601434.
22. Hess LM, Barakat R, Tian C, et al. Weight change during chemotherapy as a potential prognostic factor for stage III epithelial ovarian carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol.* Nov 2007;107(2):260-265.
23. Biolo G, Ciochi B, Stulle M, et al. Metabolic consequences of physical inactivity. *J Ren Nutr.* Jan 2005;15(1):49-53.
24. Fouladiun M, Korner U, Gunnebo L, et al. Daily physical-rest activities in relation to nutritional state, metabolism, and quality of life in cancer patients with progressive cachexia. *Clin Cancer Res.* Nov 1 2007;13(21):6379-6385.
25. Inagaki J, Rodriguez V, Bodey GP. Proceedings: Causes of death in cancer patients. *Cancer.* Feb 1974;33(2):568-573.
26. Stewart GD, Skipworth RJ, Fearon KC. Cancer cachexia and fatigue. *Clin Med.* Mar-Apr 2006;6(2):140-143.
27. Muscaritoli M, Anker SD, Argiles J, et al. Consensus definition of sarcopenia, cachexia and pre-cachexia: joint document elaborated by Special Interest Groups (SIG) "cachexia-anorexia in chronic wasting diseases" and "nutrition in geriatrics". *Clin Nutr.* Apr;29(2):154-159.
28. Roubenoff R. Sarcopenic obesity: the confluence of two epidemics. *Obes Res.* Jun 2004;12(6):887-888.
29. Kotler DP. Cachexia. *Ann Intern Med.* Oct 17 2000;133(8):622-634.
30. Kalantar-Zadeh K, Horwich TB, Oreopoulos A, et al. Risk factor paradox in wasting diseases. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* Jul 2007;10(4):433-442.
31. Laviano A, Meguid MM, Inui A, et al. Therapy insight: Cancer anorexia-cachexia syndrome--when all you can eat is yourself. *Nat Clin Pract Oncol.* Mar 2005;2(3):158-165.
32. Deans C, Wigmore SJ. Systemic inflammation, cachexia and prognosis in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* May 2005;8(3):265-269.
33. Delano MJ, Moldawer LL. The origins of cachexia in acute and chronic inflammatory diseases. *Nutr Clin Pract.* Feb 2006;21(1):68-81.
34. Inui A. Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management. *CA Cancer J Clin.* Mar-Apr 2002;52(2):72-91.
35. Mantovani G, Maccio A, Massa E, et al. Managing cancer-related anorexia/cachexia. *Drugs.* 2001;61(4):499-514.
36. Tisdale MJ. Pathogenesis of cancer cachexia. *J Support Oncol.* Sep-Oct 2003;1(3):159-168.
37. Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. The role of cytokines in cancer cachexia. *Med Res Rev.* May 1999;19(3):223-248.
38. O'Riordain MG, Falconer JS, Maingay J, et al. Peripheral blood cells from weight-losing cancer patients control the hepatic acute phase response by a primarily interleukin-6 dependent mechanism. *Int J Oncol.* Oct 1999;15(4):823-827.
39. Ng MF. Cachexia - an intrinsic factor in wound healing. *Int Wound J.* Apr;7(2):107-113.
40. Gordon JN, Green SR, Goggin PM. Cancer cachexia. *Qjm.* Nov 2005;98(11):779-788.

41. Baracos VE. Cancer-associated cachexia and underlying biological mechanisms. *Annu Rev Nutr.* 2006;26:435-461.
42. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. *Immunol Today.* Feb 1994;15(2):74-80.
43. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med.* Feb 11 1999;340(6):448-454.
44. McMillan DC, Scott HR, Watson WS, et al. Longitudinal study of body cell mass depletion and the inflammatory response in cancer patients. *Nutr Cancer.* 1998;31(2):101-105.
45. Marsik C, Kazemi-Shirazi L, Schickbauer T, et al. C-reactive protein and all-cause mortality in a large hospital-based cohort. *Clin Chem.* Feb 2008;54(2):343-349.
46. McMillan DC. Systemic inflammation, nutritional status and survival in patients with cancer. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* May 2009;12(3):223-226.
47. McMillan DC. An inflammation-based prognostic score and its role in the nutrition-based management of patients with cancer. *Proc Nutr Soc.* Aug 2008;67(3):257-262.
48. Matthys P, Billiau A. Cytokines and cachexia. *Nutrition.* Sep 1997;13(9):763-770.
49. Barton BE, Murphy TF. Cancer cachexia is mediated in part by the induction of IL-6-like cytokines from the spleen. *Cytokine.* Dec 21 2001;16(6):251-257.
50. Mantovani G, Maccio A, Mura L, et al. Serum levels of leptin and proinflammatory cytokines in patients with advanced-stage cancer at different sites. *J Mol Med (Berl).* 2000;78(10):554-561.
51. Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and nutritional status in pancreatic cancer patients. *Anticancer Res.* Mar-Apr 2001;21(2B):1355-1358.
52. Maltoni M, Fabbri L, Nanni O, et al. Serum levels of tumour necrosis factor alpha and other cytokines do not correlate with weight loss and anorexia in cancer patients. *Support Care Cancer.* Mar 1997;5(2):130-135.
53. Grossberg AJ, Scarlett JM, Marks DL. Hypothalamic mechanisms in cachexia. *Physiol Behav.* Jul 14;100(5):478-489.
54. Ramos EJ, Suzuki S, Marks D, et al. Cancer anorexia-cachexia syndrome: cytokines and neuropeptides. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* Jul 2004;7(4):427-434.
55. Reid MB, Li YP. Tumor necrosis factor-alpha and muscle wasting: a cellular perspective. *Respir Res.* 2001;2(5):269-272.
56. Dodson S, Baracos VE, Jatoi A, et al. Muscle wasting in cancer cachexia: clinical implications, diagnosis, and emerging treatment strategies. *Annu Rev Med.* Feb 18;62:265-279.
57. Tisdale MJ. Cancer cachexia. *Langenbecks Arch Surg.* Aug 2004;389(4):299-305.
58. Ockenga J, Valentini L. Review article: anorexia and cachexia in gastrointestinal cancer. *Aliment Pharmacol Ther.* Oct 1 2005;22(7):583-594.
59. Inui A. Feeding and body-weight regulation by hypothalamic neuropeptides--mediation of the actions of leptin. *Trends Neurosci.* Feb 1999;22(2):62-67.
60. Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Jr., et al. Central nervous system control of food intake. *Nature.* Apr 6 2000;404(6778):661-671.

61. Turrin NP, Ilyin SE, Gayle DA, et al. Interleukin-1beta system in anorectic catabolic tumor-bearing rats. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. Jul 2004;7(4):419-426.
62. Broberger C. Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks. *J Intern Med*. Oct 2005;258(4):301-327.
63. Laviano A, Inui A, Meguid MM, et al. NPY and brain monoamines in the pathogenesis of cancer anorexia. *Nutrition*. Sep 2008;24(9):802-805.
64. Chance WT, Balasubramaniam A, Thompson H, et al. Assessment of feeding response of tumor-bearing rats to hypothalamic injection and infusion of neuropeptide Y. *Peptides*. 1996;17(5):797-801.
65. Fredrix EW, Soeters PB, Wouters EF, et al. Effect of different tumor types on resting energy expenditure. *Cancer Res*. Nov 15 1991;51(22):6138-6141.
66. Zylicz Z, Schwantje O, Wagener DJ, et al. Metabolic response to enteral food in different phases of cancer cachexia in rats. *Oncology*. 1990;47(1):87-91.
67. Holroyde CP, Gabuzda TG, Putnam RC, et al. Altered glucose metabolism in metastatic carcinoma. *Cancer Res*. Dec 1975;35(12):3710-3714.
68. Blumberg D, Hochwald S, Brennan MF, et al. Interleukin-6 stimulates gluconeogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism*. Feb 1995;44(2):145-146.
69. Grover-McKay M, Walsh SA, Seftor EA, et al. Role for glucose transporter 1 protein in human breast cancer. *Pathol Oncol Res*. 1998;4(2):115-120.
70. Bustamante E, Pedersen PL. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Sep 1977;74(9):3735-3739.
71. Bustamante E, Morris HP, Pedersen PL. Energy metabolism of tumor cells. Requirement for a form of hexokinase with a propensity for mitochondrial binding. *J Biol Chem*. Aug 25 1981;256(16):8699-8704.
72. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. Dec 13 2001;414(6865):799-806.
73. Glicksman AS, Rawson RW. Diabetes and altered carbohydrate metabolism in patients with cancer. *Cancer*. Nov-Dec 1956;9(6):1127-1134.
74. Shellock FG, Riedinger MS, Fishbein MC. Brown adipose tissue in cancer patients: possible cause of cancer-induced cachexia. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1986;111(1):82-85.
75. Lee FY, Li Y, Zhu H, et al. Tumor necrosis factor increases mitochondrial oxidant production and induces expression of uncoupling protein-2 in the regenerating mice [correction of rat] liver. *Hepatology*. Mar 1999;29(3):677-687.
76. Bing C, Brown M, King P, et al. Increased gene expression of brown fat uncoupling protein (UCP)1 and skeletal muscle UCP2 and UCP3 in MAC16-induced cancer cachexia. *Cancer Res*. May 1 2000;60(9):2405-2410.
77. Busquets S, Carbo N, Almendro V, et al. Hyperlipemia: a role in regulating UCP3 gene expression in skeletal muscle during cancer cachexia? *FEBS Lett*. Sep 14 2001;505(2):255-258.
78. Collins P, Bing C, McCulloch P, et al. Muscle UCP-3 mRNA levels are elevated in weight loss associated with gastrointestinal adenocarcinoma in humans. *Br J Cancer*. Feb 1 2002;86(3):372-375.
79. Busquets S, Sanchis D, Alvarez B, et al. In the rat, tumor necrosis factor alpha administration results in an increase in both UCP2 and UCP3 mRNAs in skeletal

- muscle: a possible mechanism for cytokine-induced thermogenesis? *FEBS Lett.* Dec 4 1998;440(3):348-350.
80. Puigserver P, Rhee J, Lin J, et al. Cytokine stimulation of energy expenditure through p38 MAP kinase activation of PPARgamma coactivator-1. *Mol Cell.* Nov 2001;8(5):971-982.
  81. Bing C, Trayhurn P. Regulation of adipose tissue metabolism in cancer cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* May 2008;11(3):201-207.
  82. Thompson MP, Koons JE, Tan ET, et al. Modified lipoprotein lipase activities, rates of lipogenesis, and lipolysis as factors leading to lipid depletion in C57BL mice bearing the preputial gland tumor, ESR-586. *Cancer Res.* Aug 1981;41(8):3228-3232.
  83. Ryden M, Agustsson T, Laurencikiene J, et al. Lipolysis--not inflammation, cell death, or lipogenesis--is involved in adipose tissue loss in cancer cachexia. *Cancer.* Oct 1 2008;113(7):1695-1704.
  84. Fearon KC, Preston T. Body composition in cancer cachexia. *Infusionstherapie.* Apr 1990;17 Suppl 3:63-66.
  85. Ogiwara H, Takahashi S, Kato Y, et al. Diminished visceral adipose tissue in cancer cachexia. *J Surg Oncol.* Oct 1994;57(2):129-133.
  86. Fouladi M, Korner U, Bosaeus I, et 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.* May 15 2005;103(10):2189-2198.
  87. Dessi S, Batetta B, Spano O, et al. Perturbations of triglycerides but not of cholesterol metabolism are prevented by anti-tumour necrosis factor treatment in rats bearing an ascites hepatoma (Yoshida AH-130). *Br J Cancer.* Nov 1995;72(5):1138-1143.
  88. Ryden M, Arner P. Fat loss in cachexia--is there a role for adipocyte lipolysis? *Clin Nutr.* Feb 2007;26(1):1-6.
  89. Jocken JW, Blaak EE. Catecholamine-induced lipolysis in adipose tissue and skeletal muscle in obesity. *Physiol Behav.* May 23 2008;94(2):219-230.
  90. Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, et al. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res.* Jan 2009;50(1):3-21.
  91. Lass A, Zimmermann R, Oberer M, et al. Lipolysis - a highly regulated multi-enzyme complex mediates the catabolism of cellular fat stores. *Prog Lipid Res.* Jan;50(1):14-27.
  92. Das SK, Eder S, Schauer S, et al. Adipose triglyceride lipase contributes to cancer-associated cachexia. *Science.* Jul 8;333(6039):233-238.
  93. Shaw JH, Wolfe RR. Fatty acid and glycerol kinetics in septic patients and in patients with gastrointestinal cancer. The response to glucose infusion and parenteral feeding. *Ann Surg.* Apr 1987;205(4):368-376.
  94. Thompson MP, Cooper ST, Parry BR, et al. Increased expression of the mRNA for hormone-sensitive lipase in adipose tissue of cancer patients. *Biochim Biophys Acta.* Jan 22 1993;1180(3):236-242.
  95. Sanders PM, Tisdale MJ. Effect of zinc-alpha2-glycoprotein (ZAG) on expression of uncoupling proteins in skeletal muscle and adipose tissue. *Cancer Lett.* Aug 20 2004;212(1):71-81.
  96. Sartorelli V, Fulco M. Molecular and cellular determinants of skeletal muscle atrophy and hypertrophy. *Sci STKE.* Aug 3 2004;2004(244):re11.

97. Sandri M. Signaling in muscle atrophy and hypertrophy. *Physiology (Bethesda)*. Jun 2008;23:160-170.
98. Baracos VE. Management of muscle wasting in cancer-associated cachexia: understanding gained from experimental studies. *Cancer*. Sep 15 2001;92(6 Suppl):1669-1677.
99. Norton JA, Stein TP, Brennan MF. Whole body protein synthesis and turnover in normal man and malnourished patients with and without known cancer. *Ann Surg*. Aug 1981;194(2):123-128.
100. Jackman RW, Kandarian SC. The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol*. Oct 2004;287(4):C834-843.
101. Yu Z, Li P, Zhang M, et al. Fiber type-specific nitric oxide protects oxidative myofibers against cachectic stimuli. *PLoS One*. 2008;3(5):e2086.
102. Mitch WE, Goldberg AL. Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med*. Dec 19 1996;335(25):1897-1905.
103. Shintani F, Nakaki T, Kanba S, et al. Role of interleukin-1 in stress responses. A putative neurotransmitter. *Mol Neurobiol*. Feb 1995;10(1):47-71.
104. Pende A, Musso NR, Vergassola C, et al. Neuroendocrine effects of interferon alpha 2-a in healthy human subjects. *J Biol Regul Homeost Agents*. Apr-Jun 1990;4(2):67-72.
105. Ventadour S, Attaix D. Mechanisms of skeletal muscle atrophy. *Curr Opin Rheumatol*. Nov 2006;18(6):631-635.
106. Kandarian SC, Stevenson EJ. Molecular events in skeletal muscle during disuse atrophy. *Exerc Sport Sci Rev*. Jul 2002;30(3):111-116.
107. Hasselgren PO, Fischer JE. Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann Surg*. Jan 2001;233(1):9-17.
108. Solomon V, Goldberg AL. Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *J Biol Chem*. Oct 25 1996;271(43):26690-26697.
109. Du J, Wang X, Miereles C, et al. Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions. *J Clin Invest*. Jan 2004;113(1):115-123.
110. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*. Mar 2008;9(3):231-241.
111. Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer*. Mar 2005;5(3):231-237.
112. Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, et al. The role of apoptosis in the normal aging brain, skeletal muscle, and heart. *Ann N Y Acad Sci*. Apr 2002;959:93-107.
113. Dirks AJ, Leeuwenburgh C. Tumor necrosis factor alpha signaling in skeletal muscle: effects of age and caloric restriction. *J Nutr Biochem*. Aug 2006;17(8):501-508.
114. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, et al. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell*. Oct 2001;1(4):515-525.
115. Lane JD, Lucocq J, Pryde J, et al. Caspase-mediated cleavage of the stacking protein GRASP65 is required for Golgi fragmentation during apoptosis. *J Cell Biol*. Feb 4 2002;156(3):495-509.
116. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:383-424.

117. Cande C, Vahsen N, Garrido C, et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ*. Jun 2004;11(6):591-595.
118. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*. Jul 5 2001;412(6842):95-99.
119. Elinos-Baez CM, Maldonado V, Melendez-Zajgla J. [Caspases: apoptosis inducing molecules]. *Gac Med Mex*. Sep-Oct 2003;139(5):493-499.
120. Nicholson DW. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ*. Nov 1999;6(11):1028-1042.
121. Creagh EM, Conroy H, Martin SJ. Caspase-activation pathways in apoptosis and immunity. *Immunol Rev*. Jun 2003;193:10-21.
122. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. Aug 28 1998;281(5381):1305-1308.
123. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, et al. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell*. Jun 14 1996;85(6):817-827.
124. Hector S, Prehn JH. Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review. *Biochim Biophys Acta*. Apr 2009;1795(2):117-129.
125. Koseki T, Inohara N, Chen S, et al. ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Apr 28 1998;95(9):5156-5160.
126. Liu X, Kim CN, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*. Jul 12 1996;86(1):147-157.
127. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell*. Feb 2002;9(2):423-432.
128. Belizario JE, Lorite MJ, Tisdale MJ. Cleavage of caspases-1, -3, -6, -8 and -9 substrates by proteases in skeletal muscles from mice undergoing cancer cachexia. *Br J Cancer*. Apr 20 2001;84(8):1135-1140.
129. Busquets S, Figueras MT, Fuster G, et al. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. *Cancer Res*. Sep 15 2004;64(18):6725-6731.
130. Adams V, Jiang H, Yu J, et al. Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance. *J Am Coll Cardiol*. Mar 15 1999;33(4):959-965.
131. Sandri M, Minetti C, Pedemonte M, et al. Apoptotic myonuclei in human Duchenne muscular dystrophy. *Lab Invest*. Aug 1998;78(8):1005-1016.
132. de Vries EG, Gietema JA, de Jong S. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand pathway and its therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. Apr 15 2006;12(8):2390-2393.
133. Kostova Z, Wolf DH. For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *Embo J*. May 15 2003;22(10):2309-2317.
134. Burckart K, Beca S, Urban RJ, et al. Pathogenesis of muscle wasting in cancer cachexia: targeted anabolic and anticatabolic therapies. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. Jul;13(4):410-416.
135. Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev*. May 2003;29 Suppl 1:3-9.
136. Tisdale MJ. Biochemical mechanisms of cellular catabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. Jul 2002;5(4):401-405.

137. Murata S, Yashiroda H, Tanaka K. Molecular mechanisms of proteasome assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol.* Feb 2009;10(2):104-115.
138. Groll M, Ditzel L, Lowe J, et al. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* Apr 3 1997;386(6624):463-471.
139. Wray CJ, Tomkinson B, Robb BW, et al. Tripeptidyl-peptidase II expression and activity are increased in skeletal muscle during sepsis. *Biochem Biophys Res Commun.* Aug 9 2002;296(1):41-47.
140. Chand A, Wyke SM, Tisdale MJ. Effect of cancer cachexia on the activity of tripeptidyl-peptidase II in skeletal muscle. *Cancer Lett.* Feb 10 2005;218(2):215-222.
141. Brooks SA. Functional interactions between mRNA turnover and surveillance and the ubiquitin proteasome system. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* Sep-Oct;1(2):240-252.
142. Pickart CM. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem.* 2001;70:503-533.
143. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:425-479.
144. Glass DJ. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* Oct 2005;37(10):1974-1984.
145. Glass DJ. Signaling pathways perturbing muscle mass. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* May;13(3):225-229.
146. Hatakeyama S, Nakayama KI. Ubiquitylation as a quality control system for intracellular proteins. *J Biochem.* Jul 2003;134(1):1-8.
147. Kwak KS, Zhou X, Solomon V, et al. Regulation of protein catabolism by muscle-specific and cytokine-inducible ubiquitin ligase E3 $\alpha$ -II during cancer cachexia. *Cancer Res.* Nov 15 2004;64(22):8193-8198.
148. Benanti J. The ubiquitin proteasome system.
149. Ichimura Y, Komatsu M. Pathophysiological role of autophagy: lesson from autophagy-deficient mouse models. *Exp Anim.* 60(4):329-345.
150. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol.* May;221(1):3-12.
151. Majeski AE, Dice JF. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* Dec 2004;36(12):2435-2444.
152. Li WW, Li J, Bao JK. Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell Mol Life Sci.* Nov 12.
153. Mammucari C, Milan G, Romanello V, et al. FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab.* Dec 2007;6(6):458-471.
154. Bechet D, Tassa A, Combaret L, et al. Regulation of skeletal muscle proteolysis by amino acids. *J Ren Nutr.* Jan 2005;15(1):18-22.
155. McClung JM, Judge AR, Powers SK, et al. p38 MAPK links oxidative stress to autophagy-related gene expression in cachectic muscle wasting. *Am J Physiol Cell Physiol.* Mar;298(3):C542-549.
156. Kim J, Huang WP, Klionsky DJ. Membrane recruitment of Aut7p in the autophagy and cytoplasm to vacuole targeting pathways requires Aut1p, Aut2p, and the autophagy conjugation complex. *J Cell Biol.* Jan 8 2001;152(1):51-64.
157. Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev.* Nov 15 2007;21(22):2861-2873.
158. Yan L, Vatner DE, Kim SJ, et al. Autophagy in chronically ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Sep 27 2005;102(39):13807-13812.



159. Uchiyama Y, Shibata M, Koike M, et al. Autophagy-physiology and pathophysiology. *Histochem Cell Biol.* Apr 2008;129(4):407-420.
160. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *Embo J.* Nov 1 2000;19(21):5720-5728.
161. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol.* Nov 21 2005;171(4):603-614.
162. Rommel C, Bodine SC, Clarke BA, et al. Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI(3)K/Akt/mTOR and PI(3)K/Akt/GSK3 pathways. *Nat Cell Biol.* Nov 2001;3(11):1009-1013.
163. Nader GA, Hornberger TA, Esser KA. Translational control: implications for skeletal muscle hypertrophy. *Clin Orthop Relat Res.* Oct 2002(403 Suppl):S178-187.
164. Stitt TN, Drujan D, Clarke BA, et al. The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Mol Cell.* May 7 2004;14(3):395-403.
165. Kandarian SC, Jackman RW. Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy. *Muscle Nerve.* Feb 2006;33(2):155-165.
166. Ruedg MA, Glass DJ. Molecular mechanisms and treatment options for muscle wasting diseases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* Feb 10;51:373-395.
167. Costelli P, Muscaritoli M, Bossola M, et al. IGF-1 is downregulated in experimental cancer cachexia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Sep 2006;291(3):R674-683.
168. Song YH, Li Y, Du J, et al. Muscle-specific expression of IGF-1 blocks angiotensin II-induced skeletal muscle wasting. *J Clin Invest.* Feb 2005;115(2):451-458.
169. Acharyya S, Butchbach ME, Sahenk Z, et al. Dystrophin glycoprotein complex dysfunction: a regulatory link between muscular dystrophy and cancer cachexia. *Cancer Cell.* Nov 2005;8(5):421-432.
170. Sandri M, Sandri C, Gilbert A, et al. Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell.* Apr 30 2004;117(3):399-412.
171. Lagirand-Cantaloube J, Offner N, Csibi A, et al. The initiation factor eIF3-f is a major target for atrogin1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy. *Embo J.* Apr 23 2008;27(8):1266-1276.
172. Clarke BA, Drujan D, Willis MS, et al. The E3 Ligase MuRF1 degrades myosin heavy chain protein in dexamethasone-treated skeletal muscle. *Cell Metab.* Nov 2007;6(5):376-385.
173. Zuppinger C, Suter TM. Cancer therapy-associated cardiotoxicity and signaling in the myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol.* Aug;56(2):141-146.
174. Khakoo AY, Liu PP, Force T, et al. Cardiotoxicity due to cancer therapy. *Tex Heart Inst J.* 38(3):253-256.
175. Sjostrom M, Wretling ML, Karlberg I, et al. Ultrastructural changes and enzyme activities for energy production in hearts concomitant with tumor-associated malnutrition. *J Surg Res.* Mar 1987;42(3):304-313.
176. Burch GE, Phillips JH, Ansari A. The cachectic heart. A clinico-pathologic, electrocardiographic and roentgenographic entity. *Dis Chest.* Nov 1968;54(5):403-409.

177. Xu H, Crawford D, Hutchinson KR, et al. Myocardial dysfunction in an animal model of cancer cachexia. *Life Sci.* Feb 28;88(9-10):406-410.
178. Tian M, Nishijima Y, Asp ML, et al. Cardiac alterations in cancer-induced cachexia in mice. *Int J Oncol.* Aug;37(2):347-353.
179. Wysong A, Couch M, Shadfar S, et al. NF-kappaB inhibition protects against tumor-induced cardiac atrophy in vivo. *Am J Pathol.* Mar;178(3):1059-1068.
180. Shadfar S, Couch ME, McKinney KA, et al. Oral resveratrol therapy inhibits cancer-induced skeletal muscle and cardiac atrophy in vivo. *Nutr Cancer.*63(5):749-762.
181. Cospert PF, Leinwand LA. Cancer causes cardiac atrophy and autophagy in a sexually dimorphic manner. *Cancer Res.* Mar 1;71(5):1710-1720.
182. Zhou X, Wang JL, Lu J, et al. Reversal of cancer cachexia and muscle wasting by ActRIIB antagonism leads to prolonged survival. *Cell.* Aug 20;142(4):531-543.
183. Muhlfeld C, Das SK, Heinzl FR, et al. Cancer induces cardiomyocyte remodeling and hypoinnervation in the left ventricle of the mouse heart. *PLoS One.*6(5):e20424.
184. Strassburg S, Springer J, Anker SD. Muscle wasting in cardiac cachexia. *Int J Biochem Cell Biol.* Oct 2005;37(10):1938-1947.
185. von Haehling S, Doehner W, Anker SD. Nutrition, metabolism, and the complex pathophysiology of cachexia in chronic heart failure. *Cardiovasc Res.* Jan 15 2007;73(2):298-309.
186. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation.* Apr 14 2009;119(14):e391-479.
187. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics--2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* Feb 1;123(4):e18-e209.
188. Cowie MR, Mosterd A, Wood DA, et al. The epidemiology of heart failure. *Eur Heart J.* Feb 1997;18(2):208-225.
189. Anker SD, Ponikowski P, Varney S, et al. Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure. *Lancet.* Apr 12 1997;349(9058):1050-1053.
190. Mancini DM, Walter G, Reichel N, et al. Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure. *Circulation.* Apr 1992;85(4):1364-1373.
191. Aukrust P, Gullestad L, Ueland T, et al. Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in chronic heart failure: potential therapeutic implications. *Ann Med.* 2005;37(2):74-85.
192. Sharma R, Anker SD. Cytokines, apoptosis and cachexia: the potential for TNF antagonism. *Int J Cardiol.* Sep 2002;85(1):161-171.
193. Anker SD, Clark AL, Teixeira MM, et al. Loss of bone mineral in patients with cachexia due to chronic heart failure. *Am J Cardiol.* Feb 15 1999;83(4):612-615, A610.
194. Florea VG, Henein MY, Rauchhaus M, et al. The cardiac component of cardiac cachexia. *Am Heart J.* Jul 2002;144(1):45-50.

195. Florea VG, Moon J, Pennell DJ, et al. Wasting of the left ventricle in patients with cardiac cachexia: a cardiovascular magnetic resonance study. *Int J Cardiol.* Oct 2004;97(1):15-20.
196. Lainscak M, Anker MS, von Haehling S, et al. Biomarkers for chronic heart failure : diagnostic, prognostic, and therapeutic challenges. *Herz.* Dec 2009;34(8):589-593.
197. McMurray JJ. Clinical practice. Systolic heart failure. *N Engl J Med.* Jan 21;362(3):228-238.
198. Moughrabi SM, Evangelista LS. Cardiac cachexia at a glance. *Prog Cardiovasc Nurs.* Spring 2007;22(2):101-103.
199. Conraads VM, Bosmans JM, Vrints CJ. Chronic heart failure: an example of a systemic chronic inflammatory disease resulting in cachexia. *Int J Cardiol.* Sep 2002;85(1):33-49.
200. Bachetti T. Endothelial dysfunction in chronic heart failure: some new basic mechanisms. *Ital Heart J.* Oct 2000;1(10):656-661.
201. Strassburg S, Anker SD. Metabolic and immunologic derangements in cardiac cachexia: where to from here? *Heart Fail Rev.* Mar 2006;11(1):57-64.
202. Zelis R, Mason DT. Compensatory mechanisms in congestive heart failure--the role of the peripheral resistance vessels. *N Engl J Med.* Apr 23 1970;282(17):962-964.
203. Conraads VM, Hoymans VY, Vrints CJ. Heart failure and cachexia: insights offered from molecular biology. *Front Biosci.* 2008;13:325-335.
204. Anker SD, Chua TP, Ponikowski P, et al. Hormonal changes and catabolic/anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance for cardiac cachexia. *Circulation.* Jul 15 1997;96(2):526-534.
205. Berry C, Clark AL. Catabolism in chronic heart failure. *Eur Heart J.* Apr 2000;21(7):521-532.
206. Poehlman ET, Scheffers J, Gottlieb SS, et al. Increased resting metabolic rate in patients with congestive heart failure. *Ann Intern Med.* Dec 1 1994;121(11):860-862.
207. Aukrust P, Ueland T, Lien E, et al. Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* Feb 1 1999;83(3):376-382.
208. Aukrust P, Ueland T, Muller F, et al. Elevated circulating levels of C-C chemokines in patients with congestive heart failure. *Circulation.* Mar 31 1998;97(12):1136-1143.
209. Testa M, Yeh M, Lee P, et al. Circulating levels of cytokines and their endogenous modulators in patients with mild to severe congestive heart failure due to coronary artery disease or hypertension. *J Am Coll Cardiol.* Oct 1996;28(4):964-971.
210. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, et al. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* Apr 1996;27(5):1201-1206.
211. Levine B, Kalman J, Mayer L, et al. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med.* Jul 26 1990;323(4):236-241.
212. Anker SD, von Haehling S. Inflammatory mediators in chronic heart failure: an overview. *Heart.* Apr 2004;90(4):464-470.

213. Mann DL. Recent insights into the role of tumor necrosis factor in the failing heart. *Heart Fail Rev.* Mar 2001;6(2):71-80.
214. Torre-Amione G, Kapadia S, Lee J, et al. Tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor receptors in the failing human heart. *Circulation.* Feb 15 1996;93(4):704-711.
215. Kapadia SR, Oral H, Lee J, et al. Hemodynamic regulation of tumor necrosis factor-alpha gene and protein expression in adult feline myocardium. *Circ Res.* Aug 1997;81(2):187-195.
216. von Haehling S, Lainscak M, Springer J, et al. Cardiac cachexia: a systematic overview. *Pharmacol Ther.* Mar 2009;121(3):227-252.
217. Hasper D, Hummel M, Kleber FX, et al. Systemic inflammation in patients with heart failure. *Eur Heart J.* May 1998;19(5):761-765.
218. Matsumori A, Yamada T, Suzuki H, et al. Increased circulating cytokines in patients with myocarditis and cardiomyopathy. *Br Heart J.* Dec 1994;72(6):561-566.
219. Anker SD, Egerer KR, Volk HD, et al. Elevated soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure. *Am J Cardiol.* May 15 1997;79(10):1426-1430.
220. Bradham WS, Bozkurt B, Gunasinghe H, et al. Tumor necrosis factor-alpha and myocardial remodeling in progression of heart failure: a current perspective. *Cardiovasc Res.* Mar 2002;53(4):822-830.
221. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res.* May 2000;46(2):214-224.
222. Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, et al. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med.* Sep 27 1984;311(13):819-823.
223. Swedberg K, Eneroth P, Kjeksus J, et al. Hormones regulating cardiovascular function in patients with severe congestive heart failure and their relation to mortality. CONSENSUS Trial Study Group. *Circulation.* Nov 1990;82(5):1730-1736.
224. Clark AL, Anker SD. Body mass, chronic heart failure, surgery and survival. *J Heart Lung Transplant.* Mar;29(3):261-264.
225. Kaye D, Esler M. Sympathetic neuronal regulation of the heart in aging and heart failure. *Cardiovasc Res.* May 1 2005;66(2):256-264.
226. White CM. Catecholamines and their blockade in congestive heart failure. *Am J Health Syst Pharm.* Apr 1 1998;55(7):676-682.
227. Gilbert EM, Olsen SL, Renlund DG, et al. beta-adrenergic receptor regulation and left ventricular function in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* Mar 25 1993;71(9):23C-29C.
228. Cohn JN, Levine TB, Francis GS, et al. Neurohumoral control mechanisms in congestive heart failure. *Am Heart J.* Sep 1981;102(3 Pt 2):509-514.
229. Jankowska EA, Biel B, Majda J, et al. Anabolic deficiency in men with chronic heart failure: prevalence and detrimental impact on survival. *Circulation.* Oct 24 2006;114(17):1829-1837.
230. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, et al. Elevated circulating level of ghrelin in cachexia associated with chronic heart failure: relationships between ghrelin and anabolic/catabolic factors. *Circulation.* Oct 23 2001;104(17):2034-2038.

231. Ahokas RA, Warrington KJ, Gerling IC, et al. Aldosteronism and peripheral blood mononuclear cell activation: a neuroendocrine-immune interface. *Circ Res.* Nov 14 2003;93(10):e124-135.
232. Osborn JL, Holdaas H, Thames MD, et al. Renal adrenoceptor mediation of antinatriuretic and renin secretion responses to low frequency renal nerve stimulation in the dog. *Circ Res.* Sep 1983;53(3):298-305.
233. Morrone D, Marzilli M. Role of RAAS inhibition in preventing left ventricular remodeling in patients post myocardial infarction. *Heart Metab.* 2010;47:9-13.
234. Laragh JH, Sealey JE. Abnormal sodium metabolism and plasma renin activity (renal renin secretion) and the vasoconstriction volume hypothesis: implications for pathogenesis and treatment of hypertension and its vascular consequences (heart attack, stroke). *Clin Chem.* Oct 1991;37(10 Pt 2):1820-1827.
235. Ng KK, Vane JR. Fate of angiotensin I in the circulation. *Nature.* Apr 13 1968;218(5137):144-150.
236. Guglin M, Kristof-Kuteyeva O, Novotorova I, et al. Aldosterone antagonists in heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* Jun;16(2):150-159.
237. Weber KT. Angiotensin II and connective tissue: homeostasis and reciprocal regulation. *Regul Pept.* Jun 30 1999;82(1-3):1-17.
238. Jugdutt BI. Remodeling of the myocardium and potential targets in the collagen degradation and synthesis pathways. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* Mar 2003;3(1):1-30.
239. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation.* Apr 1990;81(4):1161-1172.
240. Sutton MG, Sharpe N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation.* Jun 27 2000;101(25):2981-2988.
241. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev.* Jan 1999;79(1):215-262.
242. Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, et al. Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *Am J Pathol.* Mar 1985;118(3):484-492.
243. Sato Y, Kita T, Takatsu Y, et al. Biochemical markers of myocyte injury in heart failure. *Heart.* Oct 2004;90(10):1110-1113.
244. Remme WJ. Pharmacological modulation of cardiovascular remodeling: a guide to heart failure therapy. *Cardiovasc Drugs Ther.* Jul 2003;17(4):349-360.
245. Shin J, Johnson JA. Beta-blocker pharmacogenetics in heart failure. *Heart Fail Rev.* May;15(3):187-196.
246. Reiter MJ. Cardiovascular drug class specificity: beta-blockers. *Prog Cardiovasc Dis.* Jul-Aug 2004;47(1):11-33.
247. Lynch GS, Ryall JG. Role of beta-adrenoceptor signaling in skeletal muscle: implications for muscle wasting and disease. *Physiol Rev.* Apr 2008;88(2):729-767.
248. Collins S, Surwit RS. The beta-adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Recent Prog Horm Res.* 2001;56:309-328.
249. Tsuyuki RT, McAlister FA, Teo KK. Beta-blockers for congestive heart failure: what is the current consensus? *Drugs Aging.* Jan 2000;16(1):1-7.
250. Xiao RP. Beta-adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the beta2-adrenergic receptor to G(s) and G(i) proteins. *Sci STKE.* Oct 16 2001;2001(104):re15.

251. Xiao RP, Cheng H, Zhou YY, et al. Recent advances in cardiac beta(2)-adrenergic signal transduction. *Circ Res*. Nov 26 1999;85(11):1092-1100.
252. de Groote P, Ennezat PV, Mouquet F. Bisoprolol in the treatment of chronic heart failure. *Vasc Health Risk Manag*. 2007;3(4):431-439.
253. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet*. Jan 2 1999;353(9146):9-13.
254. Lechat P, Hulot JS, Escolano S, et al. Heart rate and cardiac rhythm relationships with bisoprolol benefit in chronic heart failure in CIBIS II Trial. *Circulation*. Mar 13 2001;103(10):1428-1433.
255. de Groote P, Delour P, Lamblin N, et al. Effects of bisoprolol in patients with stable congestive heart failure. *Ann Cardiol Angeiol (Paris)*. Jul 2004;53(4):167-170.
256. Rosendorff C. Beta-blocking agents with vasodilator activity. *J Hypertens Suppl*. Jun 1993;11(4):S37-40.
257. Ovaert P, Elliott J, Bernay F, et al. Aldosterone receptor antagonists--how cardiovascular actions may explain their beneficial effects in heart failure. *J Vet Pharmacol Ther*. Apr;33(2):109-117.
258. Nappi JM, Sieg A. Aldosterone and aldosterone receptor antagonists in patients with chronic heart failure. *Vasc Health Risk Manag*. 7:353-363.
259. Hosoya K, Ishimitsu T. Protection of the cardiovascular system by imidapril, a versatile angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Cardiovasc Drug Rev*. Summer 2002;20(2):93-110.
260. Dolezal T. Imidapril in heart failure. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*. Sep 2006;7(3):146-154.
261. Robinson DM, Curran MP, Lyseng-Williamson KA. Imidapril: a review of its use in essential hypertension, Type 1 diabetic nephropathy and chronic heart failure. *Drugs*. 2007;67(9):1359-1378.
262. Tessitore L, Bonelli G, Baccino FM. Early development of protein metabolic perturbations in the liver and skeletal muscle of tumour-bearing rats. A model system for cancer cachexia. *Biochem J*. Jan 1 1987;241(1):153-159.
263. Hosaka S, Suzuki M, Goto M, et al. Motility of rat ascites hepatoma cells, with reference to malignant characteristics in cancer metastasis. *Gann*. Apr 1978;69(2):273-276.
264. Baccino FM, Tessitore L, Bonelli G, et al. Protein turnover states of tumour cells and host tissues in an experimental model. *Biomed Biochim Acta*. 1986;45(11-12):1585-1590.
265. Bauhofer A, Witte K, Celik I, et al. Sickness behaviour, an animal equivalent to human quality of life, is improved in septic rats by G-CSF and antibiotic prophylaxis. *Langenbecks Arch Surg*. Mar 2001;386(2):132-140.
266. Ishido MM, Y.; Oka, S.; Kunimoto, M.; Morita, M. Application of Supermex System to Screen Behavioral Traits Produced by Tributyltin in the Rat. *Journal of Health Science*. 2002;48(5):451-454.
267. EchoMedicalSystems. <http://www.echomri.com/qanda.aspx>.
268. VisualSonics®. Vevo 770® High-Resolution Imaging System. Available at: [http://www.brc.cornell.edu/brcinfo/files/microscopy/Vevo770\\_Manual.pdf](http://www.brc.cornell.edu/brcinfo/files/microscopy/Vevo770_Manual.pdf).
269. Von Websky K. *Einfluss der Tumorkachexie auf Herzfunktion und Herzmorphologie im Yoshida AH-130 Hepatoma Modell der Ratte*. Berlin: Center for Cardiovascular Research; 2011.

270. Costelli P, Garcia-Martinez C, Llovera M, et al. Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway. *J Clin Invest.* May 1995;95(5):2367-2372.
271. Tessitore L, Costelli P, Sacchi C, et al. The role of apoptosis in growing and stationary rat ascites hepatoma, Yoshida AH-130. *J Pathol.* Dec 1993;171(4):301-309.
272. Carbo N, Lopez-Soriano J, Tarrago T, et al. Comparative effects of beta2-adrenergic agonists on muscle waste associated with tumour growth. *Cancer Lett.* May 1 1997;115(1):113-118.
273. Costelli P, Bossola M, Muscaritoli M, et al. Anticytokine treatment prevents the increase in the activity of ATP-ubiquitin- and Ca(2+)-dependent proteolytic systems in the muscle of tumour-bearing rats. *Cytokine.* Jul 7 2002;19(1):1-5.
274. Ozaslan M, Karagoz ID, Kilic IH, et al. Ehrlich ascites carcinoma. *African Journal of Biotechnology.* 2011;10(13):2375-2378.
275. Tamsma J. The pathogenesis of malignant ascites. *Cancer Treat Res.* 2007;134:109-118.
276. Busquets S, Serpe R, Sirisi S, et al. Megestrol acetate: its impact on muscle protein metabolism supports its use in cancer cachexia. *Clin Nutr.* Dec;29(6):733-737.
277. Lopez-Soriano J, Carbo N, Costelli P, et al. alpha-Adrenergic receptors may contribute to the hypertriglyceridemia associated with tumour growth. *Cancer Lett.* Dec 20 1996;110(1-2):213-216.
278. Mackenzie ML, Bedard N, Wing SS, et al. A proinflammatory tumor that activates protein degradation sensitizes rats to catabolic effects of endotoxin. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* Oct 2005;289(4):E527-533.
279. Busquets S, Carbo N, Almendro V, et al. Curcumin, a natural product present in turmeric, decreases tumor growth but does not behave as an anticachectic compound in a rat model. *Cancer Lett.* Jun 10 2001;167(1):33-38.
280. Costelli P, Carbo N, Tessitore L, et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model. *J Clin Invest.* Dec 1993;92(6):2783-2789.
281. van Royen M, Carbo N, Busquets S, et al. DNA fragmentation occurs in skeletal muscle during tumor growth: A link with cancer cachexia? *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 13 2000;270(2):533-537.
282. Moore-Carrasco R, Busquets S, Almendro V, et al. The AP-1/NF-kappaB double inhibitor SP100030 can revert muscle wasting during experimental cancer cachexia. *Int J Oncol.* May 2007;30(5):1239-1245.
283. Dessi S, Batetta B, Anchisi C, et al. Cholesterol metabolism during the growth of a rat ascites hepatoma (Yoshida AH-130). *Br J Cancer.* Nov 1992;66(5):787-793.
284. Tessitore L, Costelli P, Baccino FM. Humoral mediation for cachexia in tumour-bearing rats. *Br J Cancer.* Jan 1993;67(1):15-23.
285. Catalano MG, Fortunati N, Arena K, et al. Selective up-regulation of tumor necrosis factor receptor I in tumor-bearing rats with cancer-related cachexia. *Int J Oncol.* Aug 2003;23(2):429-436.
286. Esper DH, Harb WA. The cancer cachexia syndrome: a review of metabolic and clinical manifestations. *Nutr Clin Pract.* Aug 2005;20(4):369-376.

287. Lang CH, Skrepnik N, Dobrescu C, et al. Impairment of insulin action on peripheral glucose uptake and hepatic glucose production in tumor-bearing rats. *Am J Physiol.* Aug 1993;265(2 Pt 2):R356-364.
288. Meijnsing B, Carbo N, Lopez-Soriano FJ, et al. Effects of the phosphodiesterase-IV inhibitor EMD 95832/3 on tumour growth and cachexia in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. *Cancer Lett.* Dec 15 2002;188(1-2):53-58.
289. Bing C, Russell S, Becket E, et al. Adipose atrophy in cancer cachexia: morphologic and molecular analysis of adipose tissue in tumour-bearing mice. *Br J Cancer.* Oct 23 2006;95(8):1028-1037.
290. Lopez-Soriano J, Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. Sequential changes in lipoprotein lipase activity and lipaemia induced by the Yoshida AH-130 ascites hepatoma in rats. *Cancer Lett.* Jun 24 1997;116(2):159-165.
291. Lopez-Soriano J, Argiles JM, Lopez-Soriano FJ. Marked hyperlipidaemia in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma. *Biochem Soc Trans.* Aug 1995;23(3):492S.
292. Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, et al. Muscle wasting associated with cancer cachexia is linked to an important activation of the ATP-dependent ubiquitin-mediated proteolysis. *Int J Cancer.* Mar 29 1995;61(1):138-141.
293. Llovera M, Garcia-Martinez C, Agell N, et al. Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumour-bearing rats. *FEBS Lett.* Feb 7 1994;338(3):311-318.
294. Llovera M, Carbo N, Garcia-Martinez C, et al. Anti-TNF treatment reverts increased muscle ubiquitin gene expression in tumour-bearing rats. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 25 1996;221(3):653-655.
295. Carbo N, Busquets S, van Royen M, et al. TNF-alpha is involved in activating DNA fragmentation in skeletal muscle. *Br J Cancer.* Mar 18 2002;86(6):1012-1016.
296. Noriki S, Imamura Y, Ikeda T, et al. Multi-organ damage (MOD) induced by cancer cachexia and its pathogenesis. *Basic Appl Histochem.* 1989;33(4):337-346.
297. Lowe SS. Physical activity and palliative cancer care. *Recent Results Cancer Res.* 186:349-365.
298. Tamsma JT, Keizer HJ, Meinders AE. Pathogenesis of malignant ascites: Starling's law of capillary hemodynamics revisited. *Ann Oncol.* Oct 2001;12(10):1353-1357.
299. Leduc D, De Troyer A. Dysfunction of the canine respiratory muscle pump in ascites. *J Appl Physiol.* Feb 2007;102(2):650-657.
300. Barreiro E, de la Puente B, Busquets S, et al. Both oxidative and nitrosative stress are associated with muscle wasting in tumour-bearing rats. *FEBS Lett.* Mar 14 2005;579(7):1646-1652.
301. Tessitore L, Costelli P, Bonetti G, et al. Cancer cachexia, malnutrition, and tissue protein turnover in experimental animals. *Arch Biochem Biophys.* Oct 1993;306(1):52-58.
302. Muscaritoli M, Costelli P, Bossola M, et al. Effects of simvastatin administration in an experimental model of cancer cachexia. *Nutrition.* Nov-Dec 2003;19(11-12):936-939.
303. Kranias EG, Bers DM. Calcium and cardiomyopathies. *Subcell Biochem.* 2007;45:523-537.
304. Birkeland JA, Sejersted OM, Taraldsen T, et al. EC-coupling in normal and failing hearts. *Scand Cardiovasc J.* Apr 2005;39(1-2):13-23.



305. Nabauer M, Kaab S. Potassium channel down-regulation in heart failure. *Cardiovasc Res*. Feb 1998;37(2):324-334.
306. Argiles JM, Moore-Carrasco R, Fuster G, et al. Cancer cachexia: the molecular mechanisms. *Int J Biochem Cell Biol*. Apr 2003;35(4):405-409.
307. Jackson G, Gibbs CR, Davies MK, et al. ABC of heart failure. Pathophysiology. *Bmj*. Jan 15 2000;320(7228):167-170.
308. Morrissey RP, Czer L, Shah PK. Chronic heart failure: current evidence, challenges to therapy, and future directions. *Am J Cardiovasc Drugs*. Jun 1;11(3):153-171.
309. Valocikova I, Kristofova B, Valocik G. Cardiac biomarkers and chronic renal diseases. *Bratisl Lek Listy*. 2008;109(8):341-344.
310. Perry SV. Troponin T: genetics, properties and function. *J Muscle Res Cell Motil*. Aug 1998;19(6):575-602.
311. de Jong S, van Veen TA, de Bakker JM, et al. Biomarkers of myocardial fibrosis. *J Cardiovasc Pharmacol*. May;57(5):522-535.
312. Maisch B. Ventricular remodeling. *Cardiology*. 1996;87 Suppl 1:2-10.
313. Mastrocola R, Reffo P, Penna F, et al. Muscle wasting in diabetic and in tumor-bearing rats: role of oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. Feb 15 2008;44(4):584-593.
314. Willis MS, Patterson C. Into the heart: the emerging role of the ubiquitin-proteasome system. *J Mol Cell Cardiol*. Oct 2006;41(4):567-579.
315. Lopez J, Meier P. To fight or die - inhibitor of apoptosis proteins at the crossroad of innate immunity and death. *Curr Opin Cell Biol*. Dec;22(6):872-881.
316. Shi J, Luo L, Eash J, et al. The SCF-Fbxo40 complex induces IRS1 ubiquitination in skeletal muscle, limiting IGF1 signaling. *Dev Cell*. Nov 15;21(5):835-847.
317. Haghikia A, Missol-Kolka E, Tsikas D, et al. Signal transducer and activator of transcription 3-mediated regulation of miR-199a-5p links cardiomyocyte and endothelial cell function in the heart: a key role for ubiquitin-conjugating enzymes. *Eur Heart J*. May;32(10):1287-1297.
318. Costelli P, Tullio RD, Baccino FM, et al. Activation of Ca(2+)-dependent proteolysis in skeletal muscle and heart in cancer cachexia. *Br J Cancer*. Apr 6 2001;84(7):946-950.
319. Ichimura Y, Komatsu M. Selective degradation of p62 by autophagy. *Semin Immunopathol*. Dec;32(4):431-436.
320. Penna F, Bonetto A, Muscaritoli M, et al. Muscle atrophy in experimental cancer cachexia: is the IGF-1 signaling pathway involved? *Int J Cancer*. Oct 1;127(7):1706-1717.
321. Inoki K, Ouyang H, Li Y, et al. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiol Mol Biol Rev*. Mar 2005;69(1):79-100.
322. Costelli P, Muscaritoli M, Bonetto A, et al. Muscle myostatin signalling is enhanced in experimental cancer cachexia. *Eur J Clin Invest*. Jul 2008;38(7):531-538.
323. Heineke J, Auger-Messier M, Xu J, et al. Genetic deletion of myostatin from the heart prevents skeletal muscle atrophy in heart failure. *Circulation*. Jan 26;121(3):419-425.
324. Elkina Y, von Haehling S, Anker SD, et al. The role of myostatin in muscle wasting: an overview. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. Sep;2(3):143-151.

325. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol.* Jan 1978;90(1):57-70.
326. Nagaya N, Uematsu M, Kojima M, et al. Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure. *Circulation.* Sep 18 2001;104(12):1430-1435.
327. White PD, Mallory GK, Salcedo-Salgar J. The Speed of Healing of Myocardial Infarcts. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 1936;52:97-104 101.
328. Deboer MD. Animal models of anorexia and cachexia. *Expert Opin Drug Discov.* Nov 1 2009;4(11):1145-1155.
329. Palus S, Schur R, Akashi YJ, et 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.*6(11):e26865.
330. Hinkle RT, Lefever FR, Dolan ET, et al. Treatment with a corticotrophin releasing factor 2 receptor agonist modulates skeletal muscle mass and force production in aged and chronically ill animals. *BMC Musculoskelet Disord.*12:15.
331. Batista ML, Jr., Rosa JC, Lopes RD, et al. Exercise training changes IL-10/TNF-alpha ratio in the skeletal muscle of post-MI rats. *Cytokine.* Jan;49(1):102-108.
332. Hou Y, Huang C, Cai X, et al. Improvements in the establishment of a rat myocardial infarction model. *J Int Med Res.*39(4):1284-1292.
333. Varan B, Tokel K, Yilmaz G. Malnutrition and growth failure in cyanotic and acyanotic congenital heart disease with and without pulmonary hypertension. *Arch Dis Child.* Jul 1999;81(1):49-52.
334. Okoromah CA, Ekure EN, Lesi FE, et al. Prevalence, profile and predictors of malnutrition in children with congenital heart defects: a case-control observational study. *Arch Dis Child.* Apr;96(4):354-360.
335. Delp MD, Duan C, Mattson JP, et al. Changes in skeletal muscle biochemistry and histology relative to fiber type in rats with heart failure. *J Appl Physiol.* Oct 1997;83(4):1291-1299.
336. Scarlett JM, Bowe DD, Zhu X, et al. Genetic and pharmacologic blockade of central melanocortin signaling attenuates cardiac cachexia in rodent models of heart failure. *J Endocrinol.* Jul;206(1):121-130.
337. Wexler BC. Myocardial infarction in young vs old male rats: pathophysiologic changes. *Am Heart J.* Jul 1978;96(1):70-80.
338. Gould KE, Taffet GE, Michael LH, et al. Heart failure and greater infarct expansion in middle-aged mice: a relevant model for postinfarction failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Feb 2002;282(2):H615-621.
339. Palus S, Akashi Y, von Haehling S, et al. The influence of age and sex on disease development in a novel animal model of cardiac cachexia. *Int J Cardiol.* Apr 17 2009;133(3):388-393.
340. Azhar G, Wei JY. Nutrition and cardiac cachexia. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* Jan 2006;9(1):18-23.
341. Arques S, Ambrosi P. Human serum albumin in the clinical syndrome of heart failure. *J Card Fail.* Jun;17(6):451-458.
342. De Smet HR, Menadue MF, Oliver JR, et al. Increased thirst and vasopressin secretion after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Nov 2003;285(5):R1203-1211.
343. Sill V. [The lung in heart diseases]. *Pneumologie.* Feb 1990;44 Suppl 1:121-126.

344. Haddad F, Doyle R, Murphy DJ, et al. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation*. Apr 1 2008;117(13):1717-1731.
345. Silvestre JS, Heymes C, Oubenaissa A, et al. Activation of cardiac aldosterone production in rat myocardial infarction: effect of angiotensin II receptor blockade and role in cardiac fibrosis. *Circulation*. May 25 1999;99(20):2694-2701.
346. Rubin SA, Fishbein MC, Swan HJ. Compensatory hypertrophy in the heart after myocardial infarction in the rat. *J Am Coll Cardiol*. Jun 1983;1(6):1435-1441.
347. Aimond F, Alvarez JL, Rauzier JM, et al. Ionic basis of ventricular arrhythmias in remodeled rat heart during long-term myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. May 1999;42(2):402-415.
348. Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res*. Feb 1998;37(2):279-289.
349. Paul S. Ventricular remodeling. *Crit Care Nurs Clin North Am*. Dec 2003;15(4):407-411.
350. Moises VA, Ferreira RL, Nozawa E, et al. Structural and functional characteristics of rat hearts with and without myocardial infarct. Initial experience with Doppler echocardiography. *Arq Bras Cardiol*. Aug 2000;75(2):125-136.
351. Sjaastad I, Sejersted OM, Ilebekk A, et al. Echocardiographic criteria for detection of postinfarction congestive heart failure in rats. *J Appl Physiol*. Oct 2000;89(4):1445-1454.
352. Morgan EE, Faulx MD, McElfresh TA, et al. Validation of echocardiographic methods for assessing left ventricular dysfunction in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Nov 2004;287(5):H2049-2053.
353. Skomedal T, Borthne K, Aass H, et al. Comparison between alpha-1 adrenoceptor-mediated and beta adrenoceptor-mediated inotropic components elicited by norepinephrine in failing human ventricular muscle. *J Pharmacol Exp Ther*. Feb 1997;280(2):721-729.
354. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*. Apr 1979;44(4):503-512.
355. Fletcher PJ, Pfeffer JM, Pfeffer MA, et al. Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. *Circ Res*. Sep 1981;49(3):618-626.
356. Drexler H, Toggart EJ, Glick MR, et al. Regional vascular adjustments during recovery from myocardial infarction in rats. *J Am Coll Cardiol*. Jul 1986;8(1):134-142.
357. Mani K. Programmed cell death in cardiac myocytes: strategies to maximize post-ischemic salvage. *Heart Fail Rev*. Jun 2008;13(2):193-209.
358. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*. Jan 1996;74(1):86-107.
359. Jiang B, Liao R. The paradoxical role of inflammation in cardiac repair and regeneration. *J Cardiovasc Transl Res*. Aug;3(4):410-416.
360. Ahmet I, Krawczyk M, Zhu W, et al. Cardioprotective and survival benefits of long-term combined therapy with beta2 adrenoreceptor (AR) agonist and beta1 AR blocker in dilated cardiomyopathy postmyocardial infarction. *J Pharmacol Exp Ther*. May 2008;325(2):491-499.

361. Sia YT, Lapointe N, Parker TG, et al. Beneficial effects of long-term use of the antioxidant probucol in heart failure in the rat. *Circulation*. May 28 2002;105(21):2549-2555.
362. Adams V, Linke A, Wisloff U, et al. Myocardial expression of Murf-1 and MAFbx after induction of chronic heart failure: Effect on myocardial contractility. *Cardiovasc Res*. Jan 1 2007;73(1):120-129.
363. Wu Y, Yin X, Wijaya C, et al. Acute myocardial infarction in rats. *J Vis Exp*. (48).
364. Walsh K. Akt signaling and growth of the heart. *Circulation*. May 2 2006;113(17):2032-2034.
365. Kerkela R, Woulfe K, Force T. Glycogen synthase kinase-3beta -- actively inhibiting hypertrophy. *Trends Cardiovasc Med*. Apr 2007;17(3):91-96.
366. Sanders PM, Russell ST, Tisdale MJ. Angiotensin II directly induces muscle protein catabolism through the ubiquitin-proteasome proteolytic pathway and may play a role in cancer cachexia. *Br J Cancer*. Aug 22 2005;93(4):425-434.
367. Stallion A, Foley-Nelson T, Chance WT, et al. Anticatabolic effect of the beta 2-agonist cimaterol in vivo in tumor-bearing animals. *J Surg Res*. Sep 1995;59(3):387-392.
368. Hoppe UC, Erdmann E. [Heart failure update 2010 and current ESC guidelines]. *Herz*. Dec;35(8):535-540.
369. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. Sep 2 1999;341(10):709-717.
370. Packer M, Coats AJ, Fowler MB, et al. Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med*. May 31 2001;344(22):1651-1658.
371. Lainscak M, Keber I, Anker SD. Body composition changes in patients with systolic heart failure treated with beta blockers: a pilot study. *Int J Cardiol*. Jan 26 2006;106(3):319-322.
372. Cao DX, Wu GH, Yang ZA, et al. Role of beta1-adrenoceptor in increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Sci*. Jul;101(7):1639-1645.
373. Agustsson T, Ryden M, Hoffstedt J, et al. Mechanism of increased lipolysis in cancer cachexia. *Cancer Res*. Jun 1 2007;67(11):5531-5537.
374. Batista ML, Jr., Peres SB, McDonald ME, et al. Adipose tissue inflammation and cancer cachexia: Possible role of nuclear transcription factors. *Cytokine*. Jan;57(1):9-16.
375. Lamont LS, Brown T, Riebe D, et al. The major components of human energy balance during chronic beta-adrenergic blockade. *J Cardiopulm Rehabil*. Jul-Aug 2000;20(4):247-250.
376. Hryniewicz K, Androne AS, Hudaihed A, et al. Partial reversal of cachexia by beta-adrenergic receptor blocker therapy in patients with chronic heart failure. *J Card Fail*. Dec 2003;9(6):464-468.
377. Kovacic D, Marinsek M, Gobec L, et al. Effect of selective and non-selective beta-blockers on body weight, insulin resistance and leptin concentration in chronic heart failure. *Clin Res Cardiol*. Jan 2008;97(1):24-31.
378. van Zwieten PA. Pharmacodynamic profile of carvedilol. *Cardiology*. 1993;82 Suppl 3:19-23.
379. Smith GL, Lichtman JH, Bracken MB, et al. Renal impairment and outcomes in heart failure: systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. May 16 2006;47(10):1987-1996.

380. Haase M, Haase-Fielitz A, Bellomo R, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute renal disease. *Curr Opin Hematol*. Nov 22.
381. Ronco C, Grammaticopoulos S, Rosner M, et al. Oliguria, creatinine and other biomarkers of acute kidney injury. *Contrib Nephrol*.164:118-127.
382. de Muinck ED, Lie KI. Safety and efficacy of beta-blockers in the treatment of stable angina pectoris. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990;16 Suppl 5:S123-128.
383. Communal C, Singh K, Sawyer DB, et al. Opposing effects of beta(1)- and beta(2)-adrenergic receptors on cardiac myocyte apoptosis : role of a pertussis toxin-sensitive G protein. *Circulation*. Nov 30 1999;100(22):2210-2212.
384. Zhu WZ, Wang SQ, Chakir K, et al. Linkage of beta1-adrenergic stimulation to apoptotic heart cell death through protein kinase A-independent activation of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II. *J Clin Invest*. Mar 2003;111(5):617-625.
385. Shizukuda Y, Buttrick PM. Subtype specific roles of beta-adrenergic receptors in apoptosis of adult rat ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. Jul 2002;34(7):823-831.
386. Diffie GM, Kalfas K, Al-Majid S, et al. Altered expression of skeletal muscle myosin isoforms in cancer cachexia. *Am J Physiol Cell Physiol*. Nov 2002;283(5):C1376-1382.
387. Ambrus JL, Ambrus CM, Mink IB, et al. Causes of death in cancer patients. *J Med*. 1975;6(1):61-64.
388. Fallon MT, Hanks GW. Control of common symptoms in advanced cancer. *Ann Acad Med Singapore*. Mar 1994;23(2):171-177.
389. Ripamonti C. Management of dyspnea in advanced cancer patients. *Support Care Cancer*. Jul 1999;7(4):233-243.
390. Anker SD, Coats AJ, inventors. Methods of treating cachexia. US patent WO00/21509, 2000.
391. Cohn JN. Sympathetic nervous system activity and the heart. *Am J Hypertens*. Dec 1989;2(12 Pt 2):353S-356S.
392. Brum PC, Rolim NP, Bacurau AV, et al. Neurohumoral activation in heart failure: the role of adrenergic receptors. *An Acad Bras Cienc*. Sep 2006;78(3):485-503.

## Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Stefan Anker für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas, für seine Unterstützung während der Forschungsarbeit und für die Teilnahme an vielen informativen Konferenzen bedanken.

Desweiteren danke ich Prof. Dr. Rupert Mutzel für die Übernahme der Betreuung seitens der Freien Universität Berlin.

Weiterhin möchte ich Dr. Jochen Springer für die konstruktiven Verbesserungsvorschläge bezüglich der Dissertation danken. Zusätzlich gilt ein großer Dank meinen Kollegen Anna Baumgarten, Mareike Pötsch, Sabine Kiauka, Sandra Palus, Loes Pelgrim, Yulia Elkina, Nancy Schanze und Lena Russ, die mir mit zahlreichem Korrekturlesen geholfen und mit aufmunternden Worten zur Seite gestanden haben.

Ein weiterer Dank gilt Frau Cornelia Anker, die sich bei bürokratischen und organisatorischen Problemen immer für unsere Arbeitsgruppe eingesetzt hat.

Auch danke ich der ATB Aufzugtechnik Berlin GmbH, die mich bei der Suche nach einer Doktorarbeit unterstützt hat und mir damals eine vorübergehende Stelle als Mitarbeiterin zur Verfügung gestellt hatte. Der Dank gilt Dirk Zelle, Michael Wittek und dem ganzem Team.

Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie, Freunden und Nachbarn bedanken, die immer an mich glauben und mich während dieser Arbeit mit Kaffee, Spaß und Ablenkung versorgt haben. Danken möchte ich besonders Oma, Gabi und Frank. Vor allem aber möchte ich meinen Ehemann Ronny für seine Unterstützung und Geduld danken, aber auch für sein leckeres Essen.

Vielen Dank.

## **Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 31.01.2012,

---

Anika Tschirner