

Aus dem  
Zentrum für Kardiovaskuläre Forschung  
Charité  
Universitätsmedizin Berlin

Eingereicht über das  
Institut für Physiologie  
des Fachbereiches Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

**Vergleich einer subkutanen Injektion oder Infusion mittels osmotischer Pumpe  
des Ghrelin-Analogons BMI-28131 bezüglich der Effekte auf Körpergewicht,  
Körperzusammensetzung und Herzfunktion im Rattenmodell der kardialen Kachexie**

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

vorgelegt von  
**Grit Ehlert**  
Tierärztin  
aus Rostock

Berlin 2012  
Journal-Nr.: 3609

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Jörg R. Aschenbach  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. Stefan D. Anker  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Kerstin E. Müller

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

rats, cardiac insufficiency, body measurements, weight losses, applications,  
food intake, gastrointestinal hormones, growth hormone

Tag der Promotion: 29.04.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-498-8

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2012**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

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

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Literatur</b> .....	<b>2</b>
2.1 Kachexie bei chronischer Herzinsuffizienz.....	2
2.1.1 Pathogenese der kardialen Kachexie.....	3
2.1.2 Katabole/anabole Imbalance.....	3
2.1.3 Aktivierung von Zytokinen und neuroendokrinen Hormonen.....	4
2.1.4 Abnahme von skelettalem Muskelgewebe.....	8
2.1.5 Abnahme von Fettgewebe.....	9
2.1.6 Abnahme von Knochengewebe.....	10
2.1.7 Medikamentelle Therapie der kardialen Kachexie.....	10
2.2 Ghrelin.....	11
2.2.1 Struktur.....	11
2.2.2 Bildung und Vorkommen.....	12
2.2.3 Ghrelinrezeptor.....	13
2.2.4 Wirkungen.....	13
2.2.4.1 Einfluss auf die Appetitregulation.....	15
2.2.4.2. Einfluss auf den Energiehaushalt.....	16
2.2.4.3 Wachstumshormon-Freisetzung.....	17
2.2.4.4 Kardiovaskuläre und hämodynamische Effekte.....	19
2.2.4.5 Beeinflussung des Blutdruckes.....	20
2.3 Zielsetzung der Studie.....	20
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>22</b>
3.1 Versuchstiere und Haltung.....	22
3.2 Studiendurchführung.....	23
3.2.1 Infarktoperationen.....	24
3.2.2 Randomisierung, Verblindung und Einteilung der Behandlungsgruppen.....	25
3.2.3 Medikamentenapplikationen.....	26
3.2.4 Messungen.....	27
3.2.4.1 Messungen der Körpergewichte.....	27

3.2.4.2 Bestimmungen der Körperzusammensetzungen mittels NMR.....	27
3.2.4.3 Echokardiographie.....	28
3.2.4.4 Invasive hämodynamische Untersuchungen.....	29
3.2.5 Organentnahme und Präparation.....	29
3.2.6 Verarbeitung der histologischen Proben.....	29
3.2.6.1 Differenzialfärbungen.....	30
3.2.7 Messungen der Querschnittsflächen der Muskelfaserzelle.....	31
3.3 Statistische Auswertungen und Darstellung der Ergebnisse.....	32
3.3.1 Charakteristika der Studienpopulation.....	32
<b>4. Ergebnisse.....</b>	<b>33</b>
4.1 Entwicklungen des Körpergewichtes.....	33
4.2 Ergebnisse der NMR-Messungen.....	37
4.2.1 Fettzuwachs.....	38
4.2.2 Muskelzuwachs.....	42
4.3 Analysen der Organgewichte.....	45
4.3.1 Ergebnisse der Lungengewichte.....	46
4.3.2 Ergebnisse der Tibialängen.....	48
4.3.3 Infarktgrößen.....	49
4.3.4 Herzgewichte.....	50
4.3.5 Gewichte des linken Atriums.....	51
4.3.6 Gewichte des rechten Atriums.....	52
4.3.7 Gewichte des rechten Ventrikels.....	53
4.3.8 Gewichte des linken Ventrikels.....	54
4.3.9 Gewichte des Septums.....	55
4.3.10 Ergebnisse der Gewichte der untersuchten Muskel.....	56
4.3.11 Gewichte der rechten und linken Niere.....	57
4.4 Analysen der Herzparameter.....	57
4.4.1 Herzfrequenz.....	58
4.4.2 Schlagvolumen.....	59
4.4.3 Linksventrikuläres Fractional Shortening.....	62
4.4.4 Linksventrikuläre Ejektionsfraktion.....	64
4.4.5 Herzminutenvolumen.....	66

4.4.6 Linksventrikuläre diastolische Hinterwanddicke.....	68
4.4.7 Interventrikularseptum diastolisch.....	70
4.4.8 Linksventrikulärer Enddiastolischer Durchmesser.....	72
4.5 Auswertung der Flächenmessungen der Muskelzellfasern des M. gastrocnemius und des M. extensor digitorum longus.....	73
<b>5. Diskussion.....</b>	<b>77</b>
5.1 Infarktgrößen.....	77
5.2 Gewichtsentwicklungen.....	77
4.5 Verteilung der Gewichtseffekte auf das Fettgewebe und das muskuloskeletale System .....	79
5.4 Gewichte ausgesuchter innerer Organe.....	82
5.5 Echokardiographische Ergebnisse der Herzfunktion.....	82
5.6 Einfluss der Applikationsart.....	84
5.7 Einfluss der Dosierungen des Ghrelin-Analogons (BIM-28131).....	86
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>88</b>
<b>7. Summary.....</b>	<b>89</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>90</b>
<b>9. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>92</b>
<b>10. Publikationen.....</b>	<b>104</b>
<b>Danksagung.....</b>	<b>105</b>
<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>106</b>



## 1. Einleitung

Die chronische Herzinsuffizienz (CHI) ist mit ca. 1% der Gesamtbevölkerung eine der häufigsten internistischen Erkrankungen weltweit. In der Todesursachenstatistik Deutschlands des statistischen Bundesamtes von 2010 liegt die Herzinsuffizienz an 3. Stelle mit einem Anteil von 5,6%. Das ansteigende Durchschnittsalter der Bevölkerung, verbesserte diagnostische Methoden zur Erkennung einer Herzschwäche und verbesserte Medikation verbunden mit einer höheren Lebensdauer bei Patienten sind Gründe für das stetige Ansteigen der CHI.

Eine häufige und ernst zu nehmende Komplikation der CHI ist die kardiale Kachexie, die mit einer Prävalenz von etwa 10-15% der Patienten mit CHI auftritt und mit einer schlechten Prognose verbunden ist. Die kardiale Kachexie ist durch komplexe Veränderungen des neurohormonellen und immunologischen Status eine multifaktorielle Störung, die durch ein kataboles / anaboles Ungleichgewicht gekennzeichnet ist.

Patienten mit kardialer Kachexie leiden an generalisiertem Verlust von Muskel-, Fett- und Knochengewebe. Für die Behandlung dieser schwerwiegenden Komplikation gibt es jedoch, neben einer adäquaten Ernährung keine spezielle Therapie.

Wie mehrere Studien belegen, scheint Ghrelin, ein Hormon, welches im Magen produziert wird und wichtige regulatorische Funktionen bei der Wachstumshormonsekretion und Energiehomöostase besitzt, ein mögliches Potential bei der Behandlung der kardialen Kachexie bei CHI zu haben.

## 2. Literatur

### 2.1 Kachexie bei chronischer Herzinsuffizienz

Prävalenz und Inzidenz der Herzinsuffizienz sind altersabhängig. Im Alter von 45 bis 55 Jahren leiden weniger als 1 Prozent der Bevölkerung an Herzinsuffizienz. Bei 65- bis 75-jährigen beträgt der Anteil derer mit Herzinsuffizienz bereits 2–5% und bei den über 80-jährigen fast 10 Prozent. Männer sind etwa 1,5-fach häufiger betroffen als gleichaltrige Frauen (McMurray und Stewart, 2000). Die chronische Herzinsuffizienz ist insgesamt durch eine katabole Stoffwechsellage gekennzeichnet (Berry und Clark, 2000), die sich in einer Abnahme von Fettgewebe, Proteinabbau und einer Abnahme von skelettalem Muskelgewebe äußert. Kachexie als schwerwiegende Komplikation tritt bei etwa 10-15% der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz auf (Anker und Sharma, 2002). Die Kachexie ist eine Erscheinung, die schon seit langer Zeit bekannt ist und häufig bei chronischen Erkrankungen auftritt, aber im kardiovaskulären Bereich bisher nicht intensiv erforscht wurde und daher nur wenig verstanden und nicht spezifisch therapierbar ist.

Schon vor Christi Geburt wurde von deutlichem Gewichtsverlust und Schwächung als wichtige Merkmale bei CHI berichtet. Der älteste bekannte Bericht von deutlichem Gewichtsverlust in Verbindung mit chronischer Herzinsuffizienz stammt aus der medizinischen Schule des Hippokrates vor über 2400 Jahren. Indem er einen Zusammenhang zwischen Aszites und Kachexie herstellte, schrieb Hippokrates: [Das Fleisch ist verbraucht und wird wässrig,...die Schultern, die Schlüsselbeine, die Brust und die Schenkel zerschmelzen...Diese Krankheit ist tödlich.] (Hryniewicz et al., 2003). Das Wort „Kachexie“ stammt aus dem Griechischen und leitet sich ab von dem Wort „Kakos“, was soviel wie „schlecht“ bedeutet, und „Hexis“, das mit „Zustand“ übersetzt werden kann (Tisdale, 2005). Es gibt keine einheitliche Definition der Kachexie (Baracos, 2006). Laut Anker (Anker et al., 2003) spricht man von kardialer Kachexie, wenn ein nicht ödematös bedingter, unabsichtlicher Gewichtsverlust von 6 % oder mehr des Ausgangsgewichtes des Patienten über einen längeren Zeitraum von mehr als 6 Monaten vorliegt.

Das Syndrom der kardialen Kachexie bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz ist verbunden mit erhöhter Mortalität (Anker et al., 2001), unabhängig vom dem Krankheitsgrad, dem Alter, von der körperlichen Leistungsfähigkeit und der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) (Anker und Sharma, 2002). Andererseits haben übergewichtige CHI-Patienten, hinsichtlich der Mortalität eine bessere Prognose als untergewichtige (Anker et al., 1997c).



### **2.1.1 Pathogenese der kardialen Kachexie**

Die kardiale Kachexie ist eine multifaktorielle Störung. Der Zusammenhang zwischen fortschreitender Herzschwäche und kardialer Kachexie wird jedoch noch nicht vollständig verstanden. Mehrere pathophysiologische Mechanismen erscheinen möglich. Adaptive neuroendokrine Mechanismen, chronische Entzündungen, Muskelabbau, gesteigerte Lipolyse, Appetitverlust und Malabsorption werden einerseits als Ursache, andererseits als Folge der kardialen Kachexie verstanden (von Haeling et al., 2007; Strassburg et al., 2005). Eine Reduktion von Muskel-, Fett- und Knochengewebe bei Patienten mit CHI korreliert signifikant mit dem Blutspiegel inflammatorischer Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin 1 (IL-1) und 6 (IL-6) und katabol wirkender Hormonen (Katecholamine, Kortisol, Aldosteron, Renin) (Anker et al., 2003).

Patienten mit symptomatischer Herzschwäche und Erbrechen können auf Grund eines intestinalen Ödems anorektisch werden. Bei diesen Patienten ist die orale Nahrungsaufnahme für gewöhnlich ungenügend.

Eine Therapie mit Medikamenten, wie Digitalis, Angiotensin Converting Enzym-Hemmern, Beta-Blockern und eine Na-restriktive Diät kann mit zu einer Anorexie beitragen. Auf der Basis von Erfahrungsberichten wird geschätzt, dass ein Appetitverlust nur in 10-20% der Fälle von kardialer Kachexie eine bedeutende Rolle spielt (Anker et al., 2003). In CHI-Studien wurde eine allgemeine Gewichtsabnahme festgestellt, welche durch eine erhöhte Nahrungsaufnahme nicht zu einer Umkehr führte und bei der die Patienten einen Verlust an Muskel-, Fett-, und Knochengewebe aufwiesen. Ein verminderter Albuminspiegel konnte bei den meisten Patienten nicht festgestellt werden (Anker et al., 1997b).

### **2.1.2 Katabole / anabole Imbalance**

Nach derzeitigem Kenntnisstand entwickelt sich die kardiale Kachexie aufgrund eines katabolen/anabolen Ungleichgewichts, hervorgerufen durch hormonelle und immunologische Veränderungen (Anker et al., 2003). Dies ist durch eine spezifische neurohormonelle Aktivierung mit erhöhten Plasma- und Serumspiegeln von Katecholaminen, Kortisol, Aldosteron, eine höhere Reninaktivität (Levine et al., 1990; Anker et al., 2003) und inflammatorische Immunaktivierung (King et al., 1996; Anker und Rauchhaus, 1999) gekennzeichnet. Darmödeme könnten für eine inadäquate Resorption von Nährstoffen aus der Nahrung verantwortlich sein (Azhar und Wie, 2006). Auch scheint eine passive Stauung zu Darmödem, Hepatomegalie, Aszites und Völlegefühl bei verringertem Darmvolumen zu führen, das zur schnelleren Sättigung und verringertem Appetit beiträgt. Durch eine verringerte Nahrungsaufnahme des Patienten und verringertem Appetit kommt es zu einem

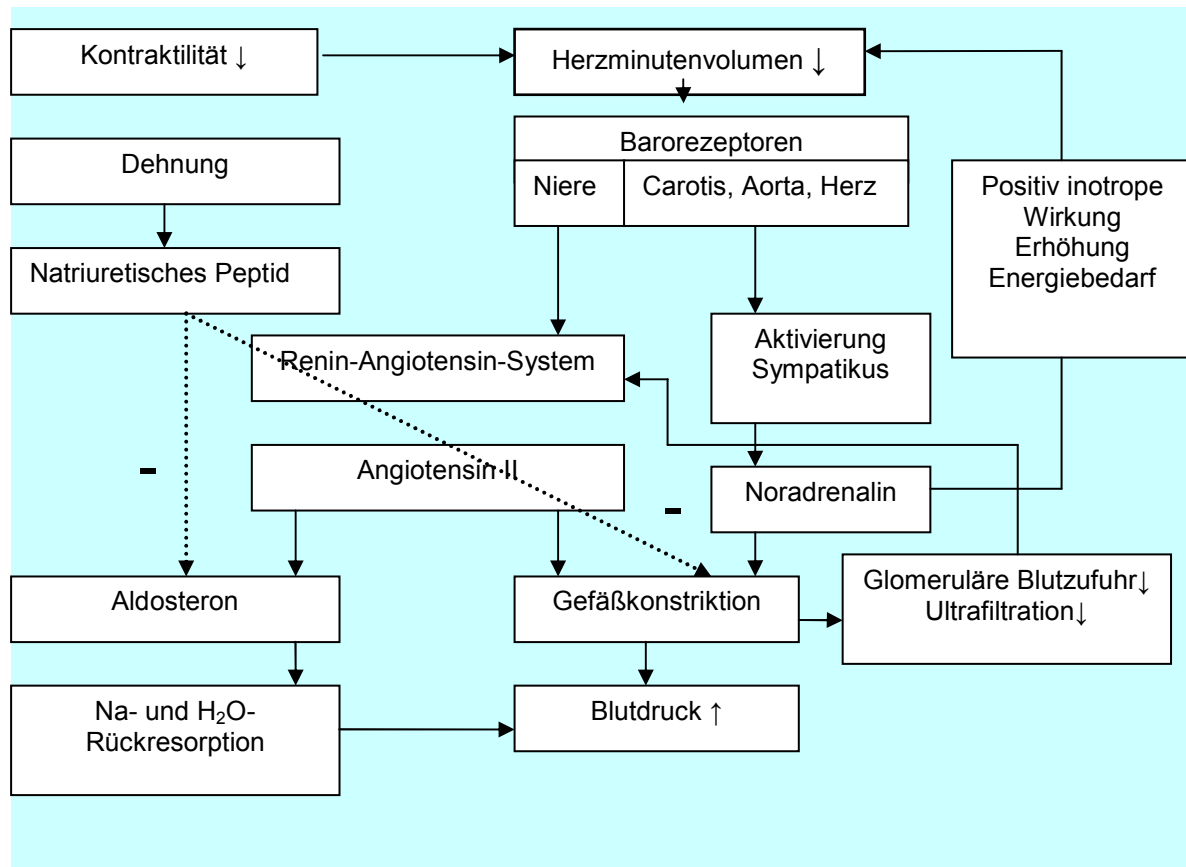
Energiedefizit gemessen an dem Energiebedürfnis des Organismus (Azhar und Wie, 2006). Darüber hinaus weisen Patienten mit kardialer Kachexie einen erhöhten Ruheenergieumsatz auf (Riley et al., 1991; Poehlman et al., 1994). Aufgrund der eingeschränkten körperlichen Aktivität ist der Gesamtenergieumsatz im Vergleich zu nicht-kachektischen CHI-Patienten reduziert (Poehlman et al., 1994). Die Mechanismen des erhöhten Ruheenergieumsatzes bei Patienten mit CHI sind unbekannt. Ein Ansteigen des myokardialen Sauerstoffbedarfes und ein erhöhter metabolischer Umsatz durch gesteigerte Atemfrequenz könnten mit dazu beitragen (Poehlman et al., 1994). Zudem ist es wahrscheinlich, dass systemische Faktoren, wie TNF- $\alpha$ , die bei CHI Patienten erhöht sind (Levine et al., 1990), eine Rolle spielen. Der Ruheenergieumsatz steigt mit dem Schweregrad der CHI an (Obisesan et al., 1996).

### **2.1.3 Aktivierung von Zytokinen und neuroendokrinen Hormonen**

Als Herzinsuffizienz bezeichnet man die Unfähigkeit des Herzens, das vom Organismus benötigte Herzzeitvolumen bei normalem enddiastolischen Ventrikeldruck zu fördern. Es handelt sich um ein klinisches Syndrom unterschiedlicher Ätiologie. Die chronische Herzinsuffizienz wird in den meisten Fällen durch eine Verminderung des kontraktiven Herzmuskelgewebes verursacht. Histologisch sieht man einerseits ein krankhaftes Wachstum einzelner Herzmuskelzellen (myozytäre Hypertrophie), andererseits einen gesteigerten Zellverlust (myozytäre Apoptose). Bei einem Herzinfarkt reagiert das Herz zunächst auf einen höheren Sauerstoffbedarf mit einer Zunahme der Frequenz und der Schlagkraft. Reichen diese kurzzeitigen Mechanismen nicht aus, erfolgen strukturelle Veränderungen, wie die Hypertrophie der Herzmuskelzellen. Die zunehmende Vergrößerung der Herzkammern führt zu einer hohen Wandspannung des Herzens, was den Eintritt des Blutes in den angespannten Muskel zusätzlich behindert. Es kommt zu einer chronischen Mangelversorgung des Herzmuskels, wodurch die bestehende Kraftminderung zusätzlich verstärkt wird. Bei einer Volumen- und Drucküberlastung des Herzens wird zudem das B-Typ-Natriuretische-Peptid (BNP), ein natriuretisches Peptid von Myozyten freigesetzt (Sun und Wang, 2007). In einer Studie zeigte sich, dass BNP die Lipolyse in humanen Fettzellen stimuliert (Sengenes et al., 2005).

Bei der CHI werden als Antwort auf die beeinträchtigte kardiale Funktion viele Neurohormone (Adrenalin, Noradrenalin, Kortisol) und Zytokine (z. B. TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6) aktiviert, die eine wichtige Rolle bei der Entstehung der kardialen Kachexie spielen (siehe Abbildungen 2.1; 2.2). Die vermehrte Freisetzung von Noradrenalin führt langfristig zu ungünstigen funktionellen und strukturellen Veränderungen am Herzen und korreliert in hohem Maße mit einer schlechten Prognose der Herzinsuffizienz (Brown et al., 1992). Studien zeigen, dass das Maß der Abnahme von Muskel-, Fett- und Knochengewebe bei

kachektischen CHI-Patienten signifikant mit katabol wirkenden Neurohormonen und inflammatorischen Zytokinspiegeln korreliert (Anker et al., 2003).



**Abb. 2.1:** Neurohormonelles Kompensationssystem bei Herzinsuffizienz zur Stabilisierung des Blutdruckes und des Herzminutenvolumens (Erläuterungen siehe Text)

Die Wirkung dieser Mechanismen zielt auf eine periphere Vasokonstriktion zur Aufrechterhaltung der Organperfusion. Durch die Erhöhung der Nachlast kommt es jedoch zu einer weiteren Beeinträchtigung der myokardialen Auswurfleistung, die in einer zusätzlichen Aktivierung der neuroendokrinen Stimulation mündet, welche das weitere Fortschreiten der Herzinsuffizienz begünstigt.

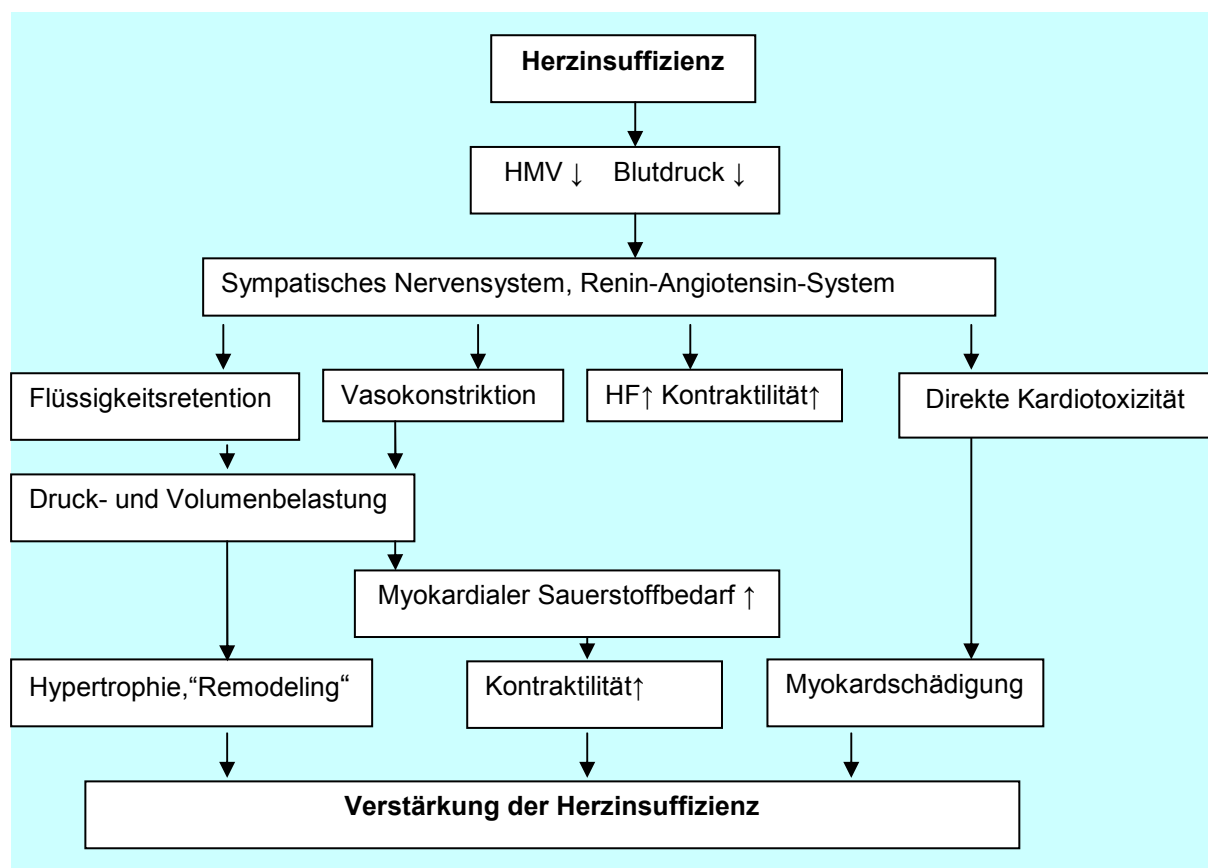
Kachektische CHI-Patienten haben einen hohen Plasmaspiegel von TNF- $\alpha$  [8,6-3,6 pg/ml vs. 5,9-2,1 pg/ml;  $p < 0,05$ ] (Richartz et al., 2001), IL-1 und IL-6 im Gegensatz zu nicht kachektischen CHI-Patienten, die einen normalen Plasmagehalt von TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-6 aufweisen (Anker et al., 2003; Krack et al., 2005). TNF- $\alpha$  ist zusammen mit IL-1, IL-6, Interferon- $\gamma$  und Transforming Growth Factor- $\beta$  eines der Schlüsselzytokine des katabolen Stoffwechsels und ein Hauptfaktor bei der Entwicklung der kardialen Kachexie (Anker et al., 2003), speziell beim Muskelabbau durch erniedrigte Proteinsynthese und erhöhten

Proteinabbau (Spate und Schulze, 2004). Die Wirkung des TNF- $\alpha$  erfolgt über die Bindung an spezifische Rezeptoren: den TNF-Rezeptoren 1 und 2, die an der Oberfläche der meisten Zellarten exprimiert werden (Ferrari et al., 1995). Obwohl der genaue Stimulus der Immunaktivierung bei CHI noch nicht bekannt ist, existieren mehrere Hypothesen bezüglich der Zytokininduktion. Als mögliche Ursache für den Anstieg der proinflammatorischen Zytokinproduktion bei CHI-Patienten wird beispielsweise ein Sauerstoffmangel genannt, der damit das betroffene Herz selbst zur Hauptquelle von TNF- $\alpha$  macht (von Haehling et al., 2004).

Durch eine Störung der intestinalen Endothel- und Barrierefunktion des Darmes kann es bei CHI zu einer bakteriellen Translokation mit anschließender Endotoxämie kommen, die die Zytokinproduktion stimuliert (Anker et al., 1997a). Dünndarm und Dickdarm sind stark vaskularisierte Organe, die ihr Blut über die A. mesenterica superior und inferior erhalten. Die Blutversorgung des Darmes erreicht ca. 25% des Herzminutenvolumens, weshalb der Darm das mit am intensivsten durchblutete Organ ist (Krack et al., 2005). Die Darmmukosa ist der metabolisch aktive Teil und erhält über 50% des Blutes des Darms. Eine gestörte Darmperfusion im Rahmen einer Herzinsuffizienz sowie chronische Stauung im Gastrointestinalbereich sind wichtige Ursachen einer gestörten Darmwandpermeabilität und enteraler Resorptionsstörung (Sandek et al., 2007). Diese führen vermutlich auch zu einer Translokation der Darmwandbakterien und Endotoxinübertritt, welche zum proinflammatorischen Status der Patienten mit CHI beitragen (Anker et al., 1997a) und zur Stimulierung und Aktivierung inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1- $\beta$  aus Makrophagen führen. Dies unterstreichen Messungen mit erhöhten Endotoxinwerten bei CHI-Patienten mit intestinalem Ödem (Niebauer et al., 1998). TNF- $\alpha$  induziert direkt Muskelproteinabbau (Gulick et al., 1989) und gilt als der stärkste Prädiktor für Gewichtsverlust bei Patienten mit CHI (Anker et al. 1997b). In vivo und in vitro führt TNF- $\alpha$  zu einer verringerten Expression von IGF-1 (Broussard et al., 2003). Neben der Aktivierung von TNF- $\alpha$  kommt es zur weiteren Freisetzung von IL-1 und IL-6. IL-1 wird von verschiedenen Zelltypen synthetisiert und hat eine zentrale Rolle in der systemischen Immunreaktion. Daneben hat IL-1 einen signifikant negativ inotropen Effekt und unterdrückt die kardiale Kontraktilität durch Stimulierung der NO-Synthase (Francis et al., 1998). Außerdem hemmt es neben TNF- $\alpha$  die Ansprechbarkeit beta-adrenerger Rezeptoren in Herzmyozyten (Gulick et al., 1989). Patienten mit einem Herzinfarkt haben erhöhte IL-6-Spiegel, was mit einer niedrigeren Klassifizierung durch die New York Heart Association (NYHA), einem längeren stationären Krankenhausaufenthalt und einer verschlechterten linksventrikulären Herzfunktion assoziiert ist (Torre-Amione et al., 1996). Bei chronischen Erkrankungen wie der CHI, könnten für die Abnahme von Fett- und Muskelgewebe Apoptosevorgänge verantwortlich sein (Sharma und Anker, 2002), die durch Zytokine und entsprechende

Rezeptoren reguliert werden (Ware et al., 1996). In-vivo-Experimente zeigten, dass IL-6 Proteolyse, Muskelatrophie und Gewichtsverlust induziert, was durch eine Therapie mit IL-6-Antikörpern verhindert werden konnte (Filippatos et al., 2005).

Neben der Zytokinaktivierung zeigen sich auch Abweichungen der Konzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin sowie des Steroidhormons Kortisol bei Patienten mit CHI. So wurden in Studien erhöhte Werte von katabol wirkenden Stresshormonen wie Adrenalin, Noradrenalin und Kortisol und erniedrigte Werte bei dem anabol wirkenden Hormon Dehydroepiandrosteron gemessen (Anker et al., 2003). Die Hormone Adrenalin und Noradrenalin wirken durch Stimulierung des Sympathikus positiv chronotrop, inotrop und erhöhen den Blutdruck. Sie sind wichtig für die kurzfristige Anpassung und Kompensation des Herzens bei kurzfristig auftretenden vermehrten Belastungen. Bei chronischer Beeinträchtigung der myokardialen Funktion tragen diese aber später zur Verschlechterung des Verlaufs der Erkrankung bei (siehe Abbildung 2.2).



**Abb. 2.2:** Verstärkung einer Herzinsuffizienz durch langfristig aktivierte Kompensationsmechanismen. Zuerst wird die Perfusion der Organsysteme sichergestellt. Die Kompensationsmechanismen sind kurzfristig sinnvoll, bei längerer Stimulation schlagen die Effekte ins Gegenteil um.

Studien zeigten, dass die Höhe des Adrenalin- und Noradrenalin-Blutspiegels mit der Schwere der Erkrankung korreliert. Auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) spielt bei der Pathogenese der CHI eine Schlüsselrolle. Neurohormonell kommt es bei CHI zu einer Aktivierung des RAAS, dessen integrale Funktion primär zur Aufrechterhaltung des vaskulären Druckes, der Salz- und Wasser-Homöostase und der kardialen Funktion dient. Bei einer Überaktivität kommt es durch die Wirkung von Angiotensin II (ANG II) zu Bluthochdruck (arterielle Hypertonie), linksventrikulärer Hypertrophie und Kontraktion der Koronargefäße des Herzens. Über die Angiotensin-Rezeptor-Subtypen 1 bzw. 2 kommt es im Herzen zur Fibrose, Vaskularisierung, Zellproliferation und -differenzierung und Apoptosevorgängen (Brewster et al., 2003). In Tierstudien zeigte sich, dass ANG II den Muskelabbau induziert, indem es eine Blutspiegelniedrigung des anabol wirkenden Hormons IGF-1 bewirkt (Brink et al., 2001). IGF hemmt die Apoptose durch eine Rezeptor-vermittelte Inhibierung einer Vielzahl intrazellulärer Caspasen. Dies ist eine Gruppe von Proteasen und Effektorenzymen des Proteasomes (Werner et al., 1991), welches als multikatalytisches Enzym für 80-90% des in der Zelle erforderlichen Proteinabbaus verantwortlich ist. ANG II steuert außerdem die Bildung und Freisetzung von Aldosteron in der Nebenniere. Aldosteron beeinflusst das Immunsystem und trägt zu einer systemischen Inflammation bei, welcher auch bei dem Verlauf der CHI und insbesondere der kardialen Kachexie eine große Bedeutung zukommt (Weber, 2003).

#### **2.1.4 Abnahme von skelettalem Muskelgewebe**

Ermüdung und Muskelschwäche sind zwei der Hauptsymptome bei Patienten mit CHI (Anker et al., 2003). Bei mehr als 68 % der Patienten mit CHI liegt ein Verlust von Muskelmasse vor (Mancini und Walter, 1992). Die Ätiologie der Muskelveränderung bei kardialer Kachexie ist jedoch noch nicht gänzlich geklärt. Ein Ungleichgewicht der physiologischen Systeme, die für die Regulation von Proteinsynthese und -abbau verantwortlich sind, könnte mit zum Muskelabbau bei kardialer Kachexie beitragen. So scheint sich der Verlust von Muskelmasse aus einem gestörten Stoffwechsel der Skelettmuskulatur zu ergeben, was aus einer reduzierten aeroben Energiegewinnung und Mitochondriendichte resultiert, und letztlich zu einer Schwächung und Funktionsstörung der Muskulatur führen könnte (Massie et al., 1987; Mancini et al., 1989; Drexler et al., 1992). Zudem zeigte sich, dass bei Patienten mit CHI die endothelabhängige periphere Vasodilatationsfähigkeit deutlich vermindert ist (Kubo et al., 1991). Dies trägt zu einer eingeschränkten Muskeldurchblutung und daraus resultierenden metabolischen Veränderungen im Sinne einer katabolen Stoffwechsellage mit Proteolyse, Abnahme des oxidativen Stoffwechsels, Azidose und gesteigerter Glykolyse bei. Auch Insulin scheint eine wichtige Rolle bei der Regulierung des Gleichgewichtes zwischen

anabolem und katabolem Stoffwechsel zu spielen. Neben der direkten Stimulierung der Aminosäureaufnahme in den Muskeln zeigten experimentelle Studien, dass Insulin den Proteinabbau im Muskel hemmt, indem es eine muskelspezifische Ubiquitin-Ligase (Atrogin-1) mit Muskelatrophie-induzierender Wirkung inhibiert (Sandri et al., 2004). Diese Fähigkeit von Insulin stellt einen möglichen therapeutischen Ansatz dar, um das Muskelwachstum zu stimulieren.

Bei Patienten mit CHI kommt es durch entstehende Ischämiephasen zu einer lokalen Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen im Skelettmuskel, die neben einer direkten Zellschädigung eine inflammatorische Aktivierung mit einer Erhöhung bestimmter Serum-Zytokinpiegel bewirken (Levine et al., 1990). Die Aktivierung von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  als auch Sauerstoffradikale stimulieren durch die Induktion der induzierbaren Stickstoffmonoxid-synthase (iNOS) eine pathologisch erhöhte intrazelluläre Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion (Adams et al., 1999; Hambrecht et al., 1999). In größeren Mengen kann NO durch Störung des Zellstoffwechsels, wie der Hemmung wichtiger Schlüsselenzyme der Atmungskette, z.B. der Cytochrom-c-Oxidase, den Energiestoffwechsel weiter reduzieren (Cleeter et al., 1994; Brown, 1995) und so zum nekrotischen und apoptotischen Zelltod beitragen. Apoptosevorgänge zeigen sich bei Patienten mit CHI nicht nur im Myokard, sondern auch in skelettalem Muskelgewebe. Bei ca. 50% der Patienten zeigten sich in Muskelbiopsien Apoptose-Erscheinungen in Verbindung mit einer Reduzierung der körperlichen Leistungsfähigkeit (Adams et al., 1999). Veränderungen in der GH / IGF-1 Achse könnten dabei eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Kachexie spielen. Patienten mit niedrigen Plasmaspiegeln von IGF-1 haben nachweislich Muskelveränderungen (Niebauer et al., 1998). Bei kachektischen CHI-Patienten sind auf Grund einer Wachstumshormon-Resistenz die Wachstums-hormonspiegel erhöht, wohingegen die IGF-1 Plasmaspiegel unangemessen niedrig sind (Hambrecht et al., 2002). Die Gabe hoher Wachstumshormondosen in Ratten mit Herzschwäche führte nicht nur zu einer Verringerung der Muskelatrophie, sondern auch zu einem geringeren TNF- $\alpha$  Spiegel im Serum und einer verringerten Anzahl apoptotischer Zellkerne, möglicherweise durch IGF-1-Überexpression (Dalla Libera et al., 2004).

### **2.1.5 Abnahme von Fettgewebe**

Bei kardialer Kachexie kommt es insbesondere in der terminalen Phase zu einem progredienten Substanzverlust des Körpers, der nicht nur die Muskulatur, sondern auch das Fettgewebe mit einschließt. Kachexie ist in der Regel nicht Folge einer Mangelernährung, die nur das Fettgewebe betrifft, sondern es handelt sich um eine komplexe Störung in verschiedenen Organsystemen. Leptin ist ein Proteohormon, das überwiegend von Adipozyten sezerniert wird und mit dem Fettanteil im Körper korreliert. Leptin ist ein zentraler

Mediator im Energiegleichgewicht durch die Wirkung auf Rezeptoren im ZNS und durch seinen Einfluss auf Appetit und Energiehaushalt. Eine wichtige Rolle spielt Leptin bei der Regulation des Stoffwechsels, da es durch Bindung an Rezeptoren im Hypothalamus die Produktion der appetitstimulierenden Neuropeptide NPY und AgRP hemmt und appetithemmende Neurotransmitter aktiviert (Dhillon et al., 2001). Die Plasmaleptinkonzentration steht in Zusammenhang mit dem Energieverbrauch bei Patienten mit Herzinsuffizienz (Toth et al., 1997). Patienten im NYHA-Stadium II zeigten in einer Studie die höchsten Leptinspiegel (14,9-4,2 ng/ml). Die Plasmaleptinkonzentration korreliert invers mit dem klinischen Stadium der Herzinsuffizienz und charakterisiert den anabolen Stoffwechsel im Frühstadium und den katabolen Stoffwechsel im Spätstadium der Herzinsuffizienz (Richartz et al., 2001).

### **2.1.6 Abnahme von Knochengewebe**

Neben einer Abnahme von Muskel- und Fettgewebe kommt es bei CHI auch zur Beeinflussung des Knochenstoffwechsels. Querschnittsstudien haben gezeigt, dass mehr als 50 % der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz einen verminderten Knochenmineralgehalt aufweisen (Christ et al., 1996, Shane et al., 1997). Patienten mit CHI und kardialer Kachexie leiden unter einem Verlust an Knochendichte und einem verminderten Mineralgehalt (Anker et al., 1999c). Die Ursachen hierfür sind multifaktorieller Natur. Die CHI führt bei Patienten zu einer verringerten Mobilität, die mit einer geringeren Lichtexposition verbunden sein kann (Albanese et al., 1999). Geringe Sonnenexposition führt zu einer Verminderung der Vitamin D-Synthese. Vitamin D<sub>3</sub> bewirkt, dass Kalzium im Darm vermehrt aufgenommen und in der Niere vermehrt rückresorbiert wird. Dadurch wird eine konstante Kalziumkonzentration im Blut gehalten (Horn et al., 2009). Auch eine medikamentelle Therapie kann zu einem negativen Knochenstoffwechsel beitragen. So führen Schleifendiuretika, die zur medikamentösen Standardtherapie bei CHI gehören, zu einer vermehrten renalen Kalziumausscheidung (Ooms et al., 1993). Eine Verminderung der Kalziumkonzentration im Blut induziert eine vermehrte Parathormonsekretion. Parathormon führt zu einer Kalzium-Phosphat-Mobilisierung aus dem Knochengewebe, was zu einem Verlust an Knochendichte führt (Rejnmark et al., 2001).

### **2.1.7 Medikamentelle Therapie bei kardialer Kachexie**

Für die Behandlung der kardialen Kachexie gibt es außer der Sicherstellung des ernährungsphysiologisch ermittelten Bedarfes an Nährstoffen und Energie bisher keine spezielle Therapie. Um einen positiven Energiestatus herzustellen, müsste die



Primärursache der Erkrankung behoben werden, was nicht möglich ist. Die medikamentöse Standardtherapie der CHI erfolgt im Allgemeinen in Abhängigkeit vom Schweregrad sowie der Symptomatik. Als häufigste Wirkstoffgruppen werden verwendet: ACE-Hemmer, Betarezeptorenblocker, Herzglykoside, Diuretika und Aldosteronantagonisten. Andere potentielle Therapeutika, deren Einsatz noch intensiverer Forschung bedarf, sind solche, die z.B. TNF- $\alpha$  hemmen (Pentoxifylline) oder Endotoxine binden können (Statine) (Filippatos et al., 2005).

Zukünftig könnte ein weiteres Behandlungsziel bei kardialer Kachexie darin bestehen, das nichtödematöse Gewicht anzuheben, insbesondere durch den Aufbau der Muskelmasse oder den Einsatz von Appetitstimulanzien wie z.B. durch Therapien mit Wachstumshormonen oder Ghrelin. Insbesondere Ghrelin, welches hauptsächlich in der Magenschleimhaut synthetisiert wird, wirkt als physiologisches Appetitstimulanz (Nakazato et al., 2001) und beeinflusst daneben noch die Wachstumshormonfreisetzung ins Blut (Kojima et al., 1999). Dies könnte durch erhöhte Nahrungsaufnahme sowie Zunahme an Muskelmasse zu einer Gewichtszunahme führen, was mit einem positiven Einfluss auf das Krankheitsgeschehen und letztlich einer verbesserten Lebensqualität und Prognose bei CHI verbunden wäre.

## **2.2 Ghrelin**

### **2.2.1 Struktur**

Das Hormon Ghrelin (Altenglisch: „ghre“ = wachsen), welches 1999 aus endokrinen Zellen des Rattenmagens isoliert und entdeckt wurde (Kojima et al., 1999), ist ein aus 28 Aminosäuren bestehendes, lineares Peptidhormon mit einem Molekulargewicht von 3,5 kDa. Posttranslational wird es an seinem N-terminalen Ende am Serinrest in Position 3 octanyliert, was bedeutend für die biologische Wirkung des Ghrelins ist (siehe Abbildung 2.3) (Kojima et al., 1999). Mittlerweile wurde Ghrelin neben dem Menschen auch in anderen Arten, wie z.B. dem Rind, dem Schwein, dem Huhn, aber auch im Frosch und im Fisch, identifiziert (Kojima und Kangawa, 2005).



### 2.2.3 Ghrelinrezeptor

Ghrelin ist ein natürlicher Ligand des „Growth-Hormone-Secretagogue“-Rezeptors (GHS-R) (Nagaya et al., 2001c). Dieser G-Protein-gekoppelte Rezeptor, welcher in zwei unterschiedliche Rezeptorsubtypen 1a und 1b unterteilt wird, besitzt sieben transmembranale Domänen. Benannt wurde dieser nach synthetischen Liganden, den „Growth Hormone Secretagogues“ (GHS), deren Bindung an den GHS-Rezeptor zu einer Erhöhung der Wachstumshormon-Konzentration führt (King et al., 1996). Der GHS-Rezeptor ist weit verbreitet. Er kommt vor allem in verschiedenen hypothalamischen Kernen vor (Guan et al., 1997) und ist in besonders hoher Dichte im medialen Nucleus arcuatus lokalisiert (Willesen et al., 1999). Daneben konnte der Rezeptor aber auch in anderen Geweben und Organen, wie der Hypophyse, dem Magen, dem Herz, der Lunge, den Nieren, dem Darm und dem Fettgewebe nachgewiesen werden, was auf die vielfältige Wirkung des Ghrelins schließen lässt (Gnanapavan et al., 2002). Nach Bindung des Ghrelins an seinen Rezeptor – erfolgt über einen Phospholipase-C-vermittelten Signalweg eine Proteinkinase-C-Aktivierung – mit anschließender Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus intrazellulären Speichern.

### 2.2.4 Wirkungen

Ghrelin hat neben der Freisetzung des Wachstumshormons (GH) und den damit verbundenen biologischen Wirkungen ein breites Spektrum an weiteren endokrinologischen und metabolischen Wirkungen (siehe Tabelle 2.1), welche speziell durch weitere Forschung auf dem Gebiet der Gastroenterologie, der Kardiologie, der Immunologie sowie der allgemeinen Stoffwechselphysiologie geklärt werden müssen.

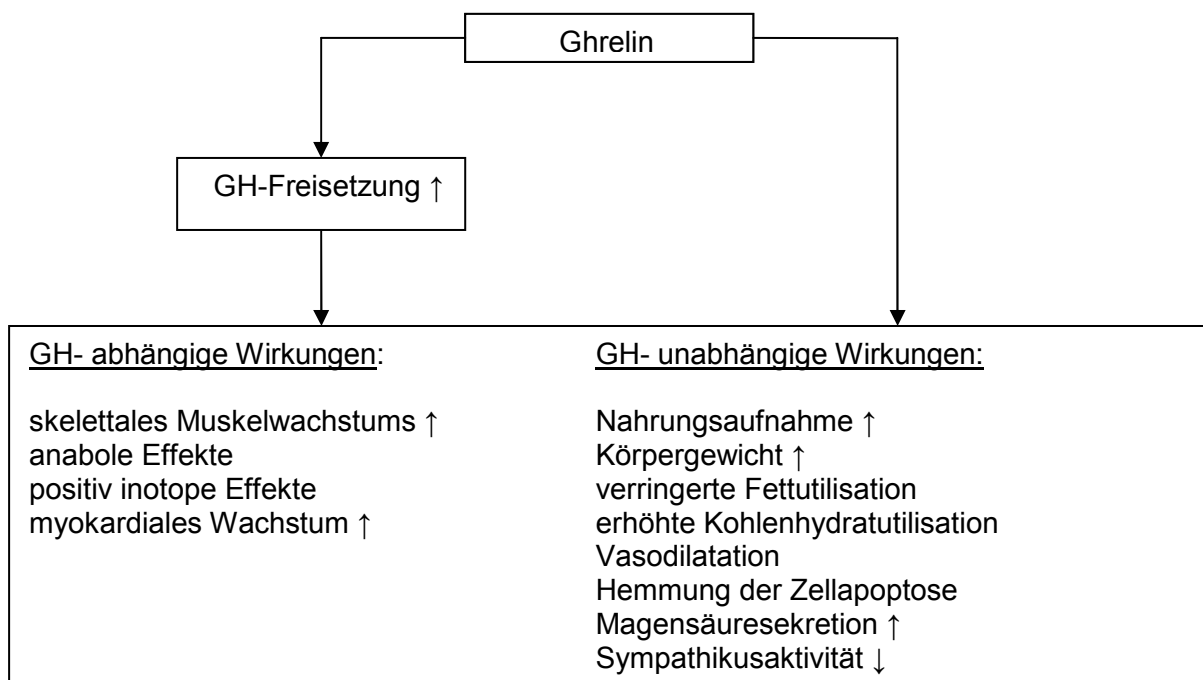
**Tab. 2.1:** Effekte von Ghrelin beim Menschen und Ratten (Sprague-Dawley) an unterschiedlich experimentellen Modellen

<b>Effekte beim Menschen</b>	<b>Referenz</b>
Steigerung der Nahrungsaufnahme	Neary et al., 2004; Wynne et al., 2005; Wren et al., 2001;
Anstieg von GH, ACTH, Kortisol, Prolactin	Messini et al., 2010; Arvat et al., 2001; Hataya et al., 2001; Nagaya et al., 2001b,c

Abfall des mittleren art. Blutdruckes ohne Veränderung der HF; Verbesserung der endothelialen Funktion, Abfall des systemischen Gefäßwiderstandes; Verbesserte Funktion des linken Ventrikels	Nagaya et al., 2001b,c Tesauro et al.; 2010  Verstergaard et al.; 2007
--	---

Effekte an Ratten	Referenz
Erhöhte Magenmotilität Steigerung der Magensäuresekretion	Masuda et al., 2000; Date et al., 2001
Gewichtszunahme	Tschöp et al., 2000

Möglicherweise könnten die unterschiedlichen Wirkungen des Ghrelins durch die verschiedenen Rezeptorsubtypen GHS-R1a und 1b, aber auch durch die unterschiedliche Verteilung der Rezeptorsubtypen in den unterschiedlichen Geweben erklärt werden. Allgemein können die biologischen Wirkungen von Ghrelin in zwei Wirkmechanismen eingeteilt werden (siehe Abbildung 2.4): a.) in von der Wachstumshormon-Freisetzung abhängige Wirkungen und b.) in von der Wachstumshormonfreisetzung unabhängigen Wirkungen.



**Abb. 2.4:** Wachstumshormonabhängige und -unabhängige Wirkungen des Ghrelins  
Abbildung modifiziert nach Nagaya und Kangawa, 2006

### 2.2.4.1 Einfluss auf die Appetitregulation

Der Appetit wird vom Gehirn aus gesteuert und durch komplexe Mechanismen vor allem im Hypothalamus reguliert. Die Nahrungsaufnahme wird dabei durch ein Gleichgewicht von stimulierenden (Ghrelin, Orexin, Neuropeptid Y, Agouti-related Protein) und inhibitorischen Faktoren (Leptin, Serotonin, TRH) im Hypothalamus reguliert. Sowohl die Organe, die Ghrelin synthetisieren, als auch die Lokalisation der GHS-Rezeptoren im Nucleus arcuatus, der eine wichtige Funktion bei der hormonellen Regulation der Nahrungsaufnahme ausübt, deuten auf eine Rolle des Ghrelins bei der Appetitregulation hin (von Haelling et al., 2009). Dass Ghrelin als wichtiges Hormon bei der Regulation der Nahrungsaufnahme fungiert und appetitanregende Wirkungen zeigt, ergeben die Experimente von Tschöp (2000). In verschiedenen Studien mit Ratten wurde gezeigt, dass tägliche peripher verabreichte subkutane Ghrelininjektionen zu einer Gewichtszunahme führen. Die zentrale intrazerebroventrikuläre Verabreichung von Ghrelin in diesen Experimenten führte zu einer dosisabhängigen Steigerung der Nahrungsaufnahme bei Ratten und zu einem signifikanten Anstieg des Körpergewichtes (Tschöp et al., 2000). Die Studien zeigten, dass die Gewichtszunahme bei peripherer Ghrelinverabreichung durch eine verminderte Fettutilisation und einen gesteigerten Kohlenhydratstoffwechsel zustande kommt (Tschöp et al., 2000). Bei Ratten mit genetisch bedingtem Wachstumshormondefizit konnte gezeigt werden, dass die Appetit steigernde Wirkung des Ghrelins unabhängig von der GH-Freisetzung ist (Nakazato et al., 2001). Mittels Markerproteinen wurde nach Ghrelinapplikation eine vermehrte neuronale Aktivität in Hirnregionen wie dem Nucleus paraventricularis, dem Nucleus arcuatus, dem Kern des Tractus solitarius, im piriformen Kortex und dem Gyrus dentatus, die an der Regulierung der Nahrungsaufnahme beteiligt sind, festgestellt. Besonders der Nucleus arcuatus scheint hier eine bedeutende Rolle einzunehmen, da hier die orexigen wirkenden Neuropeptide - Neuropeptid Y (NPY) und das Agouti-related Protein (AgRP) neben den anorektisch wirkenden Neuropeptiden leptinabhängig reguliert werden (Nakazato et al., 2001). Der Nucleus arcuatus wird neben den Neurohormonen NPY und AgRP auch von Leptin beeinflusst (Morton und Schwartz, 2001). NPY und AgRP werden in denselben Neuronen des Nucleus arcuatus produziert, ihre appetitstimulierende Wirkung wird direkt von Leptin gehemmt. Die Identifizierung von appetitregulierenden humoralen Faktoren deutet darauf hin, dass Regulationsmechanismen nicht nur im ZNS, sondern auch in peripheren Geweben existieren. (Neary et al., 2004; Ukkola 2004). So stellt Leptin, welches im Fettgewebe produziert wird, einen Appetithemmer dar, der dem Gehirn Sättigkeitssignale übermittelt, in dem es die appetitstimulierenden Neuropeptide AgRP und NPY hemmt (Friedman, 2002). Außerdem soll es bei niedrigen Energiereserven zu einer synergistisch wirkenden ghrelininduzierten Stimulation und durch

eine reduzierte leptinvermittelte Hemmung der NPY-Bildung in hypothalamischen Kernen zu einer Appetitsteigerung kommen (Bagnasco et al., 2002). Durch eine Vorbehandlung mit Antikörpern gegen NPY und AgRP ließ sich die appetitsteigernde Wirkung von Ghrelin an Ratten blockieren, so dass daraus geschlossen werden kann, dass die orexigene Wirkung von Ghrelin über diese beiden endogenen Neuropeptide vermittelt wird (Lawrence et al., 2002).

Die Messung von Ghrelinkonzentrationen im menschlichen Blutplasma deutet auf eine Abgabe ins Blut hin. Während des Transportes mit dem Blut ist Ghrelin an Lipoproteine hoher Dichte und Proteine wie Albumin gebunden (van der Lely et al., 2004). Auf Grund der Peptidstruktur des Ghrelins könnten jedoch die Übertragungsmöglichkeiten zu zentralen Wirkorten durch die Blut-Hirn-Schranke eingeschränkt sein. Daher scheint peripheres Ghrelin auf indirektem Wege die entsprechenden hypothalamischen Regionen zu aktivieren. Eine Möglichkeit könnte die Signalübertragung mittels afferenter parasympathischer Nervenfasern des Nervus vagus sein. So deutet die Entdeckung von Ghrelin-Rezeptoren auf vagalen afferenten Neuronen des Ganglion nodosum bei der Ratte darauf hin, dass Ghrelin-Signale vom Magen zum Gehirn durch den Nervus vagus übermittelt werden (Shiyya et al., 2002; Sakata et al., 2003; Zhang et al., 2004). In Experimenten nahm nach Vagotomie und anschließender Ghrelin-Injektion die Wachstumshormonfreisetzung dramatisch ab (Shiyya et al., 2002), was dafür spricht, dass der Nervus vagus der Hauptübertragungsweg bei der peripheren Signalübertragung in zentrale Gewebe mit maximalen stimulatorischen Effekt im Hungerzustand und bei der Wachstumshormonfreisetzung ist. Die eingehenden Informationen - ob direkt von Ghrelin oder durch einen von Ghrelin ausgelösten Reiz des Nervus vagus - werden unabhängig vom Weg im Hypothalamus und Hirnstamm analysiert. Eine weitere direkte Wirkung des Ghrelins ist die gesteigerte Säuresekretion im Magen (Shiyya et al., 2002). Daneben wurde erstmals auch von Masuda von einer durch intravenöse Ghrelinapplikation gesteigerten, dosisabhängigen Beeinflussung der gastralen Motilität berichtet, was sich durch eine Steigerung der Kontraktionsfrequenz und der Kontraktionsamplitude äußerte (Masuda et al., 2000). Auch konnte in Studien an Ratten gezeigt werden, dass durch Ghrelin die verlängerte Magenentleerungszeit nach Induktion eines postoperativen Ileus wieder beschleunigt werden kann (Trudel et al., 2002).

#### **2.2.4.2 Einfluss des Ghrelins auf den Energiehaushalt**

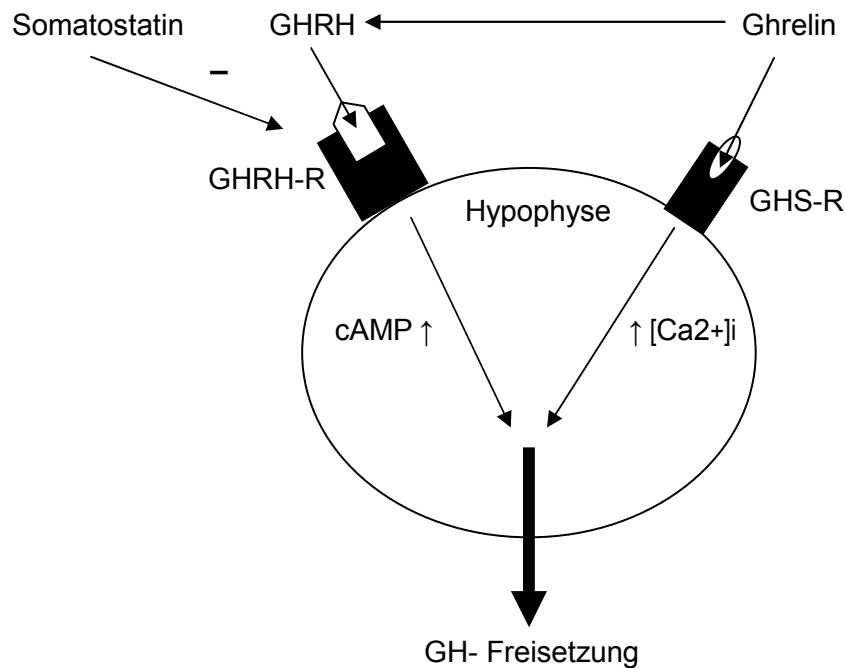
Ghrelin ist ein wichtiger Regulator der GH-Sekretion, der Energiehomöostase und des Stoffwechsels (Horvath et al., 2001). Physiologisch unterliegt die Freisetzung des Hormons einem von der Nahrungsaufnahme abhängigen zirkadianem Rhythmus (Cummings et al., 2001) und ist abhängig vom Ernährungszustand. So wurden beim Menschen

unterschiedliche basale Ghrelinspiegel in unterschiedlichen Ernährungszuständen festgestellt. Während der Fastenzeit ist der Plasmaghrelinspiegel erhöht (Kojima und Kangawa, 2008). Der Plasmaghrelinspiegel schwankt zwischen 700 pg/ml während einer Fastenzeit und 300 pg/ml nach einer Mahlzeit. Der Nüchternghrelinspiegel korreliert negativ mit dem Bodymass-Index (Shiia et al., 2002) und dem prozentualen Körperfettanteil (Tschöp et al., 2001b). Kurz vor der Nahrungsaufnahme kommt es zu einem Anstieg des Serumghrelinspiegels. Dagegen nach der Aufnahme der Nahrung zu einem signifikanten temporären Abfall der Ghrelinkonzentration im Serum, ähnlich wie nach intravenöser Glucoseinfusion (Tschöp et al., 2001a; Cummings et al., 2002; Shiia et al., 2002). In Humanstudien wurde gezeigt, dass nach oraler Glucosegabe die Plasmaghrelinkonzentration abnahm. Außerdem erfolgte ein präprandialer Anstieg, gefolgt von einem postprandialen Abfall des Ghrelins in einem 24-Stunden-Profil der Plasmakonzentration (Shiia et al., 2002). Die appetitanregende Wirkung des Ghrelins nach Injektion, die mit einer Körpergewichtszunahme, speziell mit einer Zunahme des Körperfettanteils einhergeht, kann durch eine gesteigerte Verstoffwechslung von Kohlenhydraten bei gleichzeitig reduzierter Fettverstoffwechslung und allgemein reduziertem Energieverbrauch begründet werden (Tschöp et al., 2000). Die Schaffung eines positiven Energiegleichgewichtes und das Ansteigen der Wachstumshormonkonzentration durch Ghrelin lassen eine besondere Bedeutung des Hormons besonders in der juvenilen Wachstumsphase vermuten.

### **2.2.4.3 Wachstumshormon-Freisetzung**

Eine der wichtigsten Wirkungen des Ghrelins ist sowohl bei Menschen als auch bei Ratten die Stimulierung der Wachstumshormonfreisetzung durch Bindung an den GHS-Rezeptor (siehe Abbildung 2.5). So bewirkt Ghrelin nach intravenöser Verabreichung an den Alphazellen des Hypophysenvorderlappens der Ratte eine wirkungsvolle Ausschüttung des Wachstumshormons, ohne jedoch - anders als beim Menschen - die Freisetzung anderer Hypophysenhormone zu beeinflussen (Kojima et al., 1999). Neben der Stimulierung der Freisetzung durch Ghrelin wird das Wachstumshormon in der Hypophyse vor allem durch zwei hypothalamische Hormone reguliert: dem Wachstumshormon-Freisetzung-Hormon (GHRH) und dem hemmenden Hormon Somatostatin. GHRH, das in einem Teil des Hypothalamus, der Eminentia mediana, gebildet wird, gelangt von dort über die Portalgefäße in die Adenohypophyse, wo es den GHRH-Rezeptor aktiviert und so die Freisetzung des Wachstumshormons stimuliert. Das Somatostatin, ein Peptidhormon, welches unter anderem auch im Hypothalamus gebildet wird, hemmt die Aktivierung der GHRH-Neurone durch seinen Rezeptor und hyperpolarisiert die somatotrophen Membranen, was zur Hemmung der GH-Freisetzung führt (Luque et al., 2006). Verabreichungen von Ghrelin und GHRH

zeigten einen synergistischen Effekt auf die GH-Sekretion. So bewirkte die Applikation von Ghrelin und GHRH eine höhere Freisetzung von GH als bei alleiniger Gabe von GHRH oder Ghrelin (Arvat et al., 2001; Hataya et al., 2001). Synergistische Effekte bezüglich der GH-Freisetzung wurden auch bei synthetischen Ghrelinagonisten sowie bei GHS und GHRH beobachtet (Cheng et al., 1989; Chen et al., 2004).



**Abb. 2.5:** Vereinfachtes Schema der Regulation der Wachstumshormonfreisetzung in der Hypophyse. GHRH bindet an den G-Proteine-gekoppelten GHRH-Rezeptor. Über mehrere Kaskaden kommt es zu einem Anstieg von cAMP und zur GH-Freisetzung. Im Gegensatz dazu, erfolgt die Freisetzung von GH durch Bindung des Ghrelins an seinen Rezeptor über den Anstieg von intrazellulärem Kalzium. Somatostatin, das im Hypothalamus gebildet wird gelangt in die Hypophyse und hemmt dort die die Sekretion von GH. (mod. nach Kojima und Kangawa, 2005)

Tierexperimentelle Studien und Humanstudien zeigen, dass eine intravenöse Ghrelininjektion eine beträchtliche GH-Freisetzung mit größerer Potenz als das Wachstumshormonfreisetzungshormon GHRH induziert (Arvat et al., 2000). Dabei zeigte sich eine stark dosisabhängige Stimulierung der GH-Freisetzung, die schon bei niedrigen Ghrelin-Dosen ausgeprägt ist. So bewirkte die intravenöse Ghrelininjektion bei anästhesierten Ratten ein Ansteigen der basalen GH-Konzentration von 12,0ng/ml auf 129,7ng/ml innerhalb von 5-15 Minuten. Nach einer Stunde wurden wieder basale Ausgangswerte der GH-Konzentration gemessen (Kojima et al., 1999). Neben der intravenösen Ghrelininjektion bewirken auch andere Applikationsformen wie intraperitoneale



(Takaya et al., 2000) und intracerebroventriculäre Injektionen (Date et al., 2000b) eine erhöhte GH-Sekretion.

Das Wachstumshormon ist ein Peptidhormon mit bedeutenden physiologischen Funktionen und Wirkungen. Es unterliegt einem zirkadianem Rhythmus und wird am meisten im Schlaf produziert. Maximale Blutplasmaspiegel treten vor allem im juvenilen Lebensalter auf. Zudem erhöht es den Blutzuckerspiegel und wirkt auf die Fettzellen im Gegensatz zu Ghrelin lipolytisch. Energieverbrauchende Prozesse stellen einen Sekretionsstimulus dar. Das Wachstumshormon und sein Mediator, der „Insulin-like Growth Faktor (IGF)-1“, sind anabol wirkende Hormone die in verschiedene physiologische Prozesse eingreifen. Durch eine vermehrten Aminosäureaufnahme und -verwertung in bestimmten Organen haben sie einen wesentlichen Einfluss auf das Muskelwachstum, die Körperzusammensetzung und die Regulation des Stoffwechsels (Fuller et al., 1992; Amato et al., 1993).

#### **2.2.4.4 Kardiovaskuläre und hämodynamische Effekte**

In Menschen sowie auch in Tieren wurde gezeigt, dass Ghrelin eine Wachstumshormon-unabhängige Wirkung auf die kardiovaskuläre Funktion hat. Die Existenz von GHS-R1a mRNA wurde nicht nur in zentralen, sondern auch in peripheren Geweben, wie dem Herz und der Aorta bewiesen (Gnanapavan et al., 2002). So wurden spezifische Bindungsstellen für Ghrelin in Rattenherzen und menschlichen Arterien identifiziert. Weiterhin zeigte sich, dass radioaktiv markiertes Ghrelin an Herz und periphere Blutgefäße bindet (Katugampola et al., 2001). In Humanstudien wurde ein förderlicher Einfluss des Ghrelins auf das kardiovaskuläre System bei Menschen mit chronischer Herzinsuffizienz aufgezeigt (Nagaya et al., 2004; Nagaya et al., 2001b; Nagaya et al., 2001c). Beispielsweise trat nach einer Ghrelinverabreichung im Rahmen einer adjuvanten Therapie eine Vergrößerung der LV-Dicke, eine Steigerung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) und eine Abnahme des linksventrikulären enddiastolischen Volumens (LVEV) auf; daneben wurde ein signifikantes Abfallen des systemischen Gefäßwiderstandes beobachtet (Nagaya et al., 2001c). Außerdem erhöht Ghrelin den Herz- und den Schlagvolumen-Index (Nagaya et al., 2001b). Eine i.v. Ghrelin-Injektion senkte den mittleren arteriellen Druck, ohne die Herzfrequenz zu ändern (Nagaya et al., 2001c). Tiermodellstudien bei Ratten mit chronischer Herzinsuffizienz zeigten eine Verbesserung der kardialen Kontraktilität, eine Steigerung der diastolischen Wanddicke der nichtinfarzierten posterioren Herzwand, eine Hemmung der Vergrößerung des linken Ventrikels und eine Steigerung des linksventrikulären Fractional Shortening bei wiederholter Verabreichung von Ghrelin (Nagaya et al., 2001a). Vermutlich ist der kardioprotektive Effekt von Ghrelin auf die Wechselwirkung mit der AMPK-Aktivität (5'-AMP aktivierte-Proteinkinase) zurückzuführen. Dies ist eine Serin-Threonin-Kinase, sie

dient als wichtiger Regulator bei verschiedenen energieverbrauchenden Zellvorgängen, bei denen eine erhöhte Energieversorgung erforderlich ist (Garcia und Korbonits, 2006).

#### **2.2.4.5 Beeinflussung des Blutdruckes**

In einer Studie von Nagaya (2001) zeigte sich, dass die intravenöse Ghrelin-Infusion den peripheren arteriellen Widerstand erniedrigte, was beim Menschen zu einem Absinken des Blutdrucks führte. Jedoch waren dazu 8-mal höhere Wirkspiegel erforderlich, als sie in einer Fastenzeit vorliegen. (Nagaya et al., 2001c).

Für die Blutdruckerniedrigung nach Ghrelinverabreichung existieren verschiedene Erklärungsmodelle. Zum einen scheint durch eine Vasodilatation eine direkte Wirkung des Ghrelins auf das Endothel zu bestehen (Okumura et al., 2002). Ebenso scheint eine direkte Wirkung des Ghrelins auf die glatte Gefäßmuskulatur möglich (Wiley und Davenport, 2002). Die wahrscheinlichste Erklärung ist jedoch die zentrale sympatholytische Wirkung des Ghrelins auf  $\alpha_2$ -adrenerge Rezeptoren (Adams et al., 1999). Bei Ratten scheint diese sympatholytische Wirkung von Ghrelin durch die Stimulation von Ghrelin-Rezeptoren in Nervenzellen des im Hirnstamm lokalisierten Nucleus tractus solitarius vermittelt zu werden. Eine Injektion von 20 pMol Ghrelin in dieses Gebiet reichte aus, um eine Blutdrucksenkung von 17 mm Hg im Durchschnitt zu erreichen (Adams et al., 1999). Dies wird auch durch Studien belegt, in denen eine intrazerebroventrikuläre Ghrelin-Injektion bei Kaninchen den mittleren arteriellen Druck und die renale Sympathikus-Aktivität senkte (Matsumura et al., 2002).

### **2.3 Zielsetzung dieser Studie**

Da die kardiale Kachexie bei CHI ein hoher Risikofaktor bezüglich der Mortalität bei dieser Erkrankung ist, sollte der Fokus nicht nur auf die Behandlung der kardialen Dysfunktion, sondern auch auf die Behandlung der kardialen Kachexie als therapeutisches Ziel gerichtet werden. Die Verabreichung von Ghrelin könnte, sei es durch Wachstumshormon-abhängige oder -unabhängige Mechanismen, eine positive Energiebalance bei CHI bewirken und so als antikachektisches Therapeutikum eingesetzt werden.

Bisherige Studien, die die Wirkung von Ghrelin bei Ratten untersuchten, belegen eine deutliche Gewichtszunahme (Tschöp et al., 2000) und gesteigerten Appetit (Nagaya et al., 2001a; Nagaya et al., 2004). In einigen Studien lässt die Verabreichung von Ghrelin bei Patienten mit CHI eine verbesserte kardiale Funktionen vermuten (Nagaya et al., 2001c). Zudem verfügt Ghrelin bei Menschen, durch Hemmung der proinflammatorischen

Interleukine, wie IL1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  auch über antiinflammatorische Eigenschaften (Dixit et al., 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Unterschiede in der Wirkung bei zwei verschiedenen Applikationsarten (mittels 3-mal täglicher Injektion oder mittels kontinuierlicher Infusion durch eine osmotische Pumpe) des Ghrelin-Analogons 28131 vor allem in Bezug auf das Körpergewicht und die Körperzusammensetzung zu untersuchen. Daneben sollten auch mögliche Einflüsse des Ghrelins auf Veränderungen der Organgewichte und die Herzfunktion am Rattenmodell mit CHI untersucht werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere und Haltung

Die Versuchsdurchführung erfolgte im Center for Cardiovascular Research (CCR), Charité, Berlin Mitte. Versuchstiere waren ca. sieben Wochen alte männliche Sprague-Dawley-Ratten (Harlan Winkelmann GmbH, 33178 Bochum, Deutschland). Die Käfigunterbringung erfolgte in einem klimatisierten Tierstall unter SPF-Bedingungen (spezifisch pathogenfrei) mit konstanter Lufttemperatur von 22 °C im 12-Stunden-Tag (7 Uhr)-Nacht (19 Uhr)-Rhythmus. Die Ratten wurden in 3-er Gruppen, einer Behandlungsgruppe zugehörig, aufgeteilt und in standardisierten Käfigen (Käfigtyp IV) gehalten. Das Futter bestand aus Versuchstierkost (siehe Tabelle 3.1) für Ratten (ssniff R/M-H, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Trinkwasser oder Trinkwasser mit 86 g/l Furosemid (Furosemid-ratiopharm® 250 mg Ampullen, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), welches zur freien Verfügung stand (siehe Einteilung der Behandlungsgruppen).

Die Tiere wurden 2-mal wöchentlich in gereinigte Käfige umgesetzt und gewogen. Durch den täglichen Umgang mit den Tieren zeigten die Ratten in kurzer Zeit stressfreies Verhalten und konnten schnell an alle nötigen Versuchsabläufe gewöhnt werden. Alle Eingriffe während des Versuches wurden zwischen 7.00 Uhr und 17.00 Uhr durchgeführt.

Sämtliche Experimente wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin genehmigt (Versuchsnummer: G 0115/05) und entsprechend den Tierschutzrichtlinien durchgeführt.

**Tab. 3.1:** Inhaltstoffe des Spezialfuttermittels für Versuchsratten<sup>1</sup> (V 1534-300, ssniff R/M-H, 10 mm, autoklavierbar, Soest)

Inhaltstoffe	Gehalt in %
Rohprotein	19
Rohfett	3,3
Rohfaser	4,9
Rohasche	6,7
Zusatzstoffe:	
Vitamin A	25.000 IE/kg
Vitamin D3	1000 IE/kg
Vitamin E	120 mg/kg
Cu	12 mg/kg

### 3.2 Studiendurchführung

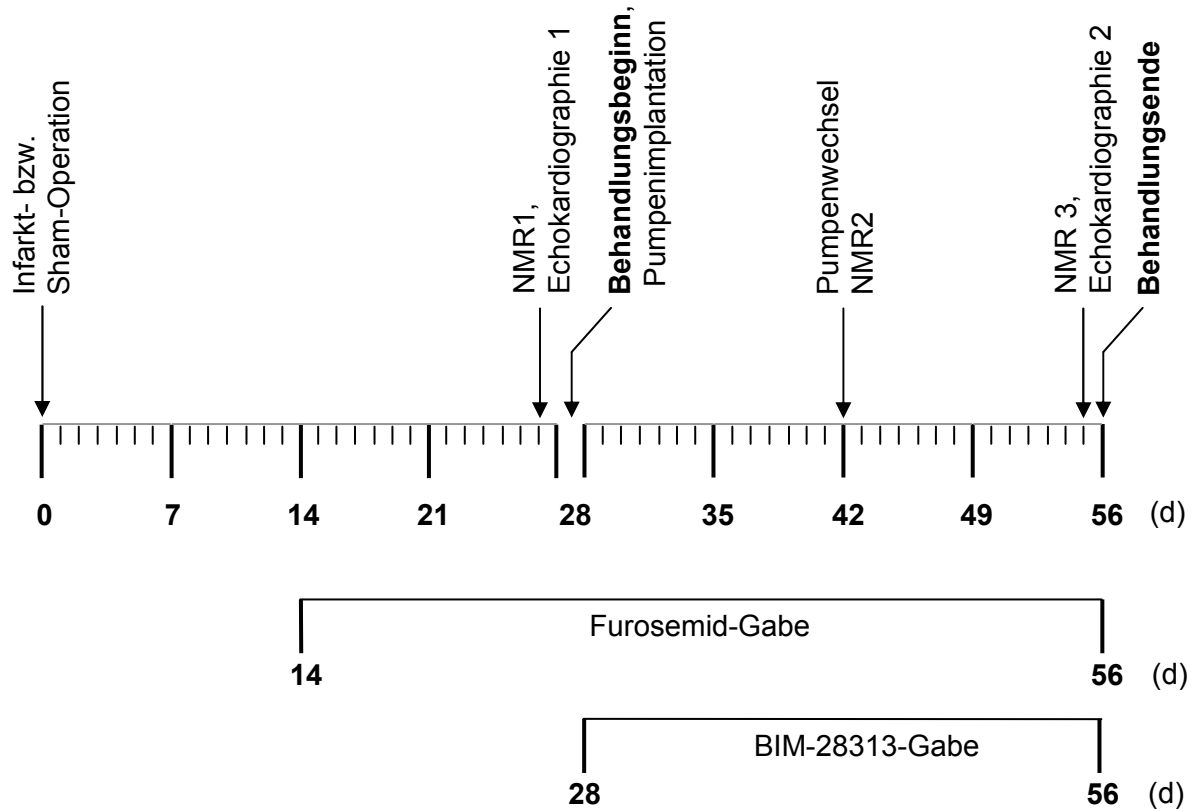
Eine schematische Darstellung der Studiendurchführung ist in der Abbildung 3.1 wiedergegeben. In dem Projekt wurde vom 27.06.2005-01.09.2005 bei 186 Sprague-Dawley-Ratten ein myokardialer Infarkt induziert. Das Gewicht der Tiere betrug am Tag der Operation im Mittel  $227 \pm 0,6g$  (Standardfehler des Mittelwertes). Die Infarktoperation an Tag 0 wurde während einer Injektionsnarkose nach einer erstmals von Selye et al. (1960) beschriebenen Methode standardisiert durchgeführt. Ab Tag 14 postoperativ wurden die Tiere mit einem Diuretikum im Trinkwasser behandelt. Eine Messung der Körperzusammensetzung mittels NMR (nuclear magnetic resonance)-Scans (Echo MRI™700, Whole Body Composition Analyzer, Echo Medical Systems, Houston Texas, USA) erfolgte an Tag 27, 42 und 55 (siehe Abschnitt 3.2.4.2). An Tag 27 wurde eine Echokardiographie durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.4.3), um die basale Herzfunktion vor Beginn der Therapie zu erfassen und um eine Infarktgröße von mindestens 25% zu gewährleisten. Tiere mit kleinerer Infarktgröße als 25% wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Randomisierung und Einteilung der Tiere erfolgte in Behandlungsgruppen. Die Anzahl der Tiere pro Behandlungsgruppe betrug 21 Tiere bei den Infarktgruppen und 15 Tiere bei den Sham-operierten Tieren. Ab Tag 28 wurden die unterschiedlichen Behandlungsgruppen mit dem Ghrelin-Analagon BIM-28131 behandelt. Neben der 3-mal täglichen Injektion um 8, 12 und 16 Uhr in zwei unterschiedlichen Dosierungen von 50 und 100nmol/kg/d wurden zusätzlich osmotische Pumpen (Alzet® Mini-Osmotic Pump Model 2002, DURECT Corporation, Cupertino, CA) mit den Dosierungen von 50 und 100nmol/kg/d verwendet, die subkutan implantiert wurden (siehe Abschnitt 3.2.3). Die Placebo-behandelten Tiere wurden per 3-mal-täglicher Injektion oder osmotischer Pumpe in gleicher Dosierung behandelt, um den alleinigen Einfluss der Applikation untersuchen zu können. Die Dauer der Behandlung betrug 28 Tage. An Tag 42 mussten die Pumpen auf Grund der Stabilität von BIM-28131 ersetzt werden. Zum Abschluss der Behandlung an Tag 56 des Versuchsprotokolls wurde eine invasive Hämodynamik unter Inhalationsnarkose (Isofluran) durchgeführt. Nach Beendigung verblieben die Tiere in Narkose und wurden zur Organentnahme getötet.

#### Versuchsprotokoll:

Tag 0:	Infarkt- bzw. Sham-Operation
Tag 14:	Randomisierung; Beginn der Gabe des Diuretikums
Tag 27:	NMR 1; Echokardiographie 1
Tag 28:	Beginn der Behandlung, Implantation der osmotischen Pumpen
Tag 42:	Auswechslung der osmotischen Pumpen; NMR 2

Tag 55: NMR 3; Echokardiographie 2

Tag 56: Behandlungsende, invasive Hämodynamik, Tiertötung und Organentnahme



**Abb. 3.1:** Schematische Darstellung der Studiendurchführung (Erläuterungen siehe Text Seite 23)

### 3.2.1 Infarktoperation

Die Operation wurde analog einer standardisierten Operationsmethode, die erstmals von Selye, H. et al., 1960 beschrieben wurde, durchgeführt. Dazu wurde eine intraperitoneale Injektionsanästhesie mit 90mg/kg Ketamin (CuraMED Pharma GmbH) und 0,5mg/kg Medetomidinhydrochlorid (Domitor®, Pfizer GmbH, Karlsruhe) durchgeführt. Anschließend wurden die Tiere mit einer Braunüle intubiert und maschinell mit einem Durchfluss von 0,2l/min beatmet (Animal Respirator „Advanced“, TSE, Bad Homburg). Nach Rasur des Operationsfeldes wurde der Brustkorb median eröffnet und das Herz frei präpariert. Nach Lokalisierung wurde die linke Koronararterie 1-2mm nach dem Abgang aus der Aorta ascendens mittels eines nichtresorbierbaren Fadens Ethibond-Excel Nahtmaterial 7/0 und BV-1 Nadel (Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) ligiert. Zur Kontrolle der richtigen Lage der Gefäßligatur konnte man kurze Zeit später typische pathophysiologische Anzeichen

wie plötzliche Blässe des entsprechenden Myokardbereiches und der Schleimhäute beobachten. Nach dem Setzen der Ligatur wurde der Thorax mit einem Vicrylnahtmaterial 2/0 und V6 Nadel (Ethicon) mit Einzelheften verschlossen. Die Hautnaht wurde mit Prolenefaden 3/0 und PS-2-Nadel (Ethicon) durchgeführt. Der Tubus wurde nach erfolgreicher Operation und ersten Anzeichen des Nachlassens der Narkose entfernt. Bei den scheinoperierten Tieren (Shamgruppen) erfolgte nur eine Thorakotomie. Zur Verhinderung von Wundinfektionen erfolgte nach der Operation eine Wunddesinfektion mit Jodtinktur. Anschließend verblieben die Tiere noch 1-2 Stunden unter Aufsicht. Postoperativ wurde die Narkose mit 1mg/kg Atipamezol (Antisedan, Pfizer GmbH, Karlsruhe) intramuskulär aufgehoben. Zur Linderung des Operationsschmerzes wurde während der Operation 0,05mg/kg Buprenorphin (Buprenovet, Bayer GmbH Leverkusen) in den Musculus quadriceps injiziert und diese Injektion über einen Zeitraum von 2-3 Tagen 2-mal täglich wiederholt. Zur Verhinderung einer operativen Dehydratation wurden 5ml NaCl-Lösung mittels subkutaner Injektion verabreicht und gegebenenfalls wiederholt. Mehrere Tage standen die Tiere post-operativ unter besonderer Beobachtung.

### 3.2.2 Randomisierung, Verblindung und Einteilung der Behandlungsgruppen

Alle Tiere wurden an Tag 27 postoperativ blockrandomisiert und in nachfolgende entsprechende Behandlungsgruppen eingeteilt. Die Studiendurchführung erfolgte als Doppelblindstudie.

#### Sham-OP (n = 60, bei Therapiestart [4 Wochen postoperativ])

Gruppe 1:	15	Diuretikum + BIM-28131; 100 nmol/kg/d; Injektion 3-mal täglich
Gruppe 2:	15	Diuretikum + BIM-28131; 100 nmol/kg/d; Pumpe
Gruppe 3:	15	Diuretikum + Placebo, Injektion 3-mal täglich
Gruppe 4:	15	Diuretikum + Placebo, Pumpe

#### Infarkt-OP (n = 126, bei Therapiestart [4 Wochen postoperativ]):

Gruppe 5:	21	Diuretikum + Placebo, Injektion 3-mal täglich
Gruppe 6:	21	Diuretikum + Placebo, Pumpe
Gruppe 7:	21	Diuretikum + BIM-28131; 50 nmol/kg/d; Injektion 3-mal täglich
Gruppe 8:	21	Diuretikum + BIM-28131; 50 nmol/kg/d; Pumpe
Gruppe 9:	21	Diuretikum + BIM-28131; 100 nmol/kg/d; Injektion 3-mal täglich
Gruppe 10:	21	Diuretikum + BIM-28131; 100 nmol/kg/d; Pumpe

### 3.2.3 Medikamentenapplikation

Je nach zugeordneter Gruppe bekamen die Infarkt- und Shamtiere Ghrelin oder ein Placebo verabreicht. Die Applikation des Ghrelin Analogons BIM-28131 (IPSEN Biomeasure, Milford, USA) und des Placebos erfolgte mittels osmotischer Pumpe oder 3-mal täglich (8.00 Uhr; 12.00 Uhr; 16.00 Uhr) mittels subkutaner Injektion in zwei unterschiedlichen Dosierungen: 50 und 100nmol/kg/d. Als Placebo wurde physiologische Kochsalzlösung mit 0,5% BSA (Bovines Serumalbumin, Fraktion V der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) verwendet. Die Dosis der subkutanen Injektion wurde bezüglich der Körpergewichtsmessung des letzten Tages zwei Mal wöchentlich neu errechnet. Die Substanzflaschen wurden farblich markiert und wegen kurzer Haltbarkeit im Kühlschrank aufbewahrt. Die Injektion der Tiere erfolgte im Nackenbereich mit einer 1ml Spritze (BD Plastikpak™, Heidelberg, Deutschland) und 25mm Kanüle (BD Microlance™3).



**Abb. 3.2:** Osmotische Minipumpe der Firma Alzet® ([www.alzet.com](http://www.alzet.com)) im Größenvergleich mit einem Lineal (Foto: Grit Ehlert). Die Außenwand der Pumpe ist semipermeabel, so dass infolge der osmotischen Druckdifferenz Gewebsflüssigkeit eindiffundiert. Der Flüssigkeitsstrom deformiert eine elastische Blase, die mit der zu applizierenden Flüssigkeit gefüllt ist. Der Flüssigkeitsausstrom kann durch eine außen aufgebrachte Steuermembran oder ein Regulierungselement an der Austrittsöffnung variiert werden, so dass eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung erfolgt (Nürnberg et al., 1991).

Die osmotisch wirkende Pumpe (siehe Abbildung 3.2) wurde unter Inhalationsanästhesie mit einem Inhalations-Anästhesiegerät (Visual Sonics Inc., Toronto, Kanada) und Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland) auf dem Rücken, seitlich unterhalb der Skapula des Tieres implantiert. Dazu wurde das Tier in Bauchlage positioniert und der entsprechende Bereich rasiert. Nach Setzen eines ca. 1cm langen Hautschnittes wurde eine Hauttasche von 2-3cm Länge und 1,5cm Breite angelegt, in die die Pumpe mit der Spitze in kraniale Richtung vorgeschoben und eingelegt wurde. Der Hautschnitt wurde mit nichtresorbierbarem Nahtmaterial, Prolene 3/0 mit 3 Einzelnähten verschlossen.



Das Auswechseln der osmotischen Pumpe an Tag 42 erfolgte in gleicher Weise und wurde ebenfalls unter Isofluran-Narkose durchgeführt. Alle Tiere erhielten 14 Tage postoperativ während des gesamten Versuchsverlauf Furosemid über das Trinkwasser. Auf Grund der geringen Lichtstabilität der Furosemidlösung wurde die Trinklösung in braune Trinkflaschen (700ml, U-Temp. [Pei], mit Silikon-Dichtring, Tecniplast, Hohenpeißenberg, Deutschland) gefüllt und den Versuchstieren zur freien Verfügung gestellt. Durch Vorversuche wurde eine Trinkmenge von 35ml/d bei Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 340-420g ermittelt und so eine Konzentration von 86mg Furosemid /l Trinkwasser eingestellt. Entsprechend des Gewichtes von 300g Körpergewicht pro Tier entsprach die Dosierung 10mg/kg/d.

### **3.2.4 Messungen**

#### **3.2.4.1 Messungen der Körpergewichte**

Während des Verlaufes der Studie wurden die Tiere 2-mal wöchentlich, entweder montags und donnerstags oder dienstags und freitags, gewogen. Dies wurde mit einer Laborwaage (Model CS2000, Ohaus Corporation, Pine Brook, NJ, USA) mit max. Wägebereich bis 2000g und einer Präzision von 1g durchgeführt.

#### **3.2.4.2 Bestimmungen der Körperzusammensetzung mittels NMR**

Die Analyse der Körperzusammensetzung mittels NMR (nähere Erläuterungen siehe Abbildung 3.3), mit der das Gesamtkörperwasser, das nicht gebundene (freie) Wasser, die Muskelmasse und der Fettanteil bestimmt werden, wurde an den Tagen 27, 42 und 55 durchgeführt. Dazu wurden die Tiere im wachen Zustand einzeln in das dafür bestimmte Behältnis gesetzt und in das NMR-Gerät geschoben. Die Messung dauerte 73 Sekunden. Anschließend wurden die Tiere wieder in ihre vorgesehenen Käfige gesetzt.



**Abb. 3.3:** Echo MRI Whole Body Composition Analyzer, Echo Medical Systems, Houston, Texas  
Das NMR-Verfahren basiert auf der Kernspinresonanz und liefert genaue Messergebnisse zum Körperfettanteil, der Muskelmasse, dem freien Wasser und dem Gesamtkörperwasser am lebenden Versuchstier. Die Messungen erfolgten ohne Anästhesie oder Sedation. Foto: Grit Ehlert

### 3.2.4.3 Echokardiographie

Eine echokardiographische Untersuchung der Herzfunktion der Ratten erfolgte in Inhalationsnarkose an Tag 27 und 55. Dazu wurden die Tiere einzeln in eine dafür vorgesehene Kammer des Inhalationsanästhesiegerätes gelegt und mit Isofluran (Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) präanarkotisiert (Isofluran-Anteil 3-4%). Die Aufrechterhaltung der Inhalationsnarkose erfolgte mittels Atemmaske und Isofluran (Anteil 2-2,5%). Für die anschließende Untersuchung wurde die Ratte im entsprechenden Thoraxbereich rasiert, mit Enthaarungscreme enthaart und in Rückenlage fixiert. Die Echokardiographie wurde mit einem Vevo 770 Imaging Systems Gerät (Visual Sonics Inc., Toronto, Kanada), welches für die Anwendung an Ratten und Mäuse bestimmt ist, durchgeführt. Für die Echokardiographie an den Tieren wurde ein 35 MHz Schallkopf benutzt. Der linke Ventrikel (LV) wurde in der parasternalen langen und kurzen Achse eingestellt. Im M-Mode der kurzen Achse wurden die enddiastolische Wanddicke und LV-Diameter gemessen und daraus die linksventrikuläre Funktion anhand des Fractional shortening (FS) und der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF berechnet aus  $SV/EDV$ ), bestimmt. Das Schlagvolumen (SV) wurde aus der Differenz von enddiastolischem Volumen (EDV) und endsystolischem Volumen (ESV) berechnet. Das Herzminutenvolumen (HMV) ist ein Maß für die Pumpleistung des Herzens und wurde aus dem Schlagvolumen und der Herzfrequenz

berechnet ( $HMV = \text{Herzfrequenz} \times \text{Schlagvolumen}$ ). Die diastolische Funktion wurde mittels Pulsed Wave-Dopplerverfahren evaluiert. Das Messvolumen des Dopplers wurde an der Spitze der geöffneten Mitralklappensegel platziert. Alle Messungen wurden verblindet durchgeführt.

#### **3.2.4.4 Invasive hämodynamische Untersuchungen**

Mittels Isoflurannarkose erfolgte unter Verwendung von Polyethylen-Kathetern (Millar Instruments, Houston, Texas, USA) die Kanülierung von V. jugularis und A. carotis. Mittels Thermodilution erfolgte die Messung des arteriellen und venösen Blutdrucks und des intrakardialen Druckes.

#### **3.2.5 Organentnahme und Präparation**

An Tag 56 wurden die Tiere nach Abschluss der invasiven Hämodynamik in Narkose belassen und zur Organentnahme per cervikaler Dyslokation getötet. Lunge, Milz, Leber, Musculus soleus, Musculus extensor digitorum longus, Musculus gastrocnemius und das Gehirn wurden vollständig oder in Teilen entnommen. Vollständig entnommene Organe wurden mit einer Analysenwaage (APX-60, Denver Instrument GmbH, Göttingen, Deutschland) mit einem Wägebereich von 0-60g und einer Präzision von 0,1mg gewogen. Das Herz wurde vollständig entnommen und gewogen. Um das Infarktgebiet zu bestimmen, wurde der linke Ventrikel aufgeschnitten, aufgeklappt, flach ausgebreitet und das gut sichtbare, hellere Infarktgebiet im Verhältnis zum gesamten linken Ventrikel abgezeichnet. Danach wurden der rechte und linke Ventrikel, beide Atrien und das Septum einzeln gewogen. Zur Fixierung der Struktur des Gewebes wurde ein Teil der Muskeln, die Niere und Lunge in Zambonilösung (15% Pikrinsäure, 2% Formaldehyd, 0,1N Natriumhydrogenphosphatpufferlösung, pH 7,4) (Stefanini et al., 1967) fixiert und bei 4°C gelagert.

#### **3.2.6 Verarbeitung der histologischen Proben**

Nach 2-tägiger Einlagerung der histologischen Proben in Zambonilösung wurden diese mit einer 0,1N Natriumhydrogenphosphatpufferlösung, pH 7,4; gespült, bis keine Gelbfärbung der vorherigen Lösung mehr erkennbar war. Nach erfolgter Fixierung wurden die Proben je nach Organ zerteilt, in Einbettungskassetten (Mega-Cassette®Tissue-Tek®, Sakura Finek Europe B.V., Niederlande) gelegt und in 70 Vol.% Ethanol belassen. Nachdem alle Proben eine Woche zur weiteren Entwässerung im Ethanolbad belassen worden waren, erfolgte die Einbettung in Paraffin (Paraffin 6 und 9, Walldorf; Deutschland). Erforderlich war dies, um

den Proben die erforderliche nötige Festigkeit zu verleihen. Nach dem Erstarren der Probe erhielt das Gewebe somit eine für das Schneiden am Mikrotom nötige Beschaffenheit. Die Einbettung der Kassetten wurde mit einem Einbettautomaten (Thermo Shandom Citadel™1000 Wax Bath, Cheshire, UK) innerhalb von 8 Stunden durchgeführt. Dabei wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 Vol.% Ethanol, 80 Vol.% Ethanol, 90 Vol.% Ethanol und absolutem Alkohol und anschließendem 2-maligen Xylolbad durchtränkt und in 2 aufeinander folgende Paraffinbäder übertragen. Nach Einschmelzen der Proben wurden diese in einen Paraffinrahmen übertragen und mit Paraffin in einer Paraffinausgießstation (EC 350-2, Microm GmbH, Walldorf, Deutschland) ausgegossen. Nach erfolgter Härtung und Zurechtschneiden des Blockes wurden die Proben mit einem Mikrotom (Microtom Cool-Cut HM 325, Walldorf, Deutschland) geschnitten. Die ca. 3µm dicken Schnitte wurden anschließend im Wasserbad auf einen Objektträger übertragen und im Wärmeschrank bei 60°C 6 Stunden getrocknet.

### **3.2.6.1 Differenzialfärbungen**

Nach Entparaffinierung der Objektträger in einem 10-minütigen Xylol- und anschließendem absoluten Alkoholbad erfolgte die Rehydratation der Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (100% Ethanol; 90% Ethanol; 80% Ethanol; 70% Ethanol). Um eine histologische Charakterisierung zur ermöglichen wurden die Differenzialfärbungen EVD, Azan und Alcian-PAS (Romeis, 1989) durchgeführt. Nach abgeschlossener Färbung wurden die Objektträger in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydratisiert und in Xylol gelegt. Anschließend wurden die Schnitte tropfenweise mit einem Schnelleinschlußmittel (Entellan®Neu, Merck, Darmstadt, Deutschland) und einem Objektglas eingedeckt. Alle verwendeten Färbelösungen und gebräuchlichen Laborchemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt, Deutschland) und der Firma Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Alle verwendeten Chemikalien waren von analytischer Qualität.

### **Färbeanleitung der durchgeführten EVD-Färbung**

- 10 min Resorcin-Fuchsinlösung nach Weigert bei 60°C
- Spülen in Aqua dest.
- 5 min Hämatoxylin nach Weigert / Lösung A+B
- Bläuen in warmem Leitungswasser
- Spülen in Aqua dest.
- 10 min Domagk-Lösung
- Spülen in Aqua dest.

Ergebnis: Zellkerne: braun-schwarz, Bindegewebe: rot, Muskulatur: gelb, Erythrocyten: gelb

### **Färbeanleitung der durchgeführten AZAN-Färbung**

- 15 min Azokarminlösung nach Heidenhain bei 60°C
- Spülen in Aqua dest.
- Spülen in Anilin-Alkohol nach Heidenhain
- Spülen in Aqua dest.
- Spülen in Eisessig-Alkohol nach Heidenhain
- Spülen in Aqua dest.
- 15 min Beizen in Phosphorwolframsäure nach Heidenhain
- Spülen in Aqua dest.
- 10 min AZAN-Lsg.

Ergebnis: Bindegewebe: blau, Zellkerne: rot, Muskelgewebe: rötlich, Erythrocyten: rot

### **Färbeanleitung der durchgeführten Alcian-PAS-Färbung**

- 10 sec 1%-Essigsäure
- 20 min Alcianblau 8GS
- Spülen in Aqua dest.
- 10 min 1% Perjodsäure
- Spülen in 70% Alkohol
- 10 min in Schiff's Reagenz
- Spülen in warmem Leitungswasser

Ergebnis: Schleim: rot, Zellkerne: rot, saure Mucopolysaccharide: blau

### **3.2.7 Messung der Querschnittsfläche der Muskelfaserzellen**

Für die Messungen wurden der M. gastrocnemius und der M. extensor digitalis longus ausgewählt und anhand eines Mikroskops (Axiovet 200 Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland) und einer im Mikroskop integrierten Auswertesoftware (Robo P.A.L.M. Microlaser Technologies AG, Bernried, Deutschland) durchgeführt.

Während des Mikroskopierens wurde ein bestimmter Zellbereich ausgewählt, an dem die Zellkerne am besten sichtbar wurden und sich der Zellquerschnitt kreisförmig dargestellt. Es wurde angenommen, dass dieser Bereich die Mitte der Muskelfaserzelle darstellt. Die Fläche wurde markiert und in  $\mu\text{m}^2$  berechnet. Aus jeder Behandlungsgruppe wurden unwillkürlich zehn Tiere gewählt und von jedem Schnitt je 30 entsprechende Muskelfaserzellen vermessen. Aus den Querschnittsdaten wurde der Durchmesser der Muskelfasern errechnet.

### **3.3 Statistische Auswertung und Darstellung der Ergebnisse**

Sämtliche im Versuchsverlauf erhobenen Daten wurden schriftlich protokolliert und anschließend in Excel-Tabellen (Microsoft®Excel2002) übertragen. Die Daten der Körperzusammensetzung, der Echokardiographie und der Messung des Querschnittes der Muskelzellen wurden direkt vom Rechner in die Excel-Tabellen exportiert. Die statistische Auswertung, alle Berechnungen und Grafiken wurden mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 11.5 für Windows erstellt. Für den Vergleich der entsprechenden Gruppen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% festgelegt ( $p=0,05$ ). Bei den Merkmalen, für die eine Symmetrie angenommen wurde, wurde die einfaktorielle ANOVA (= one way analysis of variance) und beim Auftreten von Unterschieden der Dunnet-T3-Test durchgeführt. Für die Merkmale, für die keine Symmetrie angenommen werden konnte, wurde, um die Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen zu erkennen, der H-Test von Kruskal-Wallis angewandt. Beim Auftreten von Unterschieden, wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

Die Daten wurden in Boxplots, Streudiagrammen oder Balkendiagrammen dargestellt. In Boxplots repräsentiert die Box die Daten vom 25.-75. Perzentil. Die Daten außerhalb der Box, werden durch die Whiskers dargestellt. Das Streuungsmaß bei Mittelwertsangaben ist der Standard Error of Mean (SEM).

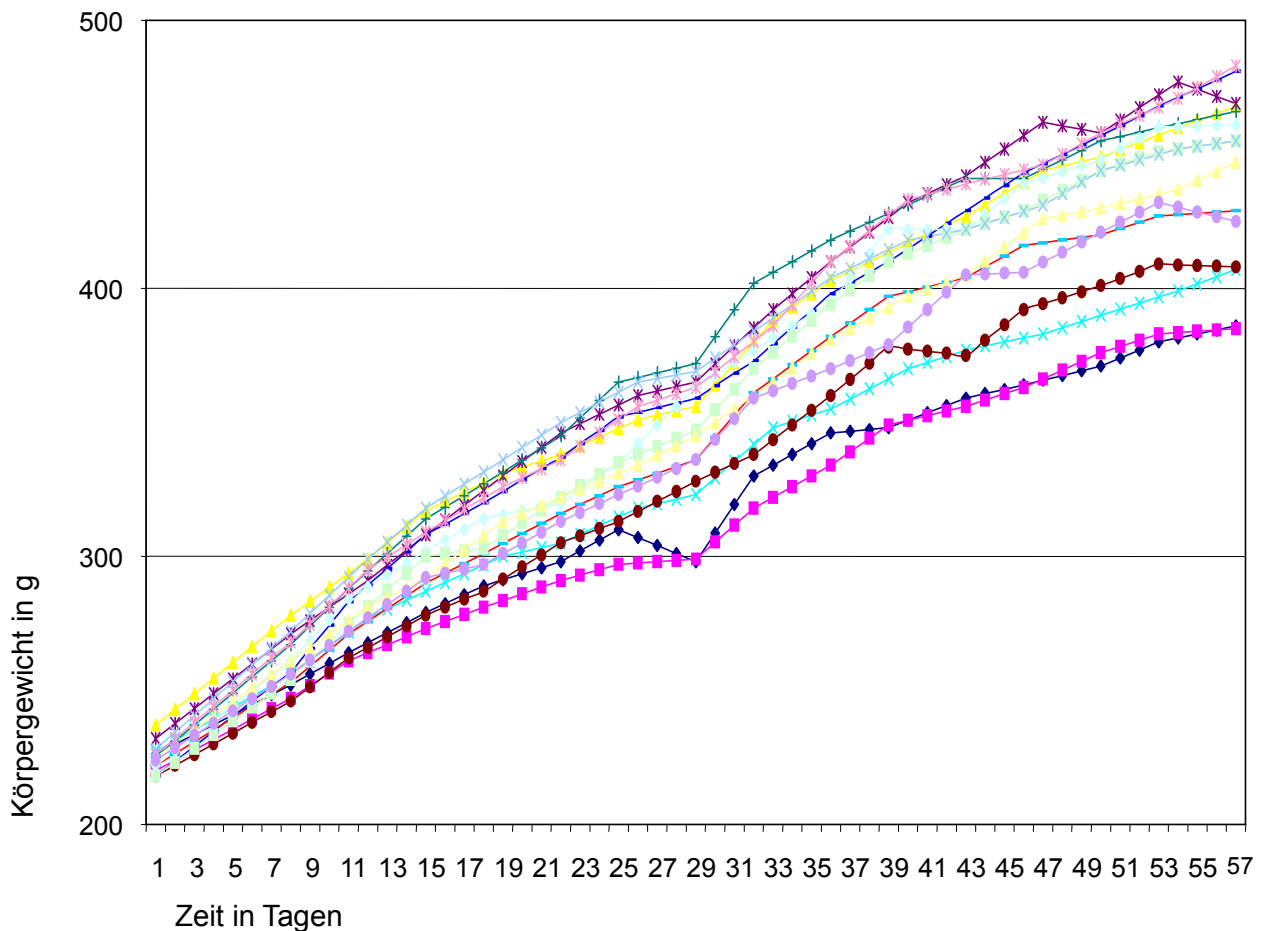
#### **3.3.1 Charakteristika der Studienpopulation**

Die Einteilung der 186 Tiere in Behandlungsgruppen erfolgte zufällig mittels Blockrandomisierung. Als Einschlusskriterium für den Behandlungsbeginn wurde die Infarktgröße mit mindestens 25% verwendet, die durch die erste Echokardiographie an Tag 27 bestimmt wurde. Bei kleinerer Infarktgröße wurden die Tiere von der Studie ausgeschlossen. Bei Zutreffen des Einschlusskriteriums wurde die Behandlung per Injektion bzw. Operation der osmotischen Pumpen eingeleitet.

## 4. Ergebnisse

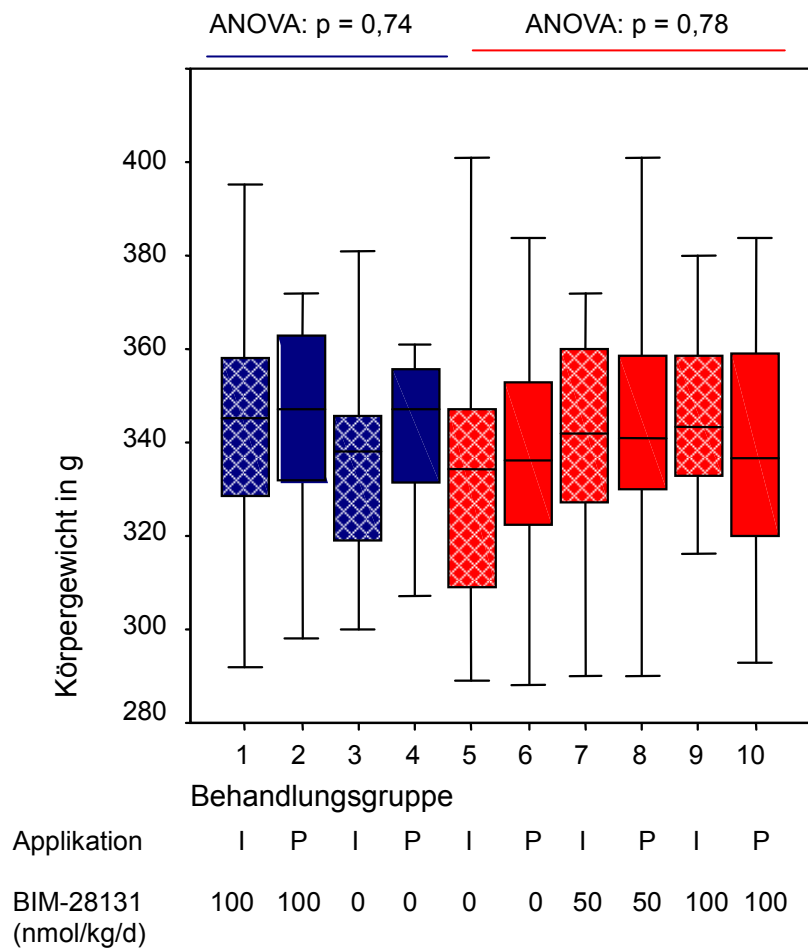
### 4.1 Entwicklung des Körpergewichtes

Um einen allgemeinen Überblick über die Entwicklung der Körpergewichte zu erhalten, wurden Liniendiagramme von jeder Behandlungsgruppe (siehe Abb. 4.1) erstellt. Dabei wurde deutlich, dass das Körpergewicht im Versuchsverlauf stetig anstieg.



**Abb. 4.1:** Beispiel der Entwicklung des Körpergewichtes der einzelnen Tiere im Verlauf der Studie an der Behandlungsgruppe 2 (Pumpe: Ghrelin-Analagon BIM-28131; 100nmol/kg/d). Auf der Ordinate wurden die einzeln gemessenen Körpergewichte jedes Tieres gegen die Zeit in Tagen auf der Abszisse eingetragen. Ab Tag 25 ließ sich bei einigen Tieren eine Abflachung der Gewichtskurve erkennen, die nach Implantation der osmotischen Pumpe mit Wirkstoffreservoir ab Tag 28 (Behandlungsbeginn) wieder anstieg.

Die Gewichte der einzelnen Gruppen wurden vor der Behandlung (Studientag 28) verglichen und analysiert (siehe Abb. 4.2). Zur Prüfung, ob zwischen den Gewichten signifikante Unterschiede bestehen, wurde der ANOVA-Test durchgeführt. Anschließend wurden ausgewählte Gruppen entsprechend den Hauptfragestellungen untersucht. Dafür wurden die Gruppen 1/2, 3/4, 5/6, 7/8, 9/10 bezüglich der Applikationsform (Injektion vs. Pumpe) untersucht. Die Gruppen 1/3, 2/4, 5/7, 5/9, 7/9, 6/8, 6/10, 8/10, wurden bezüglich der Effekte abhängig von der Dosierung (Placebo, 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d) des Ghrelin-Analogons BIM-28131 analysiert. Dabei ergab die statistische Untersuchung keine Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p = 0,74$ ) und den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ( $p = 0,78$ ).



**Abb. 4.2:** Körpergewichte der Gruppen am Tag (Studientag 28) vor der Behandlung. Die blauen Boxplots 1-4 zeigen die Körpergewichte der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots 5-10 zeigen die Körpergewichte der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe. Jede Gruppe umfasste 15-21 Tiere (siehe Kap. 3.22). In den Gruppen 5-10 entwickelte sich kein Gewichtsverlust.



Um die Körpergewichtszunahmen der unterschiedlichen Behandlungsgruppen ab dem Behandlungsbeginn (Studientag 28) statistisch auszuwerten, wurden die Differenzen der Gewichte (Tag 56 - Tag 27) errechnet und im Streudiagramm (siehe Abb. 4.3) und als Boxplot (siehe Abb.4.4) dargestellt. Bei der Analyse mittels ANOVA-Test stellten sich Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p < 0,001$ ) und den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ( $p < 0,001$ ) dar. Der anschließende Dunnett-T3-Test (siehe Tab. 4.1) ergab folgende Werte bezüglich der Hauptfragestellung der Effekte der Applikationsart (Injektion vs. Pumpe):

**Tab. 4.1:** Vergleich der Gruppen mit subkutaner Injektionsform und Infusion mittels osmotischer Pumpe des Ghrelin-Analogons BIM-28131. Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt.

Gruppe	1/2	3/4	5/6	7/8	9/10
Signifikanzen	p>0,05				

Der Dunnett-T3-Test bezüglich der Hauptfragestellung des Dosiseffektes des Ghrelin-Analogons BIM-28131 (siehe Tab. 4.2) ergab folgende Werte:

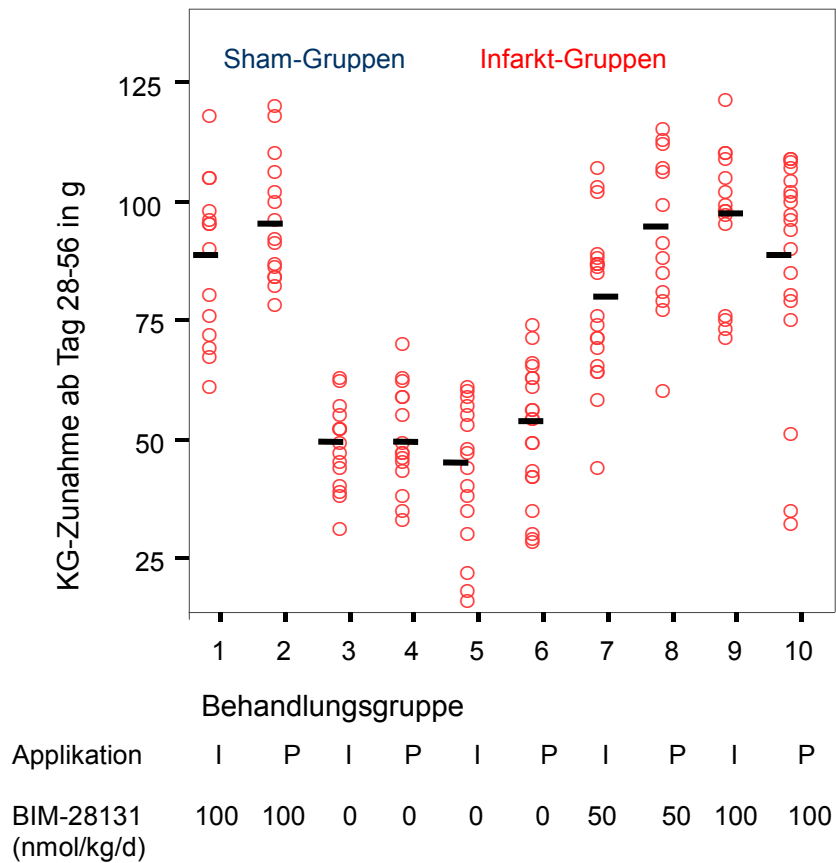
**Tab. 4.2:** Vergleich zwischen den Sham- und Infarktbehandlungsgruppen mit unterschiedlichen Dosierungen (Placebo, 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d). Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt. Zwischen den Gruppen 8 und 10 ergaben sich keine Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

Gruppe	1/3	2/4	5/7	5/9	6/8	6/10	7/9
Signifikanzen	alle p<0,001						p =0,046

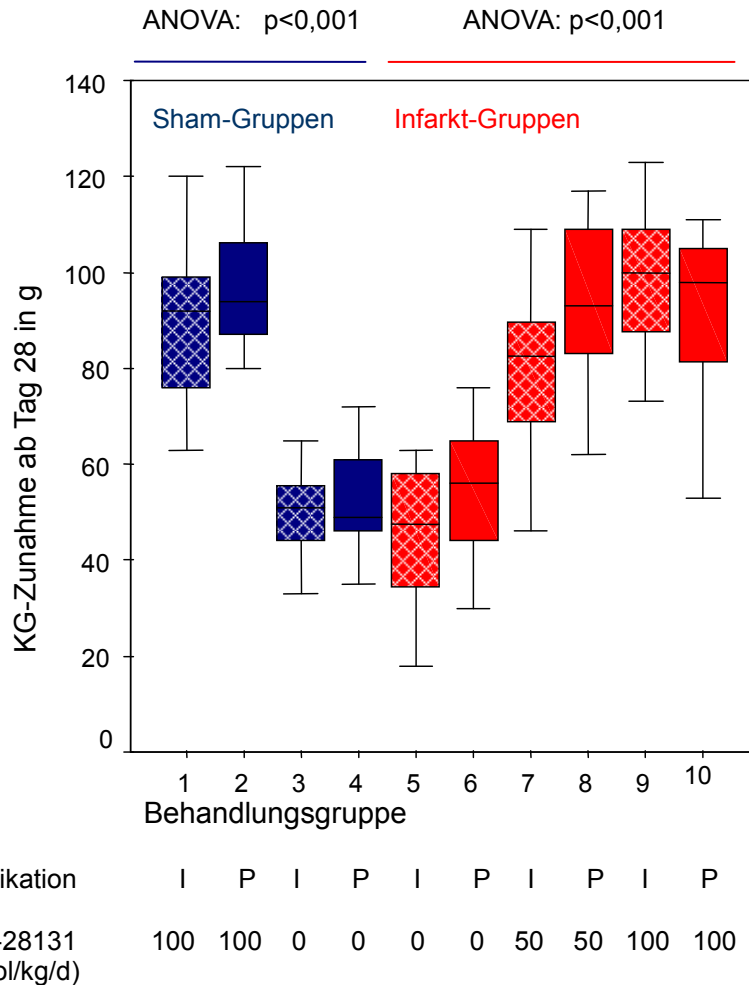
Deutlich wurde, dass während der gesamten Behandlungsdauer bei allen Gruppen ein Gewichtsanstieg zu beobachten war, der sich zwischen den Gruppen jedoch unterschied (siehe Tab. 4.3).

**Tab. 4.3:** Mittlerer absoluter Gewichtsanstieg während der Behandlung (Tag 28-56) mit Darstellung des Standardfehlers. N entspricht der Anzahl der Tiere pro Gruppe.

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n	15	15	15	15	16	20	20	13	15	19
Gewicht in g	89±4	97±3	50±2	52±3	44±4	53±3	80±4	95±4	98±4	89±5



**Abb.4.3:** Verteilung der einzelnen Körpergewichte der Behandlungsgruppen aller Tiere mit dem Mittelwert ab Tag 28 (Behandlungsbeginn) bis Tag 56 (Versuchsende). Die Gruppen 1-4 zeigen die Zunahmen der einzelnen Körpergewichte der Sham-Gruppen. Die Gruppen 5-10 zeigen die einzelnen Körpergewichte der Gruppen mit Infarkt. Jede Gruppe umfasste 15-21 Tiere (siehe Kap. 3.22). I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.



**Abb. 4.4:** Körpergewichtszunahme aller Gruppen mit Beginn der Behandlung (Versuchstag 28) bis Beendigung (Versuchstag 56). Jede Gruppe umfasste 15-21 Tiere (siehe Kap. 3.22). Die blauen Boxplots 1-4 zeigen die Zunahmen der Körpergewichte der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots 5-10 zeigen die Zunahmen der Körpergewichte der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

## 4.2 Ergebnisse der NMR-Messungen

Für die Auswertung der NMR-Messungen wurde der Fettzuwachs und der Muskelzuwachs von Tag 27 bis 42, von Tag 27 bis 56 und von Tag 42 bis 56 errechnet und als prozentuale Differenz angegeben. Dafür wurden Boxplots erstellt (Beispiel: siehe Abb. 4.5). Für die Analyse der Differenzen wurde, auf Grund der Annahme der Nichtnormalverteilung der Variablen (siehe Punkt 3.3) der H-Test nach Kruskal-Wallis durchgeführt. Bei ausgewählten Gruppen bezüglich der Hauptfragestellungen wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Dafür wurden die Gruppen 1/2, 3/4, 5/6, 7/8, 9/10 bezüglich der Applikationsform untersucht. Die Gruppen 1/3, 2/4, 5/7, 5/9, 7/9, 6/8, 6/10, 8/10, wurden bezüglich des Dosiseffektes (Placebo, 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d) des Ghrelin-Analogons BIM-28131 analysiert.

Die Anzahl der bei den gesamten MNR-Messungen untersuchten Tiere pro Behandlungsgruppe betrug 15-21 Tiere (siehe Tab. 4.4 und Kap. 3.2.2).

**Tab. 4.4:** Anzahl der bei den MNR-Messungen untersuchten Tiere pro Behandlungsgruppe. Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt. N entspricht der Tierzahl pro Gruppe.

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N	15	15	15	15	19	20	19	17	20	18

#### 4.2.1 Fettzuwachs

Fettzuwachs der NMR-Messungen zwischen Tag 27 und 42 bezüglich relevanter Gruppen (siehe Abb. 4.5): Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab sowohl für die Sham-, als auch für die Infarkt-Behandlungsgruppen einen p-Wert < 0,001. Der Mann-Whitney-U-Test zur Prüfung von Unterschieden (Tab.4.5) zwischen subkutaner Injektionsform und Infusion mittels osmotischer Pumpe des Ghrelin-Analogons BIM-28131 bezüglich des Fettzuwachses zwischen der NMR-Messung von Tag 27 und 42 ergab folgende Werte:

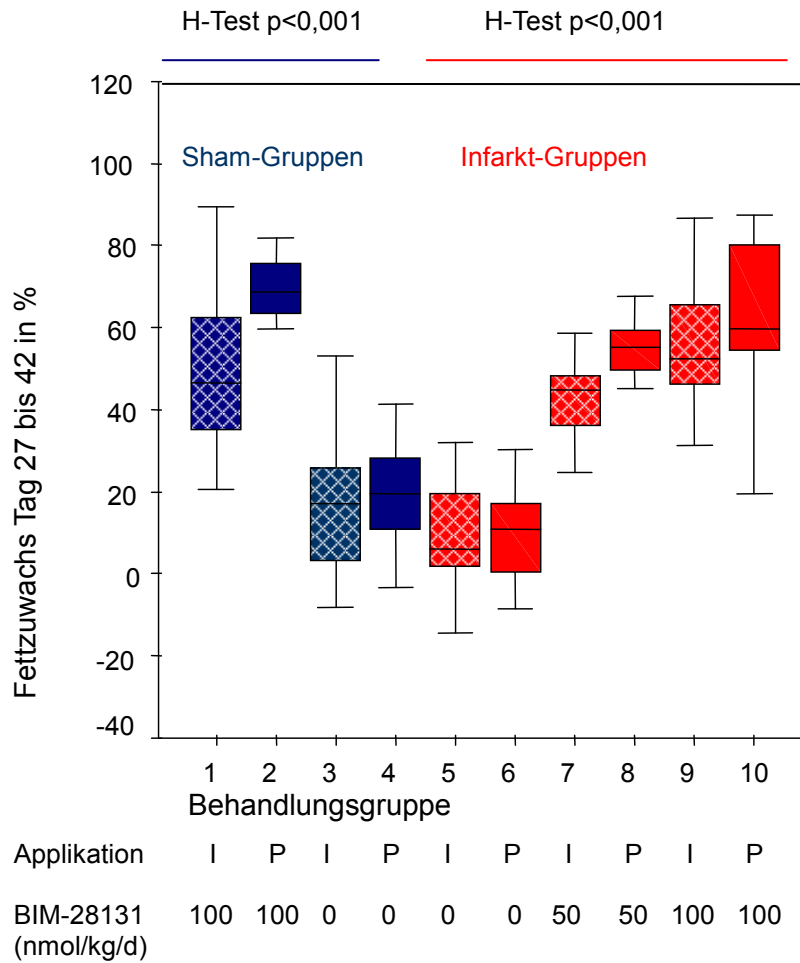
**Tab. 4.5:** Vergleich der Gruppen zwischen subkutaner Injektionsform und Infusion mittels osmotischer Pumpe des Ghrelin-Analogons BIM-28131. Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt. Der Test ergab nur Unterschiede zwischen den Gruppen 1/2 und 7/8. Zwischen den anderen Gruppen ergaben sich keine Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

Gruppe	1/2	3/4	5/6	7/8	9/10
Signifikanz	$p = 0,001$	$p > 0,05$		$p = 0,002$	$p > 0,05$

Der Mann-Whitney-U-Test zur Prüfung von Unterschieden (Tab.4.6) zwischen unterschiedlichen Dosierungen (Placebo, 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d) des Ghrelin-Analogons BIM-28131 bezüglich des Fettzuwachses zwischen Tag 27 und 42 ergab folgende Werte:

**Tab.4.6.:** Vergleich zwischen den Sham- und Infarktbehandlungsgruppen mit unterschiedlichen Dosierungen (Placebo, 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d). Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt. Bei dem Vergleich der Dosierungen ergaben sich sowohl bei den Infarkt- als auch bei den Sham-Gruppen (1/3, 2/4, 5/7, 5/9, 6/8, 6/10, 7/9) deutlich signifikante Unterschiede in der Fettzunahme. Die Gruppen 8 und 10 zeigten keine Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

Gruppe	1/3	2/4	5/7	5/9	6/8	6/10	7/9	8/10
Signifikanzen	alle $p < 0,006$							$p > 0,05$



**Abb. 4.5:** Fettzuwachs aller Gruppen in % zwischen den Tagen 27 (Therapiebeginn) bis 42. Die Masse des Gesamtfettgewebes an Tag 27 entspricht 100%. Die blauen Boxplots 1-4 zeigen die Zunahme des Fettgewebes der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots 5-10 zeigen die Zunahmen des Fettgewebes der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion, P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

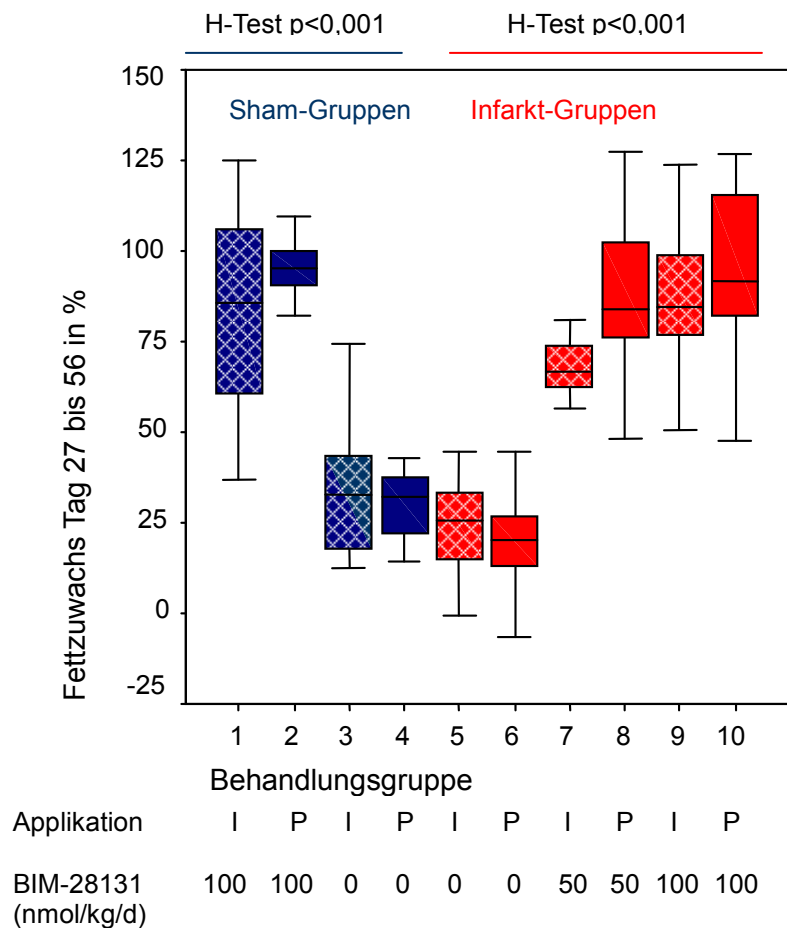
Der Fettzuwachs der NMR-Messungen zwischen Tag 27 und 56 bezüglich relevanter Gruppen (siehe Abb. 4.6): Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab bei der Untersuchung einen  $p$ -Wert  $< 0.001$ . Der anschließende Mann-Whitney-U-Test (siehe Tab. 4.7 und 4.8) zur Prüfung von Unterschieden zwischen subkutaner Injektionsform und Infusion mittels osmotischer Pumpe des Ghrelin-Analogons BIM-28131 bezüglich des Fettzuwachses zwischen der NMR-Messung von Tag 27 und 56 ergab folgende Werte:

**Tab.4.7:** Vergleich der Gruppen zwischen subkutaner Injektionsform und Infusion mittels osmotischer Pumpe des Ghrelin-Analogons BIM-28131. Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt. Der Test ergab nur Unterschiede zwischen den Gruppen 7 und 8. Zwischen den anderen Gruppen ergaben sich keine Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

Gruppe	1/2	3/4	5/6	7/8	9/10
Signifikanz	$p > 0,05$			$p < 0,001$	$p > 0,05$

**Tab.4.8:** Vergleich zwischen den Sham- und Infarkt-Behandlungsgruppen mit unterschiedlichen Dosierungen (Placebo, 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d). Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt. Bezüglich des Dosiseffektes ergaben sich zwischen den Sham-Gruppen und den Infarkt-Behandlungsgruppen (1/3, 2/4, 5/7, 5/9, 6/8, 6/10, 7/9) deutliche Unterschiede in der Fettzunahme. Die Gruppen 8 und 10 zeigten keine statistischen Unterschiede.

Gruppe	1/3	2/4	5/7	5/9	6/8	6/10	7/9	8/10
Signifikanzen	alle p<0,001							p>0,05



**Abb. 4.6:** Fettzuwachs aller Gruppen in % zwischen den Tagen 27 (Behandlungsbeginn) und 56 (Behandlungsende). Die Masse des Gesamtfettgewebes an Tag 27 entspricht 100%. Die blauen Boxplots 1-4 zeigen die Zunahmen des Fettgewebes der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots zeigen die Zunahmen des Fettgewebes der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

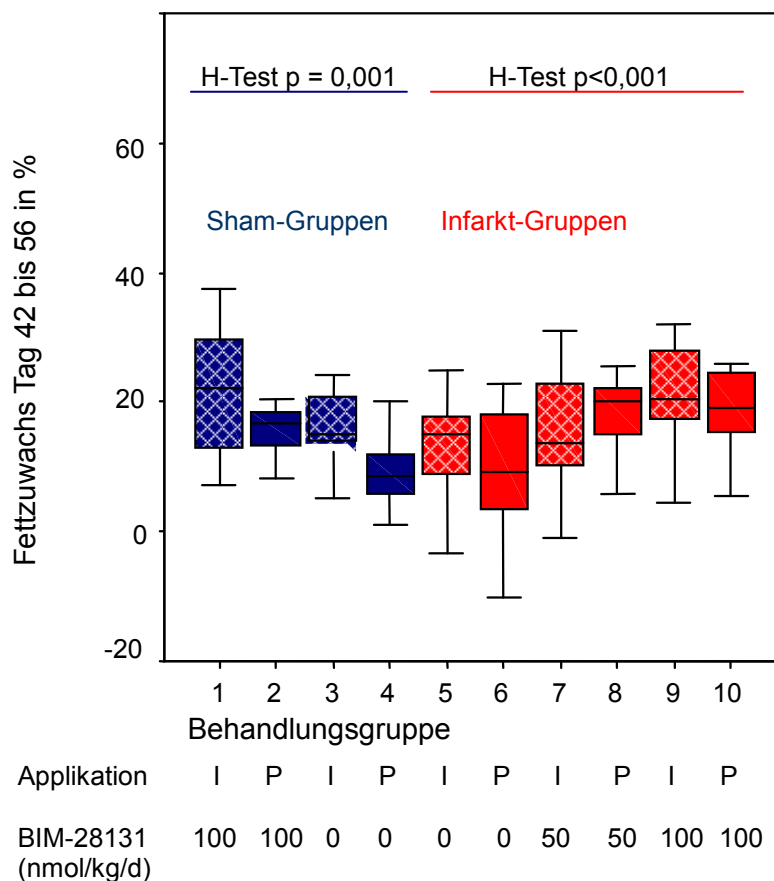
Fettzuwachs der NMR- Messungen zwischen Tag 42 und 56 bezüglich relevanter Gruppen (siehe Abb. 4.7): Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab für die Sham-Gruppen einen p-Wert von:  $p = 0,001$ . Für die Infarkt-Behandlungsgruppen ergab die Analyse einen p-Wert von:  $p < 0,001$ . Der anschließende Mann-Whitney-U-Test (siehe Tab.4.9 und 4.10) zur Prüfung von Unterschieden zwischen subkutaner Injektion und Infusion mittels osmotischer Pumpe des Ghrelin-Analogons BIM-28131 bezüglich des Fettzuwachses zwischen der NMR-Messung von Tag 42 und 56 ergab folgende Werte:

**Tab. 4.9:** Vergleich der Gruppen zwischen subkutaner Injektionsform und Infusion mittels osmotischer Pumpe des Ghrelin-Analogons BIM-28131. Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt. Der Test ergab nur Unterschiede zwischen den Gruppen 3 und 4.

Gruppe	1/2	3/4	5/6	7/8	9/10
Signifikanz	p>0,05	p= 0,011	p>0,05		

**Tab.: 4.10:** Vergleich zwischen den Sham- und Infarktbehandlungsgruppen mit unterschiedlichen Dosierungen (Placebo, 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d). Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt. Bezüglich der Dosierung ergaben sich sowohl zwischen den Infarkt- als auch bei den Sham-Gruppen (2/4, 5/9, 6/8, 6/10) Unterschiede in der Fettzunahme. Die Gruppen 1/3, 5/7, 7/9, 8/10 zeigten keine Unterschiede.

Gruppe	1/3	2/4	5/7	5/9	6/8	6/10	7/9	8/10
Signifikanz	p>0,05	p= 0,003	p>0,05	p = 0,001			p>0,05	p>0,05



**Abb. 4.7:** Fettzuwachs aller Gruppen in % zwischen den Tagen 42 und 56 (Behandlungsende). Die Masse des Gesamtfettgewebes an Tag 42 entspricht 100%. Die blauen Boxplots 1-4 zeigen die Zunahmen des Fettgewebes der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots 5-10 zeigen die Zunahmen des Fettgewebes der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse in den Infarktgruppen deutliche Fettgewebszunahmen bei einer Behandlung mit dem Ghrelin-Analogon BIM-28131 gegenüber den Placebogruppen. Zudem war insbesondere zwischen den Tagen 27-42 bei den Infarkttieren die Applikation mittels osmotischer Pumpe mit der Dosierung 50nmol/kg/d des Ghrelin-Analogons gegenüber der Applikation mittels Injektion überlegen. Bei den Sham-Behandlungsgruppen war nur mit einer Dosierung von 100nmol/kg/d des Ghrelin-Analogons die Applikation mittels osmotischer Pumpe gegenüber der Applikation mittels Injektion überlegen.

#### 4.2.2 Muskelzuwachs

Der Muskelzuwachs der NMR-Messungen zwischen Tag 27 und 42 bezüglich relevanter Gruppen (siehe Abb. 4.8): Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab sowohl für die Sham-Gruppen als auch für die Infarkt-Behandlungsgruppen einen p-Wert von  $p < 0,001$ . Der Mann-Whitney-U-Test (siehe Tab.4.11) zur Prüfung von Unterschieden zwischen subkutaner Injektionsform und Infusion mittels osmotischer Pumpe des Ghrelin-Analogons BIM-28131 ergab folgende Werte:

**Tab. 4.11:** Vergleich der Gruppen zwischen subkutaner Injektionsform und Infusion mittels osmotischer Pumpe des Ghrelin-Analogons BIM-28131. Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt. Der Test ergab nur Unterschiede zwischen den Gruppen 5 und 6.

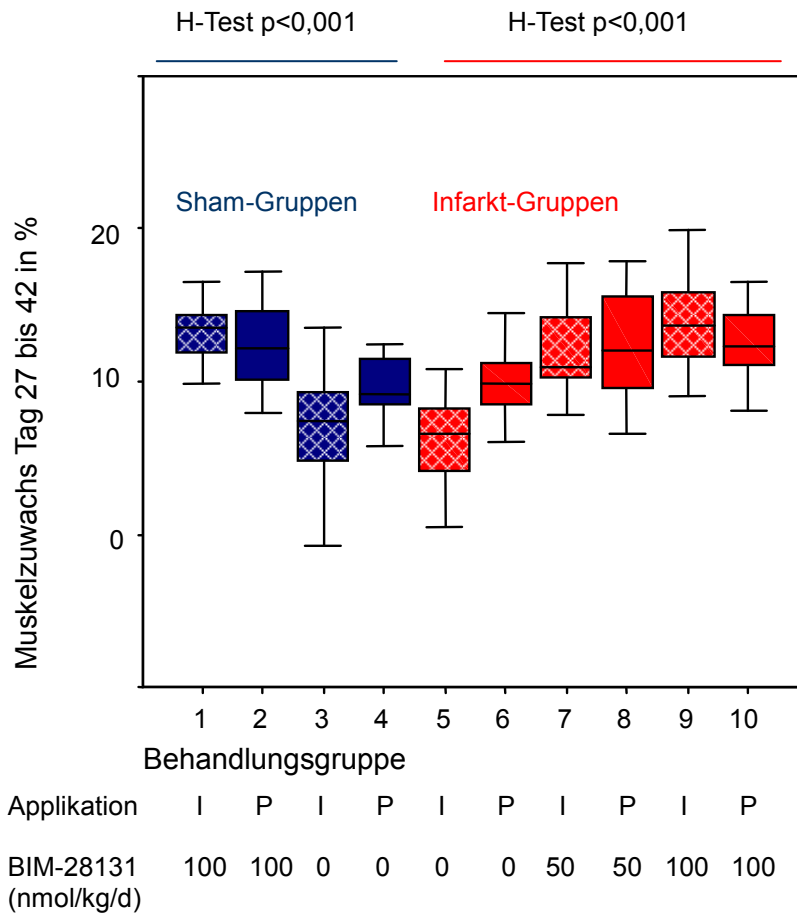
Gruppe	1/2	3/4	5/6	7/8	9/10
Signifikanz	p>0,05		p<0,001	p>0,05	

Der Mann-Whitney-U-Test (siehe Tab.4.12) zur Prüfung von Unterschieden zwischen den unterschiedlichen Dosierungen des Ghrelin-Analogons BIM-28131 ergab folgende Werte:

**Tab. 4.12:** Vergleich zwischen den Sham- und Infarktbehandlungsgruppen mit unterschiedlichen Dosierungen (Placebo, 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d). Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt. Bezüglich der Dosierung ergaben sich sowohl zwischen den Infarkt- als auch bei den Sham-Gruppen (1/3, 2/4, 5/7, 5/9) Unterschiede im Muskelzuwachs. Die Gruppen 6/8, 6/10, 7/9, 8/10 zeigten keine Unterschiede im Muskelzuwachs ( $p > 0,05$ ).

Gruppe	1/3	2/4	5/7	5/9	6/8	6/10	7/9	8/10
Signifikanzen	p=0,001	p= 0,01	alle p<0,001		p>0,05			





**Abb. 4.8:** Zunahme des Muskelgewebes aller Gruppen in % zwischen den Tagen 27 (Therapiebeginn) bis 42. Die Muskelmasse an Tag 27 entspricht 100 %. Die blauen Boxplots 1-4 zeigen die Zunahmen des Muskelgewebes der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die Zunahmen des Muskelgewebes der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

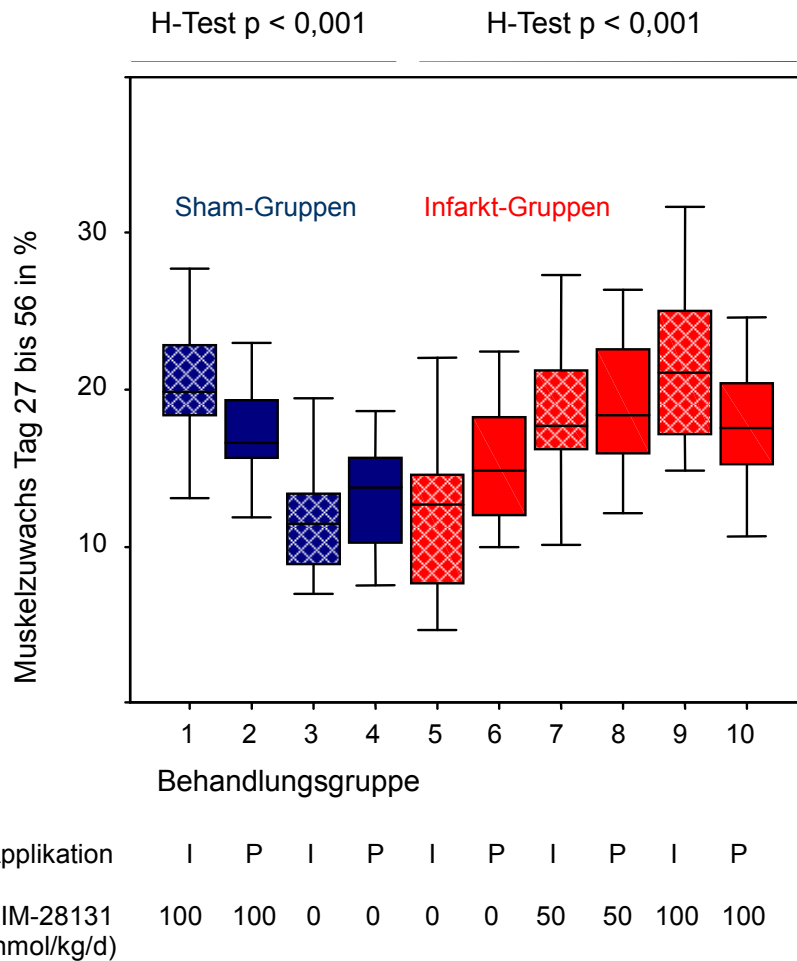
Der Muskelzuwachs der NMR-Messungen am Tag 27 und 56 bezüglich relevanter Gruppen (siehe Abb. 4.9): Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab für die Sham-Gruppen und die Infarkt-Behandlungsgruppen einen p-Wert von jeweils  $p < 0,001$ . Der Mann-Whitney-U-Test zur Prüfung von Unterschieden zwischen subkutaner Injektion und Infusion mittels osmotischer Pumpe (siehe Tab. 4.13) des Ghrelin-Analogons BIM-28131 und von Unterschieden in der Dosierung (siehe Tab. 4.14) bezüglich des Muskelzuwachses der NMR-Messung zwischen Tag 27 und 56, ergab folgende Werte:

**Tab. 4.13:** Vergleich der Gruppen zwischen subkutaner Injektionsform und Infusion mittels osmotischer Pumpe des Ghrelin-Analogons BIM-28131. Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt. Der Test ergab Unterschiede zwischen den Gruppen 9 und 10. Zwischen den anderen Gruppen ergaben sich keine Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

Gruppe	1/2	3/4	5/6	7/8	9/10
Signifikanzen	$p > 0,05$				$p = 0,015$

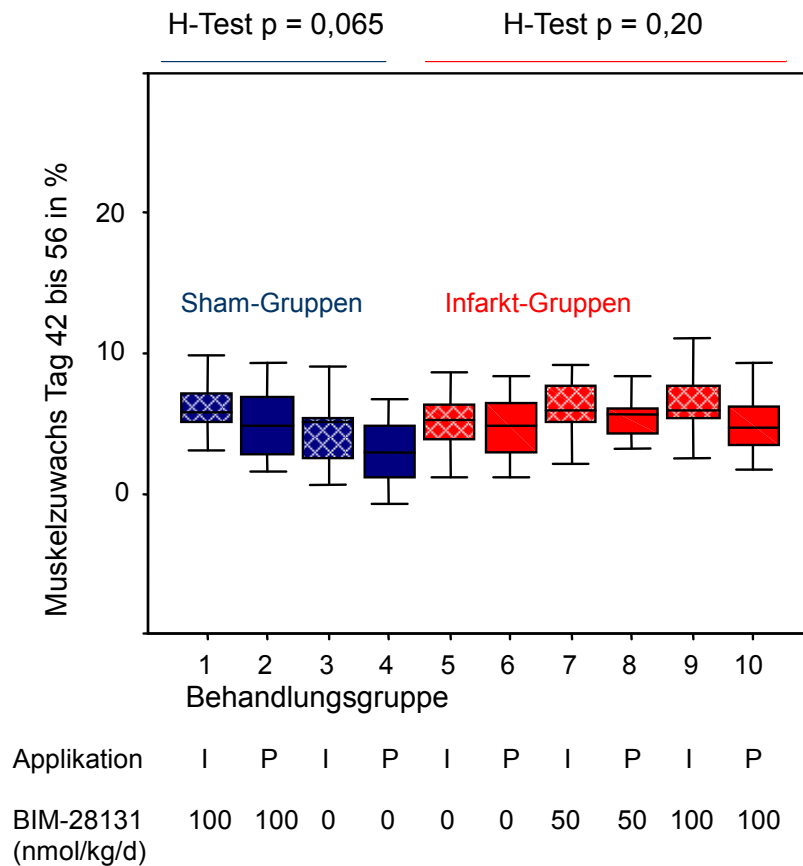
**Tab. 4.14:** Vergleich zwischen den Sham- und Infarktbehandlungsgruppen mit unterschiedlichen Dosierungen (Placebo, 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d). Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt. Bezüglich der Dosierung ergaben sich sowohl bei den Infarkt- als auch bei den Sham-Gruppen (1/3, 2/4, 5/7, 5/9) Unterschiede im Muskelzuwachs. Die Gruppen 6/8, 6/10, 7/9, 8/10 zeigten keine Unterschiede im Muskelzuwachs ( $p > 0,05$ ).

Gruppe	1/3	2/4	5/7	5/9	6/8	6/10	7/9	8/10
Signifikanzen	$p < 0,001$	$p = 0,002$	$p < 0,001$		$p > 0,05$			



**Abb. 4.9:** Zunahme des Muskelgewebes aller Gruppen in % zwischen Therapiebeginn (Tag 27) und –ende (Tag 56). Der Muskelanteil an Tag 27 entspricht 100 %. Die blauen Boxplots (1-4) zeigen die Zunahmen des Muskelgewebes der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die Zunahmen des Muskelgewebes der Gruppen mit Infarkt. I entspricht Applikation mittels Injektion; P entspricht Applikation mittels osmotischer Pumpe.

Muskelzuwachs der NMR-Messungen zwischen Tag 42 und 56 bezüglich relevanter Gruppen (siehe Abb. 4.10): Der H-Test nach Kruskal-Wallis ergab bei der Analyse der Gruppen 1-4:  $p = 0,065$  und bei den Gruppen 5-10 einen  $p$ -Wert =  $0,20$



**Abb. 4.10:** Zunahme des Muskelgewebes zwischen den Tagen 42 bis 56 (Therapieende). Der Muskelanteil an Tag 42 entspricht 100 %. Die blauen Boxplots 1-4 zeigen die Zunahmen des Muskelgewebes der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots zeigen die Zunahmen des Muskelgewebes der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse insbesondere zwischen den Tagen 27-42 eine deutliche Zunahme an Muskelgewebe, wobei keine Unterschiede zwischen einer Applikation mittels Injektion vs. osmotischer Pumpe des Ghrelin-Analogs BIM-28131 zu erkennen war. Bei den Injektions-Infarkttieren konnte insbesondere eine Zunahme an Muskelgewebe in der geringen Dosierung von 50nmol/kg/d des Ghrelin-Analogs BIM-28131 beobachtet werden. Die höhere Dosierung von 100nmol/kg/d war dieser nicht überlegen.

### 4.3 Analysen der Organgewichte

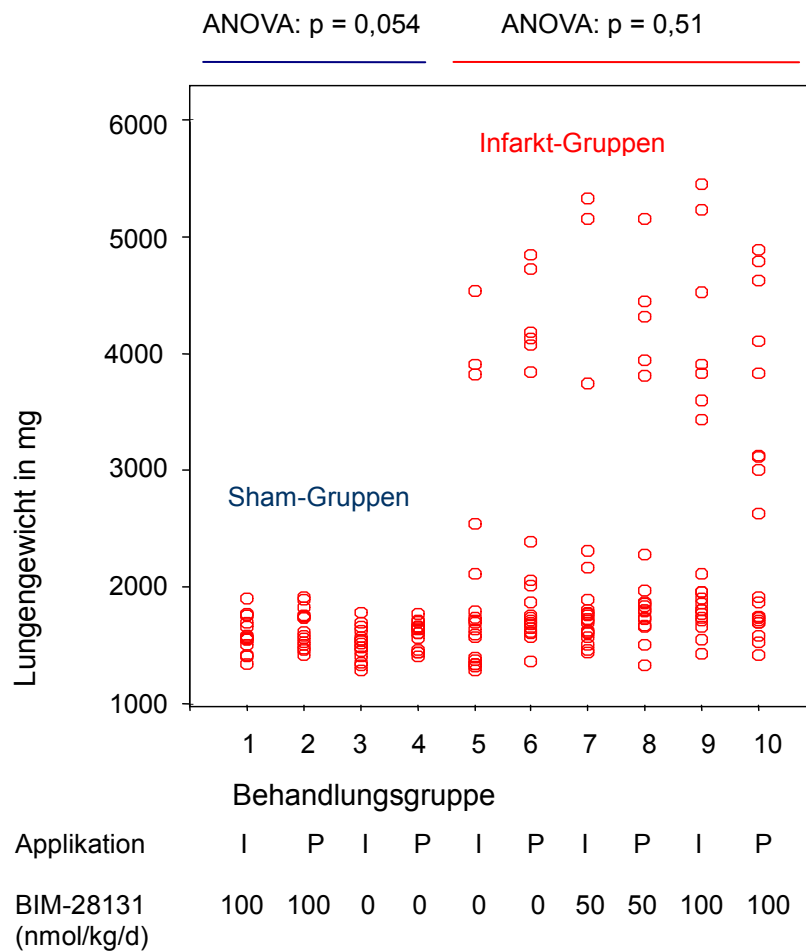
Bei allen Tieren wurden für weitere Analysen ausgesuchte Organe entnommen und gewogen. Die einzelnen Organgewichte wurden im Streudiagramm dargestellt und analysiert. Zur Prüfung von Unterschiede zwischen den Gruppen, wurde der ANOVA-Test durchgeführt. Als Signifikanzkriterium wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% ( $p < 0,05$ ) angenommen. Die Anzahl der bei den Gewichtsmessungen der untersuchten Organe verwendeten Tiere pro Gruppe betrug 15-20 Tiere (siehe Tab. 4.15 und Kap. 3.2.2).

**Tab. 4.15:** Anzahl der bei den Gewichtsmessungen der untersuchten Organe verwendeten Tiere pro Behandlungsgruppe. Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-operierten Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Gruppen mit Infarkt. N entspricht der Tierzahl pro Gruppe.

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
n	15	15	15	15	18	20	20	18	20	20

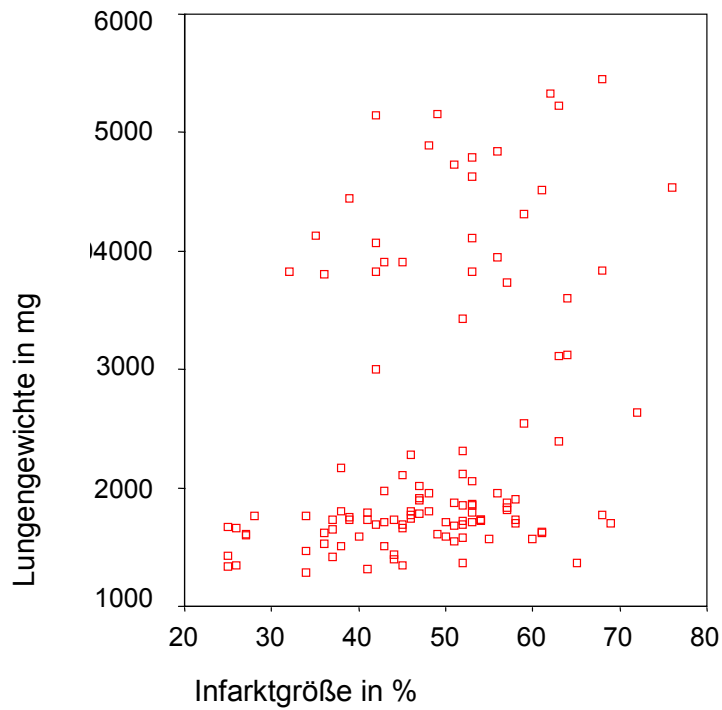
### 4.3.1 Ergebnisse der Lungengewichte

In der grafischen Darstellung (siehe Abb. 4.11) war eine Konzentration der Gewichte im Bereich von 1,3-1,9g erkennbar. Die Infarktgruppen zeigten jedoch eine große Streuung der Werte einzelner Tiere in höheren Bereichen bis zu 5g. Bei den Gruppen 5-9 war eine Lücke ohne Beobachtungswerte zu erkennen. Bei den Shamgruppen konnte diese Beobachtung nicht gemacht werden. Die Analyse mittels ANOVA-Test ergab innerhalb der Shamgruppen sowie innerhalb der Infarktgruppen keine signifikanten Unterschiede.



**Abb. 4.11:** Grafische Darstellung der einzelnen Lungengewichte aller Behandlungsgruppen am Tag 56. Die Gruppen 1-4 zeigen die einzelnen Lungengewichte der Sham-operierten Gruppen; die Gruppen 5-10 zeigen die Lungengewichte der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

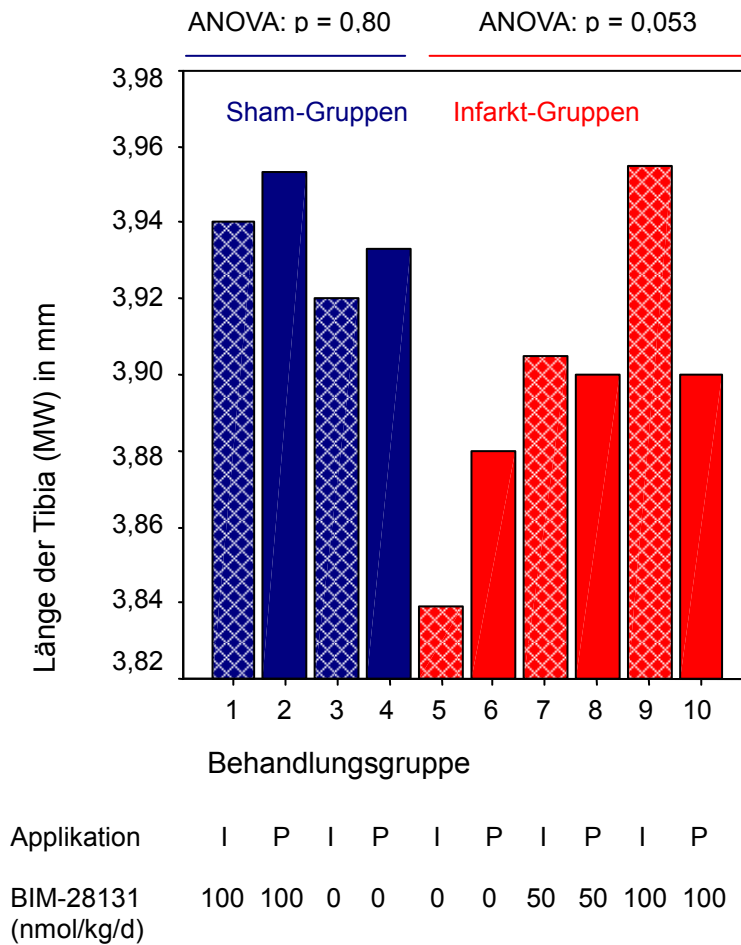
Ein Zusammenhang zwischen den Gewichten der Lunge und der Infarktgröße des Herzens konnte nicht beobachtet werden (siehe Abb. 4.12).



**Abb. 4.12:** Darstellung der Lungengewichte in Bezug zur Infarktgröße bei den Gruppen 5-10. Um einen möglichen Zusammenhang der Lungengewichte zur Infarktgröße festzustellen, wurde ein Scatterplot mit den Variablen Lungengewicht und Infarktgröße erstellt. Aus diesem ist ersichtlich, dass beide Variablen in keinem Zusammenhang miteinander stehen.

### 4.3.2 Ergebnisse der Tibialängen

In der grafischen Darstellung (siehe Abb. 4.13) werden die Tibialängen als Balkendiagramm dargestellt. Die Analyse mittels ANOVA-Test innerhalb der Shamgruppen ergab einen Wert von:  $p = 0,80$ . Innerhalb der Infarktgruppen ergaben sich ebenso keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,053$ ).

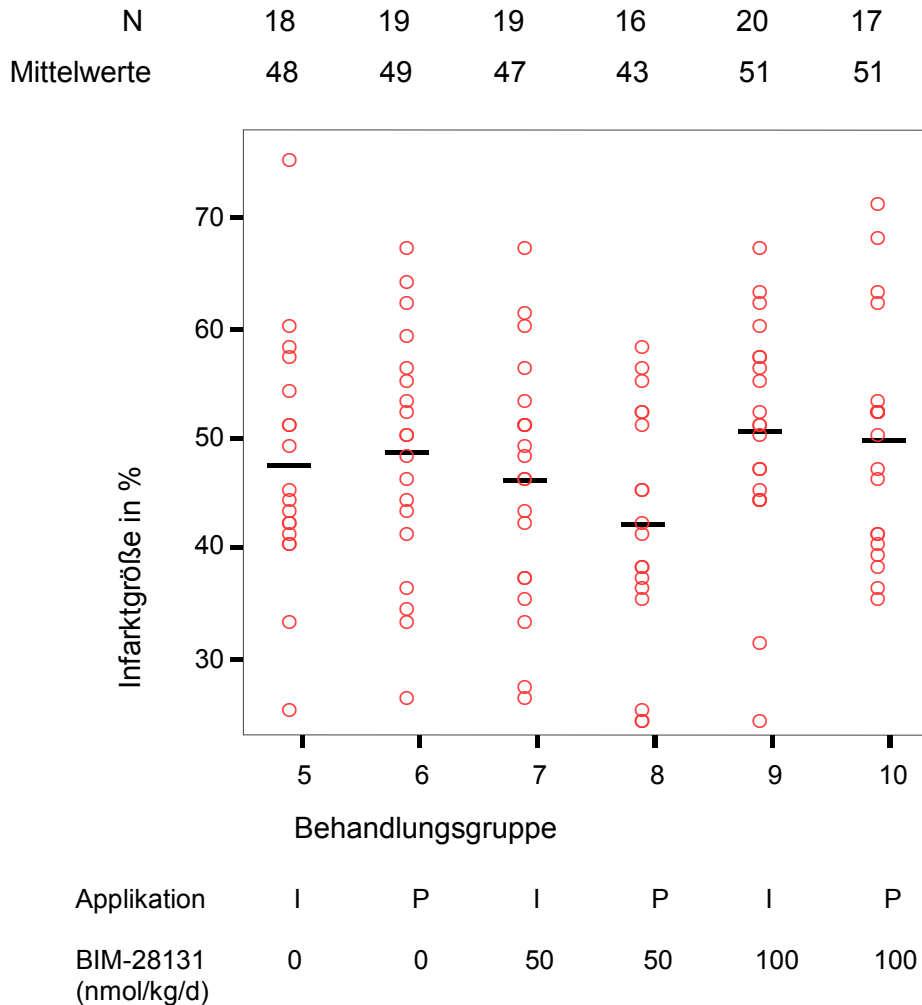


**Abb. 4.13:** Abbildung der Tibialängen aller Behandlungsgruppen am Tag 56 (Studienende). Die blauen Balken (1-4) zeigen die Mittelwerte der Tibialängen der Sham-operierten Gruppen; die roten Balken (5-10) zeigen die Mittelwerte der Tibialängen der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Streuung der Daten nicht gezeigt.

### 4.3.3 Infarktgrößen

Um eine Verteilung der Infarktgrößen der Infarktgruppen (5-10) darzustellen, wurde zur besseren Veranschaulichung ein Streudiagramm mit dem dazugehörigen Mittelwert der Behandlungsgruppen erstellt (siehe Abb. 4.14).

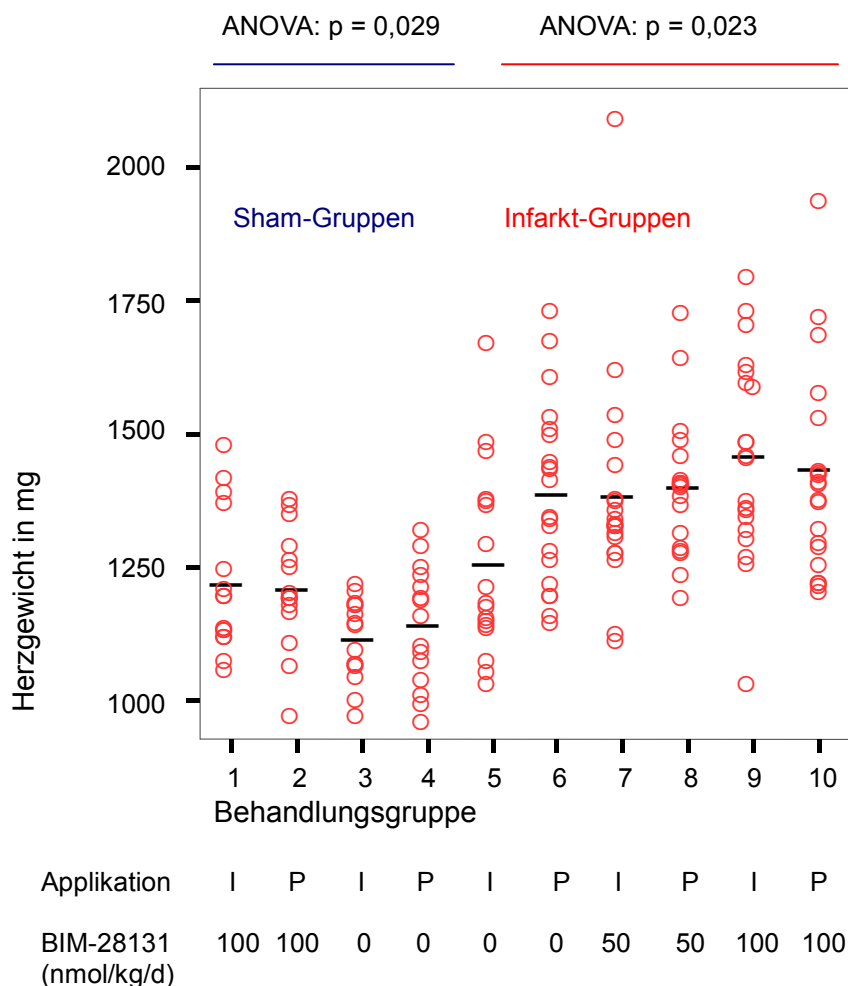
Der ANOVA-Test ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen ( $p = 0,20$ ). Im Mittel betrug die Infarktgröße  $48 \pm 1\%$ , bezogen auf die Gesamtfläche des linken Ventrikels.



**Abb. 4.14:** Verteilung der einzelnen Infarktgrößen (als %-Anteil der Gesamtfläche des linken Ventrikels), mit Darstellung des Mittelwertes der Infarkt-Behandlungsgruppen am Tag 56 (Studienende). I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe. N entspricht der Anzahl der Fälle pro Gruppe.

#### 4.3.4 Herzgewichte

Der Vergleich der absoluten Herzgewichte der Sham- und Infarkttiere wird in der Abbildung 4.15 veranschaulicht. Beim Vergleich der Gruppen wurde deutlich, dass die Herzgewichte der Shamgruppen niedriger als die der Infarktgruppen waren. Die höchsten Herzgewichte traten in der Gruppe 9, mit einem Mittelwert von  $1475 \pm 42$  mg auf. Die Analyse mittels ANOVA-Test ergab zwischen den Shamgruppen 1-4 ( $p = 0,029$ ) und zwischen den Infarktgruppen 5-10 ( $p = 0,023$ ) jeweils keine Unterschiede. Bezüglich der Applikationsform (Injektion vs. Pumpe) ergaben sich keine Unterschiede. Dosisabhängige Unterschiede (Placebo vs. 50 nmol/kg/d vs. 100 nmol/kg/d) ergaben sich nur zwischen den Gruppen 5 und 9 Unterschiede ( $p = 0,027$ ).

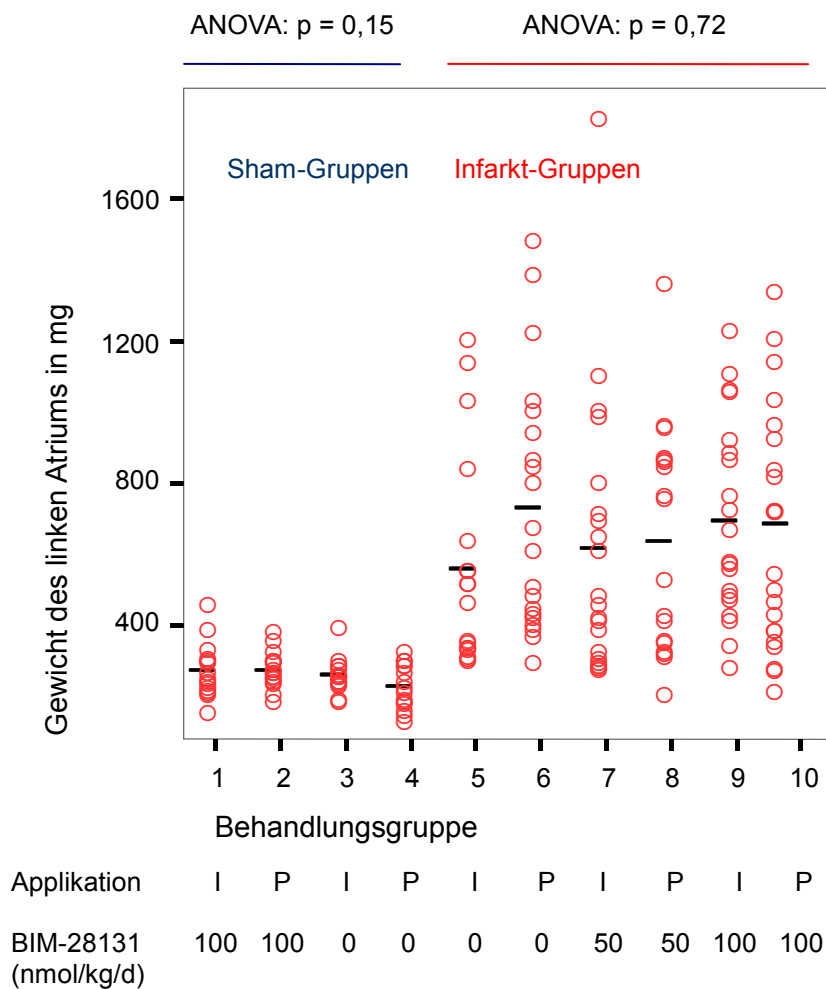


**Abb. 4.15:** Verteilung der absoluten Herzgewichte aller Behandlungsgruppen mit Darstellung des Mittelwertes am Tag 56 (Studienende). Die Gruppen 1-4 zeigen die einzelnen Herzgewichte der Sham-operierten Gruppen; die Gruppen 5-10 zeigen die einzelnen Herzgewichte der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.



### 4.3.5 Gewichte des linken Atriums

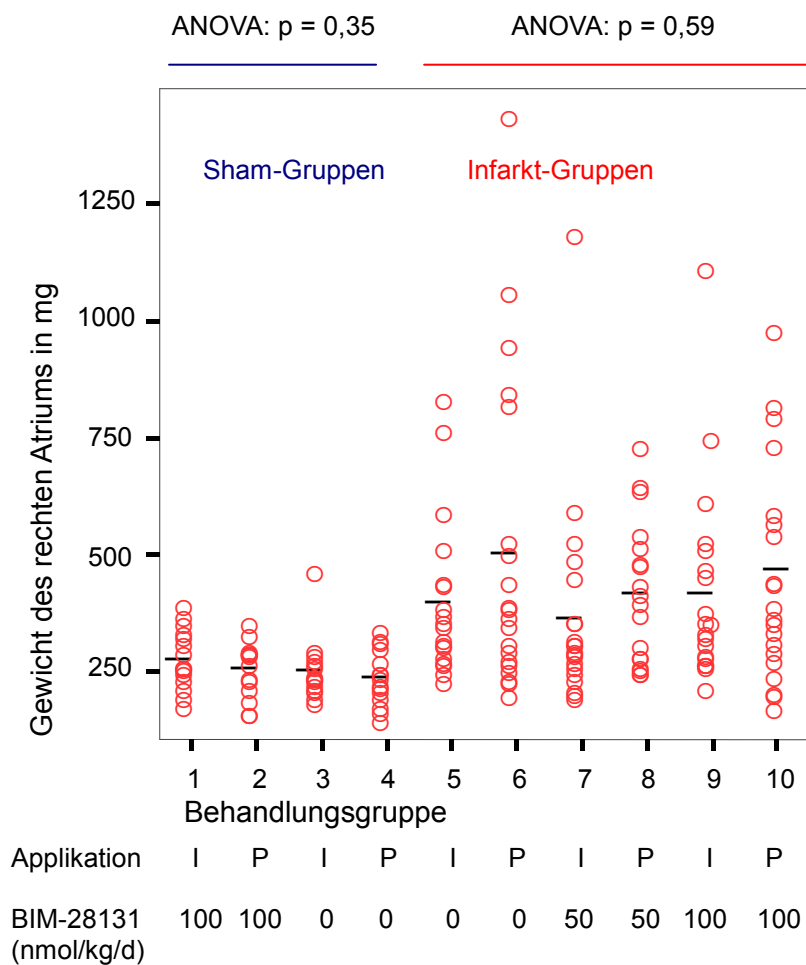
Beim Vergleich der Gruppen 1-10 (siehe Abb. 4.16) ist erkennbar, dass die Gewichte des linken Atriums bei den Shamgruppen niedriger als bei den Infarktgruppen waren. Die Streuung der Messungen der Infarktgruppen ist deutlich größer als die der Shamgruppen. Die Analyse mittels ANOVA-Test ergab innerhalb der Shamgruppen keine Unterschiede ( $p = 0,15$ ). Innerhalb der Infarktgruppen ergaben sich ebenso keine Unterschiede ( $p = 0,72$ ). Die Gruppe 6 hatte im Vergleich aller Gruppen den höchsten Mittelwert mit  $754 \pm 7 \text{mg}$ .



**Abb. 4.16:** Verteilung der absoluten Gewichte des linken Atriums mit Darstellung des Mittelwertes am Tag 56 (Studienende). Die Gruppen 1-4 zeigen die einzelnen Gewichte der linken Atrien der Sham-operierten Gruppen; die Gruppen 5-10 zeigen die einzelnen Gewichte der linken Atrien der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

#### 4.3.6 Gewichte des rechten Atriums

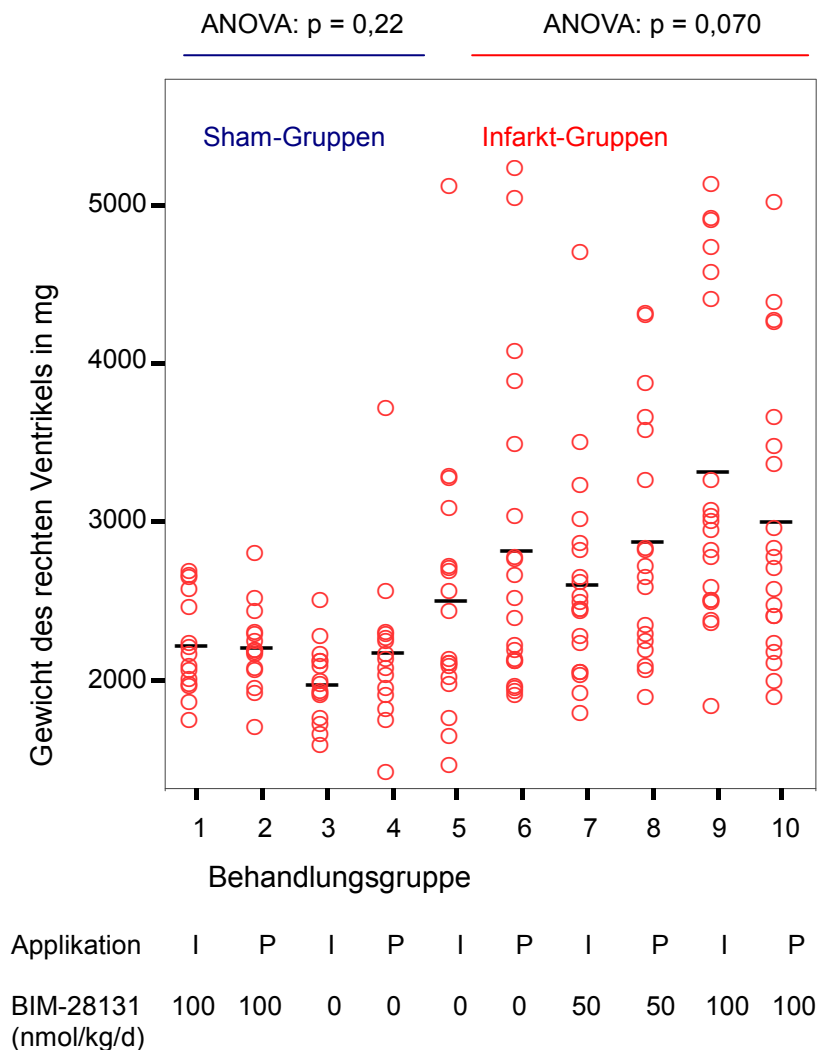
Beim Vergleich der Gruppen 1-10 (siehe Abb. 4.17) ist erkennbar, dass die Gewichte des rechten Atriums bei den Shamgruppen niedriger waren als bei den Infarktgruppen. Die Streuung der Messungen der Infarktgruppen war deutlich größer als die der Shamgruppen. Die Analyse mittels ANOVA-Test ergab innerhalb der Shamgruppen einen p-Wert von:  $p = 0,35$ . Innerhalb der Infarktgruppen ergaben sich ebenso keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,59$ ). Die Gruppe 6 erreichte den höchsten Mittelwert mit  $519 \pm 4$ mg.



**Abb. 4.17:** Verteilung der absoluten Gewichte des rechten Atriums mit Darstellung des Mittelwertes am Tag 56 (Studienende). Die Gruppen 1-4 zeigen die einzelnen Gewichte der rechten Atrien der Sham-operierten Gruppen; die Gruppen 5-10 zeigen die einzelnen Gewichte der rechten Atrien der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

### 4.3.7 Gewichte des rechten Ventrikels

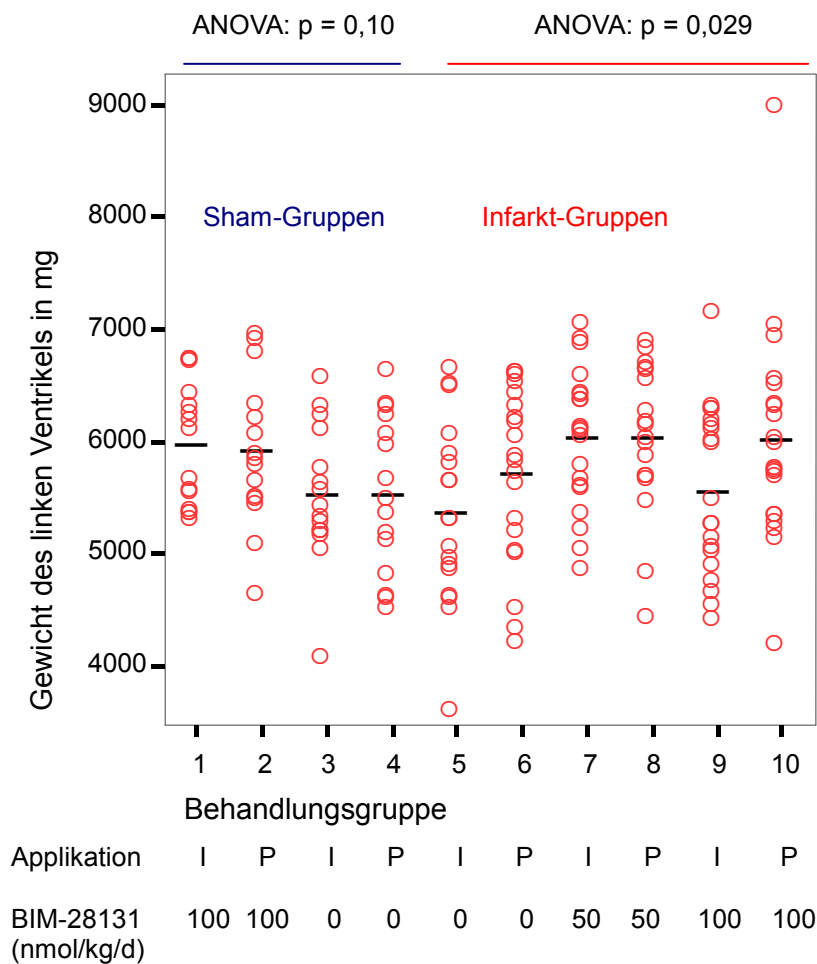
Beim Vergleich der Gruppen 1-10 (siehe Abb. 4.18) ist erkennbar, dass die Gewichte des rechten Ventrikels bei den Shamgruppen niedriger waren als bei den Infarktgruppen. Bei den Infarktgruppen war eine größere Streuung der Werte in Vergleich zu den Shamgruppen erkennbar. Die Analyse mittels ANOVA-Test ergab innerhalb der Shamgruppen einen p-Wert von:  $p = 0,22$ . Innerhalb der Infarktgruppen ergaben sich ebenso keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,07$ ). Die Gruppe 9 erreichte den höchsten Mittelwert von  $3360 \pm 23$ mg.



**Abb. 4.18:** Verteilung der absoluten Gewichte des rechten Ventrikels mit Darstellung des Mittelwertes am Tag 56 (Studienende). Die Gruppen 1-4 zeigen die einzelnen Gewichte der rechten Ventrikel der Sham-operierten Gruppen; die Gruppen 5-10 zeigen die einzelnen Gewichte der rechten Ventrikel der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

#### 4.3.8 Gewichte des linken Ventrikels

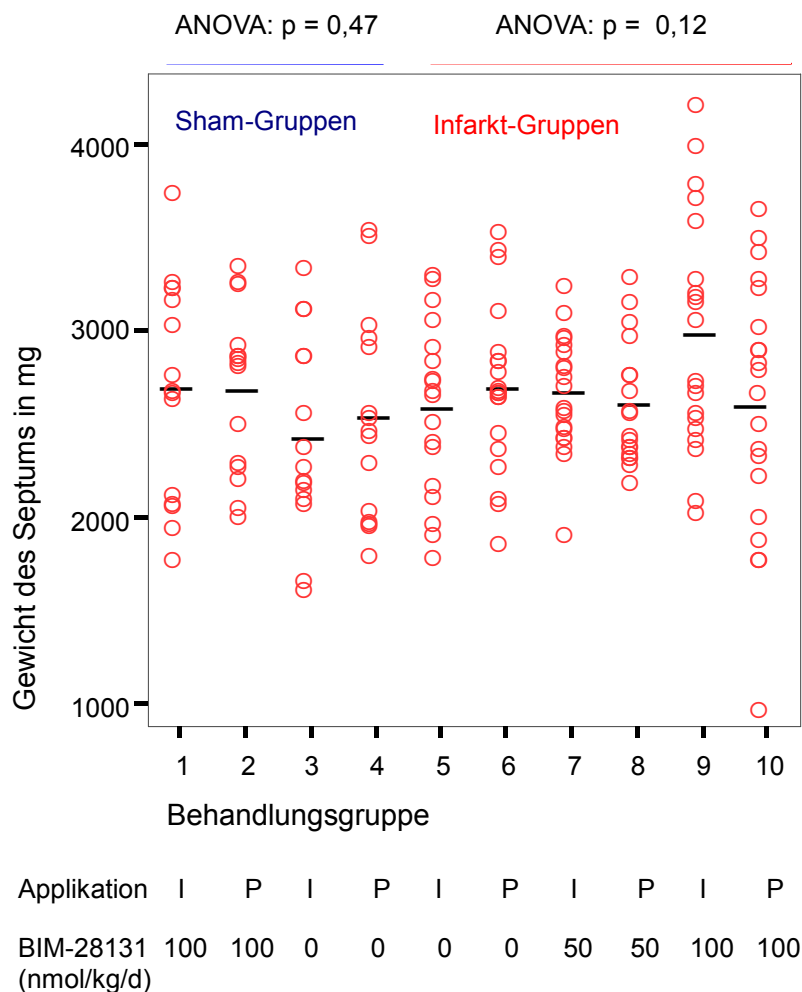
Beim Vergleich der Gruppen 1-10 (siehe Abb. 4.19) ist erkennbar, dass sich die Gewichte der linken Ventrikel in den Gruppen nicht erkennbar unterscheiden. Eine Konzentration der Gewichte im Bereich von 5000–6900mg ist deutlich. Den höchsten Mittelwert mit  $6110 \pm 137$  bzw.  $6110 \pm 157$ mg) erreichten die Gruppen 7 und 8. Die Analyse mittels ANOVA-Test ergab innerhalb der Shamgruppen einen p-Wert von:  $p = 0,10$ . Der ANOVA-Test ergab innerhalb der Infarktgruppen einen p-Wert von:  $p = 0,029$ . Die relevanten Behandlungsgruppen bezüglich der Applikationsform und der Dosierung wiesen jedoch keine Unterschiede auf ( $p > 0,05$ )



**Abb. 4.19:** Verteilung der absoluten Gewichte des linken Ventrikels mit Darstellung des Mittelwertes am Tag 56 (Studienende). Die Gruppen 1-4 zeigen die einzelnen Gewichte der linken Ventrikel der Sham-operierten Gruppen; die Gruppen 5-10 zeigen die einzelnen Gewichte der linken Ventrikel der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

### 4.3.9 Gewichte des Septums

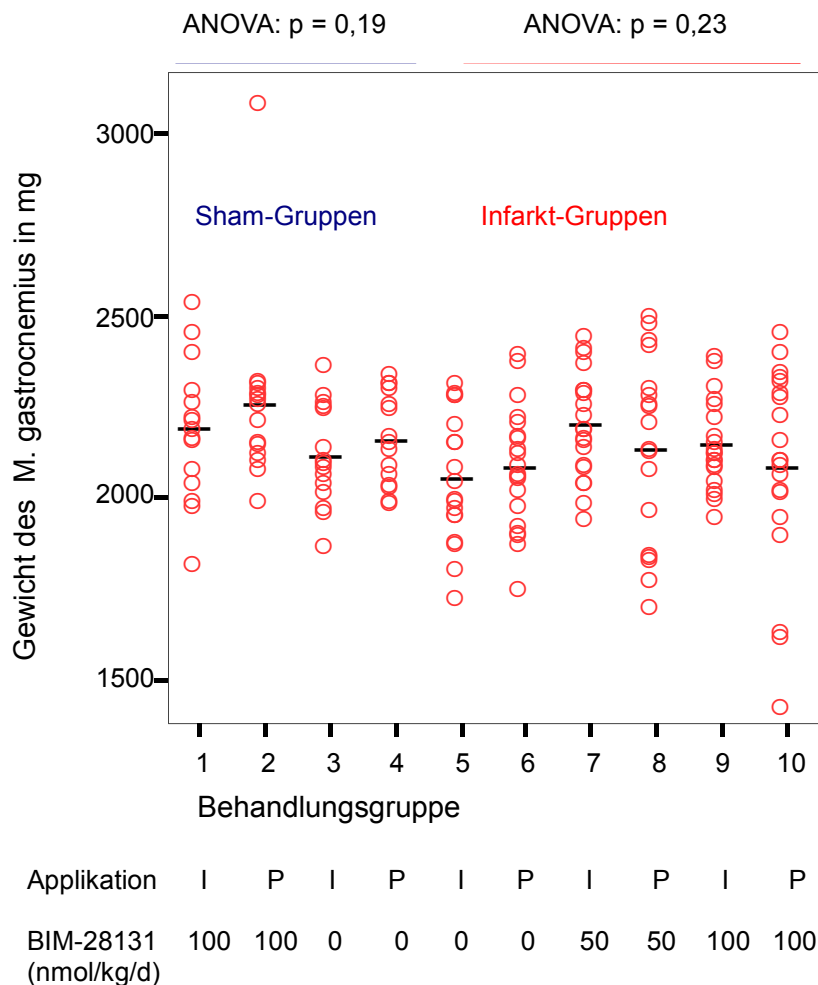
Beim Vergleich der Gruppen (siehe Abb. 4.20) ist erkennbar, dass sich die Gewichte der Septen in den Gruppen nicht erkennbar unterscheiden. Im Bereich von 2000–3500mg ist eine Häufung deutlich. Unterschiedlich Streuungsausmaße sind in den Gruppen 7 und 8 im Vergleich zu den Gruppen 9 und 10 deutlich. Die Analyse mittels ANOVA-Test ergab innerhalb der Shamgruppen einen p-Wert von:  $p = 0,47$ . Innerhalb der Infarktgruppen ergaben sich ebenso keine Unterschiede ( $p = 0,12$ ). Die Gruppe 9 wies innerhalb aller Gruppen den höchsten Mittelwert mit  $3028 \pm 14$ mg auf.



**Abb. 4.20** : Verteilung der Gewichte des Septums mit Darstellung des Mittelwertes am Tag 56 (Studienende). Die Gruppen 1-4 zeigen die einzelnen Gewichte der Septen der Sham-operierten Gruppen; die Gruppen 5-10 zeigen die einzelnen Gewichte der Septen der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

#### 4.3.10 Ergebnisse der Gewichte der untersuchten Muskel

Bei allen Tieren wurde der Musculus gastrocnemius, der M. soleus und der M. extensor digitorum longus am Studienende am Tag 56 entnommen (siehe Punkt 3.2.5). Beim Vergleich der Gewichte des Musculus gastrocnemius (siehe Abb. 4.21) ist zu erkennen, dass bei den Shamgruppen die Gruppen mit einer Pumpenimplantation eine geringere Streuung aufwiesen. Die Analyse mittels ANOVA -Test ergab für die Gewichte des M. gastrocnemius innerhalb der Shamgruppen einen p-Wert von:  $p = 0,19$ . Innerhalb der Infarktgruppen ergaben sich ebenso keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,23$ ).



**Abb. 4.21:** Verteilung der absoluten Einzelgewichte des M. gastrocnemius in den Behandlungsgruppen mit Darstellung des Mittelwertes am Tag 56 (Studienende). Die Gruppen 1-4 zeigen die einzelnen Gewichte der Sham-operierten Gruppen; die Gruppen 5-10 zeigen die einzelnen Gewichte der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

Die Analyse mittels ANOVA-Test ergab für die Gewichte des M. soleus innerhalb der Shamgruppen einen p-Wert von:  $p = 0,057$ . Innerhalb der Infarktgruppen ergaben sich ebenso keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,098$ ).

Auch die Gewichte des untersuchten M. extensor digitorum longus unterschieden sich nicht (Gruppen 1-4:  $p = 0,60$ ; Gruppen 5-10:  $p = 0,40$ ).

#### 4.3.11 Gewichte der rechten und linken Niere

Die Ergebnisse der absoluten Nierengewichte der Infarkt- und Shamgruppen werden in der Tabelle 4.16 veranschaulicht. Innerhalb der Shamgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Gewichte (rechte Niere  $p = 0,54$ ; linke Niere  $p = 0,58$ ). Auch innerhalb der Infarktgruppen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Nierengewichte ermittelt werden (rechte Niere  $p = 0,20$ ; linke Niere  $p = 0,14$ ).

**Tab. 4.16:** Absolute Nierengewichte aller Gruppen. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben. Die Gruppen 1-4 zeigen die Mittelwerte der Sham-Gruppen; die Gruppen 5-10 zeigen die Mittelwerte der Nierengewichte der Gruppen mit Infarkt. Die N-Zahl ist in der Tab. 4.15 dargestellt.

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
rechte Niere in g	12,4± 0,4	12,3± 0,3	11,9± 0,2	11,9± 0,3	11,3± 0,3	11,3± 0,3	12,1± 0,3	12,5± 0,5	11,9± 0,3	11,9± 0,3
linke Niere in g	12,6± 0,3	11,8± 0,7	11,9± 0,2	12,1± 0,3	11,3± 0,3	11,2± 0,2	12,2± 0,3	12,3± 0,5	11,9± 0,3	11,9± 0,3

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse keine Unterschiede bei den Gewichtsmessungen der untersuchten Organe, weder zwischen den Sham-Behandlungsgruppen noch zwischen den Infarkt-Behandlungsgruppen nach Injektion bzw. Applikation mittels osmotischer Pumpe des Ghrelin-Analogons BIM-28131 mit unterschiedlichen Dosierungen (Placebo, 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d). Lediglich die Gewichte der untersuchten Herzen der Infarkttiere der Gruppe 9 (BIM-28131; 100 nmol/kg/d; Injektion) waren höher als die Gewichte der Gruppe 5 (Placebo, Injektion).

#### 4.4 Analyse der Herzparameter

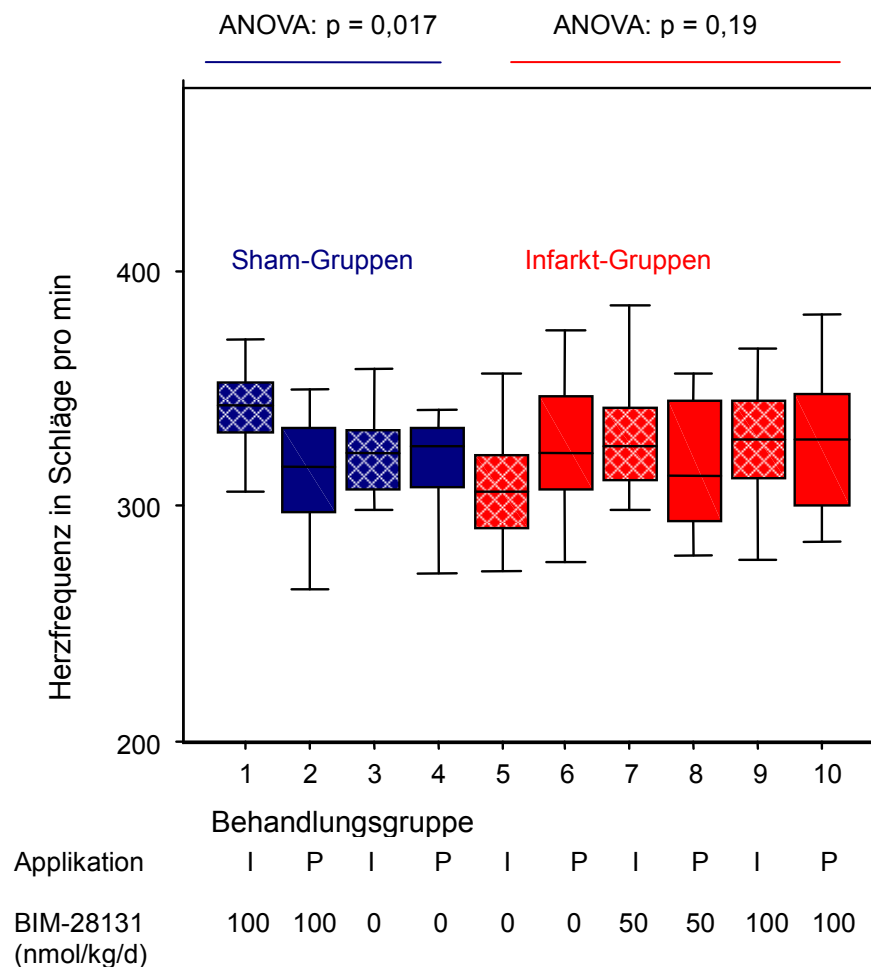
Die echokardiographische Untersuchung (siehe Kap. 3.2.4.3) wurde bei den Tieren an den Studientagen 27 (Behandlungsbeginn) und 56 (Studienende) durchgeführt und diente der Beurteilung der anatomischen Verhältnisse, z.B. der Abschätzung der Infarktgröße oder Ausmessung der Durchmesser der Ventrikel und der Beurteilung der Herzfunktion. Die Anzahl der bei der gesamten echokardiographischen Untersuchung verwendeten Tiere pro Behandlungsgruppe betrug 15-20 Tiere (siehe Tab. 4.17 und Kap. 3.2.2).

**Tab. 4.17:** Anzahl der bei der echokardiographischen Untersuchung verwendeten Tiere pro Behandlungsgruppe. Die blau markierten Gruppen (1-4) entsprechen den Sham-Gruppen. Die rot markierten Gruppen (5-10) entsprechen den Infarktgruppen. N entspricht der Tierzahl pro Gruppe.

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
N	15	13	15	15	18	20	19	16	20	17

#### 4.4.1 Herzfrequenz (HF)

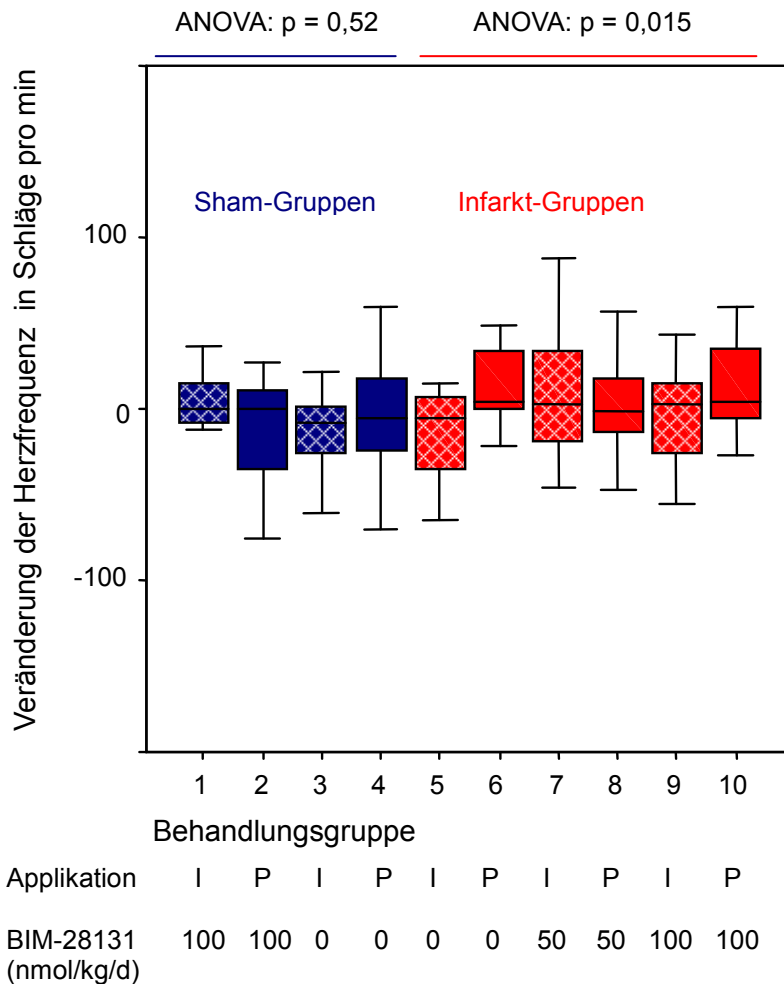
Am Studientag 27 ergab die Analyse mittels ANOVA-Test keine Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p = 0,25$ ) und den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ( $p = 0,39$ ). In der Folgeuntersuchung am Tag 56 (Abb. 4.22) ergab die Analyse mittels ANOVA-Test für die Sham-Behandlungsgruppen einen p-Wert von:  $p = 0,017$ . Der anschließende Dunnett-T3-Test ergab lediglich für die untersuchten Gruppen 1 und 2 Unterschiede ( $p = 0,029$ ). Der ANOVA-Test für die Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ergab einen p-Werte von:  $p = 0,19$ .



**Abb. 4.22:** Herzfrequenz am Tag 56. Die blauen Boxplots 1-4 zeigen die Herzfrequenzen der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots 5-10 zeigen die Herzfrequenzen der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.



Bei der Analyse der Veränderung der Herzfrequenz (siehe Abb. 4.23) von Tag 27 und 56 ergab der ANOVA-Test für die Sham-Behandlungsgruppen (1-4) einen p-Wert von:  $p = 0,52$  und für die Infarktbehandlungsgruppen (5-10) einen p-Wert von:  $p = 0,015$ . Die anschließende Prüfung von Unterschiede zwischen den relevanten Gruppen ergab nur Unterschiede zwischen den Gruppen 5 und 6 ( $p = 0,017$ ).

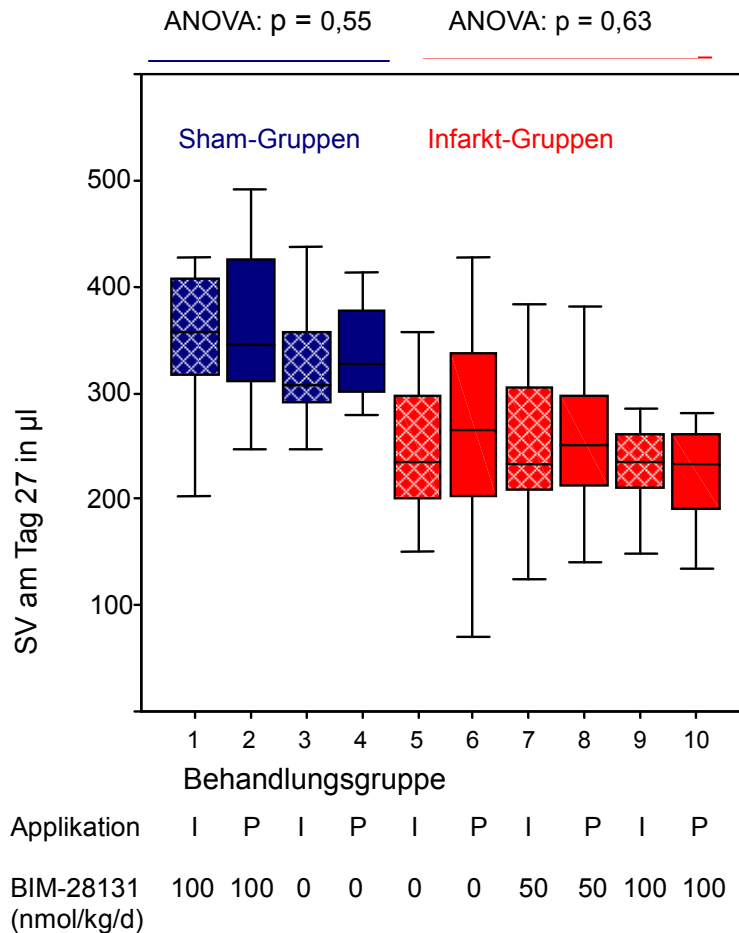


**Abb. 4.23:** Veränderung der Herzfrequenz zwischen Studientag 27 und 56. Die blauen Boxplots (1-4) zeigen die Veränderung der Herzfrequenzen der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die Veränderung der Herzfrequenzen der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

#### 4.4.2 Schlagvolumen (SV)

Das Schlagvolumen (SV) ist das Blutvolumen, das mit jedem Herzschlag aus dem Ventrikel ausgeworfen wird. Es wird berechnet aus der Differenz von enddiastolischem Volumen (EDV) und endsystolischem Volumen (ESV).

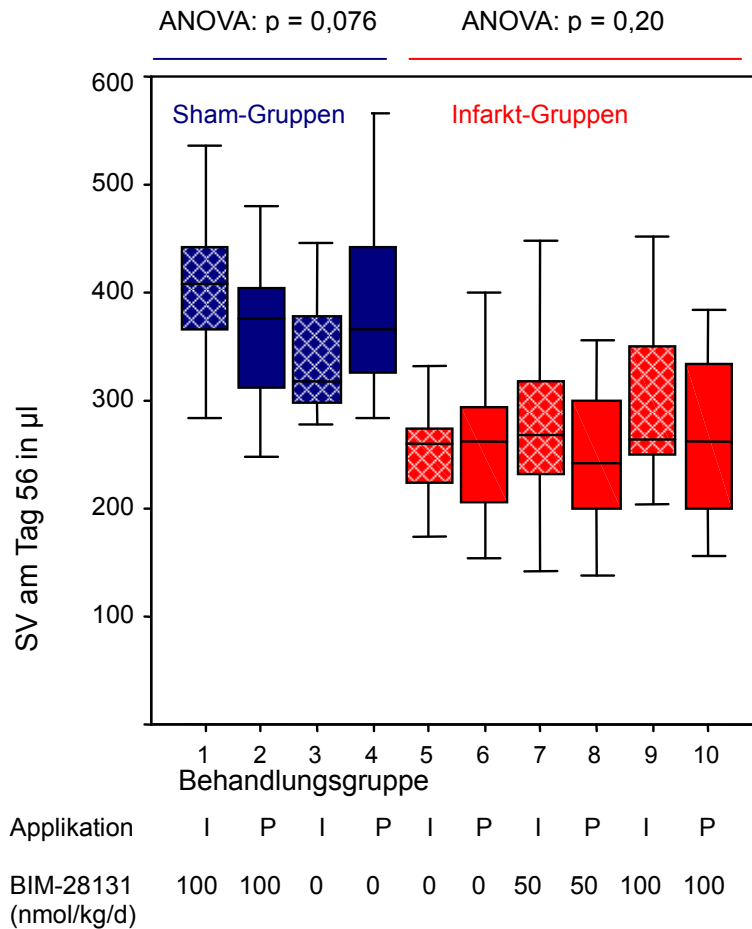
Am Behandlungstag 27 ergab die Analyse mittels ANOVA-Test keine Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p = 0,55$ ) und den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ( $p = 0,63$ ).



**Abb. 4.24:** Darstellung der Schlagvolumina der einzelnen Behandlungsgruppen vor dem Behandlungsbeginn (Tag 27). Die blauen Boxplots (1-4) zeigen die Schlagvolumina der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die Schlagvolumina der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

In der Abbildung 4.24 ist erkennbar, dass die Mittelwerte der Schlagvolumina der Sham-operierten Gruppen im Bereich von  $329 \pm 17 \mu\text{l}$  bis  $367 \pm 22 \mu\text{l}$  lagen. Die Streuung der Werte wies bei diesen Gruppen keine Unterschiede auf. Die Mittelwerte der Schlagvolumina der Infarktgruppen wiesen deutlich geringere Werte im Bereich von  $229 \pm 14 \mu\text{l}$  bis  $266 \pm 20 \mu\text{l}$  auf.

In der Folgeuntersuchung am Tag 56 (siehe Abb. 4.25) ergab die Analyse mittels ANOVA-Test für die Sham-Behandlungsgruppen 1-4 keine Unterschiede ( $p = 0,076$ ). Der ANOVA-Test für die Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ergab ebenso keine Unterschiede ( $p = 0,20$ ).



**Abb. 4.25:** Darstellung der Schlagvolumina der einzelnen Behandlungsgruppen am Tag 56 (Behandlungsende). Die blauen Boxplots (1-4) zeigen die Schlagvolumina der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die Schlagvolumina der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

Bei der Analyse der Differenzen beider Behandlungstage ergab der ANOVA-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sham-Gruppen ( $p = 0,34$ ). Der ANOVA-Test für die Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ergab einen p-Wert von:  $p = 0,043$ . Der anschließende Dunnett-T3-Test ergab jedoch für die relevanten Gruppen, entsprechend den Hauptfragestellungen keine Unterschiede. Tendenziell war jedoch eine Verbesserung des Schlagvolumens (siehe Tab. 4.18) besonders in der Gruppe 9 von  $237\mu\text{l}$  auf  $300\mu\text{l}$  zu erkennen.

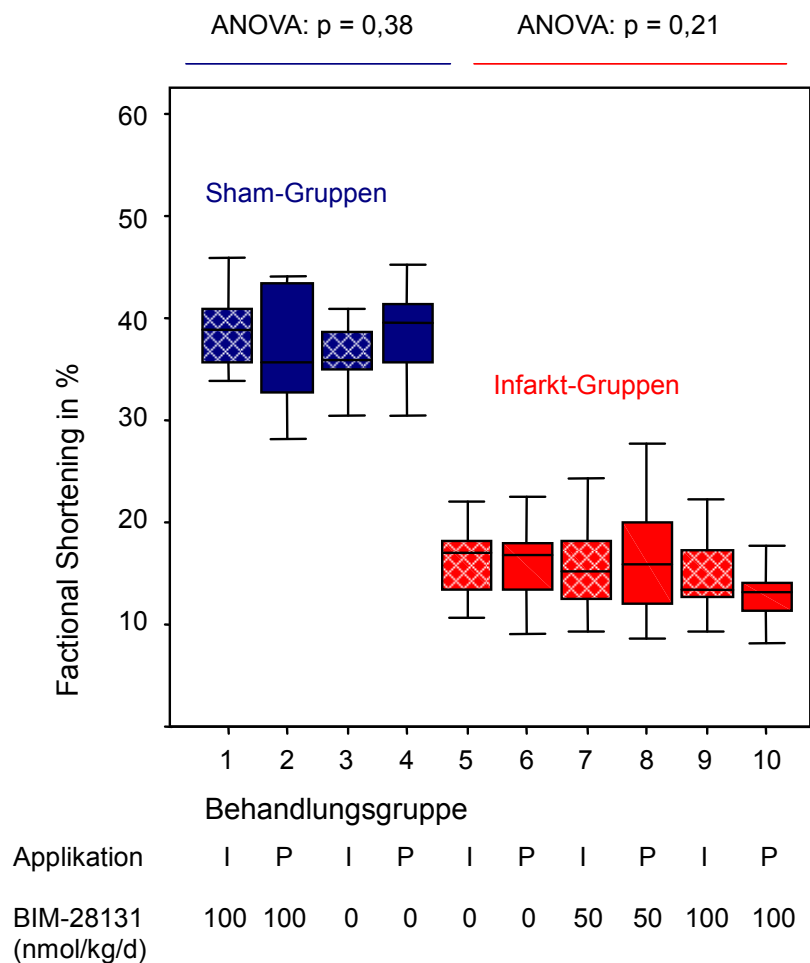
**Tab. 4.18** Veränderung des Schlagvolumens zwischen Studientag 27 und 56. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben. Die Gruppen 1-4 zeigen die Mittelwerte der Sham-Gruppen; die Gruppen 5-10 zeigen die Mittelwerte der Gruppen mit Infarkt.

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
SV(µl)	45	-4	9	30	0	-6	14	-7	63	36
± SEM	20	22	23	15	15	23	16	17	15	21

#### 4.4.3 Linksventrikuläres Fractional Shortening (LVFS)

Das LVFS oder die linksventrikuläre Verkürzungsfraction ist ein Maß für die Pumpfunktion des Herzens. Es wird aus dem linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) und dem linksventrikulären endsystolischen Durchmessers (LVESD) berechnet und als relativer Wert in % angegeben (Formel:  $(LVEDD - LVESD)/LVEDD \times 100$ ).

Am Behandlungstag 27 ergab die Analyse mittels ANOVA-Test jeweils keine Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 und zwischen den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 (siehe Abb. 4.26).



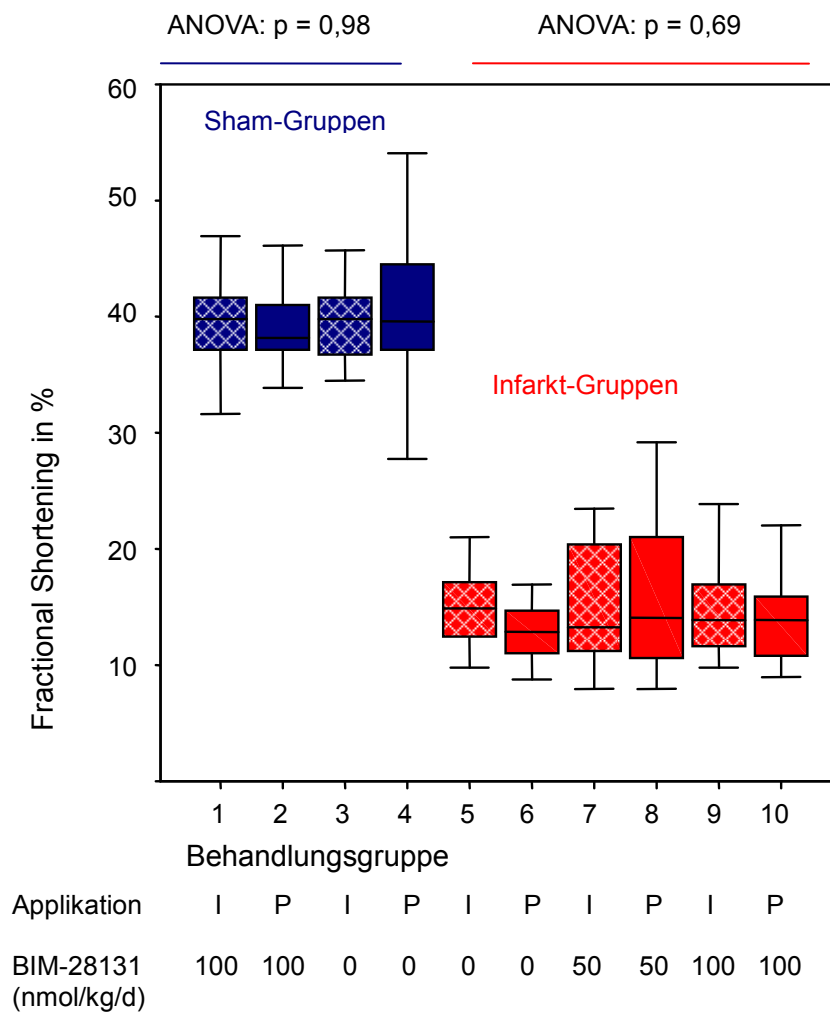
**Abb. 4.26:** Fractional Shortening (FS) der einzelnen Behandlungsgruppen am Tag 27. Die blauen Boxplots (1-4) zeigen das FS der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen das FS der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

Generell erkennbar ist dabei, dass die Shamgruppen am Tag 27 (siehe Abb. 4.26 und Tab. 4.19) ein deutlich höheres LVFS als die Infarktgruppen hatten, wobei das LVFS aller Sham-Tiere um 40% lag. Die Infarkt-Tiere wiesen ein wesentlich geringeres LVFS von ca. 15% auf. Die Gruppe 10 wies hierbei das niedrigste LVFS von  $12,9 \pm 0,6\%$  auf.

**Tab. 4.19:** LVFS der einzelnen Behandlungsgruppen vor dem Behandlungsbeginn (Tag 27). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben. Die Gruppen 1-4 zeigen die Mittelwerte der Sham-Gruppen; die Gruppen 5-10 zeigen die Mittelwerte der Gruppen mit Infarkt.

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LVFS(%)	38,6	37,5	36,3	39,6	16,6	16,2	15,9	16,8	15,5	12,9
±SEM	1,2	1,6	1	1,6	0,9	0,7	1	1,5	1,5	0,6

In der Verlaufsuntersuchung am Behandlungstag 56 (siehe Abb. 4.27) ergab die Analyse mittels ANOVA-Test keine Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 und zwischen den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10.



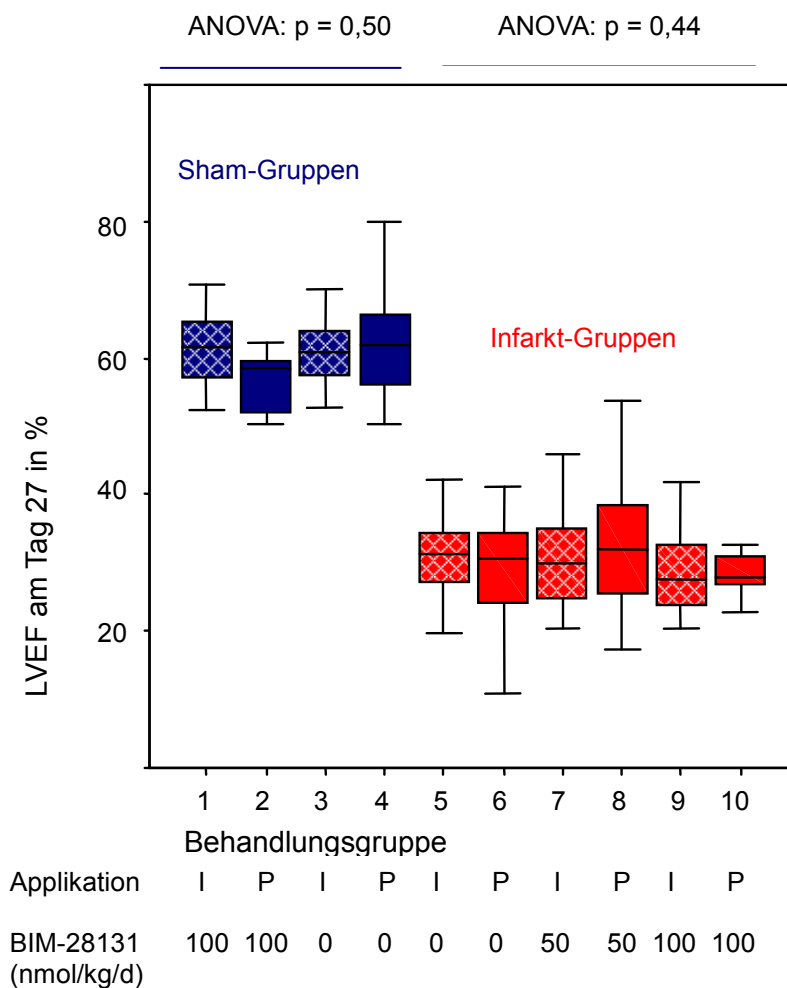
**Abb. 4.27:** Fractional Shortening der einzelnen Behandlungsgruppen am Tag 56. Die blauen Boxplots (1-4) zeigen das FS der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen das FS der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

Bei der Analyse der Differenzen beider Behandlungstage ergab der ANOVA-Test ebenso keine Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 (p = 0,82) und den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 (p = 0,12).

#### 4.4.4 Linksventrikuläre Ejektionsfraction (LVEF)

Die Funktion des linken Ventrikels und dessen Auswurfvolumens lässt sich durch die Erfassung der LVEF bestimmen. Die LVEF ist der Anteil des vom Herzen bei einer Kontraktion ausgeworfenen Blutes im Verhältnis zum Gesamtvolumen der linken Herzkammer.

Am Behandlungstag 27 ergab die Analyse mittels ANOVA-Test keine Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 und zwischen den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10.



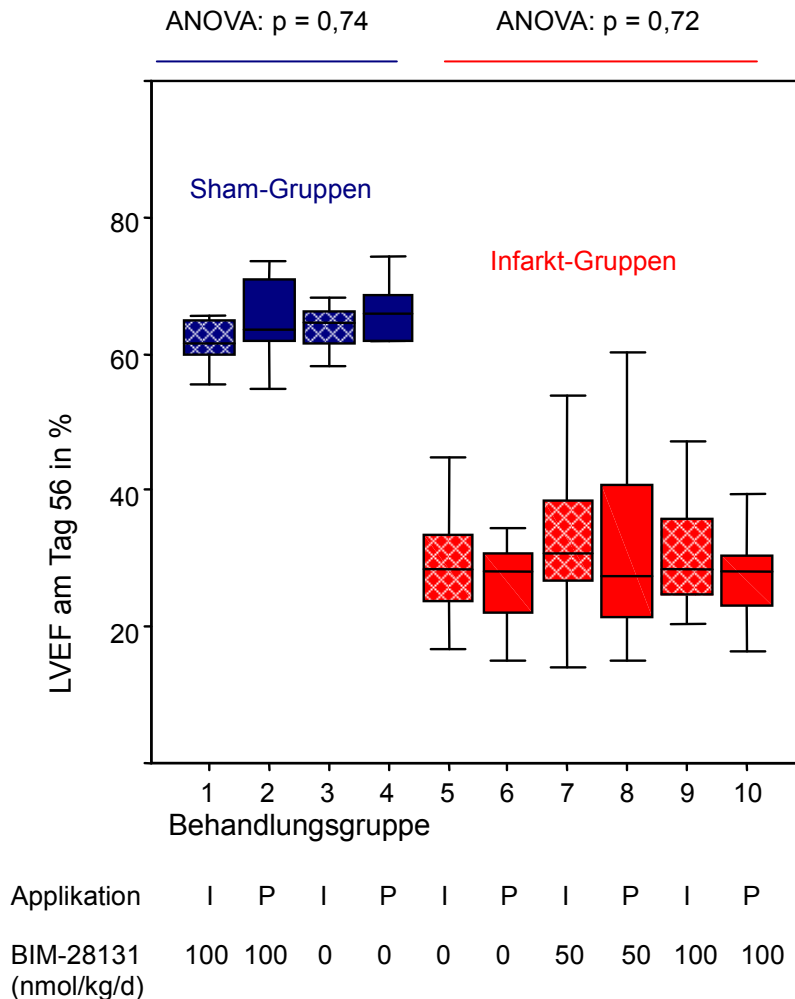
**Abb. 4.28:** Linksventrikuläre Ejektionsfraction der einzelnen Behandlungsgruppen vor dem Behandlungsbeginn (Tag 27). Die blauen Boxplots (1-4) zeigen die LVEF der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die LVEF der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

In der Abbildung 4.28 und der Tabelle 4.20 ist erkennbar, dass die LVEF der Shamgruppen am Tag 27 um die 60% betragen. Die LVEF der Infarktgruppen wiesen deutlich geringere Werte auf, die im Bereich von 30% lagen. Die Gruppe 10 wies die geringste LVEF mit einem arithmetischen Mittel von  $27 \pm 1,2\%$  auf.

**Tab. 4.20:** LVEF der einzelnen Behandlungsgruppen vor dem Behandlungsbeginn (Tag 27). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben. Die Gruppen 1-4 zeigen die Mittelwerte der Sham-Gruppen; die Gruppen 5-10 zeigen die Mittelwerte der Gruppen mit Infarkt.

Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LVEF(%)	61,4	58,4	60,9	62,1	31,9	29,4	30,7	32,6	29,8	27,3
±SEM	1,4	2,1	1,3	2,1	1,6	1,6	1,8	2,7	2,0	1,2

In der Verlaufsuntersuchung (siehe Abb. 4.29) am Tag 56 zeigte sich keine wesentliche Änderung des LVEF. Die Analyse mittels ANOVA-Test ergab ebenso keine Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p = 0,74$ ) und den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ( $p = 0,72$ ).



**Abb. 4.29:** Linksventikuläre Ejektionsfraktion der einzelnen Behandlungsgruppen am Tag 56. Die blauen Boxplots 1-4 zeigen die LVEF der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots 5-10 zeigen die LVEF der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

Bei der Analyse der Differenzen beider Behandlungstage ergab die ANOVA keine signifikanten Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p = 0,24$ ) und den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ( $p = 0,54$ ).

#### 4.4.5 Herzminutenvolumen (HMV)

Das Herzminutenvolumen (HMV) ist aus dem Schlagvolumen und der Herzfrequenz berechenbar ( $\text{HMV} = \text{Herzfrequenz} \times \text{Schlagvolumen}$ ). Das Schlagvolumen und die Herzfrequenz können aus der Echokardiografie abgeschätzt werden. Das HMV ist ein Maß für die Pumpleistung des Herzens.

Die HMV der Shamgruppen vor dem Behandlungsbeginn (Tag 27) lagen zwischen 110ml/min und 122ml/min (siehe Tab. 4.21). Die HMV der Infarktgruppen wiesen deutlich geringere Werte auf, die im Bereich von 72ml/min und 84ml/min lagen. Die Gruppe 10 wies hierbei das geringste HMV auf.

**Tab. 4.21:** HMV der einzelnen Behandlungsgruppen vor Behandlungsbeginn (Tag 27). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardfehler angegeben. Die Gruppen 1-4 zeigen die Mittelwerte der Sham-Gruppen; die Gruppen 5-10 zeigen die Mittelwerte der Gruppen mit Infarkt.

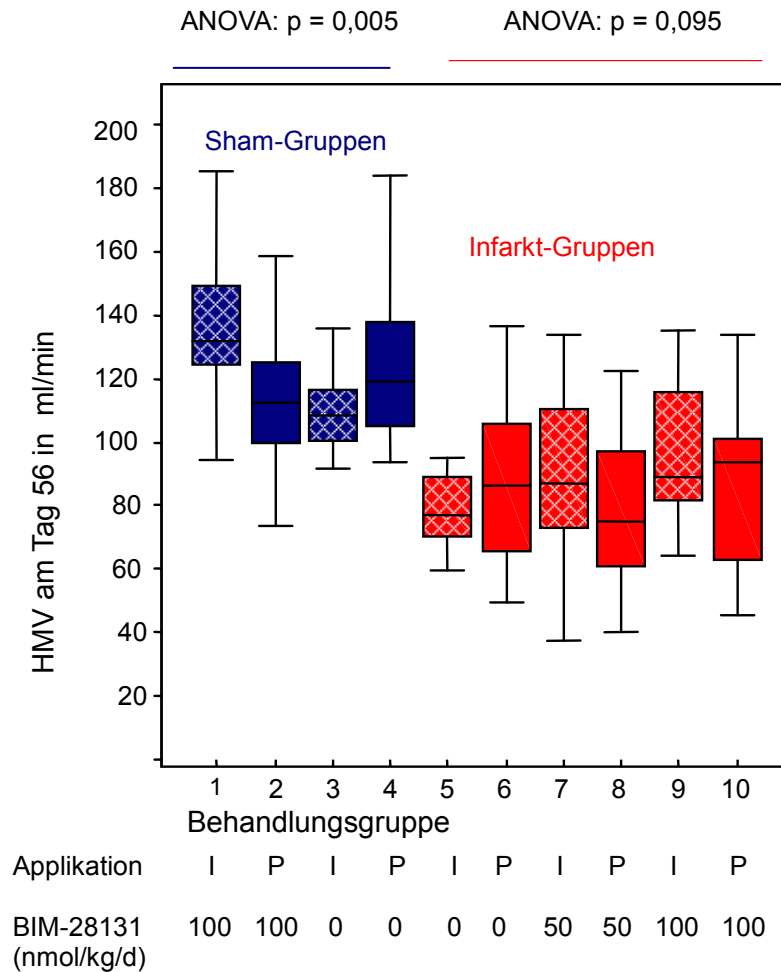
Gruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
HMV(ml/min)	121,8	118,0	109,9	114,0	81,2	84,3	81,9	79,6	77,5	72,5
$\pm$ SEM	6,3	7,1	6,1	5,7	4,7	7,1	5,4	5,1	3,3	4,9

Am Studientag 27 ergab die Analyse mittels ANOVA-Test keine Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p = 0,57$ ) und den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ( $p = 0,69$ ).

In der Verlaufsuntersuchung am Tag 56 (siehe Abb. 4.30) wiesen die Shamgruppen ähnliche Werte wie in der ersten Untersuchung auf. Einige Infarktgruppen zeigten jedoch ein höheres HMV, wie die Gruppe 7 (von 81,9ml/min auf 89ml/min), die Gruppe 9 (77,5ml/min auf 97ml/min) und die Gruppe 10 (von 72,5ml/min auf 87ml/min).

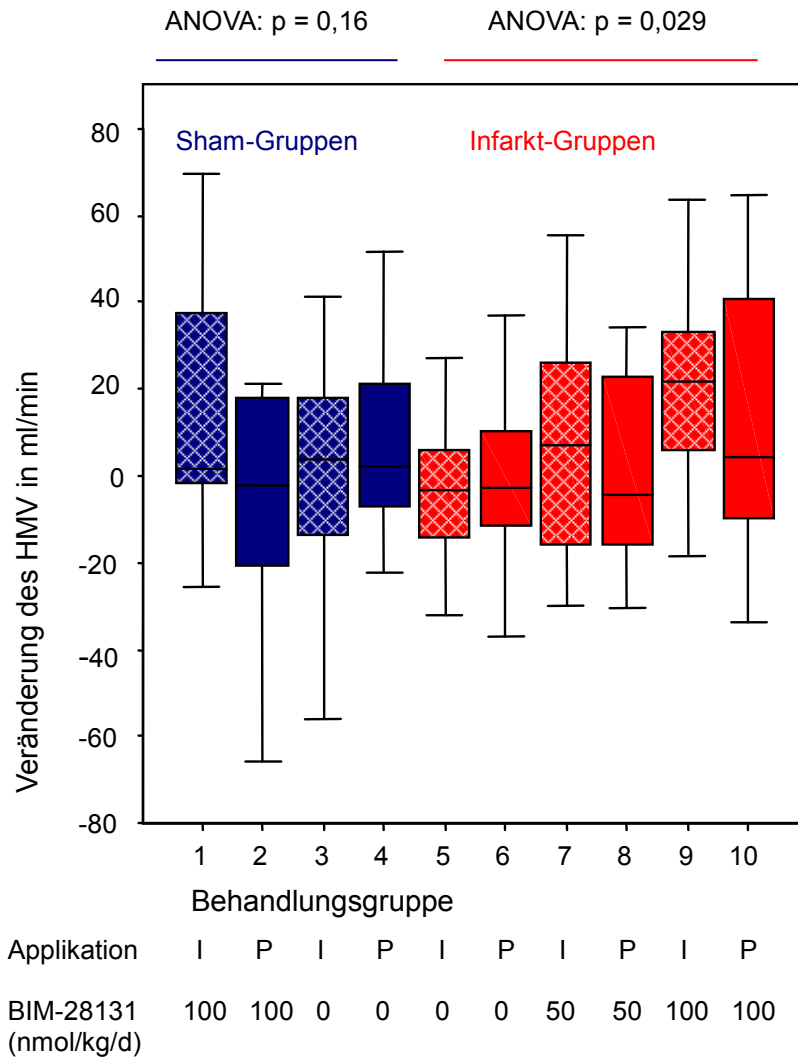
Die Analyse mittels ANOVA-Test ergab für die Sham-Behandlungsgruppen einen p-Wert von:  $p = 0,005$ . Der anschließende Dunnett-T3-Test ergab lediglich für die untersuchten Gruppen 1 und 3 einen Unterschied ( $p = 0,005$ ). Der ANOVA-Test für die Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ergab einen p-Wert von:  $p = 0,095$ .





**Abb. 4.30:** Herzleistung der einzelnen Behandlungsgruppen am Tag 56. Die blauen Boxplots 1-4 zeigen die HMV der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots 5-10 zeigen die HMV der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

Bei der Analyse der Differenzen beider Behandlungstage (siehe Abb. 4.31) ergab die ANOVA zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p = 0,16$ ) keine Unterschiede. Zwischen den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ergaben sich Unterschiede ( $p = 0,029$ ). Der anschließende Dunnett-T3-Test zur Prüfung von Unterschieden zwischen den relevanten Infarkt-Behandlungsgruppen, ergab nur für die Gruppen 5 und 9 ( $p = 0,008$ ) einen Unterschied. Die höchste Verbesserung des HMV war dabei in den Gruppen 9 ( $19,9 \pm 4,9$  ml) zu verzeichnen.



**Abb. 4.31:** Veränderung der Herzleistung der Behandlungsgruppen zwischen dem Behandlungsbeginn (Tag 27) und dem Behandlungsende (Tag 56). Die blauen Boxplots (1-4) zeigen die Veränderungen der HMV der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die Veränderungen der HMV der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

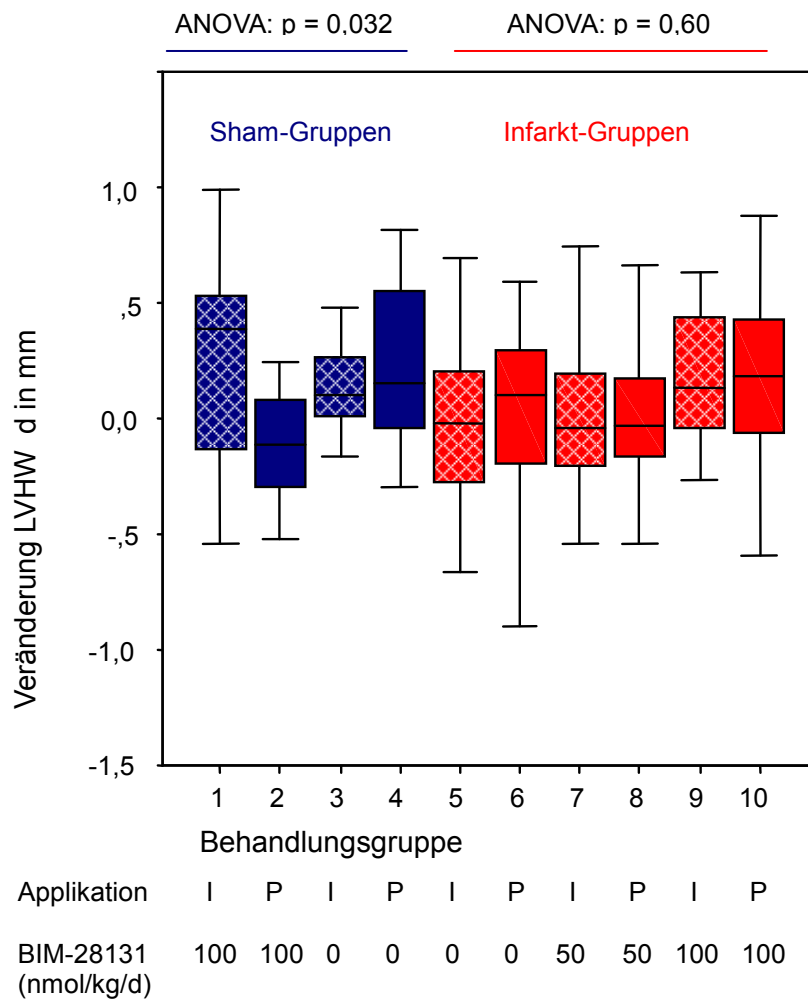
#### 4.4.6 Linksventrikuläre Hinterwanddicke diastolisch (LVHW d)

Um ein Maß für eine eventuelle Hypertrophie zu haben und um die Wanddicken der linksventrikulären Hinterwand zwischen den Behandlungsgruppen zu vergleichen, wurden das LVHW in der Diastole gemessen.

Am Studientag 27 ergab die Analyse mittels ANOVA-Test keine Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p = 0,19$ ) und zwischen den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ( $p = 1,0$ ). Am Behandlungsende (Tag 56) ergab die Analyse mittels ANOVA-Test ebenso keine Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p = 0,15$ ) und den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ( $p = 0,47$ ).

Bei der Analyse der Differenzen beider Behandlungstage (siehe Abb. 4.32) ergab der ANOVA-Test zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p = 0,032$ ) und zwischen den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ( $p = 0,60$ ) jeweils keine Unterschiede.

Der anschließende Dunnett-T3-Test zur Prüfung von Unterschieden zwischen den relevanten Sham-Behandlungsgruppen, ergab nur für die Gruppen 2 und 4 ( $p = 0,014$ ) Unterschiede.

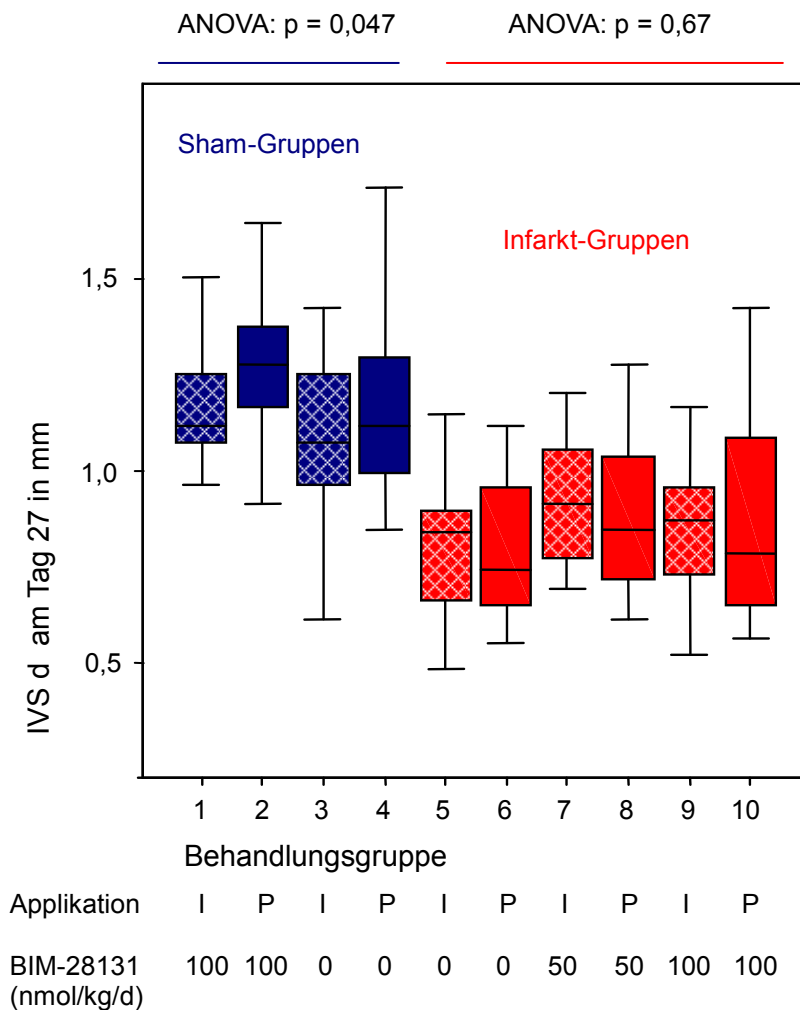


**Abb. 4.32:** Veränderung der linksventikulären Hinterwanddicke in der Diastole der einzelnen Behandlungsgruppen zwischen Tag 27 und Tag 56. Die blauen Boxplots (1-4) zeigen die Veränderungen der LVHW in der Diastole der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die Veränderungen der LVHW in der Diastole der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

#### 4.4.7 Interventrikularseptum diastolisch (IVS d)

Um ein Maß für eine eventuelle Hypertrophie zu haben und die Wanddicken des interventrikulären Septums (IVS) zwischen den Behandlungsgruppen zu vergleichen, wurden das IVS in der Diastole gemessen.

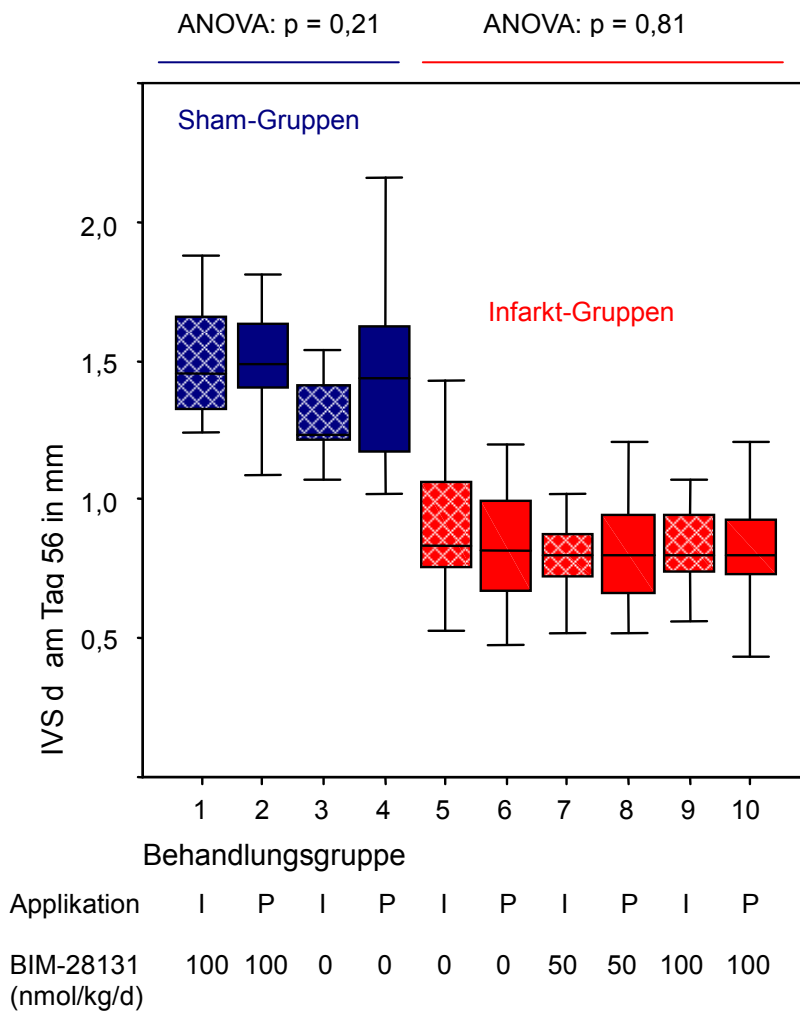
Am Studientag 27 (Behandlungsbeginn) (siehe Abb. 4.33) ergab die Analyse mittels ANOVA-Test Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p = 0,047$ ). Der anschließende Dunnett-T3-Test zur Prüfung von Unterschieden entsprechend den Hauptfragestellungen ergab keine Unterschiede zwischen den Sham-Behandlungsgruppen. Zwischen den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ergaben sich mittels ANOVA-Test keine Unterschiede ( $p = 0,67$ ).



**Abb. 4.33:** Darstellung der Dicke des IVS in der Diastole der einzelnen Behandlungsgruppen vor dem Behandlungsbeginn (Tag 27). Die blauen Boxplots (1-4) zeigen die Dicken des IVS in der Diastole der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die Dicken des IVS in der

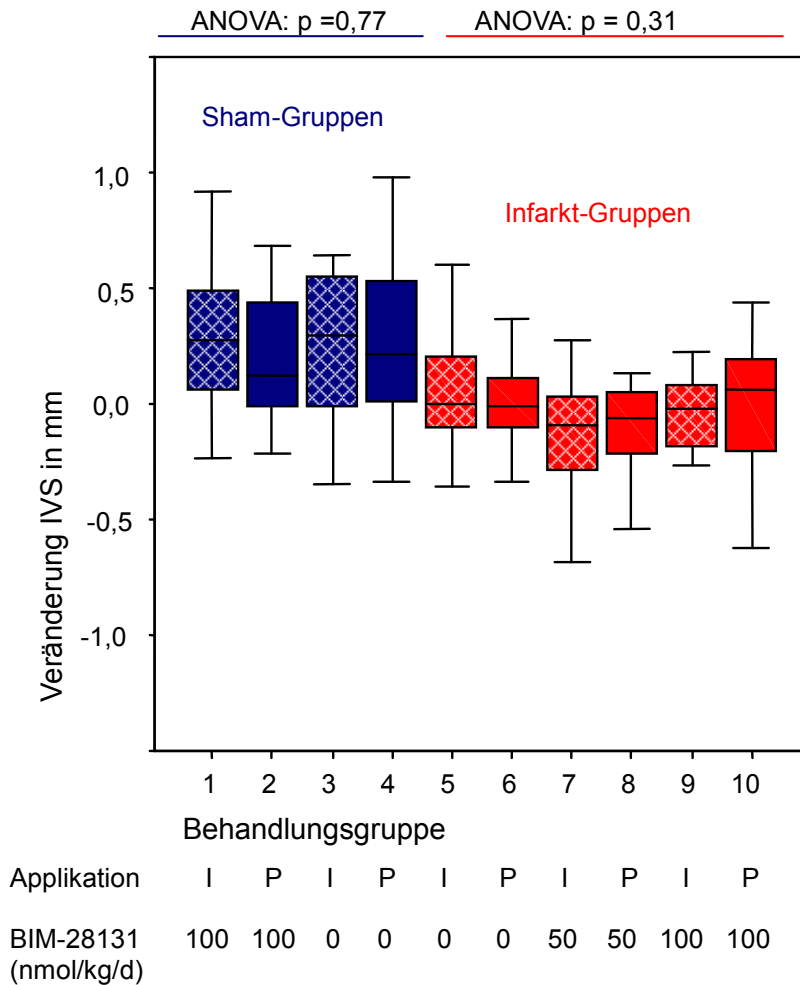
Diastole der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

In der Folgeuntersuchung (siehe Abb. 4.34) am Tag 56 (Versuchsende) ergab die Analyse mittels ANOVA-Test zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p = 0,21$ ) und zwischen den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ( $p = 0,81$ ) jeweils keine Unterschiede.



**Abb. 4.34:** Darstellung der Dicke des IVS in der Diastole der einzelnen Behandlungsgruppen am Tag 56. Die blauen Boxplots (1-4) zeigen die Dicken des IVS in der Diastole der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die Dicken des IVS in der Diastole der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

Bei der Analyse der Veränderungen der Dicke des IVS beider Behandlungstage (siehe Abb. 4.35) ergab der ANOVA-Test zwischen den Sham-Behandlungsgruppen 1-4 ( $p = 0,77$ ) und zwischen den Infarkt-Behandlungsgruppen 5-10 ( $p = 0,31$ ) jeweils keine signifikanten Unterschiede.



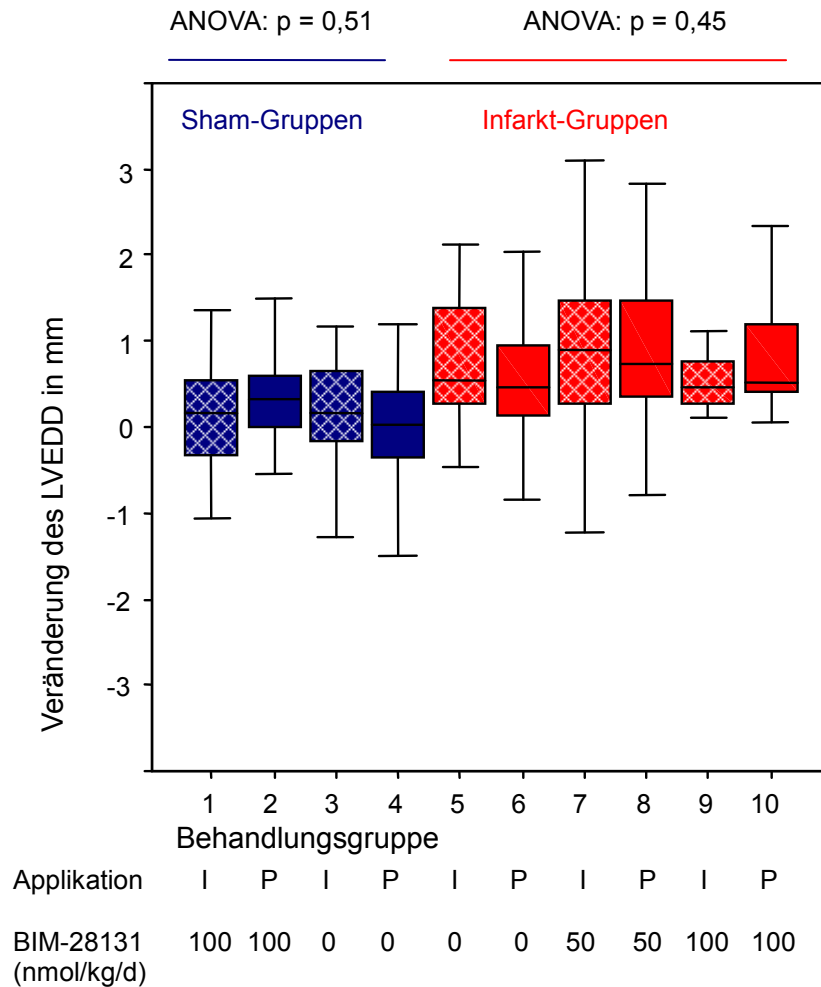
**Abb. 4.35:** Veränderung der Dicke des IVS der Behandlungsgruppen zwischen Versuchstag 27 und 56. Die blauen Boxplots (1-4) zeigen die Veränderungen der Dicken des IVS in der Diastole der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die Veränderungen der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

#### 4.4.8 Linksventrikulärer Enddiastolischer Durchmesser (LVEDD)

Die Analyse der Messwerte vor Behandlungsbeginn (Tag 27) mittels ANOVA-Test ergab zwischen den Sham-Gruppen 1-4 keine Unterschiede ( $p = 0,68$ ). Zwischen den Infarkt-Gruppen 5-10 ergab die Analyse mittels ANOVA-Test Unterschiede ( $p = 0,048$ ). Der anschließende Dunnett-T3-Test zur Prüfung von Unterschieden entsprechend den Hauptfragestellungen ergab keine Unterschiede zwischen den relevanten Infarkt-Gruppen.

In der Folgeuntersuchung am (Tag 56) ergab der ANOVA-Test zwischen den Sham-Gruppen ( $p = 0,52$ ) und zwischen den Infarkt-Gruppen 5-10 ( $p = 0,19$ ) jeweils keine Unterschiede.

Bei der Analyse der Veränderungen des Linksventrikulären Enddiastolischen Durchmessers beider Behandlungstage (siehe Abb. 4.36) ergab der ANOVA-Test zwischen den Sham-Gruppen 1-4 ( $p = 0,51$ ) und zwischen den Infarkt-Gruppen 5-10 ( $p = 0,45$ ) jeweils keine Unterschiede.



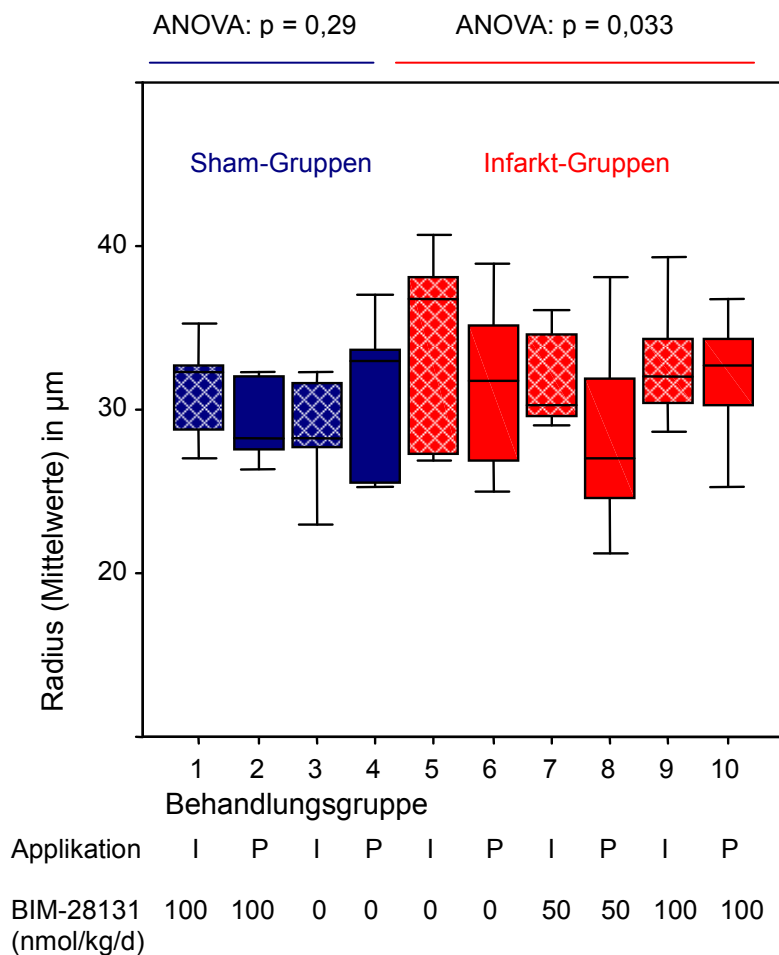
**Abb. 4.36:** Veränderung der Dicke des LVEDD der Behandlungsgruppen zwischen Versuchstag 27 und 56. Die blauen Boxplots (1-4) zeigen die Veränderungen des LVEDD der Sham-operierten Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die Veränderungen der Gruppen mit Infarkt. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der echokardiographischen Untersuchung keine systematischen Unterschiede in der Wirkung der verwendeten Applikationsarten (Pumpe vs. Injektion) des verwendeten Ghrelin-Analogons BIM 28131 auf die Herzfunktion. Lediglich geringe Verbesserungen sind bei einigen Parametern, wie dem HMV (Gruppe 1 vs. 3 und Gruppe 5 vs. 9) zu bemerken. Eine tendenzielle Erhöhung des Schlagvolumens konnte in der Gruppe 9 (Infarktgruppe: Placebo vs. 100nmol/kg/d) beobachtet werden.

#### 4.5 Auswertung der Flächenmessungen der Muskelzellfasern des *M. gastrocnemius* und des *M. extensor digitorum longus*

Anhand der Flächenbestimmung der Muskelzellfasern des *M. gastrocnemius* und des *M. extensor digitorum longus* sollte ein Einfluss des Ghrelin-Analogons BIM-28131 auf das Wachstum der Muskelfaserzellen überprüft werden.

Für die Flächenbestimmung der Muskelzellfasern wurden zufällig 10 Tiere pro Gruppe ausgewählt und davon jeweils bei 30 Muskelzellen der Flächeninhalt bestimmt. Durch anschließende Radiusbestimmung mittels der Formel:  $A=r^2 \times \pi$  konnten die Zellen auf Unterschiede in der Größe (siehe Abb. 4.37 und Tab. 4.22) untersucht werden. Als Einschlusskriterium wurden quer geschnittene Muskelzellen mit mehreren randständigen Zellkernen verwendet. Die anschließende Analyse mittels ANOVA-Test ergab zwischen den Sham-Gruppen 1-4 keine Unterschiede ( $p = 0,29$ ). Zwischen den Infarkt-Gruppen 5-10 ergab die Analyse mittels ANOVA-Test Unterschiede ( $p = 0,033$ ). Der anschließende Dunnett-T3-Test zur Prüfung von Unterschieden entsprechend den Hauptfragestellungen ergab keine Unterschiede zwischen den Infarkt-Gruppen.



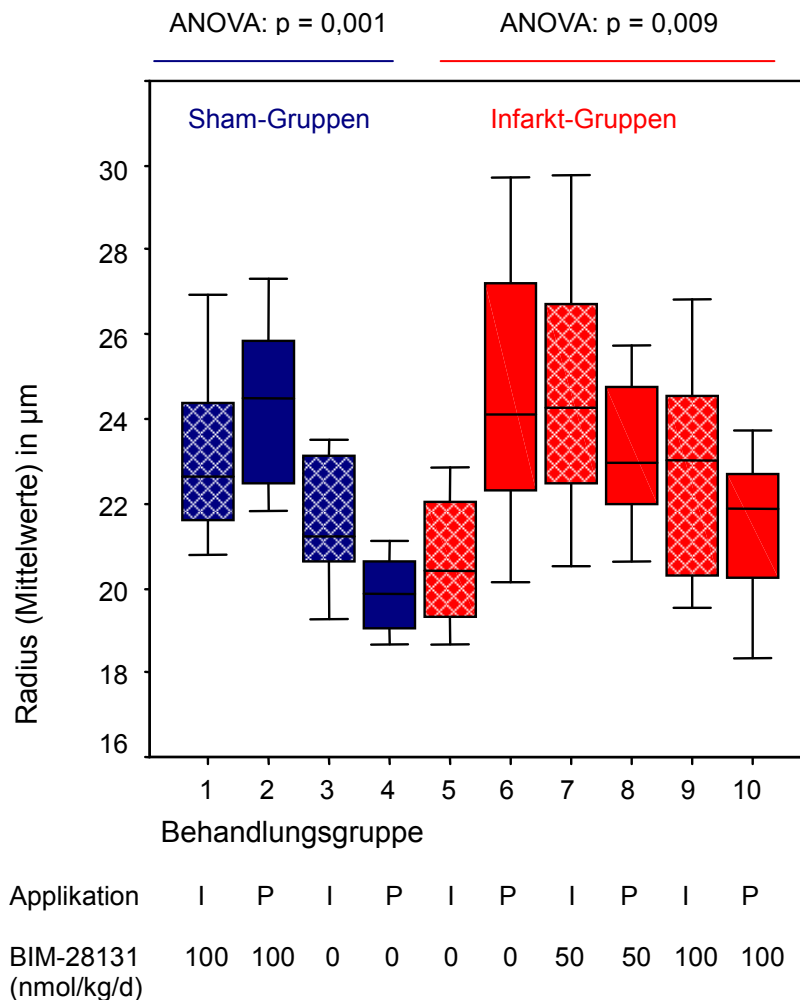
**Abb. 4.37:** Radien der Muskelzellfasern des M. gastrocnemius der Behandlungsgruppen am Versuchsende (Tag 56). Die blauen Boxplots (1-4) zeigen die Radien der Muskelzellfasern des M. gastrocnemius der Sham-Gruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die Radien der Muskelzellfasern des M. gastrocnemius der Infarktgruppen. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe. Per Zufall wurden für die Untersuchung 10 Tiere pro Gruppe ausgewählt.



**Tab. 4.22:** Absolute Mittelwerte und Standardfehler der Radien der Muskelzellfasern des M. gastrocnemius. Für die Flächenbestimmung wurden zufällig 10 Tiere pro Gruppe ausgewählt.

Tiergruppe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mittelwert in $\mu\text{m}$	32,3	29,2	29,3	30,8	34,6	31,1	31,8	28,2	33,6	32,8
S.E.M.	1,5	0,7	1,3	1,5	1,7	1,4	0,9	1,5	1,5	1,0

Bei der statistischen Untersuchung der Radien der Muskelzellfasern des M. extensor digitorum longus ergab die Analyse mittels ANOVA-Test für die Shamgruppen Unterschiede ( $p = 0,001$ ). Für die Infarktgruppen 5-10 ergab die Analyse ebenso Unterschiede ( $p = 0,009$ ). Der anschließende Dunnett-T3-Test zur Prüfung von Unterschieden entsprechend der Fragestellung ergab jedoch nur Unterschiede zwischen den Gruppen 2 und 4 ( $p = 0,001$ ) und den Gruppen 5 und 7 ( $p = 0,041$ ).



**Abb. 4.38:** Radien der Muskelzellfasern des M. extensor digitalis longus der Behandlungsgruppen. Die blauen Boxplots (1-4) zeigen die Radien der Muskelzellfasern des M. extensor digitalis longus der Shamgruppen; die roten Boxplots (5-10) zeigen die Radien der Muskelzellfasern des M. extensor digitalis longus der Infarktgruppen. I entspricht der Applikation mittels Injektion; P entspricht der Applikation mittels osmotischer Pumpe. Per Zufall wurden für die Untersuchung 10 Tiere pro Gruppe ausgewählt.

Zusammenfassend machen die Ergebnisse der Untersuchung kaum einen Einfluss des Ghrelin-Analogons BIM-28313 auf die Größe der Muskelzellfasern der ausgewählten Muskel deutlich.

Lediglich bei der Untersuchung des M. extensor digitorum longus ergab die Analyse Unterschiede zwischen den Sham-Gruppen 2 vs. 4 (BIM-28131: 100 nmol/kg/d; Pumpe vs. Placebo, Pumpe) sowie zwischen den Infarkt-Gruppen 5 vs. 7 (Placebo, Injektion vs. BIM-28131: 50 nmol/kg/d; Injektion). Dies könnte einen positiven Einfluss des Ghrelin-Analogons BIM-28313 auf die Radien der Muskelzellfasern deutlich machen, der aber nicht mit einer größeren Muskelmasse des Muskels vergesellschaftet war (Kap. 4.3.10).

## **5. Diskussion**

Gewichtsverlust, d.h. Kachexie aufgrund einer Herzinsuffizienz ist ein Hinweis für eine schlechte Prognose (Anker et al., 2004). In dieser Studie wurden die Effekte des appetitstimulierenden Hormons Ghrelin in zwei verschiedenen Applikationsformen (subcutane Injektion vs. osmotische Pumpe) an einem Rattenmodell mit Herzinsuffizienz getestet. Dabei wurde der Schwerpunkt der Untersuchung auf die Gewichtsentwicklung gelegt. Daneben wurden auch die Körperzusammensetzung, die kardiale Funktion und bestimmte Organgewichte untersucht.

### **5.1 Infarktgrößen**

Die Infarktgröße wurde prozentual zur Größe des gesamten linken Ventrikels bestimmt. Die planimetrisch ermittelte Infarktgröße des linken Ventrikels (im Mittel  $48,3 \pm 1,02\%$ ) war im Vergleich zu einer früheren Ghrelinstudie von Nagaya (Nagaya et al., 2001a) größer (Placebo  $37 \pm 6\%$ ; Ghrelin:  $36 \pm 7\%$ ). Die ermittelten Infarktgrößen der Ratten als auch die Streuung der Werte waren von der verwendeten Methode abhängig. Zwischen den Infarktgruppen (5-10) waren die Infarktgrößen statistisch nicht unterschiedlich ( $p = 0,2$ ).

### **5.2 Gewichtsentwicklung**

Um einen Einfluss der Thorakotomie auf die Gewichtsentwicklung auszuschließen, wurden in der Studie vier Gruppen Sham-operiert. Von diesen vier Gruppen wurden zwei Gruppen mit jeweils 15 Tieren (s.c. Injektion und osmotische Pumpe) mit einem Placebo behandelt (siehe Kapitel 3.2). Die Analyse der Körpergewichte der Tiere kurz vor der Behandlung (siehe Kapitel 4.1) ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen, so dass von ähnlichen Ausgangsgewichten ausgegangen werden kann ( $339,8g \pm 1,8$ ). Eine Ödembildung auf Grund der Funktionseinschränkung des Herzens konnte durch die tägliche Verabreichung des Diuretikums Furosemid ab Studientag 14 ausgeschlossen werden, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass sich trotz Entwicklung einer deutlichen CHI (siehe Kapitel 4.4) keine Kachexie entwickelt hatte. Tschöp und Mitarbeiter (2000) zeigten in Studien, dass die tägliche Verabreichung von Ghrelin ein Ansteigen des Körpergewichtes durch einen reduzierten Fettstoffwechsel in Ratten hervorruft. In einer Humanstudien wurde auch von einer Steigerung der Nahrungsaufnahme und einem präprandial stärkerem Hungergefühl berichtet (Wren et al., 2001). Die Wirkung von Ghrelin im Zusammenhang mit einer Zunahme des Körpergewichtes ist auch bei der Ratte beschrieben worden (Balasubramaniam et al., 2006). In der vorliegenden tierexperimentellen Studie zeigten sich im Vergleich zu den

Infarkt-Placebogruppen und den Behandlungsgruppen mit dem Ghrelinanalogon BIM-28131 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d signifikante Unterschiede (alle  $p < 0,001$  siehe Ergebnisse S. 34 bis 37, außer 7/9  $p = 0,046$ ) in der Zunahme des Körpergewichtes. Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit einer Studie, die über eine gesteigerte Nahrungsaufnahme und vermehrte Gewichtszunahme bei s.c. Ghrelinverabreichung bei Ratten mit kardialer Kachexie berichtete (Nagaya et al., 2001c). Jedoch war im Vergleich zu Nagayas Studie keine verringerte Gewichtszunahme der Placebo-Infarkttiere vs. Placebo-Shamtiere zu erkennen. Die signifikant stärkere Gewichtsentwicklung nach Ghrelinverabreichung war den Ergebnissen nach scheinbar unabhängig von der verwendeten Applikationsart. Die tendenziell höchste Gewichtszunahme erreichte die Gruppe 9: Pumpe 100nmol/kg mit  $98 \pm 4g$  (siehe S. 35 Tab.4.1). In vorliegender Studie konnte eine Abflachung der Kurve am Ende der Gewichtsentwicklung beobachtet werden. Dies entsprach der natürlichen Wachstumskurve der Tiere, da sich alle Tiere der Behandlungsgruppen in einem juvenilen Stadium ihrer Entwicklung befanden, was bei allen Ergebnissen der Studie Berücksichtigung finden muss. Die Beobachtung einer leichten Verringerung der Gewichtsentwicklung um den Tag 28 könnte zudem bei einigen Tieren durch den individuellen Stress der Narkose begründet werden (siehe S. 33 Abb. 4.1). Durch eine zweite Implantation osmotischer Pumpen nach 14-tägiger Behandlung war bei einigen Tieren in den entsprechenden Gruppen ebenfalls eine Gewichtsverringering zu beobachten. Bei chirurgischem und anderen invasiven Eingriffen (zu denen auch subkutane Injektionen zählen), kommt es durch eine Aktivierung des sympathoadrenergen Systems zur Freisetzung von Stresshormon, wie z.B. Adrenalin und Cortisol. Dies kann sich ungünstig auf verschiedenen Körperfunktionen und die perioperative Morbidität auswirken (Kehlet, 1999). Starke Angst, Schmerzen sowie chirurgischer Stress führen zur Freisetzung von Adrenalin (Jaattela et al., 1975). Die Implantation der osmotischen Pumpe sowie auch subkutane Injektionen stellten somit für die Tiere eine Stressbelastung mit Schmerzempfindung dar, wobei sich ausgeschüttete Stresshormone negativ auf den Energiestoffwechsel auswirken könnten. Hormone wie Cortisol sind katabol wirkende Hormone, die in Stresssituationen die Energie für einen erhöhten Stoffwechsel bereitstellen können. Cortisol steigert dabei die Gluconeogenese und die Proteolyse und begünstigt die Lipolyse. Zudem kann es bei chronischen Schmerzzuständen zu Gewichtsverlust, Apathie und Inappetenz kommen.

Bei dem Vergleich der Applikationsarten (Injektion vs. Pumpe) ergaben sich bei den relevanten Gruppen (1/2; 3/4; 5/6; 7/8; 9/19) in der vorliegenden Studie keine Unterschiede bezüglich der Zunahmen des Körpergewichtes (alle  $p > 0,05$ ).

Jedoch demonstrieren die Ergebnisse der Studie (siehe S. 35 Tab.4.3, S. 36 und 37; Abb.4.3, 4.4) eine dosisabhängige Gewichtszunahme der Sham- und Infarktgruppen bei subkutaner Injektion: Gruppe 3: Placebo  $50 \pm 2$  vs. Gruppe 1 100 nmol/kg/d  $89 \pm 4$  und Gruppe 5: Placebo

44±4g vs. Gruppe 7: 50nmol/kg/d 80±4g vs. Gruppe 9: 100 nmol/kg/d 98±4g. Bei der Applikation mittels osmotischer Pumpe ergaben sich nur dosisabhängige Gewichtszunahmen zwischen der Gruppe 6: Placebo 53,3±3g und Gruppe 8: 50nmol/kg/d 95±4g. Wie schon vorausgehend beschrieben, führt Ghrelin bei Ratten sowie auch bei Menschen zu einer dosisabhängigen Wachstumshormonfreisetzung, die schon bei niedrigen Dosen ausgeprägt ist (Arvat et al., 2000; Nagaya et al., 2001c; Takaya et al., 2000), und die zwei bis drei mal stärker als durch das entsprechende Freisetzungshormon GHRH ausfällt (Arvat et al., 2000). Eine dosisabhängige Gewichtszunahme mit Dosierungen von 40nmol/kg (kein Effekt) und 400nmol/kg (Steigerung der Nahrungsaufnahme und Gewichtszunahme) eines Ghrelinanalogs (BIM-28163) wurde in einer früheren Studie an Ratten beschrieben (Halem et al., 2005). Die Freisetzung von Wachstumshormon könnte durch anabole Wirkungen, wie Muskelaufbau und Steigerung des Knochenwachstums, zu einem Ansteigen des Körpergewichtes führen. In einer Studie zeigte sich, dass ein erhöhter Body Mass Index (BMI) bei Patienten mit CHI mit einer besseren Überlebensrate verbunden ist (Lavie et al., 2003). Eine osmotische Pumpe als kontinuierliches Wirkstoffreservoir wäre bei einer Anwendung für den Patienten angenehmer, da wiederholte Injektionen entfallen.

In Humanstudien wurde berichtet, dass der Ernährungsstatus bei Patienten mit chronischen Erkrankungen wie CHI (Anker et al., 1997b), AIDS (Chlebowski et al., 1989) malignen Tumoren (Costelli und Baccino, 2000) oder chronischer Niereninsuffizienz (Kalantar-Zadeh et al., 2006) einen wesentlichen Einfluss auf die Prognose und die Lebenserwartung hat. In einer Studie zeigte sich, dass eine Abnahme von Gewicht bei Patienten mit CHI ein wesentlicher Risikofaktor darstellt und mit einer schlechten Prognose verbunden ist (Anker et al., 1997c).

### **5.3 Verteilung der Gewichtseffekte auf das Fettgewebe und das muskuloskelettale System**

Wie schon ausführlich im Kapitel 2.2 beschrieben, hat Ghrelin neben der Freisetzung des Wachstumshormons (GH) und den damit verbundenen biologischen Wirkungen ein breites Spektrum an weiteren endokrinologischen und metabolischen Wirkungen, wie zum Beispiel der Stimulierung der Nahrungsaufnahme (Nakazato et al., 2001, Toshinai et al., 2006) durch Freisetzung der Neuropeptide NPY und AgRP (Nakazato et al., 2001; Shintani et al., 2001) oder eine begünstigte Bildung von Körperfettgewebe (Tschöp et al., 2000). Die Menge der Nahrungsaufnahme der Ratten wurde in vorliegender Studie nicht untersucht. Eine Steigerung der Nahrungsaufnahme und der damit verbundenen positiven Energiebilanz mit einer Gewichtszunahme könnten aber nicht ausgeschlossen werden. In einer Verhaltensstudie an Ratten wurde nach intraperitonealer Injektion von Ghrelin (13µg/kg)

innerhalb der ersten halben Stunde im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von einer 2,3-fach signifikant gesteigerten Nahrungsaufnahme berichtet (Tjandra, 2007).

In vorliegender Studie scheint die Zunahme an Fettmasse unabhängig der angewendeten Applikationsarten (Injektion vs. Pumpe) zu sein (siehe Tab. 4.5; 4.7; 4.9). Die Ergebnisse zeigten, dass die Körpergewichtszunahmen sowohl in den Shamgruppen als auch in den Infarktgruppen durch das Ansteigen der Fettmasse besonders in den ersten 14 Tagen der Behandlung erfolgten. Der Zuwachs an Fettmasse betrug während der Studientage 27-42  $39\pm 2\%$ . Während der Studientage 42-56 betrug der Zuwachs nur  $16\pm 0,7\%$ . Die Untersuchungen der Studie zeigten, dass das Ghrelinanalogons BIM-23131 in allen Dosierungen im Vergleich zum Placebo den Fettanteil steigerte. Eine höhere Dosierung des Ghrelinanalogons BIM-23131 ( $50\text{nmol/kg/d}$  vs.  $100\text{nmol/kg/d}$ ) schien jedoch nicht sicher den Fettanteil zu erhöhen.

Auch bei den Untersuchungen bezüglich der Muskelmasse schienen die Zunahmen an Muskelmasse unabhängig der angewendeten Applikationsarten (Injektion vs. Pumpe) zu sein (siehe Tab. 4.11; 4.13). Die Ergebnisse zeigten, dass die Körpergewichtszunahmen sowohl in den Shamgruppen als auch in den Infarktgruppen durch das Ansteigen der Muskelmasse besonders in den ersten 14 Tagen der Behandlung erfolgten. Der Zuwachs an Muskelmasse während der Studientage 27-42 betrug  $39\pm 2\%$ . Zwischen den Studientagen 42-56 ergaben sich nur sehr geringe Zunahmen ( $5\pm 0,2\%$ ). Eine Zunahme an Muskelmasse könnte bei kachektischen Patienten mit CHI insbesondere durch eine verbesserte Mobilität zu mehr Lebensqualität beitragen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung zeigten keinen Einfluss des Ghrelin-Analogons BIM-28313 auf die Gewichte der ausgewählten Muskel. In einer Studie von Nagaya (2001a) war der Quotient aus den Gewichten des M. gastrocnemius und Körpergewicht von Ratten mit CHI, die mit Ghrelin behandelt worden waren, signifikant höher als jener der Placebo-behandelten Tiere ( $p>0,05$ ).

Bei der Auswertung der Flächenbestimmungen der Muskelzellfasern des M. gastrocnemius und M. extensor digitorum longus konnte lediglich für den M. extensor digitorum longus zwischen den Sham-Gruppen 2 und 4 ein deutlicher Effekt des Ghrelinanalogons beobachtet werden. Bei den Infarktgruppen 5 und 7 des M. extensor digitorum longus konnte ebenfalls eine Vergrößerung der Muskelfasern beobachtet werden. Systematische Unterschiede zwischen den Applikationsformen (Injektion vs. Pumpe) konnte bei diesen Ergebnissen nicht deutlich gemacht werden.

Die Untersuchung der Tibialängen mittels ANOVA-Test ergaben keine signifikanten Unterschiede (siehe Kap. 4.3.2). Jedoch lassen die Ergebnisse erkennen, dass die Tibialängen der Placebo-behandelten Infarkttiere ( $3,8\pm 0,02\text{mm}$ ) geringer als die der Gruppe 9 mit Ghrelin-Analogon BIM-28131:  $100\text{nmol/kg/d}$ ; Injektion ( $3,95\pm 0,02\text{mm}$ ) waren. CHI

beeinflusst den Knochenstoffwechsel. Kachektische Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz haben ein signifikant reduziertes Knochengewebe (Anker et al., 1999c; Anker und Sharma, 2002). Patienten mit CHI weisen einen um 50% verminderten Knochenmineralsalzgehalt auf (Christ et al., 1996). Anker postulierte in seinen Studien, dass die Ursache des Verlustes an Knochen-, Muskel- und Fettmasse aus dem neurohormonellen und immunologischen Ungleichgewicht bei kardialer Kachexie resultiert, da die Blutspiegel bestimmter Hormone und Zytokine signifikant mit dem Gewebsverlust korrelierten (Anker et al., 1999a; Anker und Sharma, 2002). Es zeigte sich, dass die GH secretagogues (GHS) in der Regulation des Knochenmetabolismus bei Tieren und Menschen eine Rolle spielen könnten. Eine Studie zeigte, dass Ghrelin signifikant zum Ansteigen der alkalischen Phosphatase und der Osteokalzin-Produktion in Osteoblastenzellkulturen von Ratten beiträgt (Cocchi et al., 2005). In einer Tierstudie zur CHI wurden Ratten mit Ghrelin behandelt. Es zeigte sich, dass die Tiere, die mit Ghrelin behandelt worden waren, am Studienende eine signifikant größere Tibialänge ( $42,3 \pm 2,0$ mm) als die Placebo behandelten Tiere ( $40,3 \pm 1,9$ mm) aufwiesen ( $p < 0,05$ ) (Nagaya et al., 2001a).

Die vorausgehende Beschreibung des Ansteigens der Fett- und Muskelmasse besonders in den ersten 14 Tagen der Behandlung, bzw. eine Verringerung der Zunahmen zwischen den Tagen 42-56 könnte mit einem Toleranzeffekt des Ghrelinanalogons BIM-28131 in Zusammenhang stehen. Daneben erscheint aber auch ein physiologisches Verlangsamen der Wachstumsgeschwindigkeit und damit eine Verringerung der Gewichtszunahme der juvenilen Tiere im Verlauf der Studie eine mögliche Erklärung zu sein. Bei einem Toleranzeffekt erfolgt ein Abnehmen der Wirkung bei gleich bleibender Dosierung (Mello, 1972). Für die Entwicklung einer Toleranz gibt es verschiedene Ursachen. Eine pharmakokinetische Toleranz wird durch Enzyminduktion hervorgerufen, die einen beschleunigten Abbau des Hormonanalogons bewirkt (Frey et al., 1996). Die pharmakodynamische Toleranz entsteht z.B. durch verminderte Wirkstoffsensibilität der Zelle auf Grund verminderter Rezeptordichte auf der Zelloberfläche (Aktories et al., 2008).

In einer früheren Studie des gleichen Modells (Akashi et al., 2005), in der humanes Ghrelin mittels osmotischer Pumpe (50; 500nmol/kg/d) vs. Placebo verabreicht wurde, ergaben die Dosierungen von 500nmol/kg/d bezüglich der Zunahmen des Körpergewichtes (+25%), der Muskelmasse (+16%) und der Fettmasse (+17%) signifikante Unterschiede. Ebenfalls Signifikanzen der Zunahmen des Körpergewichtes (beide +18%), der Muskelmasse (beide +25%) und der Fettmasse (+43%) ergaben sich mittels Ghrelininjektion von 50 und 100nmol/kg/d. Eine Humanstudie mit Hämodialyse-Patienten kam zu dem Ergebnis, dass ein hohes Körpergewicht zwar mit einer besseren Überlebensprognose assoziiert aber mit einer schlechteren Lebensqualität verbunden ist. Die Daten der Studie zeigten bei einem BMI ( $20,8 \pm 2,4$ ) und Körperfettanteil ( $8,1 \pm 2,4$ ) eine Mortalität von 24% (in 30 Monaten), die sich

auf 17% bei einem BMI ( $26,2 \pm 4,6$ ) und Körperfettanteil ( $30,4 \pm 3,5$ ) verringerte. So zeigte sich, dass der Verlust von Fettgewebe mit einer höheren Mortalität bei CHI verbunden war (Kalantar-Zadeh et al., 2006).

### 5.3 Gewichte ausgesuchter innerer Organe

Am Studienende wurden neben dem Herz noch weitere Organe, wie die Lungen und die Nieren entnommen und gewogen. In den Infarktgruppen konnte eine Streuung der Lungengewichte in Bereiche über 2000mg beobachtet werden. In den Sham-Gruppen 1-4 war diese Streuung der einzelnen Lungengewichte nicht zu beobachten. Wahrscheinlich führt eine Stauung des Blutes aus dem linken Ventrikel über die Lungenvenen in die Lunge zum Übertreten kleiner Flüssigkeitsmengen (Ödeme) in die Lungenalveolen. Eine Zunahme der Lungengewichte wurde ebenfalls in anderen Studien beobachtet (Francis et al., 2001; Jasmin et al., 2003). Ein Zusammenhang mit der Infarktgröße konnte nicht beobachtet werden (siehe Kap. 4.31).

Bezüglich der Nierengewichte konnten in vorliegender Studie weder innerhalb der Sham-Gruppen noch innerhalb der Infarkt-Gruppen signifikante Unterschiede deutlich gemacht werden (siehe Kap. 4.3.11).

Bei der statistischen Analyse der Herzgewichte konnten nur Gewichtszunahmen zwischen den Infarktgruppen 5 und 9 ( $p = 0,027$ ) beobachtet werden, die einen Effekt des Ghrelinanalogs beschreiben könnten. Bei den Untersuchungen bezüglich der Gewichte des rechten und linken Atriums, des rechten und linken Ventrikels sowie des Septums treten zwischen den Gruppen keine relevanten Unterschiede auf (siehe Kap. 4.3.5- 4.3.9).

### 5.4 Echokardiographische Ergebnisse der Herzfunktion

Zur Beurteilung der Funktionalität des Herzens wurden bestimmte echokardiographische Parameter, wie SV, HF, FS, LVEF, HVM, IVS und LVHW analysiert (siehe Kap. 4.4). Die Entwicklung einer Herzinsuffizienz bei Ratten ist von der Größe des Infarktareals abhängig (Pfeffer et al., 1979). In der vorliegenden Studie wurden deshalb nur Tiere mit einem Infarktareal von mindestens 25% verwendet. Tiere mit kleinerer Infarktgröße wurden von der Studie ausgeschlossen. Die vorliegenden echokardiographischen Ergebnisse der Herzfunktion verifizieren das Vorhandensein einer Herzinsuffizienz bei den Tieren der Gruppen 5-10 und bestätigen die Ergebnisse einer Studie von Francis (2001).

Das Schlagvolumen ist das Blutvolumen, das mit jedem Herzschlag aus dem Ventrikel ausgeworfen wird. Es hängt von einigen Faktoren wie der Herzgröße, EDV, FS, Dauer der Kontraktion, Preload und Afterload ab. Die Ergebnisse zeigten, dass das SV der Gruppen 1-



4 größer war als das der Gruppen 5-10 (siehe Kap. 4.4.2; Abb.4.24, 4.25). Begründet werden könnten diese Ergebnisse durch eine irreversible Ischämie des infarzierten Gebietes und nachfolgenden Myokardnekrosen. Die kompensatorische Hypertrophie des verbleibenden Gewebes kann die Infarkte (im Mittel: 48% der Fläche des linken Ventrikels) nicht kompensieren und das SV verringert sich. In Vergleichsstudien zeigten Ratten, die mit einem Ghrelin-Analogen behandelt worden waren, ein signifikant höheres SV (Nagaya et al., 2001a). Die Analysen der echokardiographischen Untersuchungen der vorliegenden Studie bestätigten diese Ergebnisse nicht. Lediglich bei den mit Ghrelin-Analogen behandelten Tieren der Gruppe 9 (100nmol/kg/d) konnte gegenüber den Placebo behandelten Tieren eine tendenzielle Erhöhung des Schlagvolumens beobachtet werden.

Das Fractional Shortening bezeichnet die Verkürzung des Herzens während des Pumpvorganges und gibt damit eine Abschätzung der Funktion des linken Ventrikels wieder. Bei normaler Herzfunktion verkleinert sich der linke Ventrikel um ca. 25-30%. Bei gestörter Myokardfunktion verringern sich diese Werte. In der vorliegenden Studie wiesen die Gruppen 5-10 niedrigere Werte auf, was auf einen deutlichen Funktionsverlust schließen lässt (siehe Kap. 4.4.3). In der Folgeuntersuchung am Behandlungsende ergab sich nach Behandlung mit dem Ghrelin-Analogen-BIM 28131 zwischen den Sham-Behandlungsgruppen und den Infarkt-Behandlungsgruppen keine Verbesserung des LVFS. In Vergleichsstudien anderer Autoren zeigten Ratten, die mit Ghrelin-Analogen behandelt worden waren, ein signifikant höheres LVFS (von  $15\pm 3\%$  zu  $19\pm 3\%$ ,  $p < 0,05$ ) (Nagaya et al., 2001a).

Die LVEF bezeichnet den Anteil ausgeworfenen Blutes des linken Ventrikels während der Systole und sollte mehr als 60% betragen (Bonow et al., 1998). Circa ein Drittel des Blutes verbleibt dabei in der Herzkammer. Nach einem Myocardinfarkt kommt es zu einer systolischen Funktionsstörung des Herzens (Francis et al., 2001). Dabei steigt das endsystolische Volumen an. Gleichzeitig verringert sich damit die LVEF. Somit deuten kleinere Werte, wie die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten, auf eine geringere Auswurfleistung des Herzens hin. In vorliegender Studie betrug die LVEF der Infarktgruppen im Mittel ca.  $30,2\pm 0,76\%$ . Nach Verabreichung des Ghrelin-Analogons- BIM 28131 konnte keine Verbesserung des LVEF beobachtet werden (siehe Kap. 4.4.4).

Das Herzminutenvolumen (HMV) ist ein Maß für die Pumpleistung des Herzens. Die Herzminutenvolumina der Infarktgruppen wiesen deutlich geringere Werte als die Sham-Behandlungsgruppen auf (siehe Kap. 4.4.5). In Vergleichsstudien mit männlichen Wistar Ratten, die s.c. mit  $100\mu\text{g/kg}$  Ghrelin behandelt worden waren, zeigten diese ein signifikant höheres HMV ( $315\pm 49\text{ml/min/kg}$ , vs.  $266\pm 31\text{ml/min/kg}$ ,  $p < 0,05$ ; ) (Nagaya et al., 2001a). Nach Injektion des Ghrelin-Analogons-BIM 28131 in einer Dosierung von  $100\text{ nmol/kg/d}$  konnten geringe Verbesserungen des Herzminutenvolumens im Vergleich zu den mit

Placebo-behandelten Tieren der Sham- und Infarkt-Gruppen in vorliegender Studie bemerkt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten keine Unterschiede in der linksventrikulären Hinterwanddicke von Sham- und Infarkttieren (siehe Kap. 4.4.6), weshalb eine Hypertrophie ausgeschlossen werden konnte. Zwischen den mit Ghrelin-Analagon und Placebo-behandelten Tieren waren nur bei der Analyse der Differenzen beider Behandlungstage (siehe Abb. 4.32) Unterschiede zwischen den Sham-Gruppen 2 und 4 ( $p = 0,014$ ) erkennbar. Das Septum interventriculare ist die Trennwand zwischen dem linken und dem rechten Ventrikel des Herzens, das hauptsächlich vom Myokard des linken Ventrikels gebildet wird. Auf Grund der Unterversorgung des Myokards durch eine Ligatur der Koronararterie des linken Ventrikels könnte es ebenso zu Versorgungseinschränkungen des Septums kommen, was die verminderte Dicke des Septums der Infarkttiere erklären konnte (siehe Kap. 4.4.7; Abb.4.33 - 4.35). Unterschiede zwischen den Gruppen Pumpe vs. Injektion und Ghrelin-Analagon vs. Placebo ließ die vorliegende Studie nicht erkennen.

Allgemein ließen sich in der vorliegenden tierexperimentellen Studie nur bei dem Parameter HMV geringe Verbesserungen der kardiologischen Funktionen, durch eine Behandlung mit dem Ghrelin-Analagon BIM-28131 erkennen. In der schon vorhergehend erwähnten Studie (Akashi Abstract 2005) des gleichen Modells, in der humanes Ghrelin mittels osmotischer Pumpe (50; 500nmol/kg/d) und mittels s.c. Injektion von 50 und 100nmol/kg/d eingesetzt wurde, ergaben sich ebenfalls keine Signifikanzen, die auf Verbesserungen der kardialen Funktionen schließen ließen. In einer Studie von Nagaya (2001a) weichen die echokardiographischen Ergebnisse nach einer Behandlung mit humanem Ghrelin jedoch von den Ergebnissen der vorliegenden Studie ab. Nach subkutaner Injektion von 100µg/kg BID wurde ein erhöhtes HMV, LVFS, erniedrigtes LV-Remodeling und eine bessere Kontraktilität des Herzens beschrieben. Ein größeres Infarktareal und damit verbundene größere Funktionseinschränkung des Herzens, eine längere Behandlungsdauer, die Prämedikation mit Furosemid und die Studiendurchführung mit einem anderen Rattenstamm könnten mögliche Erklärungen für die Unterschiede zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie sein.

## **5.6 Einfluss der Applikationsart**

Die Verabreichung eines Ghrelin-Analogons in bisher veröffentlichten Studien erfolgte nicht einheitlich. Unterschiedliche Applikationsarten wie z.B. die i.v, s.c und i.c.v.-Injektion wurden bisher beschrieben (Masuda et al., 2000; Nagaya et al., 2001a; Tschöp et al., 2000).

Die Verabreichung des Ghrelin-Analogons BIM-28131 in vorliegender Studie erfolgte mittels osmotischer Pumpe und 3-mal täglicher s.c. Injektion. Dabei konnten keine eindeutigen

Unterschiede bezüglich eines Effektes auf das Körpergewicht zwischen den beiden verwendeten Applikationsarten Pumpe vs. Injektion beobachtet werden.

Bezüglich eines Effektes auf den Fettzuwachs ließen besonders in den ersten 14 Tagen der Behandlung, die Gruppen 1 vs. 2 und 7 vs. 8 Unterschiede erkennen. Dabei wurden die besten Zunahmen mittels Pumpenapplikation erzielt (siehe Kap. 4.2.1). Signifikante Ergebnisse ergaben sich besonders zwischen den Gruppen 7 und 8.

Bezüglich eines Effektes der Applikationsform auf den Muskelzuwachs (siehe Kap. 4.2.2) ließen in den ersten 14 Tagen der Behandlung nur die Placebo-Infarktgruppen 5 (Injektion) vs. 6 (Pumpe) Unterschiede erkennen. Dabei könnten die schlechteren Zunahmen der Gruppe 5 (Injektion) in Zusammenhang mit den 3-mal täglichen invasiven Eingriffen und dem damit entstandenen Stress für das Tier stehen. Während des gesamten Behandlungszeitraumes (Tag 28-56) zeigten nur die Gruppen 9 (Injektion) vs. 10 (Pumpe) Unterschiede, wobei die Gruppe 9 mittels Injektion die besseren Zunahmen aufwies. Dieser Effekt könnte durch die 3-mal tägliche Applikation, die der physiologischen pulsatilem Freisetzung des Hormones Ghrelin am nächsten kommt und der damit verbundenen anabolen Wirkungen begründet werden. Mit der Applikation mittels osmotischer Pumpe wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen eine kontinuierliche Wirkstofffreisetzung mit einem konstanten Wirkstoffniveau erreicht ([www.alzet.com](http://www.alzet.com)). Die dreimal tägliche Injektion des Ghrelin-Analogons könnte innerhalb kurzer Zeit zu Spitzenkonzentrationen im Plasma führen, welche durch eine osmotische Pumpe nicht erreicht werden könnten. Physiologisch erfolgt die Ghrelinausschüttung pulsatil in Verbindung mit dem Fütterungs- und Schlafzyklus (Tolle et al., 2002). Bei gesunden Probanden zeigte sich, dass das Plasmaghrelin in Zusammenhang mit der Wachstumshormonausschüttung steht, was darauf hinweist, dass Ghrelin an der pulsatilem Regulation der Wachstumshormonsekretion teilnimmt (Koutkia et al., 2004). Temporär hohe Ghrelinkonzentrationen mit Spitzenkonzentrationen wie nach subkutaner Injektion, scheinen die Höhe der Ausschüttung von GH zu beeinflussen (Enomoto et al., 2003), was einzelne Ergebnisse vorliegender Studie begründen könnte.

Die Wahl der Applikationsart bei der Verabreichung von Arzneistoffen ist von mehreren Faktoren abhängig. Zum einen spielt die Compliance (Seeberger, 1998) des Patienten eine bedeutende Rolle. Das dreimal tägliche Spritzen setzt ein kooperatives Verhalten, ein konsequentes Befolgen und eine entsprechende körperliche Verfassung des Patienten voraus, was bei schwerwiegendem Krankheitsverlauf, wie bei progredienter CHI, nur eingeschränkt möglich ist. Alternative Applikationsarten von Hormonen könnten die Therapie erleichtern. Zum Beispiel könnte, ein mit hormonellen Arzneimitteln gefülltes Gel, mittels subkutaner Injektion als Retardform künftig mehrmaliges Spritzen ersetzen. Ebenso könnten transdermale therapeutische Systeme, wie sie z.B. auch schon zur Hormonsubstitution angewendet werden, eine Alternative zur subkutanen Injektion darstellen. Auch eine nasale

Applikation könnte diskutiert werden. Schon seit den 80er Jahren wurden für mehrere Peptidarzneistoff, wie z.B. Insulin oder Wachstumshormon nasale Formulierungen entwickelt, die für chronisch kranke Patienten eine erhebliche Erleichterung bei der Verabreichung bedeuten würden. Ein Vorteil dieser Applikation wäre, dass durch die starke Durchblutung der Nasenschleimhaut eine gute Bioverfügbarkeit gegeben wäre. Zudem könnte der Effekt der ersten Leberpassage umgangen werden (Daniels, 2011).

### **5.7 Einfluss der Dosierung des Ghrelin-Analogons (BIM-28131)**

Wie mehrere Autoren beschreiben, führt Ghrelin bei einigen Spezies zu einer dosisabhängigen Freisetzung von GH in vivo und in vitro (Arvat et al., 2000; Hataya et al., 2001; Kojima et al., 1999; Takaya et al., 2000). In einer Humanstudie mit gesunden Probanden zeigte sich nach subkutaner Ghrelinapplikation in drei unterschiedlichen Dosierungen (1, 5 und 10µg/kg) eine dosisabhängige Wachstumshormon-Freisetzung. Die Serum-GH-Spiegel stiegen von  $0,5\pm 0,4$  auf  $3,6\pm 2,1$ ng/ml (1µg/kg;  $p=0,99$ ),  $27,1\pm 12,0$ ng/ml (5µg/kg;  $p<0,01$ ) und  $45,5\pm 12,8$ ng/ml (10µg/kg;  $p<0,01$ ) innerhalb von 30 min nach Ghrelinverabreichung (Enomoto et al., 2003). In der Literatur wird keine einheitlich verwendete Dosierung für ein Ghrelin-Analogon beschrieben. Die Dosierungen bei Ratten reichen z.B. von 0,8µg (Masuda et al., 2000) bis zu 1mg je Tier (Yukawa et al., 2008). Die Ergebnisse der eigenen Studie zeigten, dass eine dosisabhängige Wirkung besonders während der ersten 14 Tage der Behandlung bestehen könnte.

Bezüglich der Gewichtsentwicklung zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Dosierungen (Placebo, 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d) der Sham- und Infarktgruppen. Ausgeschlossen davon waren die Infarktgruppen mit 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d mittels osmotischer Pumpe. Auch bezüglich der Körperfettzunahme konnten besonders während der ersten 14 Tage der Behandlung Unterschiede zwischen den einzelnen Dosierungen (Placebo, 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d) der Sham- und Infarktgruppen beobachtet werden, wobei keine Effekte zwischen den Infarktgruppen mit 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d mittels Pumpe beobachtet wurden. Eine hohe Dosierung des Ghrelin-Analogons BIM-28131 mittels Injektion schien in vorliegender Untersuchung begünstigend für eine große Zunahme zu sein. Bezüglich des Muskelzuwachs zeigten sich besonders während der ersten 14 Tage der Behandlung Unterschiede zwischen den Dosierungen Placebo vs. Ghrelin-Analogon, scheinbar unabhängig von den Dosierungen 50nmol/kg/d vs. 100nmol/kg/d. Als mögliche Ursache wurde bereits in Kapitel 5.3 ein Toleranzeffekt des Ghrelin-Analogons BIM-28131 und ein physiologisches Verlangsamen der Wachstumsgeschwindigkeit diskutiert. Unterschiede in der Tibialänge und den ermittelten Muskelgewichten ergaben sich nicht. Bei den untersuchten Organgewichten ergaben sich

nur bei dem Parameter Herzgewicht Unterschiede zwischen den Injektionsinfarktgruppen 5 (Placebo) und 9 (100nmol/kg/d).

Die vorliegende Studie zeigte, dass das Ghrelin-Analogon mit 50nmol/kg/d und 100nmol/kg/d im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren eine Zunahme von Körper, Fett- und teilweise Muskelmasse bewirkten. Dabei war ein Dosiseffekt nicht immer erkennbar. Bei einer möglichen antikachektischen Behandlung sollte daher, um mögliche Nebenwirkungen des Hormones Ghrelin zu minimieren, eine geringe Dosis mit maximaler Wirkung verwendet werden.

## 6. Zusammenfassung

Vergleich einer subkutanen Injektion oder Infusion mittels osmotischer Pumpe des Ghrelin-Analogons BIM-28131 bezüglich der Effekte auf Körpergewicht, Körperzusammensetzung und Herzfunktion im Rattenmodell der kardialen Kachexie

Die kardial bedingte Kachexie ist eine häufige und ernst zu nehmende Komplikation der CHI, die mit einer ungünstigen Prognose verbunden ist und deren multifaktorielle Ätiologie noch nicht vollständig geklärt ist. Für die Behandlung der kardialen Kachexie gibt es bisher keine spezielle Therapie. Ein mögliches Behandlungsziel bei kardialer Kachexie könnte darin bestehen, das nichtödematöse Gewicht zu stabilisieren bzw. anzuheben. Dies könnte sich positiv auf das Krankheitsgeschehen und letztlich auf die Lebensqualität und Überlebensrate bei Patienten mit CHI auswirken. Ghrelin, welches zum größten Teil in der Magenschleimhaut synthetisiert wird, wirkt als physiologisches Appetitstimulanz und beeinflusst daneben die Wachstumshormonfreisetzung ins Blut.

In vorliegender Studie wurde der Einfluss des Ghrelin-Analogons BIM-28131 auf den Gewichtsverlauf, die Körperzusammensetzung, die Organgewichte und die kardiologischen Funktionen in einem Rattenmodell mit CHI untersucht, wobei eine wiederholte subkutane Injektion mit einer kontinuierliche Applikation via osmotischer Pumpe verglichen wurde.

Der bei den juvenilen Ratten erzeugte Myokardinfarkt mit ca. 48% linksventrikulärem Infarktareal führte bei allen Infarkttieren zu einer Herzinsuffizienz, jedoch konnte kein eindeutig kachektischer Zustand erzeugt werden. Die im Rahmen dieser Dissertation erzielten Ergebnisse zeigten jedoch, dass das Ghrelin-Analogon BIM-28131 einen günstigen Einfluss in der Verhinderung der Entwicklung eines kachektischen Zustandes bei Ratten mit CHI erkennen lässt. Die Verabreichung des Ghrelin-Analogons BIM-28131 führte zu einem Ansteigen des Körpergewichtes, unabhängig von der Applikationsart. Zudem zeigten die Ergebnisse ein Ansteigen der Fett- und Muskelmasse im Vergleich zu den placebobehandelten Tieren, wobei die Art der Applikation auf Fett- bzw. Muskelzunahmen unterschiedlichen Einfluss hatte.

Entgegen den Ergebnissen anderer Studien mit Ghrelin konnte nach Verabreichung des Ghrelin-Analogons BIM-28131 – unabhängig von der Applikationsart – nur eine geringfügige Verbesserung der kardialen Funktionen beobachtet werden.

Bei der zukünftigen Entwicklung einer speziellen Therapie bei kardial bedingter Kachexie könnten diese Ergebnisse Berücksichtigung finden, jedoch sollte im Sinne einer verbesserten Compliance für den Patienten alternative Applikationsformen Anlass zu weiterführender Forschung geben.

## 7. Summary

The effects of repeated subcutaneous injections vs. continuous application via osmotic pump of the ghrelin-analogue BIM-28131 on the body weight, composition and cardiac function in a rat model with CHI

A serious complication of chronic heart failure (CHI) is cardiac cachexia, which is associated with a poor prognosis but its multifactorial etiology is not completely clarified yet. There is currently no therapeutic option for the treatment of the cardiac cachexia. An option for a treatment of the cardiac cachexia could be to stabilise or even increase the non-oedematous weight. This could positively affect the progress of the recovery and finally the quality of life, as well as the survival rate of patients with CHI. Ghrelin, which is produced in the gastric lining, is effective as a physiologic appetite stimulant and influences the release of growth hormone into the blood stream.

This study determined the effects of repeated subcutaneous injection vs. continuous application via osmotic pump of the ghrelin analogue BIM-28131 on the body weight and composition, as well as the weight of organs and cardiac function in a rat model with CHI.

Myocardial infarction of the left ventricle was induced in juvenile rats with a size of approx. 48%, which led to heart failure in all animals. However, it was not possible to induce a welldefined cachectic status. However, the results of this research showed that ghrelin analogue BIM-28131 had some beneficial potential for cachexia treatment in rats with CHI. The medication of the ghrelin analogon induced an increase in body weight independently of the type of application. In addition, the results showed an increase in fat and muscle mass compared to the placebo-treated rats, whereas the way of application had a different effect on fat- and muscle growth.

In contrast to the results of other studies with ghrelin, the application of ghrelin analogue BIM-28131 could only slightly improve the cardiac function, independently of the way of application.

In future, the results of the research should be considered when developing a special therapy for cardiac cachexia. However, alternative forms of application should also be taken into account in order to improve the compliance of patients.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AgRP	agouti-related protein (engl.)
ANG	Angiotensin
ANOVA	analysis of variance (engl.); Varianzanalyse
BNP	B-Typ-Natriuretische-Peptid
BSA	Bovines Serum Albumin
CCR	Center for Cardiovascular Research (engl.)
CHI	Chronische Herzinsuffizienz
FS	fractional shortening (engl.); relative Durchmesserverkürzung
GH	growth hormone
GHRH	growth hormone releasing hormone (engl.); Wachstumshormon-Freisetzungshormon)
GHS	growth hormone secretagogues (engl.)
GHS-R	growth hormone secretagogue receptor (engl.)
HF	Herzfrequenz
HMV	Herzminutenvolumen
IGF	insuline-like growth factor (engl.)
IL	Interleukin
IVS	Interventrikularseptum
KG	Körpergewicht
LVEDD	left ventricular enddiastolic diameter (engl.); Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
LVESD	left ventricular endsystolic diameter (engl.); Linksventrikulärer endsystolischer Durchmesser
LVEF	left ventricular ejection fraction (engl.); Linksventrikuläre Auswurfraction
LVFS	left ventricular fractional shortening (engl.); relative Linksventrikuläre Durchmesserverkürzung
LVHW	Linksventrikuläre Hinterwand
n	Fallzahl
NMR	nuclear magnetic resonance (engl.); Kernspinresonanz
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Y
NYHA	New York Heart Association (engl.)
p	statistisches Maß für die Wahrscheinlichkeit



RAAS	Renin-Angiotensin-Aldesteron-System
RR	Relatives Risiko
SPF	Spezifisch Pathogen frei
SV	stroke volume (engl.); Schlagvolumen
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TRH	thyreotropin-releasing hormone (engl.)

## 9. Literaturverzeichnis

- Adams, V., H. Jiang, J. Yu, S. Mobius-Winkler, E. Fiehn, A. Linke, C. Weigl, G. Schuler, R. Hambrecht (1999). "Apoptosis in skeletal myocytes of patients with chronic heart failure is associated with exercise intolerance." *J Am Coll Cardiol* 33(4): 959-965.
- Akashi, Y.J., S. Springer, S. Paulus, R. Datta, H. Halem, J. Dong, M. D. Culler, S.D. Anker, "The administration of human ghrelin attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure" Cachexia Conference Rom 2005 Abstract
- Aktories, K., U. Förstermann, F. Hofmann, K. Starke, W. Forth (2008) „Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie: für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker“ Verlag Elsevier, Urban & Fischer, Ausg. 9, 1189 (14, 21).
- Albanese, M.C., M. Plewka, D. Gregori, C. Fresco, G. Avon, D. Caliandro, L. Grassi, P. Rossi, P. Udina, A. Bulfoni, R. Colle, A.L. Cuzzato, P.M. Fioretti (1999) "Use of medical resources and quality of life of patients with chronic heart failure: a prospective survey in a large Italian community hospital." *Eur J Heart Fail.* 1(4): 411-417.
- Amato, G., C. Carella, S. Fazio, G. La Montagna, A. Cittadini, D. Sabatini, C. Marciano-Mone, L. Sacca, A. Bellastella (1993). "Body composition, bone metabolism, and heart structure and function in growth hormone (GH)-deficient adults before and after GH replacement therapy at low doses." *J Clin Endocrinol Metab* 77(6): 1671-1676.
- Anker, S.D., K.R. Egerer, H.D. Volk, W.J. Kox, P.A. Poole-Wilson, A.J. Coats, (1997) "Elevated soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure" *Am J Cardiol* 79(10): 1426-1430.
- Anker, S.D., T.P. Chua, P. Ponikowski, D. Harrington, J.W. Swan, W.J. Kox, P.A. Poole-Wilson, A.J. Coats (1997). "Hormonal changes and catabolic/anabolic imbalance in chronic heart failure and their importance for cardiac cachexia." *Circ* 96(2): 526-534.
- Anker, S.D., P. Ponikowski, S. Varney, T.P. Chua, A.L. Clark, K.M. Webb-Peploe, D. Harrington, W.J. Kox, P.A. Poole-Wilson, A.J. Coats (1997). "Wasting as independent risk factor for mortality in chronic heart failure." *Lancet* 349(9058): 1050-1053.
- Anker, S.D., P.P. Ponikowski, A.L. Clark, F. Leyva, M. Rauchhaus, M. Kemp, M.M. Teixeira, P.G. Hellewell, J. Hooper, P.A. Poole-Wilson, A.J. Coats (1999). "Cytokines and neurohormones relating to body composition alterations in the wasting syndrome of chronic heart failure." *Eur Heart J* 20(9): 683-693.
- Anker, S.D. and M. Rauchhaus (1999). "Insights into the pathogenesis of chronic heart failure: immune activation and cachexia." *Curr Opin Cardiol* 14(3): 211-216.
- Anker, S.D., A.L. Clark, M.M. Teixeira, P.G. Hellewell, A.J. Coats (1999). "Loss of bone mineral in patients with cachexia due to chronic heart failure." *Am J Cardiol* 83(4): 612-615.
- Anker, S.D., M. Volterrani, C.D. Pflaum, C.J. Strasburger, K.J. Osterziel, W. Doehner, M.B. Ranke, P.A. Poole-Wilson, A. Giustina, R. Dietz, A.J. Coats (2001). "Acquired growth

- hormone resistance in patients with chronic heart failure: implications for therapy with growth hormone." *J Am Coll Cardiol* 38(2): 443-452.
- Anker, S.D., R. Sharma (2002). "The syndrome of cardiac cachexia." *Int. J Cardiol* 85(1): 51-66.
- Anker, S.D., A. Negassa, A.J. Coats, R. Afzal, P.A. Poole-Wilson, J.N. Cohn, S. Yusuf (2003). "Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study." *Lancet* 361(9363): 1077-1083.
- Anker, S.D., W. Steinborn, S. Strassburg (2004). "Cardiac cachexia". *Ann Med* 36(7): 518-529.
- Arvat, E., L. Di Vito, F. Broglio, M. Papotti, G. Muccioli, C. Dieguez, F.F. Casanueva, R. Deghenghi, F. Camanni, E. Ghigo (2000). "Preliminary evidence that Ghrelin, the natural GH secretagogue (GHS)-receptor ligand, strongly stimulates GH secretion in humans." *J Endocrinol Invest* 23(8): 493-495.
- Arvat, E., M. Maccario, L. Di Vito, F. Broglio, A. Benso, C. Gottero, M. Papotti, G. Muccioli, C. Dieguez, F.F. Casanueva, R. Deghenghi, F. Camanni, E. Ghigo (2001). "Endocrine activities of ghrelin, a natural growth hormone secretagogue (GHS), in humans: comparison and interactions with hexarelin, a nonnatural peptidyl GHS, and GH-releasing hormone." *J Clin Endocrinol Metab* 86(3): 1169-1174.
- Azhar, G., J.Y. Wei (2006). "Nutrition and cardiac cachexia." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9(1): 18-23.
- Bagnasco, M., P.S. Kalra, S.P. Kalra (2002). "Ghrelin and leptin pulse discharge in fed and fasted rats." *Endocrinol* 143(2): 726-729.
- Balasubramaniam A. , S. Wood, R. Joshi , C. Su, L.A. Friend, S. Sheriff, J.H. James (2006). "Ghrelin stimulates food intake and growth hormone release in rats with thermal injury: synthesis of ghrelin." *Peptides* 27(7): 1624–1631.
- Baracos, V.E. (2006) "Cancer-associated cachexia and underlying biological mechanisms." *Annu Rev Nutr.*;26: 435-461.
- Berry, C., A.L. Clark (2000). "Catabolism in chronic heart failure." *Eur Heart J* 21(7): 521-532.
- Bonow, R.O., B. Carabello, A.C. de Leon, L.H. Jr. Edmunds, B.J. Fedderly, M.D. Freed, W.H. Gaasch, C.R. McKay, R.A. Nishimura, P.T. O'Gara, R.A. O'Rourke, S.H. Rahimtoola, J.L. Ritchie, M.D. Cheitlin, K.A. Eagle, T.L. Gardner, A. Jr. Garson, R.J. Gibbons, R.O. Russell, T.J. Ryan, S.C. Jr. Smith (1998). "ACC/AHA Guidelines for the Management of Patients With Valvular Heart Disease. Executive Summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee on Management of Patients With Valvular Heart Disease)." *J Heart Valve Dis* 7(6): 672-707.
- Brewster, U.C., J.F. Setaro, M.A. Perazella (2003). "The renin-angiotensin-aldosterone system: cardiorenal effects and implications for renal and cardiovascular disease states." *Am J Med Sci* 326(1): 15-24.

- Brink, M., S.R. Price, J. Chrast, J.L. Bailey, A. Anwar, W.E. Mitch, P. Delafontaine (2001). "Angiotensin II induces skeletal muscle wasting through enhanced protein degradation and down-regulates autocrine insulin-like growth factor I." *Endocrinol* 142(4): 1489-1496.
- Broussard S.R., R.H. McCusker, J.E. Novakofski, K. Strle, W.H. Shen, R.W. Johnson, G.G. Freund, R. Dantzer, K.W. Kelley (2003). "Cytokine-hormone interactions: tumor necrosis factor  $\alpha$  impairs biologic activity and downstream activation signals of the insulin-like growth factor I receptor in myoblasts." *Endocrinol* 144(7): 2988-2996.
- Brown, G.C. (1995). "Nitric oxide regulates mitochondrial respiration and cell functions by inhibiting cytochrome oxidase." *FEBS Lett* 369(2-3): 136-139.
- Brown, L., C. Sernia, R. Newling, P. Fletcher (1992). "Cardiac responses after norepinephrine-induced ventricular hypertrophy in rats." *J Cardiovasc Pharmacol* 20(2): 316-323.
- Carr, J.G., L.W. Stevenson, J.A. Walden, D. Heber (1989). "Prevalence and hemodynamic correlates of malnutrition in severe congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy." *Am J Cardiol* 63(11): 709-713.
- Chen, H.Y., M.E. Trumbauer, A.S. Chen, D.T. Weingarth, J.R. Adams, E.G. Frazier, Z. Shen, D.J. Marsh, S.D. Feighner, X.M. Guan, Z. Ye, R.P. Nargund, R.G. Smith, L.H. Van der Ploeg, A.D. Howard, D.J. MacNeil, S. Qian (2004). "Orexigenic action of peripheral ghrelin is mediated by neuropeptide Y and agouti-related protein." *Endocrinol* 145(6): 2607-2612.
- Cheng, K., W.W. Chan, A. Jr. Barreto, E.M. Convey, R.G. Smith (1989). "The synergistic effects of His-D-Trp-Ala-Trp-D-Phe- Lys-NH<sub>2</sub> on growth hormone (GH)-releasing factor-stimulated GH release and intracellular adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in rat primary pituitary cell culture." *Endocrinol* 124(6): 2791-2798.
- Chlebowski, R.T., M.B. Grosvenor, N.H. Bernhard, L.S. Morales, L.M. Bulcavage (1989). "Nutritional status, gastrointestinal dysfunction, and survival in patients with AIDS." *Am J Gastroenterol* 84(10): 1288-1293.
- Christ, E., A. Linka, G. Junga, M. Odermatt, H. Steinert, W. Kiowski, C. Schmid (1996). "Bone density and laboratory parameters of bone metabolism in patients with terminal heart disease". *Schweiz Med Wochenschr* 126, 1553-1559.
- Ciulla, M.M., R. Paliotti, S. Ferrero, P. Braidotti, A. Esposito, U. Gianelli, G. Busca, U. Cioffi, G. Bulfamante, F. Magrini (2004). "Left ventricular remodeling after experimental myocardial cryoinjury in rats". *J Surg Res* 116, 91-97.
- Cleeter, M.W., J.M. Cooper, V.M. Darley-Usmar, S. Moncada, A.H. Schapira (1994). "Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases." *FEBS Lett* 345(1): 50-54.
- Cocchi, D., G. Maccarinelli, V. Sibilìa, G. Tulipano, A. Torsello, U.E. Pazzaglia, A. Giustina, C. Netti (2005). "GH-releasing peptides and bone." *J Endocrinol Invest* 28, 11-14.

- Cohn, J.N., T.B. Levine, M.T. Olivari, V. Garberg, D. Lura, G.S. Francis, A.B. Simon, T. Rector (1984). "Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure." *N Engl J Med* 311(13): 819-823.
- Costelli, P. and F.M. Baccino (2000). "Cancer cachexia: from experimental models to patient management." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 3(3): 177-181.
- Cowie, M.R., A. Mosterd, D.A. Wood, J.W. Deckers, P.A. Poole-Wilson, G.C. Sutton, D.E. Grobbee (1997). "The epidemiology of heart failure." *Eur Heart J* 18(2): 208-225.
- Cummings, D.E., J.Q. Purnell, R.S. Frayo, K. Schmidova, B.E. Wisse, D.S. Weigle (2001). "A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans." *Diabetes* 50(8): 1714-1719.
- Cummings, D.E., D.S. Weigle, R.S. Frayo, P.A. Breen, M.K. Ma, E.P. Dellinger, J.Q. Purnell (2002). "Plasma ghrelin levels after diet-induced weight loss or gastric bypass surgery." *N Engl J Med* 346(21): 1623-1630.
- Daniels, R. (2011). "Hormone Schlucken, Kleben oder Cremen?" *Pharmazeutische Zeitung* 06/2011 <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=36748>
- Dalla Libera, L., B. Ravara, M. Volterrani, V. Gobbo, M. Della Barbera, A. Angelini, D. Danieli Betto, E. Germinario, G. Vescovo (2004). "Beneficial effects of GH/IGF-1 on skeletal muscle atrophy and function in experimental heart failure." *Am J Physiol Cell Physiol* 286(1): C138-144.
- Date, Y., N. Murakami, M. Kojima, T. Kuroiwa, S. Matsukura, K. Kangawa, M. Nakazato (2000). "Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats." *Biochem Biophys Res Commun*. 275(2):477-480.
- Date, Y., M. Kojima, H. Hosoda, A. Sawaguchi, M.S. Mondal, T. Suganuma, S. Matsukura, K. Kangawa, M. Nakazato (2000). "Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in a gastrointestinal tracts of rats and humans." *Endocrinol* 141(11): 4255-4261.
- Dhillon, H., S.P. Kalra, P.S. Kalra (2001). "Dose-dependent effects of central leptin gene therapy on genes that regulate body weight and appetite in the hypothalamus." *Mol Ther* 4(2): 139-45.
- Date, Y., M. Nakazato, N. Murakami, M. Kojima, K. Kangawa, S. Matsukura (2001). "Ghrelin acts in the central nervous system to stimulate gastric acid secretion." *Biochem Biophys Res Commun* 280(3): 904-907.
- Dixit, V.D., E.M. Schaffer, R.S. Pyle, G.D. Collins, S.K. Sakthivel, R. Palaniappan, J.W. Jr. Lillard, D.D. Taub (2004). "Ghrelin inhibits leptin- and activation-induced proinflammatory cytokine expression by human monocytes and T cells." *J Clin Invest* 114(1): 57-66.
- Drexler, H., U. Riede, T. Munzel, H. Konig, E. Funke, H. Just (1992). "Alterations of skeletal muscle in chronic heart failure." *Circ* 85(5): 1751-1759.
- Enomoto, M., N. Nagaya, M. Uematsu, H. Okumura, E. Nakagawa, F. Ono, H. Hosoda, H. Oya, M. Kojima, K. Kanmatsuse, K. Kangawa (2003). "Cardiovascular and hormonal effects of subcutaneous administration of ghrelin, a novel growth hormone-releasing peptide, in healthy humans". *Clin Sci (Lond)* 105, 431-435.

- Ferrari, R., T. Bachetti, R. Confortini, C. Opasich, O. Febo, A. Corti, G. Cassani, O. Visioli (1995). "Tumor necrosis factor soluble receptors in patients with various degrees of congestive heart failure." *Circulation* 92(6): 1479-1486.
- Filippatos, G.S., S.D. Anker, D.T. Kremastinos (2005). "Pathophysiology of peripheral muscle wasting in cardiac cachexia." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 8(3): 249-254.
- Francis, S.E., H. Holden, C.M. Holt, G.W. Duff (1998). "Interleukin-1 in myocardium and coronary arteries of patients with dilated cardiomyopathy." *J Mol Cell Cardiol* 30(2): 215-223.
- Francis, J., R.M. Weiss, S.G. Wei, A.K. Johnson, R.B. Felder (2001). "Progression of heart failure after myocardial infarction in the rat." *Am J Physiol* 281(5):1734-1745.
- Frey, H.-H., Löscher, W. (1996) *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban&Fischer-Verlag
- Friedman J.M. (2002). "The function of leptin in nutrition, weight, and physiology." *Nutr Rev*. 60(10 Pt 2):1-14.
- Fuller, S.J., J.R. Mynett, P.H. Sugden (1992). "Stimulation of cardiac protein synthesis by insulin-like growth factors." *Biochem J* 282 (Pt 1): 85-90.
- García, E.A, M. Korbonits (2006) "Ghrelin and cardiovascular health." *Curr Opin Pharmacol* (2):142-147.
- Gnanapavan, S., B. Kola, S.A. Bustin, D.G. Morris, P. McGee, P. Fairclough, S. Bhattacharya, R. Carpenter, A.B. Grossman, M. Korbonits (2002). "The tissue distribution of the mRNA of ghrelin and subtypes of its receptor, GHS-R, in humans." *J Clin Endocrinol Metab* 87(6): 2988.
- Guan, X.M., H. Yu, O.C. Palyha, K.K. McKee, S.D. Feighner, D.J. Sirinathsinghji, R.G. Smith, L.H. Van der Ploeg, A.D. Howard (1997). "Distribution of mRNA encoding the growth hormone secretagogue receptor in brain and peripheral tissues." *Brain Res Mol Brain Res* 48(1): 23-29.
- Gulick, T., M.K. Chung, S.J. Pieper, L.G. Lange, G.F. Schreiner (1989). "Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(17): 6753-6757.
- Halem, H.A., J.E. Taylor, J.Z. Dong, Y. Shen, R. Datta, A. Abizaid, S. Diano, T.L. Horvath, M.D. Culler (2005). "A novel growth hormone secretagogue-1a receptor antagonist that blocks ghrelin-induced growth hormone secretion but induces increased body weight gain." *Neuroendocrinol* 81(5): 339-349.
- Hambrecht, R., V. Adams, S. Gielen, A. Linke, S. Mobius-Winkler, J. Yu, J. Niebauer, H. Jiang, E. Fiehn, G. Schuler (1999). "Exercise intolerance in patients with chronic heart failure and increased expression of inducible nitric oxide synthase in the skeletal muscle." *J Am Coll Cardiol* 33(1): 174-179.
- Hambrecht, R., P.C. Schulze, S. Gielen, A. Linke, S. Mobius-Winkler, J. Yu, J.J. Kratzsch, G. Baldauf, M.W. Busse, A. Schubert, V. Adams, G. Schuler (2002). "Reduction of insulin-like growth factor-I expression in the skeletal muscle of noncachectic patients with chronic heart failure." *J Am Coll Cardiol* 39(7): 1175-1181.

- Hataya, Y., T. Akamizu, K. Takaya, N. Kanamoto, H. Ariyasu, M. Saijo, K. Moriyama, A. Shimatsu, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao, (2001). "A low dose of ghrelin stimulates growth hormone (GH) release synergistically with GH-releasing hormone in humans." *J Clin Endocrinol Metab* 86(9): 4552.
- Helin, K., M. Stoll, S. Meffert, U. Stroth, T. Unger (1997). "The role of angiotensin receptors in cardiovascular diseases." *Ann Med* 29(1): 23-29.
- Horn, F., M. Armbruster, S. Berghold, F. Blaeschke, C. Grillhösl, S. Helferich, I. Moc, M. Pritsch, N. Schneider, P. Ziegler (2009) „Biochemie des Menschen: das Lehrbuch für das Medizinstudium“ Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Auflage, 630: 392-393.
- Horvath, T.L., S. Diano, P. Sotonyi, M. Heiman, M. Tschop (2001). "Minireview: ghrelin and the regulation of energy balance-a hypothalamic perspective." *Endocrinol* 142(10): 4163-4169.
- Hryniewicz, K., A.S. Androne, A. Hudaihed, S.D. Katz (2003). "Partial reversal of cachexia by beta-adrenergic receptor blocker therapy in patients with chronic heart failure." *J Card Fail* 9(6): 464-468.
- Jaattela, A., A. Alho, V. Avikainen, E. Karaharju, J. Kataja, M. Lahdensuu, P. Lepisto, P. Rokkanen, T. Tervo (1975). "Plasma catecholamines in severely injured patients: a prospective study on 45 patients with multiple injuries." *Br J Surg* 62(3): 177-181.
- Jasmin, J.F., A. Calderone, T.K. Leung, L. Villeneuve, J. Dupuis (2003). "Lung structural remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: complete reversal with irbesartan." *Cardiovasc Res* 58(3): 621-631.
- Kalantar-Zadeh, K., N. Kuwae, D.Y. Wu, R.S. Shantouf, D. Fouque, S.D. Anker, G. Block, J.D. Kopple (2006). "Associations of body fat and its changes over time with quality of life and prospective mortality in hemodialysis patients." *Am J Clin Nutr* 83(2): 202-210.
- Katugampola, S.D., Z. Pallikaros, A.P. Davenport (2001). "[125I-His(9)]-ghrelin, a novel radioligand for localizing GHS orphan receptors in human and rat tissue: up-regulation of receptors with atherosclerosis." *Br J Pharmacol* 134(1): 143-149.
- Kehlet, H. (1999). "Surgical stress response: does endoscopic surgery confer an advantage?" *World J Surg* 23(8): 801-807.
- King, D., M.L. Smith, M. Lye (1996). "Gastro-intestinal protein loss in elderly patients with cardiac cachexia." *Age Ageing* 25(3): 221-223.
- Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo, K. Kangawa (1999). "Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach." *Nature* 402(6762): 656-660.
- Kojima, M. and K. Kangawa (2005). "Ghrelin: structure and function." *Physiol Rev* 85(2): 495-522.
- Kojima, M. and K. Kangawa (2008). "Structure and function of ghrelin." *Results Probl Cell Differ* 46: 89-115.

- Koutkia, P., B. Canavan, J. Breu, M.L. Johnson, S.K. Grinspoon (2004). "Nocturnal ghrelin pulsatility and response to growth hormone secretagogues in healthy men." *Am J Physiol* 287, E506-512.
- Krack, A., R. Sharma, H.R. Figulla, S.D. Anker, (2005). "The importance of the gastrointestinal system in the pathogenesis of heart failure." *Eur Heart J* 26(22): 2368-2374.
- Kubo, S.H., T.S. Rector, A.J. Bank, R.E. Williams, S.M. Heifetz (1991). "Endothelium-dependent vasodilation is attenuated in patients with heart failure." *Circ* 84(4): 1589-1596.
- Lavie, C.J., A.F. Osman, R.V. Milani, M.R. Mehra (2003). "Body composition and prognosis in chronic systolic heart failure: the obesity paradox". *Am J Cardiol* 91(7): 891-894.
- Lawrence, C.B., A.C. Snape, F.M. Baudoin, S.M. Luckmann (2002). "Acute central ghrelin and GH secretagogues induce feeding and activate brain appetite centers." *Endocrinol* 143(1): 155-162.
- Levine, B., J. Kalman, L. Mayer, H.M. Fillit, M. Packer (1990). "Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure." *N Engl J Med* 323(4): 236-241.
- Luque, R. M., M. Duran-Prado, S. Garcia-Navarro, F. Gracia-Navarro, R.D. Kineman, M.M. Malagon, J.P. Castano (2006). "Identification of the somatostatin receptor subtypes (sst) mediating the divergent, stimulatory/inhibitory actions of somatostatin on growth hormone secretion." *Endocrinol* 147(6): 2902-2908.
- Mancini, D.M., E. Coyle, A. Coggan, J. Beltz, N. Ferraro, S. Montain, J.R. Wilson (1989). "Contribution of intrinsic skeletal muscle changes to <sup>31</sup>P NMR skeletal muscle metabolic abnormalities in patients with chronic heart failure." *Circulation* 80(5): 1338-1346.
- Mancini, D.M., G. Walter (1992). "Contribution of skeletal muscle atrophy to exercise intolerance and altered muscle metabolism in heart failure." *Circ* 85(4): 1364-1373.
- Massie, B., M. Conway, R. Yonge, S. Frostick, J. Ledingham, P. Sleight, G. Radda, B. Rajagopalan (1987). "Skeletal muscle metabolism in patients with congestive heart failure: relation to clinical severity and blood flow." *Circulation* 76(5): 1009-1019.
- Masuda, Y., T. Tanaka, N. Inomata, N. Ohnuma, S. Tanaka, Z. Itoh, H. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa (2000). "Ghrelin stimulates gastric acid secretion and motility in rats." *Biochem Biophys Res Commun* 276(3): 905-908.
- Matsumura, K., T. Tsuchihashi, K. Fujii, I. Abe, M. Iida (2002). "Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits." *Hypertension* 40(5): 694-699.
- Messini, C.I., K. Dafopoulos, N. Chalvatzas, P. Georgoulis, G. Anifandis, I.E. Messinis (2010) "Effect of ghrelin and thyrotropin-releasing hormone on prolactin secretion in normal women." *Horm Metab Res.* 42(3): 204-208.
- McMurray, J.J. and S. Stewart (2000). "Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure." *Heart* 83(5): 596-602.
- Mello, N.K. (1972). "Behavioral Studies of alcoholism." *Psychosom Med* 219-291.



- Morton, G.J. and M.W. Schwartz (2001). "The NPY/AgRP neuron and energy homeostasis." *Int J Obes Relat Metab Disord* 25 Suppl 5: S56-62.
- Nagaya, N., M. Uematsu, M. Kojima, Y. Ikeda, F. Yoshihara, W. Shimizu, H. Hosoda, Y. Hirota, H. Ishida, H. Mori, K. Kangawa (2001). "Chronic administration of ghrelin improves left ventricular dysfunction and attenuates development of cardiac cachexia in rats with heart failure." *Circ* 104(12): 1430-1435.
- Nagaya, N., M. Kojima, M. Uematsu, M. Yamagishi, H. Hosoda, H. Oya, Y. Hayashi, K. Kangawa (2001). "Hemodynamic and hormonal effects of human ghrelin in healthy volunteers." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280(5): R1483-1487.
- Nagaya, N., K. Miyatake, M. Uematsu, H. Oya, W. Shimizu, H. Hosoda, M. Kojima, N. Nakanishi, H. Mori, K. Kangawa (2001). "Hemodynamic, renal, and hormonal effects of ghrelin infusion in patients with chronic heart failure." *J Clin Endocrinol Metab* 86(12): 5854-5859.
- Nagaya, N., J. Moriya, Y. Yasumura, M. Uematsu, F. Ono, W. Shimizu, K. Ueno, M. Kitakaze, K. Miyatake, K. Kangawa (2004). "Effects of ghrelin administration on left ventricular function, exercise capacity, and muscle wasting in patients with chronic heart failure." *Circ* 110(24): 3674-3679.
- Nagaya, N. and K.Kangawa (2006). "Therapeutic potential of ghrelin in the treatment of heart failure." *Drugs* 66(4): 439-448.
- Nakazato, M., N. Murakami, Y. Date, M. Kojima, H. Matsuo, K. Kangawa, S. Matsukura (2001). "A role for ghrelin in the central regulation of feeding." *Nature* 409(6817): 194-198.
- Neary, N.M., A.P. Goldstone, S.R. Bloom (2004). "Appetite regulation: from the gut to the hypothalamus." *Clin Endocrinol (Oxf)* 60(2): 153-160.
- Niebauer, J., C.D. Pflaum, A.L. Clark, C.L. Strasburger, J. Hooper, P.A. Poole-Wilson, A.J. Coats, S.D. Anker (1998). "Deficient insulin-like growth factor I in chronic heart failure predicts altered body composition, anabolic deficiency, cytokine and neurohormonal activation." *J Am Coll Cardiol* 32(2): 393-397.
- Nürnberg, E. and P. Surmann (1991): „Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis“, 2. Band Methoden, Berlin; Heidelberg; New York; London; Paris; Tokyo; Hong Kong; Barcelona; Budapest, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1991: 981
- Obisesan, T.O., M.J. Toth, K. Donaldson, S.S. Gottlieb, M.L. Fisher, P. Vaitekevicius, E.T. Poehlman (1996). "Energy expenditure and symptom severity in men with heart failure." *Am J Cardiol* 77(14): 1250-1252.
- Okumura, H., N. Nagaya, M. Enomoto, E. Nakagawa, H. Oya, K. Kangawa (2002). "Vasodilatory effect of ghrelin, an endogenous peptide from the stomach." *J Cardiovasc Pharmacol* 39(6): 779-783.
- Ooms, M.E., P. Lips, A. Van Lingen, H.A. Valkenburg (1993). "Determinants of bone mineral density and risk factors for osteoporosis in healthy elderly women." *J Bone Miner Res* 8(6): 669-675.

- Pfeffer, M.A., J.M. Pfeffer, M.C. Fishbein, P.J. Fletcher, J. Spadaro, R.A. Kloner, E. Braunwald (1979). "Myocardial infarct size and ventricular function in rats." *Circ Res* 44(4): 503-512.
- Poehlman, E.T., J. Scheffers, S.S. Gottlieb, M.L. Fisher, P. Vaitekevicius (1994). "Increased resting metabolic rate in patients with congestive heart failure." *Ann Intern Med* 121(11): 860-862.
- Rejnmark, L., P. Vestergaard, L. Heickendorff, F. Andreasen, L. Mosekilde (2001). "Loop diuretics alter the diurnal rhythm of endogenous parathyroid hormone secretion. A randomized-controlled study on the effects of loop- and thiazide-diuretics on the diurnal rhythms of calcitropic hormones and biochemical bone markers in postmenopausal women." *Eur J Clin Invest* 31(9): 764-772.
- Richartz, B.M., U. Lotze, A. Krack, A. Gastmann, F. Kuthe, H.R. Figulla (2001). "Leptin: a parameter for metabolic changes in heart failure." *Z Kardiol* 90(4): 280-285.
- Riley, M., J.S. Elborn, W.R. McKane, N. Bell, C.F. Stanford, D.P. Nicholls (1991). "Resting energy expenditure in chronic cardiac failure." *Clin Sci (Lond)* 80(6): 633-639.
- Romeis, B. (1989): „Mikroskopische Technik“, 17. Aufl. München-Wien-Baltimore, Verlag Urban und Schwarzenberg
- Sackmann, J.E. (1997). "Pain and its management". *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 27(6): 1487-1504.
- Sakata, I., M. Yamazaki, K. Inoue, Y. Hayashi, K. Kangawa, T. Sakai (2003). "Growth hormone secretagogue receptor expression in the cells of the stomach-projected afferent nerve in the rat nodose ganglion." *Neuro-sci Lett* 342(3): 183-186.
- Sandek, A.; J. Bauditz, A. Swidsinski, S. Buhner, J. Weber-Eibel, S. von Haehling, W. Schroedl, T. Karhausen, W. Doehner, M. Rauchhaus, P. Poole-Wilson, H. D. Volk, H. Lochs, S. Anker (2007). "Altered intestinal function in patients with chronic heart failure." *J Am Coll Cardiol* 50(16): 1561-9.
- Schmidt, L. (1972). "Alkoholkrankheit und Alkoholmissbrauch. Definition-Ursachen-Folgen-Behandlung" Kohlhammer Druckerei GmbH
- Sandri, M., C. Sandri, A. Gilbert, C. Skurk, E. Calabria, A. Picard, K. Walsh, S. Schiaffino, S.H. Lecker, A.L. Goldberg (2004). "Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy." *Cell* 117(3): 399-412.
- Seeberger, J. (1998). "Behandlungcompliance bei Tumorschmerzpatienten"  
<http://www.ub.uni-heidelberg.de/archiv/391/>
- Selye, H., E. Bajusz, S. Grasso, P. Mendell (1960). "Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat." *Angiol.* 11: 398-407.
- Sengenès, C., C. Moro, J. Galitzky, M. Berlan, M. Lafontan (2005). "Natriuretic peptides: a new lipolytic pathway in human fat cells." *Med Sci (Paris)* 21 Spec No: 29-33.
- Shane, E., D. Mancini, K. Aaronson, S.J. Silverberg, M.J. Seibel, V. Addesso, D.J. McMahon (1997). "Bone mass, vitamin D deficiency, and hyperparathyroidism in congestive heart failure." *Am J Med* 103(3): 197-207.

- Sharma, R. and S.D. Anker (2002). "Cytokines, apoptosis and cachexia: the potential for TNF antagonism." *Int J Cardiol* 85(1): 161-71.
- Shiiba, T., M. Nakazato, M. Mizuta, Y. Date, M.S. Mondal, M. Tanaka, S. Nozoe, H. Hosoda, K. Kangawa, S. Matsukura (2002). "Plasma ghrelin levels in lean and obese humans and the effect of glucose on ghrelin secretion." *J Clin Endocrinol Metab* 87(1): 240-244.
- Shintani, M., Y. Ogawa, K. Ebihara, M. Aizawa-Abe, F. Miyanaga, K. Takaya, T. Hayashi, G. Inoue, K. Hosoda, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao (2001). "Ghrelin, an endogenous growth hormone secretagogue, is a novel orexigenic peptide that antagonizes leptin action through the activation of hypothalamic neuropeptide Y/Y1 receptor pathway." *Diabetes* 50(2): 227-232.
- Spate, U. and P. C. Schulze (2004). "Proinflammatory cytokines and skeletal muscle." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7(3): 265-269.
- Stefanini, M., C. De Martino, L. Zamboni (1967). "Fixation of ejaculated spermatozoa for electron microscopy." *Nature* 216(5111): 173-174
- Strassburg, S., J. Springer, S.D. Anker (2005). „Muscle wasting in cardiac cachexia.“ *Int J Biochem Cell Biol* 37(10): 1938-1947
- Sun, T.W. and L.X. Wang (2007). "Low levels of B-type natriuretic peptide predict poor clinical outcomes in patients with chronic and advanced heart failure." *Med Hypotheses* 68(3): 677-679.
- Takaya, K., H. Ariyasu, N. Kanamoto, H. Iwakura, A. Yoshimoto, M. Harada, K. Mori, Y. Komatsu, T. Usui, A. Shimatsu, Y. Ogawa, K. Hosoda, T. Akamizu, M. Kojima, K. Kangawa, K. Nakao (2000). "Ghrelin strongly stimulates growth hormone release in humans." *J Clin Endocrinol Metab* 85(12): 4908-4911.
- Tesauro M., F. Schinzari, M. Caramanti, R. Lauro, C. Cardillo (2010). "Cardiovascular and metabolic effects of ghrelin." *Curr Diabetes Rev.*; 6(4): 228-235.
- Tisdale, M.J. (2005). "Molecular pathways leading to cancer cachexia" *Physiology (Bethesda)*, 20: 340-348
- Tjandra, I. (2007) "Untersuchungen zur Interaktion von Ghrelin und Cholezystokinin (CCK) bei der Appetitregulation". <http://www.diss.fu-berlin.de/2007/564/index.html>
- Tolle, V., M.H. Bassant, P. Zizzari, F. Poindessous-Jazat, C. Tomasetto, J. Epelbaum, M.T. Bluet-Pajot (2002). "Ultradian rhythmicity of ghrelin secretion in relation with GH, feeding behavior, and sleep-wake patterns in rats." *Endocrinol* 143(4) 1353-1361.
- Torre-Amione, G., S. Kapadia, C. Benedict, H. Oral, J.B. Young, D.L. Mann (1996). "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* 27(5): 1201-1206.
- Toshinai K, H. Yamaguchi, Y. Sun, R.G. Smith, A. Yamanaka, T. Sakurai, Y. Date, M.S. Mondal, T. Shimbara, T. Kawagoe, N. Murakami, M. Miyazato, K. Kangawa, M. Nakazato (2006). "Des-acyl ghrelin induces food intake by a mechanism

- independent of the growth hormone secretagogue receptor." *Endocrinol.* 147(5): 2306-2314.
- Toth, M.J., S.S. Gottlieb, M.L. Fisher, A.S. Ryan, B.J. Nicklas, E.T. Poehlman (1997). "Plasma leptin concentrations and energy expenditure in heart failure patients." *Metabolism* 46(4): 450-453.
- Trudel, L., C. Tomasetto, M.C. Rio, M. Bouin, V. Plourde, P. Eberling, P. Poitras (2002). "Ghrelin/motilin-related peptide is a potent prokinetic to reverse gastric postoperative ileus in rat." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282(6): G948-952.
- Tschöp, M., D.L. Smiley, M.L. Heiman (2000). "Ghrelin induces adiposity in rodents." *Nature* 407(6806): 908-913.
- Tschöp, M., C. Weyer, P.A. Tataranni, V. Devanarayan, E. Ravussin, M.L. Heiman (2001). "Circulating ghrelin levels are decreased in human obesity." *Diabetes* 50(4): 707-709.
- Tschöp, M., R. Wawarta, R.L. Riepl, S. Friedrich, M. Bidlingmaier, R. Landgraf, C. Folwaczny (2001). "Postprandial decrease of circulating human ghrelin levels." *J Endocrinol Invest* 24(6): RC19-21.
- Ukkola, O. (2004). "Peripheral regulation of food intake: new insights." *J Endocrinol Invest* 27(1): 96-98.
- van der Lely, A.J., M. Tschop, M.L. Heiman, E. Ghigo (2004). "Biological, physiological, pathophysiological, and pharmacological aspects of ghrelin." *Endocr Rev* 25(3): 426-457.
- Vestergaard, E.T., N.H. Andersen, T.K. Hansen, L.M. Rasmussen, N. Moller, K.E. Sorensen, E. Sloth, J.O. Jorgensen (2007). "Cardiovascular effects of intravenous ghrelin infusion in healthy young men." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293(5): H3020-3026.
- von Haehling, S., E.A. Jankowska, S.D. Anker (2004). "Tumour necrosis factor-alpha and the failing heart-pathophysiology and therapeutic implications." *Basic Res Cardiol* 99(1): 18-28.
- von Haehling, S., W. Doehner, S.D. Anker (2007). "Nutrition, metabolism, and the complex pathophysiology of cachexia in chronic heart failure." *Cardiovasc Res* 73(2): 298-309.
- von Haehling, S., M. Lainscak, J. Springer, S.D. Anker (2009). "Cardiac cachexia: A systematic overview." *Pharmacol Ther* 121(3): 227-252
- Ware, C.F., S. VanArsdale, T.L. VanArsdale (1996). "Apoptosis mediated by the TNF-related cytokine and receptor families." *J Cell Biochem* 60(1): 47-55.
- Weber, K.T. (2003). "A neuroendocrine-immune interface. The immunostimulatory state of aldosteronism." *Herz* 28(8): 692-701.
- Werner, H., B. Stannard, M.A. Bach, C.T. Jr. Roberts, D. LeRoith (1991). "Regulation of insulin-like growth factor I receptor gene expression in normal and pathological states." *Adv Exp Med Biol* 293: 263-272.

- Wiley, K.E. and A.P. Davenport (2002). "Comparison of vasodilators in human internal mammary artery: ghrelin is a potent physiological antagonist of endothelin-1." *Br J Pharmacol* 136(8): 1146-1152.
- Willesen, M.G., P. Kristensen, J. Römer (1999). "Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat." *Neuroendocrinol* 70(5): 306-316.
- Wren, A.M., L.J. Seal, M.A. Cohen, A.E. Brynes, G.S. Frost, K.G. Murphy, W.S. Dhillo, M.A. Ghatei, S.R. Bloom (2001). "Ghrelin enhances appetite and increases food intake in humans." *J Clin Endocrinol Metab* 86(12): 5992.
- Wynne, K., K. Giannitsopoulou, C.J. Small, M. Patterson, G. Frost, M.A. Ghatei, E.A. Brown, S.R. Bloom, P. Choi (2005). "Subcutaneous ghrelin enhances acute food intake in malnourished patients who receive maintenance peritoneal dialysis: a randomized, placebo-controlled trial" *J Am Soc Nephrol* 16(7): 2111-2118.
- Yukawa, M., D.S. Weigle, C.D. Davis, B.T. Marck, T. Wolden-Hanson (2008). "Peripheral ghrelin treatment stabilizes body weights of senescent male Brown Norway rats at baseline and after surgery". *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294(5): 1453-1460.
- Zhang, W., T.R. Lin, Y. Hu, Y. Fan, L. Zhao, E.L. Stuenkel, M.W. Mulholland (2004). "Ghrelin stimulates neurogenesis in the dorsal motor nucleus of the vagus." *J Physiol* 559(Pt 3): 729-737.

## 10. Publikationen

Teile dieser Dissertation wurden bereits veröffentlicht:

Akashi Y.J., S. Palus, R. Datta, H. Hale, J.E. Taylor, C. Thoene-Reineke, J. Dong, T. Thum, M.D. Culler, S.D. Anker, J. Springer (2009). "No effects of human ghrelin on cardiac function despite profound effects on body composition in a rat model of heart failure." *Int J Cardiol.* 137(3):267-75

Palus, S., S. von Haehling, W. Doehner, R. Datta, J. Zhang, J.Z. Dong, M.D. Culler, S.D. Anker, J. Springer (2013). "Effect of application route of the ghrelin analog BIM-28131 (RM-131) on body weight and body composition in a rat heart failure model in *International journal of cardiology.*" *Int J Cardiol* 168(3): 2369-2374

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich in irgendeiner Form unterstützt und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Jörg Aschenbach für das Interesse an diesem Thema sowie die Betreuung und Begutachtung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. Stefan Anker für die Überlassung des Themas und die Begutachtung der Arbeit.

Herrn Dr. Jochen Springer für die Unterstützung und Hilfe bei der Planung, Durchführung und Abfassung dieser Arbeit.

Frau Karen Hornemann für die statistische Beratung und Betreuung.

Allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Anker für die gute Zusammenarbeit.

Peter Käb für seine Geduld, Unterstützung und Zuspruch.

Meinen Eltern, Christa Ehlert und Lutz-Peter Ehlert, die mir meine Ausbildung ermöglicht sowie meine Pläne immer unterstützt haben und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

## **Selbstständigkeitserklärung**

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

Rostock, den 28.09.2012

Grit Ehlert