

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

**Der Einfluss von Erythropoetin und Tissue Protective
Molecule auf Gewichtsverlauf, Körperzusammensetzung
und spontane Aktivität in einem Rattenmodell der
Tumorkachexie**

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

**vorgelegt von
Tanja Hamm, geb. Braun
Tierärztin aus Ravensburg**

Berlin 2010

Journal-Nr.: 3470

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. A. Gruber
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Dr. S. D. Anker
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

erythropoietin, rats, cachexia, beta-blockers, hepatoma, neoplasms, animal models, cytokines

Tag der Promotion: 22.06.2012

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: 978-3-86387-323-3

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2010

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 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AIS	anemia-inducing factor
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
AP-1	Transkriptionsfaktor
APP	Akute Phase Protein
APR	Akute Phase Reaktion
β -cR	β -Rezeptor Untereinheit
β -MHC	Major Histocompatibility Complex
BAT	braunes Fettgewebe
BCAA	branched chain amino acids
BMI	Body Mass Index
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CEPO	carbamyliertes Erythropoetin
CFU-ES	colony-forming units-erythroid
CD131	β -Rezeptor Untereinheit
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CO	Cardiac Output
COPD	chronic obstructive pulmonary disease
CRH	Corticotropin Releasing Hormon
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
d	diastolisch
E3alpha II	Ubiquitin-Ligase
EF	Ejection Fraction
EPA	Eicosapentaensäure
EPO	Erythropoetin
EPO-R	Erythropoetin-Rezeptor
ERK	extrazelluläre signal-regulated Kinase
et al.	und andere
FS	Fractional Shortening
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCP	haematopoietic cell phosphatase
HIF-1	hypoxia inducible factor 1
HSL	Hormon-sensitive Lipase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IFN γ	Interferon Gamma
IL	Interleukin
IU	International Units
IVS	interventrikuläres Septum
JAK	Janus Kinase
LMF	lipid-mobilizing factor
LPL	Lipoprotein Lipase
LPS	Lipopolysaccharide
LVID	left ventricular intraventricular diameter
LVPW	left ventricular posterior wall
M.	Musculus
M. EDL	Musculus extensor digitorum longus
MAC 16	ein Adenokarzinom der Maus
MAF bx	Muscle Atrophy F-box
MAPK	mitogen-activated protein kinase

MEF-2	Transkriptionsfaktor
mRNA	messenger RNA
MURF 1	Muscle RING Finger 1
MV E / MV A	Maß für den Mitralfluss
Myo D	Transkriptionsfaktor
NFκB	Nuklear Faktor kappa B
NMR	nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanz
NO	Stickstoffmonoxid
NPY	Neuropeptid Y
NSAIDS	Nichtsteroidale Antiphlogistika
NPY	Neuropeptid Y
PI3K/Akt	Phosphoinositol 3 kinase- Signaltransduktionsweg
PIF	proteolysis inducing factor
POMC/CART	durch Pro-Opiomelanocortin/Kokain und Amphetamin regulierter Transkriptionsweg
Raf	rapidly growing fibrosarcoma
REE	Ruheenergieverbrauch
RHuEPO	rekombinantes humanen Erythropoetin
s	systolisch
STAT	signal transducer and activator of transcription
TNFα	Tumor-Nekrose-Faktor α
TPM	Tissue Protective Molecule
U	Unit
UCP	Uncoupling-Protein
ZAG	Zink α2-Glykoprotein
ZNS	Zentrales Nerven System

Abbildungsverzeichnis

Monotherapie	Seite
Abbildung 1 Kaplan-Meier-Kurve: Überleben	57
Abbildung 2 Endgewicht excl. Tumor	58
Abbildung 3 Gewichtsverlust excl. Tumor	58
Abbildung 4 Gewichtsverlust excl. Tumor pro Tag	59
Abbildung 5 Tumorzvolumen	59
Abbildung 6 NMR: Verlust an Fett	60
Abbildung 7 NMR: Verlust an Fett pro Tag	61
Abbildung 8 NMR: Verlust an fettfreier Masse	61
Abbildung 9 NMR: Verlust an fettfreier Masse pro Tag	62
Abbildung 10 Futtermittelaufnahme Tag 10	63
Abbildung 11 Prozentualer Aktivitätsverlust Tag 10/ Tag 0	63
Abbildung 12 Gewicht:Herz	64
Abbildung 13 Echokardiographie: EF Tag 11	64
Abbildung 14 Echokardiographie: FS Tag 11	65
Abbildung 15 Echokardiographie: CO Tag 11	65
Kombinationstherapie mit Erythropoetin und Bisoprolol	
Abbildung 16 Kaplan-Meier-Kurve: Überleben	70
Abbildung 17 Endgewicht excl. Tumor	70
Abbildung 18 Gewichtsverlust excl. Tumor	71
Abbildung 19 Gewichtsverlust excl. Tumor pro Tag	71
Abbildung 20 Tumorzvolumen	72
Abbildung 21 NMR: Verlust an Fett	73
Abbildung 22 NMR: Verlust an Fett pro Tag	73
Abbildung 23 NMR: Verlust an fettfreier Masse	74
Abbildung 24 NMR: Verlust an fettfreier Masse pro Tag	74
Abbildung 25 Futtermittelaufnahme Tag 10	75

Abbildung 26	Prozentualer Aktivitätsverlust Tag 10/ Tag 0	76
Abbildung 27	Gewicht: Herz	76
Abbildung 28	Echokardiographie: EF Tag 11	77
Abbildung 29	Echokardiographie: FS Tag 11	77
Abbildung 30	Echokardiographie: CO Tag 11	78

Kombinationstherapie mit Tissue Protective Molecule und Bisoprolol

Abbildung 31	Kaplan-Meier-Kurve: Überleben	83
Abbildung 32	Endgewicht excl. Tumor	83
Abbildung 33	Gewichtsverlust excl. Tumor	84
Abbildung 34	Gewichtsverlust excl. Tumor pro Tag	84
Abbildung 35	Tumorvolumen	85
Abbildung 36	NMR: Verlust an Fett	86
Abbildung 37	NMR: Verlust an Fett pro Tag	86
Abbildung 38	NMR: Verlust an fettfreier Masse	87
Abbildung 39	NMR: Verlust an fettfreier Masse pro Tag	87
Abbildung 40	Futteraufnahme Tag 10	88
Abbildung 41	Prozentualer Aktivitätsverlust Tag 10/Tag 0	89
Abbildung 42	Gewicht Herz	89
Abbildung 43	Echokardiographie: EF Tag 11	90
Abbildung 44	Echokardiographie: FS Tag 11	90
Abbildung 45	Echokardiographie: CO Tag 11	91

Vergleich der niedrig dosierten Monotherapien

Abbildung 46	Kaplan-Meier-Kurve: Überleben	92
Abbildung 47	Histologie: weißes Fett	92
Abbildung 48	Histologie: Milz Vergleich	93

Vergleich der hoch dosierten Monotherapien

Abbildung 49 Gewichtsverlust excl. Tumor	93
Abbildung 50 NMR: Verlust an Fett	94
Abbildung 51 NMR: Verlust an fettfreier Masse	94
Abbildung 52 Futtermaufnahme Tag 10	95
Abbildung 53 Histologie: weißes Fett	95
Abbildung 54 Histologie: Milz	96
Abbildung 55 Histologie: M. gastrocnemius	96

Vergleich der niedrig dosierten Kombinationstherapien

Abbildung 56 Kaplan-Meier-Kurve: Überleben	97
Abbildung 57 Gewichtsverlust excl. Tumor pro Tag	98
Abbildung 58 Futtermaufnahme Tag 10	98
Abbildung 59 Histologie: weißes Fett	99

Vergleich der hoch dosierten Kombinationstherapien

Abbildung 60 Kaplan-Meier-Kurve: Überleben	100
Abbildung 61 Gewichtsverlust excl. Tumor	100
Abbildung 62 NMR: Verlust an fettfreier Masse pro Tag	101
Abbildung 63 Futtermaufnahme Tag 10	101
Abbildung 64 Histologie: M. gastrocnemius	102
Abbildung 65 Histologie: Herz	102
Abbildung 66 Histologie: Leber	103
Abbildung 67 Histologie: weißes Fett	103
Abbildung 68 Histologie: braunes Fett	104

Tabellenverzeichnis	Seite
Tabelle M1 Sham-Gruppen	39
Tabelle M2 Tumor-Monotherapie-Gruppen	40
Tabelle M3 Tumor- Kombinationstherapie-Gruppen	40
Tabelle 1.1 Gewichte: Sham-Gruppen	47
Tabelle 1.2 Echokardiographie: Sham-Gruppen	48
Tabelle 2.1 Gewichte: Behandlungsgruppen ohne Tumor	50
Tabelle 2.2 Echokardiographie: Behandlungsgruppen ohne Tumor	52
Tabelle 3.1 Gewichte: Monotherapie	54
Tabelle 3.2 Echokardiographie: Monotherapie	56
Tabelle 3.3 Tumorzellzahl Monotherapie	60
Tabelle 3.4 Futteraufnahme Monotherapie	62
Tabelle 4.1 Gewichte: Kombinationstherapie Erythropoetin	67
Tabelle 4.2 Echokardiographie: Kombinationstherapie Erythropoetin	69
Tabelle 4.3 Tumorzellzahl Kombinationstherapie Erythropoetin	72
Tabelle 4.4 Futteraufnahme Kombinationstherapie Erythropoetin	75
Tabelle 5.1 Gewichte: Kombinationstherapie Tissue Protective Molecule	80
Tabelle 5.2 Echokardiographie: Kombinationstherapie Tissue Protective Molecule	82
Tabelle 5.3 Tumorzellzahl Kombinationstherapie Tissue Protective Molecule	85
Tabelle 5.4 Futteraufnahme Kombinationstherapie Tissue Protective Molecule	88
Tabelle 5.5 Hämatokrit in der niedrig dosierten Kombinationstherapie	99
Tabelle 5.6 Hämatokrit in der hoch dosierten Kombinationstherapie	104

Inhaltsangabe

Inhaltsangabe	1
1. Einleitung.....	5
2. Literaturübersicht.....	6
2.1 Kachexie.....	6
2.2 Tumorkachexie.....	8
2.2.1 Epidemiologie der Tumorkachexie	8
2.2.2 Pathophysiologie der Tumorkachexie	9
2.2.2.1 Anorexie	9
2.2.2.2 Ruheenergieverbrauch (REE) und Hypermetabolismus	11
2.2.2.3 Die Akute-Phase-Reaktion (APR)	13
2.2.2.4 Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel.....	14
2.2.2.5 Abbau von Fettgewebe und Veränderungen im Fettstoffwechsel.....	14
2.2.2.6 Abbau von Muskelgewebe und Veränderungen im Proteinstoffwechsel.....	16
2.2.2.7 Zytokine und andere Mediatoren.....	18
2.2.3 Therapie der Tumorkachexie	21
2.3 Erythropoetin (EPO).....	24
2.4 Tissue Protective Molecule (TPM)	29
2.5 Bisoprolol	32
3. Material und Methoden.....	35
3.1 Tiere und Tierhaltung	35
3.2 Substanzen	36
3.2.1 Erythropoetin.....	36
3.2.2 Tissue Protective Molecule (TPM)	36
3.2.3 Bisoprolol.....	37
3.2.4 Placebo	37
3.3 Applikation der Medikamente	37
3.4 Tumor	38
3.5 Versuchsaufbau und Behandlungsprotokoll.....	39
Der Versuchsablauf zeigte folgenden Aufbau.....	39
Es bestanden folgende Behandlungsgruppen	39
3.6 Gewichtsmessungen	41
3.7 Echokardiographische Untersuchung	41

3.8	Magnetresonanzspektroskopie (NMR).....	43
3.9	Aktivitätsmessung im Lokomotor-System	43
3.10	Tötung und Organentnahme	44
3.11	Ermittlung der Tumorzellzahl.....	45
3.12	Statistische Auswertung	46
3.13	Nutzung gemeinsam erhobener Daten der Arbeitsgruppe.....	46
4.	Ergebnisse.....	47
4.1	Sham Gruppen.....	47
4.2	Monotherapie: Erythropoetin und Tissue Protective Molecule.....	53
4.3	Kombinationstherapie: Erythropoetin + Bisoprolol	66
4.4	Kombinationstherapie: Tissue Protective Molecule + Bisoprolol.....	78
4.5	Vergleich von Erythropoetin und Tissue Protective Molecule	91
4.5.1	Erythropoetin 500 mg/kg/d - Tissue Protective Molecule 0.17 µg/kg/d	91
4.5.2	Erythropoetin 5000 mg/kg/d - Tissue Protective Molecule 1.7 µg/kg/d	93
4.5.3	Erythropoetin / Bisoprolol 25% - Tissue Protective Molecule / Bisoprolol 25%.....	97
4.5.4	Erythropoetin / Bisoprolol 75% - Tissue Protective Molecule / Bisoprolol 75%.....	99
5.	Diskussion	105
5.1	Kachexiemodell.....	105
5.2	Ergebnisse des Vergleichs von Placebo Sham gegen Placebo Tumor	105
5.3	Ergebnisse des Vergleichs von Placebo Sham mit Erythropoetin Sham und Tissue Protective Molecule Sham	109
5.4	Ergebnisse des Vergleichs von Placebo mit Erythropoetin und Tissue Protective Molecule	111
5.4.1	Überlebenszeitraum und Tumorgröße	112
5.4.2	Gewichtsverlust.....	113
5.4.3	Futteraufnahme	114
5.4.4	Aktivität.....	114
5.4.5	Organgewichte	115
5.4.6	Fett	117
5.4.7	Muskeln.....	118
5.4.8	Herzfunktion	119
5.5	Ergebnisse der Erythropoetin Kombinations-Therapie.....	124
5.5.1	Überlebenszeitraum und Tumolvolumen	125

5.5.2 Gewichtsverlust.....	126
5.5.3 Fett.....	126
5.5.4 Aktivität und Lebensqualität	127
5.5.5 Organgewichte	127
5.5.6 Herzfunktion	128
5.6 Ergebnisse der Tissue Protective Molecule Kombinations-Therapie	130
5.6.1 Überlebenszeitraum und Tumormenge.....	130
5.6.2 Gewichtsverlust.....	131
5.6.3 Futteraufnahme und Aktivität	131
5.6.4 Organgewichte	132
5.6.5 Herzfunktion	133
5.7 Vergleich der Ergebnisse von Erythropoetin und Tissue Protective Molecule	134
6. Zusammenfassung.....	136
7. Summary	137
8. Literaturverzeichnis	138

1. Einleitung

Tumorerkrankungen stellen ein bedeutendes globales Gesundheitsproblem dar, mit jährlich etwa 3,2 Millionen neu diagnostizierter Fälle allein in der EU. Jedes Jahr sterben in der EU ca. 1,7 Millionen Menschen an Krebs, was hier die zweithäufigste Todesursache darstellt. Die wahrscheinlich häufigste Konsequenz einer malignen Krebserkrankung ist die Entstehung der Tumorkachexie, die bei etwa 50% aller Krebspatienten auftritt. Der Gewichtsverlust ist sowohl mit einer reduzierten Lebensqualität als auch mit einer verkürzten Lebenserwartung verbunden. Schätzungsweise sterben weltweit etwa 2 Millionen Menschen jährlich infolge der durch die Krebserkrankung entstandenen Kachexie. Obwohl es einige Therapieansätze zur Behandlung der Tumorkachexie gibt, zeigen diese jedoch bisher nur begrenzt Erfolg. Erythropoetin (EPO) und Tissue Protective Molecule (TPM) stellen aufgrund ihres zytoprotektiven Effektes, der in Studien mit anderen Krankheitsbildern nachgewiesen werden konnte, möglicherweise ein geeignetes Mittel zur Bekämpfung der Tumorkachexie dar. Da der Einsatz von β -Blockern in klinischen Studien bei Herzinsuffizienzpatienten mit kardialer Kachexie eine positive Wirkung auf die Entwicklung des Körpergewichts gezeigt hat, könnte Bisoprolol auch einen günstigen Effekt auf das Körpergewicht bei Tumorpatienten haben.

In diesem Versuch soll geklärt werden, ob eine Verabreichung von EPO oder TPM in der Monotherapie oder aber in der Kombination mit Bisoprolol dem Entstehen und Fortschreiten der Tumorkachexie bei Ratten des Yoshida AH-130 Hepatoma Modells entgegen wirken kann. Hierfür wurden neben der Überlebenszeit und dem Gewichtsverlauf auch die Körperzusammensetzung, die Aktivität und Futteraufnahme, die einzelnen Organgewichte sowie die Herzfunktion dokumentiert und ausgewertet.

Diese Studie fand im Rahmen eines größeren Projektes statt, an dessen Umsetzung weitere Doktoranden beteiligt waren. Eventuelle Ähnlichkeiten in bestimmten Bereichen der Dissertation sind daher aufgrund der gleichartigen Thematik unvermeidbar.

Aus Gründen des Tierschutzes wurden die für die Sham Gruppen, die mit Placebo behandelte Tumorgruppe und die Bisoprolol Gruppe ermittelten Daten nur einmal erhoben und von allen Doktoranden genutzt, die an der Studie beteiligt waren (Kai Hartmann, Katja Schmidt, Valerie Flach).

2. Literaturübersicht

2.1 Kachexie

Der Begriff Kachexie stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus den Wortteilen „kakos“ (schlecht) und „hexis“ (Zustand) zusammen [1]. Die Kachexie ist ein fortschreitender Prozess von Muskelabbau und Gewichtsverlust, tritt bei chronischen Erkrankungen auf und ist am Alterungsprozess beteiligt [2]. Sie zeichnet sich durch einen deutlichen Gewichtsverlust, Verlust an Muskelgewebe, Anorexie, Asthenie, Anämie sowie Veränderungen im Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinstoffwechsel aus, verbunden mit einer chronischen Entzündungsreaktion [3, 4]. Wenn auch die Kachexie sehr häufig von Anorexie begleitet wird, so kann doch die Verringerung der Kalorienzufuhr allein nicht die im Verlauf der Kachexie auftretenden Veränderungen in der Körperzusammensetzung bedingen. Darüber hinaus kann Kachexie sogar in der Abwesenheit von Anorexie auftreten und ist im Gegensatz zur Anorexie nicht reversibel [5].

Allein in den USA sind mehr als 5 Millionen Menschen von Kachexie betroffen [6].

Die Kachexie ist von anderen Formen des Gewichtsverlustes, die durch Hungern, Sarkopenie oder Dehydratation entstehen, klar abzugrenzen.

So entsteht der durch Hungern verursachte Gewichtsverlust als direkte Folge des Kalorienmangels ohne das Vorkommen einer Entzündungsreaktion und unter physiologischen Albuminkonzentrationen, außerdem verlieren hungernde Personen grundsätzlich mehr Fett als Muskelgewebe [6]. Der Proteinverlust, der im Rahmen des Hungerprozesses auftritt, betrifft im gleichen Ausmaß den Skelettmuskel als auch das viszerale Protein, wohingegen bei der Kachexie das viszerale Proteinvorkommen von einem Abbau relativ verschont bleibt. So kommt es durch das Hungern zu einem Verlust an Lebermasse, während es bei der Kachexie infolge der erhöhten Stoffwechselaktivität und der Akute-Phase-Reaktion zu einer Zunahme an Lebermasse kommt. Letztlich ist der durch das Hungern entstandene Gewichtsverlust durch erhöhte Nahrungsaufnahme leicht rückgängig zu machen, wohingegen es in verschiedenen Versuchsreihen, die mit oraler und parenteraler Ernährung arbeiteten, eindeutig gezeigt werden konnte, dass eine erhöhte Nahrungszufuhr allein die Kachexie nicht rückgängig machen kann [7].

Der Gewichtsverlust, der im Rahmen der Sarkopenie auftritt, resultiert aus der Muskelatrophie, die wiederum verschiedene Ursachen haben kann. Bei der Dehydratation führt der Verlust an Flüssigkeit zu einer Gewichtsreduktion [6, 8, 9].

Kachexie tritt bei einer ganzen Reihe verschiedenster Erkrankungen wie etwa der Sepsis, chronischer Herzinsuffizienz, Gelenkrheumatismus, Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS), Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) und auch bei malignen Tumoren auf. Sie steht immer im Zusammenhang mit einer schlechten Prognose [10]. Obwohl Kachexie schon vor mehr als 2000 Jahren das erste mal von Hippokrates beschrieben wurde [11] und im letzten Jahrzehnt Gegenstand vermehrter Untersuchungen war, gibt es zum jetzigen Zeitpunkt weder eine etablierte Therapie, die in der Lage wäre, eine Kachexie rückgängig zu machen, noch gab es bis vor kurzem eine einheitliche Definition des Begriffs Kachexie [12].

Meist dient das Körpergewicht als Maßstab für den Ernährungsstatus. Nach Rosenbaum et al. sind Veränderungen im Körpergewicht von mehr als $\pm 2\%$ innerhalb eines Monats, $\pm 3,5\%$ innerhalb von 3 Monaten, $\pm 5\%$ innerhalb von 6 Monaten, $\pm 10\%$ in einem Jahr oder bis zu 5 nachfolgenden Jahren und $\pm 20\%$ nach mehr als 5 Jahren als außerhalb der physiologischen Grenzen liegend zu betrachten [13]. Durch eine alleinige Gewichtsmessung kann aber nicht zwischen Muskel- und Fettverlust unterschieden werden, weshalb es für die Bestimmung des Ernährungszustands von Bedeutung ist, eine Analyse der Körperkompartimente durchzuführen, wodurch Fett von fettfreier Masse abgegrenzt werden kann [14].

Diagnostische Kriterien für das Vorliegen einer Kachexie sind ein unbeabsichtigter Gewichtsverlust von mindestens 5% des ursprünglichen Körpergewichts, ein Body Mass Index (BMI) kleiner 20 bei unter 65-Jährigen bzw. ein BMI kleiner 22 bei über 65-Jährigen, eine Albuminkonzentration von weniger als 3,5 g/dl, eine geringe fettfreie Masse und der Nachweis einer stark erhöhten Zytokinproduktion [6]. Im Bezug auf die kardiale Kachexie schlugen Anker et al. den Begriff eines dokumentierten nicht-ödematösen Gewichtsverlusts von mehr als 6% des bisherigen normalen Körpergewichts, beobachtet über einen Zeitraum von mehr als 6 Monaten, vor [15]. Bei einer Konferenz der Cachexia Consensus Working Group im Dezember 2006 in Washington, DC wurde folgende Definition der Kachexie gefunden: Die Kachexie ist ein komplexes metabolisches Syndrom, das in Folge einer zugrundeliegenden Erkrankung auftritt und bei dem es charakteristisch zu einem Verlust von Muskelmasse mit oder ohne gleichzeitigem Verlust von Fettmasse kommt. Das deutlichste klinische Symptom der Kachexie ist ein Gewichtsverlust bei Erwachsenen oder eine

Wachstumsstörung bei Kindern. Anorexie, Entzündung, Insulinresistenz und ein vermehrter Abbau von Muskelprotein stehen häufig in Verbindung mit der Kachexie. Kachexie muss von Hungern, einem altersbedingten Verlust von Muskelmasse, primärer Depression, Malabsorption und Schilddrüsenüberfunktion klar abgegrenzt werden und steht in Verbindung mit einer erhöhten Morbidität [16].

Unabhängig von der zugrunde liegenden Ätiologie entwickelt sich die Kachexie schlussendlich doch immer in ähnlicher Weise. Charakteristische Merkmale sind etwa die Aktivierung des Immunsystems [17] und der Abbau von Muskelgewebe über den Ubiquitin-Proteasomen-Weg [18]. So kommt es im Rahmen der Kachexie zu einer Erhöhung der zirkulierenden proinflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6 und IFN γ sowie zu einer Akute-Phase-Reaktion [7, 19]. Für TNF α wurde als erstes die Fähigkeit beschrieben, Gewichtsverlust und Anorexie bei Mäusen auszulösen, aufgrund dessen erhielt es auch die Bezeichnung Cachectin [20]. TNF α führt dosisabhängig zu einem Anstieg der Plasmakonzentration des Hormons Leptin, welches zentral eine Verringerung der Futteraufnahme und einen Anstieg des Ruheenergieumsatzes bewirkt [21]. In vivo Experimente haben gezeigt, dass IL-6 in der Lage ist, Proteolyse, Muskelatrophie und Gewichtsverlust auszulösen, was durch eine Therapie mit einem IL-6 Antikörper verhindert werden kann [22].

2.2 Tumorkachexie

2.2.1 Epidemiologie der Tumorkachexie

Tumorerkrankungen sind ein bedeutendes globales Gesundheitsproblem mit jährlich etwa 3,2 Millionen neu diagnostizierter Fälle allein in der EU. Jedes Jahr sterben in der EU ca. 1,7 Millionen Menschen an Krebs, was hier die zweithäufigste Todesursache darstellt. Brust-, Kolorektal-, Lungen- und Prostatakrebs sind die am häufigsten vorkommenden Formen [23].

Die wahrscheinlich häufigste Konsequenz einer malignen Krebserkrankung ist die Entstehung der Tumorkachexie. Etwa 50% aller Krebspatienten verlieren Gewicht, das Vorkommen der Kachexie ist aber nicht gleichmäßig auf alle Tumorarten verteilt. So haben Patienten mit Pankreas- oder Magenkrebs das häufigste Vorkommen an Kachexie (83-87%), Patienten mit einem hochmalignen Non-Hodgkin-Lymphom,

Kolon-, Prostata- oder Lungenkrebs bilden eine mittlere Gruppe (48-61%) während an niedrigmalignem Non-Hodgkin-Lymphom, Brustkrebs, akuter nichtlymphozytärer Leukämie oder Sarkomen erkrankte Patienten ein relativ kleines Vorkommen an Kachexie zeigen (31-40%) [24]. Der Gewichtsverlust ist sowohl mit einer reduzierten Lebensqualität als auch mit einer verkürzten Lebenserwartung verbunden. Diese tritt vor dem Tod bei einem Großteil der Krebspatienten auf und Warren et al. zufolge ist sie für den Tod von 22% aller Krebspatienten verantwortlich [25]. Schätzungsweise sterben weltweit etwa 2 Millionen Menschen jährlich infolge der durch die Krebserkrankung entstandenen Kachexie [26, 27]. Der Tod tritt ein, wenn Patienten ca. 30% ihres vor Eintritt der Krankheit vorhandenen normalen Körpergewichts verloren haben [28], wobei der Verlust an Fettgewebe zu diesem Zeitpunkt 85%, der von Skelettmuskelprotein 75% erreichen kann [29]. Der Verlust an Muskelprotein ist vermutlich der wichtigste, das Überleben beeinflussende Faktor, weil dieses Ausmaß an Gewebeverlust physiologische Funktionen, wie etwa die der Atmungsmuskulatur, deutlich beeinträchtigt [30].

Außerdem sprechen kachektische Patienten schlechter auf eine Chemotherapie an und neigen eher dazu, aufgrund der Toxizität der Therapie Nebenwirkungen zu entwickeln [31].

2.2.2 Pathophysiologie der Tumorkachexie

2.2.2.1 Anorexie

15%-40% aller Krebspatienten haben bereits zum Zeitpunkt der Diagnose eine Anorexie entwickelt [32]. Patienten, die an Tumorkachexie leiden, haben häufig spezifische Probleme, die zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme führen. Solche Faktoren sind Übelkeit und Erbrechen, Verstopfung, Obstruktionen des Gastrointestinaltrakts, Verschlechterung des physischen Zustands und Schmerz sowie die Nebenwirkungen der Behandlung mit Opiaten, Bestrahlung und Chemotherapie. Kachexiepatienten schildern oft ein frühzeitiges Sättigungsgefühl, Veränderungen im Geschmack und geringen Appetit [4]. Obwohl die Anorexie sicherlich einen sehr wichtigen Faktor in der Entstehung der Kachexie darstellt, konnte gezeigt werden, dass in vielen Fällen eine künstliche Ernährung den Verlust an Körpergewicht nicht unterbinden kann [33]. Es scheint also offensichtlich, dass Störungen im Stoffwechsel

(erhöhter Ruheenergieverbrauch (REE), Insulinresistenz und gestörter Kohlenhydratstoffwechsel, Auflösung des Fettgewebes, Hypertriglyzeridämie und Muskelverlust) eine maßgebliche Rolle in der Entstehung der Kachexie spielen [34]. So scheint die Anorexie eher ein Effekt als die Ursache des Gewichtsverlustes bei einer Krebserkrankung zu sein. In Tierversuchen führte „pair-feeding“ weder zu dem selben Ausmaß an Gewichtsverlust, noch zu den metabolischen Störungen, die bei an Tumoren erkrankten Tieren zu beobachten sind [35].

Anorexie ist bei Krebspatienten üblich und kommt bei über 50% aller Fälle vor. Sie ist definiert als ein Verlust von Appetit mit frühzeitiger Sättigung [36] oder als vermindertes Verlangen zu essen [37] und resultiert aus einer Störung des komplexen zentralen und peripheren Signalwegs, der die Nahrungsaufnahme kontrolliert [38]. Eine Regulierung des Appetits resultiert aus der Synthese von appetitanregenden und appetithemmenden Faktoren, einschließlich peripherer metabolischer Signale, die am Gehirn wirken (Leptin, Insulin, Peptid YY, Ghrelin, Zytokine und Fett Mediatoren) sowie der Signale der metabolischen Sensoren in Hirnstamm und Hypothalamus (Neuropeptid Y, Serotonin und Melanocortin-Peptide) [39-43]. Eine Stimulierung des medialen Hypothalamus führt zu einer Hemmung der Nahrungsaufnahme, während die Stimulierung des lateralen Teils die Nahrungszufuhr fördert [44]. Im Hypothalamus stimuliert Neuropeptid Y (NPY) die Nahrungsaufnahme, während der durch Pro-Opiomelanocortin/Kokain und Amphetamin regulierte Transkriptionsweg (POMC/CART) die Nahrungsaufnahme hemmt. Die peripheren Hauptregulatoren dieser Signalwege sind Hormone wie Ghrelin, das appetitanregend und Leptin, das zusammen mit Neurotransmittern wie Serotonin, appetithemmend wirkt [7]. So kommt es bei anorektischen Ratten im Vergleich zu nicht-anorektischen Kontrolltieren zu einer Abnahme immunreaktiver NPY Nervenzellen im Hypothalamus [45], wohingegen eine Blockade des POMC/CART Signalwegs die Futteraufnahme bei Tieren, die an einem Tumor leiden, wiederherstellen kann [46, 47]. Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α) erfüllen eine wichtige Position in der Dysregulation dieser Systeme, indem sie entweder direkt die Peristaltik und Entleerung des Magens beeinflussen oder zentral wirken, indem sie efferente Signale, die den Sättigungsvorgang regulieren, verändern [3], so etwa durch eine Erhöhung des Vorkommens an Corticotropin Releasing-Hormon (CRH), einem Neurotransmitter im zentralen Nervensystem, der appetithemmend wirkt, durch die Aktivierung von Glukose sensitiven Nervenzellen, was wiederum die Nahrungszufuhr hemmen würde [48] oder durch eine Hemmung des Neuropeptid Y Signalwegs [49]. Demnach scheint Leptin,

das Hormon, welches vom Fettgewebe produziert wird und zur Erhaltung der Gewichtsstabilität Appetit unterdrückt und den Energieverbrauch erhöht [50], an der Entstehung der Tumoranoorexie nicht beteiligt zu sein. Das zeigen zumindest Modelle im Tierversuch [51, 52]. Auch beim Menschen scheint eine Dysregulation der Leptinproduktion nicht der Grund für die Tumoranoorexie zu sein [53]. Kachektische Tumorpatienten zeigen tatsächlich keine erhöhten Leptinkonzentrationen [54, 55], die Konzentrationen verhalten sich umgekehrt proportional zu der Intensität der Entzündungsreaktion [56] und der Höhe der inflammatorischen Zytokine [57]. So scheint die Leptinkonzentration allein von der totalen Menge an Fettgewebe des Patienten abzuhängen [3].

Zusätzlich könnte es durch verschiedene Mediatoren zu Veränderungen in der Menge des zirkulierenden Tryptophans kommen, was eine Veränderung in der Konzentration von Serotonin im Gehirn bewirken und somit zu Abweichungen in der Nahrungsaufnahme führen könnte [58]. Erhöhte Konzentrationen an Tryptophan im Plasma und im Gehirn können deutlich an der Entstehung von oxidativem Stress mitwirken. In einem Modell der Tumoranoorexie wurde gezeigt, dass sich erhöhter oxidativer Stress im Hypothalamus von krebserkrankten Ratten entwickelte. So entstandene erhöhte Mengen an H_2O_2 könnten den Effekt einer gesteigerten Insulinaktivität nachahmen, obwohl die Konzentration von Insulin im Plasma verringert ist, was zu einer verminderten Nahrungsaufnahme führen könnte [59]. Desweiteren wird vermutet, dass auch manche vom Tumor selbst gebildete Verbindungen im Falle einer Krebserkrankung zu Anorexie führen können [60].

2.2.2.2 Ruheenergieverbrauch (REE) und Hypermetabolismus

Die Energiebilanz setzt sich zusammen aus Energiezufuhr, also Nahrungsaufnahme, und Energieverbrauch. Der Ruheenergieverbrauch (REE) bezeichnet den Verbrauch an Energie, der durch die lebenserhaltenden Funktionen entsteht. Dieser Anteil stellt 70% des Gesamtenergieverbrauchs dar, während die restlichen 30% durch körperliche Aktivität und nahrungsinduzierte Thermogenese entstehen [61]. In klinischen Studien variiert der prozentuale Anteil des Ruheenergieverbrauchs am totalen Energieverbrauch innerhalb verschiedener Gruppen von Krebspatienten, er erreicht Werte, die zwischen weniger als 60% bis mehr als 150% der Normalwerte liegen. So zeigen manche Studien eine Erhöhung des REE [62, 63], während er in anderen Studien normal oder erniedrigt ist [64, 65]. Gewöhnlich kommt es bei Lungen- oder

Pankreaskarzinoms zu einem erhöhten REE, während andere Krebsarten, wie etwa kolorektale Tumoren oder Magenkrebs, zu keiner Erhöhung des REE führen [66].

Eine Erhöhung des Ruheenergieverbrauchs beruht auf Veränderungen im Stoffwechsel, die spezifisch für eine Tumorerkrankung sind, Substratzyklen sind hier oft erhöht. So können nicht veresterte Fettsäuren, die aus dem Fettgewebe freigesetzt werden, sofort im Triacylglycerin/Fettsäuren Substrat Zyklus verestert werden. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess bei tumorkranken Mäusen um das dreifache erhöht war, wobei es keinen Unterschied zwischen Tieren mit oder ohne Kachexie gab [67]. Ein weiterer Substratzyklus, der zu einem Energieverlust von 300 kcal/d bei Krebspatienten führen kann, ist der Cori Zyklus. Tumorpatienten entwickeln häufig eine relative Glukoseintoleranz und Insulinresistenz mit einer erhöhten Glukoseproduktion und einer erhöhten Wiederherstellung von Glukose aus Laktat durch den Cori Zyklus [68]. Diese Veränderungen können im Verlauf der Erkrankung immer ausgeprägter werden [69]. Die meisten soliden Tumoren beziehen ihre Energie aus der anaeroben Verstoffwechslung von Glukose und so besteht die Frage, bis zu welchem Ausmaß die genannten Veränderungen im Stoffwechsel zu dem Zweck entstehen, den Tumor mit Nährstoffen zu versorgen [70].

Tumore verbrauchen große Mengen an Glukose und wandeln diese in Laktat um, weil aufgrund des niedrigen Sauerstoffdrucks ein Ablaufen des Krebs Zyklus und eine mitochondriale oxidative Phosphorylierung nicht möglich sind. Das erzeugte Laktat gelangt über den Blutweg zur Leber und wird dort über den Cori Zyklus zu Glukose umgewandelt. Der Cori Zyklus ist unter physiologischen Bedingungen für 20% des Glukoseumsatzes verantwortlich, bei kachektischen Tumorpatienten wurde ein Anstieg auf 50% gezeigt [71]. Die Glukoneogenese verbraucht 6 ATP Moleküle für jeden Laktat-Glukose-Zyklus, ist demzufolge sehr ineffizient für den Betroffenen und trägt zu dem erhöhten Ruheenergieumsatz bei [36].

Langzeitstudien mit tumorkranken Ratten zeigen eine zeitabhängige Veränderung des Energieverbrauchs. So kommt es initial zu einer hypermetabolischen Phase, gefolgt von einer Phase des normalen Energieverbrauchs, die schließlich präterminal in eine hypometabolische Phase endet [72]. Sollte das beim Menschen ebenso der Fall sein, ließen sich die deutlichen Abweichungen im REE durch die verschiedenen Phasen im Krankheitsablauf erklären [7]. Es ist unklar, auf welche Weise Tumore den Ruheenergieverbrauch beeinflussen, allerdings zeigen neuere Studien eine erhöhte Expression von „uncoupling“-Proteinen, die zur Familie der mitochondrialen Membranproteine gehören, die Thermogenese steigern und den Energieverbrauch

erhöhen können. Uncoupling-Protein-1 (UCP-1) kann Wärme erzeugen, indem es die Oxidation von Fettsäuren entkoppelt, wodurch die Synthese von ATP zum Erliegen kommt. Es kommt ausschließlich im braunen Fettgewebe (BAT) vor und ist entscheidend an der Thermoregulation von Nagetieren beteiligt, wohingegen beim erwachsenen Menschen der Skelettmuskel den wohl wichtigsten Ort der Thermogenese darstellt [5]. Obwohl ein Vorkommen von braunem Fettgewebe beim erwachsenen Menschen selten ist, konnte es in einer Studie bei 80% der Kachexiepatienten, aber nur bei 13% der Kontrollen, gefunden werden [73]. UCP-2 und UCP-3, die im Skelettmuskel exprimiert werden, könnten ebenfalls eine wichtige Rolle in Energiebilanz und Fettstoffwechsel spielen, da deren Expression in Nagetiermodellen der Kachexie ebenfalls erhöht ist. Auch beim Menschen wurde bei kachektischen Patienten mit gastrointestinalem Adenokarzinom im Skelettmuskel eine 5 mal höhere Menge an UCP-3 mRNA gefunden als bei gesunden Kontrollen oder bei Krebspatienten ohne Kachexie [74], trotz des dokumentierten Fehlens eines Anstiegs des REE. Bei kachektischen Ratten mit Yoshida AH-130 Aszites Hepatoma konnte ein zweifacher Anstieg der mRNA Expression von UCP-2 und ein drei- bis vierfacher Anstieg der von UCP-3 sowohl im M. soleus als auch im M. gastrocnemius nachgewiesen werden [75].

2.2.2.3 Die Akute-Phase-Reaktion (APR)

Die APR bezeichnet eine Serie physiologischer und metabolischer Veränderungen, die durch eine Verletzung von Gewebe, durch eine Infektion oder Entzündung in Gang kommt. Die physiologischen Effekte der APR sind eine Förderung der Gewebsheilung, der Blutgerinnung, eine Verhinderung weitergehender Gewebeschädigungen und die Zerstörung infektiöser Organismen. Innerhalb dieses Prozesses kommt es zu einer deutlichen Veränderung in der Proteinsynthese der Leber. Diese verlagert sich von einer Albuminsynthese hin zu einer Produktion von Akute-Phase-Proteinen wie C-reaktives Protein (CRP), Serum Amyloid A Protein, β_2 -Makroglobulin und α_1 -Antitrypsin [5]. Worin die Bedeutung der APR für den Krebspatienten liegt, ist nicht klar, sie könnte als Teil einer stereotypen Reaktion des Körpers auf eine Entzündung gedeutet werden [4].

Eine APR steht in Zusammenhang mit einem zunehmenden Gewichtsverlust bei Patienten mit Lungen- und Pankreaskrebs wie auch bei solchen mit Melanomen [76].

Sie wird ebenfalls mit einer verkürzten Überlebenszeit bei Patienten mit Nieren-, Pankreas- oder Kolorektalkrebs in Verbindung gebracht [77].

Die APR wird durch proinflammatorische Zytokine angeregt, von denen IL-6, IL-1 und TNF in diesem Fall wohl die größte Bedeutung zukommt [78]. Einige Tumorzelllinien produzieren ebenfalls proinflammatorische Zytokine und es ist möglich, dass Veränderungen, die mit der APR in Zusammenhang stehen, wie etwa ein veränderter Energiesubstratstoffwechsel, auch das Wachstum des Tumors vorantreiben können [4]. In einer Studie wurde gezeigt, dass eine Blockade des IL-6 Rezeptors zu einer reduzierten Metastasenbildung von Melanomzellen in vivo führt [79]. Durch ein Vorantreiben des Muskelabbaus aufgrund des gesteigerten Bedarfs an Aminosäuren, die für die vermehrte Proteinbildung in der Leber benötigt werden, kann die APR zu einer verkürzten Überlebenszeit der Patienten beitragen [4].

2.2.2.4 Veränderungen im Kohlenhydratstoffwechsel

Glukose ist der wichtigste Energielieferant für den Organismus. Eine verminderte Glukoseaufnahme führt zu einer verstärkten Glukoneogenese aus Laktat, Aminosäuren aus dem Muskel und freien Fettsäuren, was schließlich zu einem Abbau von Fett- und Proteinspeichern führt.

Tumorzellen brauchen für ihr Wachstum enorme Mengen an Glukose, sie verbrauchen etwa vier bis fünf mal so viel wie normale Zellen. Maligne Tumore gewinnen ihre Energie zu etwa 50% aus der anaeroben Glykolyse, was vom Patienten ein hohes Maß an Glukoneogenese erfordert [80]. Sauerstoff wird in Tumorzellen nicht in gleich hohem Maß wie Glukose verwertet, es kommt zur Bildung von Laktat. Das Laktat gelangt zur Leber und wird dort durch das Enzym Phosphoenol Pyruvat Carboxykinase in Glukose umgewandelt, die dann wiederum dem Tumor zur Verfügung steht. Dieser Prozess wird Cori Zyklus genannt und ist bei Krebspatienten gegenüber Gesunden um bis zu 50% erhöht. Im Rahmen der Tumorkachexie kommt es auch zu einer beeinträchtigten Glukosetoleranz. Dem könnte eine verminderte Insulinsekretion und eine durch TNF α erhöhte Insulinresistenz zugrunde liegen [81].

2.2.2.5 Abbau von Fettgewebe und Veränderungen im Fettstoffwechsel

Die Menge an Fettgewebe wird bestimmt durch die Syntheserate von Triacylglycerin aus den im Blut zirkulierenden Lipoproteinen und durch das Ausmaß, in dem dieses durch Hydrolyse zu Fettsäuren und Glycerin umgewandelt wird. Das Enzym

Lipoproteinlipase (LPL) ist an der Extraktion von Fettsäuren aus Plasmalipoproteinen, der Transportform von Lipiden im Plasma, beteiligt und die Syntheserate wird durch die Bereitstellung von Substraten aus der Leber bestimmt. Fett hat von allen Nährstoffen den höchsten Kalorienwert. Der Energiebedarf wird durch die Hydrolyse von Triacylglycerin durch die Hormon-sensitive Lipase (HSL) gedeckt, dies wird durch den intrazellulären Spiegel an cAMP reguliert. Hormone wie Adrenalin und Glukagon regen die Umwandlung von ATP zu cAMP im Adipozyten an. cAMP aktiviert eine Proteinkinase, die wiederum HSL phosphoryliert und aktiviert. Sobald der Energiebedarf sinkt, wird der Überschuss an freigesetzten Fettsäuren im Fettgewebe zu Triacylglycerin, was die Speicherform darstellt, rücksynthetisiert [36].

Körperfett stellt ca. 90% der natürlichen Speicherform für Energie dar. Ein großer Verlust an Körperfett ist ein typisches Merkmal der Tumorkachexie.

Kachexie führt zu einer gesteigerten Lipolyse, zu einer verminderten Lipogenese, zu Hyperlipidämie, zu erhöhten Mengen an im Blut zirkulierenden freien Fettsäuren und Glycerin und letztlich zu einem Verlust von bis zu 85% des Fettgewebes [82]. Diese erhöhte Mobilisierung von Lipiden ist oft nachweisbar, bevor sich ein Gewichtsverlust einstellt. CT-Untersuchungen haben gezeigt, dass intraabdominales Fett beim Krebspatienten, im Gegensatz zu dem von an Anorexia nervosa Erkrankten, vom Abbau relativ verschont bleibt [83]. Diese Patienten zeigten ebenfalls erhöhte Mengen an Katecholaminen im Plasma und im Urin, eine erhöhte Herzfrequenz sowie eine gesteigerte Fettoxidation [84]. So führte eine orale Verabreichung des spezifischen β_1 -Blockers Atenolol und des nicht spezifischen β_1 , β_2 -Blockers Propranolol bei kachektischen Krebspatienten zu einem signifikant reduzierten REE, verminderter Sauerstoffaufnahme und CO_2 Produktion.

Proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\gamma$, IL-6, IL-1 und LIF hemmen die LPL, beeinträchtigen dadurch die Lipogenese und verhindern eine Speicherung von Fettsäuren in den Adipozyten [7, 85]. Obwohl manche Studien auf erniedrigte Mengen von LPL im Plasma kachektischer Patienten hinweisen [86], finden andere keine Veränderungen in der Aktivität des Enzyms oder der üblichen Menge an LPL mRNA. Es wurde aber ein zweifacher Anstieg gegenüber dem normalen Spiegel von HSL mRNA gefunden, der auf einen Anstieg der Hydrolyse von Triacylglycerin schließen lässt [87]. Die freigesetzten Fettsäuren dienen als Energiequelle für Substratzyklen und für die Wärmeproduktion im BAT und im Muskel [36].

Es wurde gezeigt, dass Kachexiepatienten einen „lipid-mobilizing factor“ (LMF) im Urin ausscheiden. Dieser wurde ebenfalls in einem MAC16 Tumormodell der Maus

nachgewiesen [88]. LMF ist identisch mit dem im Plasma vorkommenden Zink α 2-Glykoprotein (ZAG), welches von menschlichen Adipozyten exprimiert wird und das bei an Tumorkachexie leidenden Mäusen erhöht ist [89, 90]. ZAG begünstigt den Abbau von Fettgewebe über einen cAMP abhängigen Weg und fördert die Expression von UCPs, was möglicherweise zu Veränderungen des Ruheenergieverbrauchs beiträgt [28, 91].

2.2.2.6 Abbau von Muskelgewebe und Veränderungen im Proteinstoffwechsel

Der Verlust von Muskelmasse ist das auffälligste Merkmal der Tumorkachexie und resultiert aus einem erhöhten Proteinabbau, einer eingeschränkten Proteinsynthese oder aus einem Zusammenspiel beider [92]. Während einer Hungerperiode kommt es aufgrund der Mangelsituation zuerst zu einer Mobilisierung von Glukose und AS aus der Leber, danach werden für die Glukoneogenese auch AS aus dem Muskel mobilisiert. Nach einer gewissen Adaptionsphase werden dann periphere Lipide in Form von Ketonkörpern und freien Fettsäuren für die Energiegewinnung herangezogen, was eine Erhaltung der Muskelmasse sicherstellt [61]. Im Gegensatz dazu kommt es beim Kachexiepatienten, der diese Adaptation nicht zeigt, zu einem enormen, progressiven Verlust an Skelettmuskulatur unter einer relativen Schonung von viszeralen Proteinreserven und zu einer Vergrößerung der Lebermasse infolge der APR.

Aufgrund des Mangel an Aminosäuren, die als Substrat dienen und die nun aber größtenteils für die Synthese von APP und für die Glukoneogenese herangezogen werden, kommt es zu einer verlangsamten Proteinsynthese im Muskel [7]. So macht die Proteinsynthese des Muskels bei Tumorkachexiepatienten nur noch 8% der gesamten Proteinsynthese im Körper aus, bei Gesunden hingegen etwa 53% [93]. Desweiteren können branched chain amino acids (BCAA) die Proteinsynthese unmittelbar beeinflussen, indem sie die mRNA Translation regulieren. Wenngleich die verminderte Proteinsynthese eine wichtige Rolle spielt, so ist doch der Muskelabbau der Hauptgrund für den Verlust an Skelettmuskulatur im Verlauf der Kachexie [7].

Es gibt drei Mechanismen, die für den Proteinabbau im Skelettmuskel verantwortlich sind. Zum einen das lysosomale System zur Proteolyse von extrazellulärem Protein und Zelloberflächenrezeptoren, zum zweiten das zytosolische kalziumaktivierte System, das bei Zellverletzungen und Zelluntergängen aktiviert wird und zum dritten den ATP-Ubiquitin-Proteasom-abhängigen Mechanismus, der beispielsweise für die

Proteolyse im Rahmen von Fasten, Sepsis, Azidose, Diabetes oder auch der Tumorkachexie hauptsächlich aktiviert wird [18]. Die lysosomale Protease Cathespin B spielt vermutlich eine Rolle in der frühen Phase der Kachexie, so ist diese in Muskelbiopsien von Lungenkrebspatienten mit geringem Gewichtsverlust erhöht [24]. In der fortgeschrittenen Phase der Kachexie wird die Ubiquitin-Proteasom-abhängige Proteolyse hochreguliert und stellt damit den Hauptmechanismus des Proteinabbaus dar. Bei diesem Abbaumechanismus wird das myofibrilläre Protein durch das Anhängen mehrerer Ubiquitinmoleküle für die Proteolyse markiert und kann so durch das 26S Proteasom, das die proteolytisch wirkenden Enzyme enthält, erkannt und abgebaut werden [94]. Den limitierenden Schritt im Abbau stellt der Bindungsvorgang der einzelnen Ubiquitinmoleküle an das Protein dar, dieser wird durch spezifische Ligasen gesteuert. Muscle RING Finger 1 (MuRF 1) und Muscle Atrophy F-box (MAFbx, auch als Atrogin 1 bezeichnet) sind zwei Ligasen, die eine entscheidende Funktion in der Entstehung der Kachexie einnehmen. Sie sind in verschiedenen Tiermodellen der Atrophie und Kachexie deutlich erhöht. Mäuse, denen die Fähigkeit zu Bildung der Ligasen fehlt, zeigen sich gegenüber einem Muskelabbau resistent [95-97]. MAFbx vermittelt außerdem über den Ubiquitin-Proteasom-Weg den Abbau von MyoD, einem Transkriptionsfaktor, der Wachstum und Differenzierung der Muskelzellen kontrolliert [98]. So kann eine erhöhte Expression von MAFbx sowohl den Aufbau neuer Muskelzellen verhindern als auch den Abbau von Muskelgewebe fördern. Schließlich könnten noch andere Ligasen eine wichtige Rolle im Muskelkatabolismus spielen, so zum Beispiel E3alpha-II, dessen Synthese durch TNF α und INF γ induziert wird und das im Rahmen der Kachexie vermehrt exprimiert wird [99].

Muskelprotein macht in etwa 50% des gesamten Körperproteins aus [81]. Der Verlust an Muskelgewebe kann, wenn ein Gewichtsverlust von 30% eingetreten ist, bis zu 75% betragen [29]. Weiße, schnelle Muskelfasern werden schneller abgebaut als rote, langsame. Der Grund dafür ist nicht bekannt [100]. Desweiteren kommt es zu Konzentrationsänderungen von Aminosäuren im Plasma. Die meisten Studien zeigen eine Abnahme von Aminosäuren, die für die Glukoneogenese herangezogen werden können, was einen Unterschied zur schweren Unterernährung darstellt, wo die BCAA (Valin, Leucin und Isoleucin) im Plasma in normaler oder sogar erhöhter Menge gefunden werden. Der Proteinabbau im Muskel führt zur Freisetzung von Aminosäuren, insbesondere von Alanin und Glutamin. Alanin wird in der Leber für die Glukoneogenese und die Synthese von Akute-Phase-Proteinen genutzt, während

Glutamin eine Energiequelle für den Tumor darstellt und dessen Stickstoffbedarf deckt. Die Oxidation von Leucin mit daraus entstehendem Anfall von CO₂ ist bei tumorkranken Tieren erhöht [5]. Im Skelettmuskel von Krebspatienten wurden signifikant geringere Aktivitäten der Enzyme Hexokinase, Phosphofruktokinase und Cytochrome c-Oxidase gemessen als bei Gesunden, gleichzeitig war die Aktivität der Glucose-6-Phosphatase Dehydrogenase deutlich erhöht. Dies deutet auf eine beeinträchtigte Energiegewinnung hin, was zu einer Muskelschwäche beitragen könnte [101]. NF-κB spielt ebenfalls eine wichtige Rolle in der Tumorkachexie. Im Zusammenspiel mit den proinflammatorischen Zytokinen führt eine Aktivierung von NF-κB zu einer erniedrigten Myogenese, NF-κB reguliert die Expression von Zytokinen [102].

2.2.2.7 Zytokine und andere Mediatoren

Die Veränderungen im Stoffwechsel, die im Rahmen der Tumorkachexie auftreten, werden durch die Produktion von Zytokinen und anderen Kachexie fördernden Faktoren vorangetrieben. Dies können sowohl körpereigene als auch vom Tumor selbst produzierte Verbindungen sein. Die Anwesenheit eines Tumors führt zu einer andauernden Entzündungsreaktion, in der es charakteristischerweise zu einer Produktion von Zytokinen durch T1-Helferzellen, wie etwa TNFα, IL-1β, IL-6, IFNγ und CNTF und zu einer APR kommt. Beim Krebspatienten führt der durch den Tumor hervorgerufene Status einer chronischen Entzündung zur Entstehung der Kachexie [7]. Obwohl TNFα, IL-1β, IL-6 und IFNγ allein nicht das vollständige Bild der Kachexie hervorrufen können, so können sie doch alle im Tiermodell einige Merkmale der Kachexie auslösen [103-107]. Allein für TNFα konnte bisher die Fähigkeit nachgewiesen werden, den Abbau von Muskelprotein tatsächlich zu induzieren. Doch auch diese Feststellung wird kontrovers diskutiert, da in vivo Studien an Krebspatienten auf keinen direkten Einfluss von TNF auf den Metabolismus des Muskels hindeuten [108].

Es wird aber vermutet, dass die Kachexie, die durch das Yoshida Aszites Hepatom entsteht, durch TNFα hervorgerufen wird. So zeigen Ratten, die eine einzelne intravenöse TNFα-Injektion erhielten einen signifikanten Anstieg an UCP-2 und UCP-3 im Skelettmuskel [109]. Manche Tumorzelllinien sind, zumindest in der Zellkultur, ebenfalls in der Lage, Zytokine zu produzieren [110]. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von anti-TNF, anti-IFNγ und anti-IL-6 Antikörpern

einige Symptome der Kachexie mildern oder sogar rückgängig machen konnte [104, 111, 112]. TNF α und IFN γ konnten in vitro synergistisch einen Muskelabbau in Skelettmyozyten auslösen, wurden beide einzeln verabreicht, konnte kein Effekt gesehen werden [113].

Im Allgemeinen stehen jedoch die gemessenen Serum-Level von TNF α , IL-1, IL-6 und IFN γ nicht in Korrelation mit dem Gewichtsverlust bei Krebspatienten im fortgeschrittenen oder im Endstadium der Erkrankung [114]. Im Gegensatz zu TNF α und IL-1 ist zumindest IL-6 gewöhnlich im Plasma oder Serum von Krebspatienten nachweisbar [115]. Die kurze Halbwertszeit von TNF α und die Bildung von Komplexen mit dem Rezeptor könnten ein Grund für die fehlende Nachweisbarkeit sein, obwohl ein Nachweis bei anderen Krankheiten wie Malaria oder viszeraler Leishmaniose durchaus gelingt [36].

Es gibt Hinweise darauf, dass die lokale Produktion von Zytokinen eine größere Rolle als die systemische spielen könnte, da erhöhte Werte von TNF α und IL-6 in isolierten mononukleären Zellen gefunden wurden, die aus dem Blut kachektischer Pankreaskrebspatienten mit APR stammten [62].

Die Produktion proinflammatorischer Zytokine bewirkt eine Produktion der entsprechenden antiinflammatorischen Zytokine wie IL-15, IL-10 oder auch des IL-1 Rezeptorantagonisten. Das Gleichgewicht zwischen diesen gegensätzlichen Mediatoren könnte entscheidend die Ausprägung der klinischen Symptome bestimmen [76].

Veränderungen in den Hormonspiegeln und im Ansprechen der Zielorgane auf die Hormone werden sowohl bei Tieren als auch bei Menschen mit Kachexie beschrieben. So konnten bei Krebspatienten erhöhte Spiegel von Kortisol und Glukagon gefunden werden [116, 117], die wiederum die APR verstärken könnten [118]. Zytokine fördern die Freisetzung von Kortisol und Katecholaminen aus der Nebenniere [119]. Eine Verabreichung von Hydrokortison oder Kortisol, Glukagon und Adrenalin erzeugt beim Menschen Merkmale der Kachexie wie zum Beispiel Proteinverlust, eine APR, einen erhöhten Energieumsatz und eine Glukoseintoleranz [120, 121].

Tumoren produzieren ebenfalls spezifische kachexieauslösende Faktoren wie PIF (proteolysis inducing factor) oder LMF (lipid mobilizing factor). Diese haben direkte Auswirkungen auf den Fett- und Proteinabbau. PIF ist ein Glykoprotein, das erstmals in MAC16 Tumor-Mäusen und auch im Urin kachektischer Krebspatienten gefunden wurde. Es verursacht den Proteinabbau durch die Aktivierung des Ubiquitin-Proteasom-Proteolyse Weges [122]. In einer weiteren Studie konnte weder ein

humanes Homolog zum murinen PIF noch eine entsprechende Rolle in der Tumorkachexie des Menschen verifiziert werden [123]. Mäusen verabreichtes LMF führte zu einem deutlichen Verlust an Körperfett, allerdings mit einer Tendenz zum Anstieg der fettfreien Masse, was sich durch eine Interaktion mit β_3 -Rezeptoren erklären ließe [124]. Der Verlust an Fettgewebe stand in Verbindung mit einem Anstieg der Expression von UCP1 im braunen Fettgewebe [125]. Die Anwesenheit dieser beiden Faktoren steht in deutlicher Korrelation mit einem Gewichtsverlust sowohl bei Tieren als auch beim Menschen [28, 126]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass LMF nicht nur vom Tumor, sondern auch von weißem und braunem Fettgewebe produziert werden kann [89]. Ein weiterer Faktor, der von malignem Tumorgewebe produziert wird, ist AIS (anemia-inducing factor). Er beeinträchtigt die Funktion von Erythrozyten und Leukozyten [44]. Beim Kaninchen führt eine Verabreichung zu reduzierter Futteraufnahme und zu Verlust an Körpergewicht und –fett, was nahe legt, dass auch dieser Faktor eine wichtige Rolle in der verstärkten Lipolyse im Verlauf der Tumorkachexie spielen könnte [127].

Viele Zytokine, einschließlich TNF α , IL-1 α , IL-1b und IL-6, können durch die Blut-Hirn-Schranke gelangen und so einen hemmenden Effekt auf den Appetit ausüben, während sowohl LMF [124] wie auch PIF [122] einen Gewichtsverlust auslösen, der nicht von Anorexie begleitet ist.

Es gibt vermehrt Hinweise darauf, dass sowohl Zytokine als auch PIF den Proteinabbau über die Aktivierung des Nuklear Faktor kappa B (NF κ B) bewerkstelligen. NF κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der die Expression einer Reihe von pro-inflammatorischen Zytokinen steuert [7]. Die Aktivierung von NF κ B durch TNF α führte in Muskelzellen der Maus zu einer verminderten Produktion des Transkriptionsfaktors MyoD und auch Interaktion mit MEF-2 und dadurch zur Verhinderung der Proteinsynthese [113]. Außerdem konnten Inhibitoren von NF κ B, so etwa Thalidomid, die Expression von Proteasomen, den Gewichtsverlust und den Proteinabbau im Skelettmuskel der Maus abschwächen [128]. PIF kann des weiteren NF κ B und STAT3 in Hepatozyten aktivieren, was zu einer gesteigerten Produktion von IL-6, IL-8 und C-reaktivem Protein (CRP) und zu einer verminderten Produktion von Transferrin führt [129]. Auch gentechnische Studien weisen auf eine wichtige Beteiligung von Zytokinen an der Kachexie hin, so zeigt ein Polymorphismus sowohl der IL-1 β als auch der IFN γ Gene Einfluss auf das Überleben von Patienten mit fortgeschrittenem Pankreaskrebs [130, 131].

Es besteht die Möglichkeit, dass noch weitere Mediatoren, wie etwa Myostatin und Angiotensin II, am Entstehen der Kachexie beteiligt sind. So kann Angiotensin II, wenn es kontinuierlich infundiert wird, eine direkte Proteolyse induzieren [7].

2.2.3 Therapie der Tumorkachexie

Obwohl es einige Therapieansätze zur Behandlung der Tumorkachexie gibt, sind diese doch nur von begrenztem Nutzen. Alle Therapieversuche zielen darauf hin, entweder die Nahrungsaufnahme zu erhöhen oder die metabolischen Störungen, die im Rahmen der Kachexie auftreten, zu beheben.

Trotz der Tatsache, dass die Nahrungsaufnahme bei Tumorkachexiepatienten oft signifikant erniedrigt ist, führt eine hyperkalorische Ernährung nicht zu einem Gewichtszuwachs. Sowohl Versuche einer parenteralen als auch einer enteralen Ernährung zeigten keine Verbesserungen in Bezug auf Gewichtszunahme, Ernährungsstatus, Lebensqualität oder Überlebenszeitraum [132-134].

Die gebräuchlichsten Medikamente zur Behandlung der Tumorkachexie sind Kortikosteroide. Prednisolon oder Dexamethason können sowohl den Appetit steigern als auch die Lebensqualität verbessern. Allerdings sind diese Verbesserungen oft nur von kurzer Dauer und es treten gravierende Nebenwirkungen auf [4].

Das Appetitstimulanz Megastrolacetat, ein Progesteron-Derivat, wird häufig in der Behandlung von Anorexie und Kachexie eingesetzt. Es erhöht das Vorkommen von NPY, steigert dadurch den Appetit und reguliert die Entstehung der proinflammatorischen Zytokine. Obwohl es kurzfristig zu einer Erhöhung der Nahrungsaufnahme, größerem Appetit und verbessertem Allgemeinbefinden führt, kann es doch den Anteil an fettfreier Masse und die Überlebenszeit nicht positiv beeinflussen. Außerdem scheint eine durch dieses Medikament verursachte Gewichtszunahme aus einem Zusammenspiel von Fettzuwachs und Flüssigkeitsretention zu resultieren [135-138]. Außerdem kann die Gabe von Megastrolacetat zu schwerwiegenden Nebenwirkungen wie Thrombembolie, proximaler Myopathie, Stimmungsschwankungen und Insulinresistenz führen [7].

Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAIDs) hemmen die Cyclooxygenase und dadurch die Produktion von Prostaglandinen. Ibuprofen konnte bei Patienten mit Kolorektalkrebs die Konzentration von Akute-Phase-Proteinen, IL-6 und Kortisol senken und den Proteinumsatz normalisieren. Auch bei Pankreaskrebspatienten, die

mit Ibuprofen behandelt wurden, kam es zu einer Reduzierung der Akute-Phase-Proteine und zu einer Senkung des REE. Eine Studie zeigte bei Behandlung mit Indomethacin eine verlängerte Überlebenszeit bei Patienten mit verschiedenen Krebsarten im fortgeschrittenen Stadium [4]. Eine Kombination aus Ibuprofen und Megastrolacetat konnte bei Patienten mit Magendarmkrebs das Gewicht stabilisieren und führte zu mehr Gewichtszuwachs als eine alleinige Megastrolacetatgabe [139].

Eicosapentaensäure (EPA) ist eine mehrfach ungesättigte Fettsäure, gehört zur Klasse der Omega-3-Fettsäuren und kommt vor allem in Seefischen vor. Bei Gesunden und bei Patienten mit Pankreaskrebs führt die Gabe von EPA zu einem anti-inflammatorischen Effekt, indem es die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen verringert. EPA reguliert außerdem die APR und scheint die Effekte von PIF und LMF abzuschwächen [140, 141]. Mehrere Studien deuten darauf hin, dass EPA das Wachstum von Tumorzellen in vitro hemmt und auch das Wachstum von experimentellen Tumoren im Tiermodell verlangsamt [142, 143]. Bei Mäusen mit Tumorkachexie konnte EPA das Gewicht stabilisieren, ähnliche Effekte zeigte es auch bei kachektischen Patienten mit Pankreaskrebs [144].

Dronabinol, eine synthetische Variante des Tetrahydrocannabinols, kann dem Gewichtsverlust entgegenwirken. Obwohl damit behandelte Patienten im Anschluss an die Therapie weiterhin Gewicht verloren, so war doch das Ausmaß des Gewichtsverlustes bei den Behandelten kleiner und es kam zu symptomatischen Verbesserungen in Bezug auf Stimmungslage und Appetit [145]. Bei fast 20% der mit Dronabinol behandelten Patienten kam es jedoch zu Nebenwirkungen wie Euphorie, Schwindel, Somnolenz und Verwirrung.

Der appetitanregende Mediator Ghrelin, der durch Rezeptorbindung auch die Sekretion von Wachstumshormon fördert, scheint eine Schlüsselrolle in der Erhöhung des Appetits und damit der Nahrungsaufnahme einzunehmen. Eine Studie, in der ein Ghrelin-Mimetikum oral verabreicht wurde, zeigte eine Zunahme an fettfreier Masse, totalem Körpergewicht und Muskelstärke (hand grip strength) bei kachektischen Krebspatienten [146]. In einer Studie der kardialen Kachexie führte eine wiederholte Gabe von Ghrelin zur Verbesserung der Struktur und der Funktion des Herzens [147].

Die Verabreichung einer Kombination von Epoetin- α und Indomethacin führte in klinischen Versuchen neben einer Anhebung des Hämatokrits zu einer Zunahme des Körpergewichts, größerer körperlicher Leistungsfähigkeit und einer verminderten APR [148, 149].

In Tiermodellen zeigte sich eine Anti-Zytokin Therapie als sehr wirksam in der Behandlung der Tumoranorexie [150]. Auch beim Menschen wurden bereits eine Reihe von Substanzen, die der Zytokinaktivität entgegenwirken sollen, getestet. Eine Therapie mit Anti-IL-6- Antikörpern erscheint vielversprechend, allerdings mangelt es noch an klinischen Daten [151]. Die Verabreichung von Pentoxifyllin, Thalidomid und Suramin führte zu einer signifikanten Verringerung der Freisetzung von Zytokinen beim Menschen. Bedauerlicherweise führte die Behandlung mit Pentoxifyllin bei Patienten mit Anorexie-Kachexie-Syndrom zu keinerlei klinischen Verbesserungen [26]. Thalidomid zeigte positive Effekte bei Patienten mit multiplen Tumoren, die Effekte bei Patienten mit soliden Tumoren waren jedoch mäßig [152]. Außerdem kann eine Verabreichung dieser Substanzen zu schwerwiegenden Nebenwirkungen führen, so zum Beispiel zu einer durch Suramin erzeugten Hemmung der durch Chemotherapie ausgelösten Apoptose [153].

Eine orale Supplementierung mit BCAA zeigte in einer Studie mit anorektischen Krebspatienten positive Auswirkungen in Bezug auf Anorexie und Energieaufnahme [154]. BCAA konkurrieren mit Tryptophan um das selbe Transportsystem an der Blut-Hirn-Schranke, es kommt zu einer verringerten Verfügbarkeit von Tryptophan im Hypothalamus und so zu einer eingeschränkten Synthese des appetithemmend wirkenden Serotonins. Es ist auch möglich, dass BCAA zentral den Appetit und die Energieaufnahme beeinflussen, während sie gleichzeitig den peripheren Muskelabbau hemmen [155]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Leucin, eine der drei verzweigtkettigen AS, einen hemmenden Effekt auf die ATP-abhängige Ubiquitinaktivität hat [156].

Viele verschiedene Substanzen, die ebenfalls Einfluss auf die Tumorkachexie nehmen könnten, werden in zahlreichen Studien untersucht. Es gibt eine Reihe von Versuchen zur Wirksamkeit von Cyproheptadin, Insulin, antiinflammatorischen Zytokinen, Melatonin, Wachstumshormon, Statinen, anabolen Steroiden, Beta-2 Agonisten, Hydrazinsulfat und vielen mehr, von denen einige gewisse Erfolge zeigen [44].

Da die Tumorkachexie ein sehr komplexes Krankheitssyndrom darstellt, kann eine Monotherapie wohl nur sehr begrenzt Erfolg zeigen. Eine Kombination verschiedener Substanzen könnte zu besseren Resultaten führen [44].

2.3 Erythropoetin (EPO)

Erythropoetin (EPO) ist ein saures Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 30,4 kDa, das in seiner Funktion als hämatopoetischer Faktor in den Jahren 1905 und 1906 von Carnot und Deflandre im Blut geschöpfter Kaninchen entdeckt wurde [157]. Die Bezeichnung Erythropoetin wurde 1948 eingeführt [158]. 1977 gelang es erstmals, EPO aus menschlichem Urin zu isolieren [159]. 1985 konnte das EPO-Gen kloniert werden [160, 161], was die Voraussetzung zur Produktion von rekombinantem humanem Erythropoetin (rHuEPO) schuf.

Das menschliche EPO-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 7 (q11-q22) lokalisiert [162]. Beim Menschen kodiert die EPO mRNA ein Protein mit 193 AS. Im Rahmen einer posttranslationalen Modifikation kommt es zur Abspaltung von 27 N-terminalen AS und des C-terminalen Argininrestes und somit zur Entstehung der aus 165 AS bestehenden aktiven Form des Erythropoetins. Das EPO-Molekül weist zwei strukturstabilisierende Disulfidbrücken zwischen den As 7 und 161 und den AS 29 und 33 auf. Außerdem zeigt es drei N-glykosidisch gebundene Zuckerseitenketten an den AS 24, 38 und 83 sowie eine O-glykosidisch gebundene Seitenkette an der Position 126. Der Zuckeranteil macht 40% des Moleküls aus. Während die O-glykosidische Seitenkette keine bekannte Funktion hat, sind die N-glykosidisch gebundenen Seitenketten nötig für die Stabilität des EPO-Moleküls im Kreislauf [163]. Deglykosyliertes EPO ist zwar biologisch aktiv, hat aber nur eine extrem kurze Halbwertszeit. Die Tertiärstruktur von EPO zeigt vier antiparallele α -Helices mit angrenzenden Schleifen [164]. Edogenes EPO und rHuEPO sind in ihrer AS-Sequenz identisch [165]. Die ursprünglichen rHuEPO Präparate Epoetin- α und Epoetin- β werden in Ovarialzellen des chinesischen Hamsters, in die das humane EPO-Gen durch Transfektion eingebracht wurde, erzeugt. Diese Präparate werden seit 20 Jahren routinemäßig in der klinischen Medizin zur Behandlung der Anämie angewandt [166]. EPO Mengen werden traditionell in Units (U) berechnet, wobei 1 U EPO bei Versuchstieren dieselbe stimulierende Wirkung auf die Erythropoese zeigt wie 5 μ mol Kobaltchlorid [167].

In der fetalen Entwicklungsphase findet die EPO Produktion hauptsächlich in den Hepatozyten statt. Nach der Geburt stammt der Großteil des im Blut zirkulierenden EPOs aus den peritubulären Fibroblasten-ähnlichen Zellen der Nierenrinde [168].

EPO, das zur Familie der Typ I Zytokine gehört, ist seit langem als das Hormon bekannt, das im Knochenmark die Reifung der erythroiden Vorläuferzellen zu Erythrozyten fördert [169]. Eine geringe Konzentration von Sauerstoff im Gewebe durch eine verminderte Sauerstoffsättigung des Blutes induziert die Expression des EPO-Gens [170]. Diese Aktivierung von EPO ist die direkte Folge einer Aktivierung des HIF-1 (hypoxia inducible factor 1).

Die physiologischerweise niedrige Konzentration des Hormons erlaubt es nur einem geringen Prozentsatz der Vorläuferzellen zu überleben und zu proliferieren, während die übrigen Vorläuferzellen durch Apoptose zugrunde gehen. Der Hauptmechanismus, mit dem EPO die Erythropoese steuert, ist also die Verhinderung des programmierten Zelltodes [172]. CFU-Es (colony-forming units-erythroid) sind hier die Zellen, die am meisten auf EPO ansprechen, da sie die größte Dichte an EPO Rezeptoren (EPO-R) an ihrer Oberfläche aufweisen [167]. So können Vorläuferzellen zwischen 1000 und 3000 EPO-R pro Zelle aufweisen, wobei schon ein geringer Anteil an besetzten Rezeptoren, in Abhängigkeit von Ca^{2+} , die Zelle zur Teilung anregt [173].

Der EPO-R ist ein aus 484 As bestehendes Glykoprotein und gehört zur Familie der Zytokin Klasse I Rezeptoren [174]. Er zeichnet sich durch eine einzelne hydrophobe Transmembran-Sequenz, eine variable zytoplasmatische Domäne und einen extrazellulären Anteil mit konservierten Cysteinen und einem WSXWS-Motiv aus [174]. Jeweils zwei der aus der Membran herausragenden EPO-R Moleküle bilden ein Dimer, an welches das EPO Molekül binden kann [167]. Erst die Bindung des EPO Moleküls führt tatsächlich zur Homodimerisierung des Rezeptors und anschließend zur Phosphorylierung und damit Aktivierung des rezeptorgekoppelten Enzyms Janus Kinase 2 (JAK-2). Dies wiederum setzt einige Signaltransduktionswege in Gang, dazu gehören der STAT5 (signal transducer and activator of transcription 5), der MAPK (mitogen-activated protein kinase) und der PI3K/Akt (phosphoinositol 3 kinase) Signaltransduktionsweg [176]. Die Wirkung von EPO wird durch HCP (haematopoietic cell phosphatase) beendet, da dieses Enzym die Dephosphorylierung von JAK-2 bewirkt [177]. In vitro Studien haben gezeigt, dass der akute Effekt von EPO etwa 30 bis 60 Minuten andauert [178]. Im Anschluss an die Dephosphorylierung wird der EPO/EPO-R Komplex internalisiert, zum Teil intrazellulär abgebaut und zum Teil wieder sezerniert, wobei nicht klar ist, ob resezerniertes EPO in vivo biologisch aktiv ist [166].

Neben dieser seit langem bekannten Funktion in der Erythropoese, ist EPO aber auch an einigen anderen Abläufen im Organismus beteiligt. EPO-R wurden in vielen

Zellentypen außerhalb des blutbildenden Systems nachgewiesen, so zum Beispiel auf Endothelzellen der Gefäße, Zellen der glatten Muskulatur, Myoblasten der Skelettmuskulatur, Myozyten des Herzens, Neuronen, Mikroglia, Astrozyten, Myelinscheiden, Photorezeptoren der Retina, Zellen des Leberinterstitiums, Enterozyten, Zellen der Plazenta, Epithelialzellen des proximalen Tubulus und Mesangialzellen der Niere, Makrophagen, Mastzellen, Lymphozyten, Megakaryozyten, myeloiden Zellen und Zellen des pankreatischen Inselgewebes [176]. Eine durch Hypoxie und HIF-1 induzierbare EPO Produktion konnte in Astrozyten und in Zellen des Endometriums nachgewiesen werden, was nahe legt, dass EPO neben der Erythropoese auch Reaktionen einzelner Organe auf eine verminderte Sauerstoffsättigung des Gewebes vermittelt [179]. Eine Vielzahl von Versuchen konnte nachweisen, dass EPO mit seinem Rezeptor in vielen Geweben interagiert und somit eine Reihe zellschützender Effekte auslösen kann, indem es die Mitogenese und Angiogenese fördert, die Apoptose verhindert und eine Reparatur der Gefäße durch die Mobilisierung endothelialer Vorläuferzellen vorantreibt [180].

Es wurde gezeigt, dass Knockout-Mäuse, die EPO oder EPO-R nicht bilden konnten, aufgrund einer gestörten fetalen Blutbildung in der Leber schon in Utero verstarben [181]. Derart veränderte Mäuse entwickelten aber auch schon in der Embryonalphase Fehlbildungen in der Angiogenese [182] und der kardialen Morphogenese. Dies ging einher mit einer verstärkten Apoptose in Endokard und Myokard [183]. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigte eine neuere Studie, in der die Expression von EPO-R zwar auf erythroiden Zellen, aber nicht im Herzen erhalten blieb, dass eine EPO-R Expression für eine normale Herzentwicklung nicht notwendig ist [184].

Eine andere Studie zeigte eine Beteiligung des EPO/EPO-R Systems an der physiologischen Wundheilung. Hier fördert es die Angiogenese und die Bildung von Granulationsgewebe. Dieser Effekt konnte durch die Verabreichung von Anti-EPO Antikörpern und von löslichen rekombinanten EPO-R verhindert werden [186].

Im zentralen Nervensystem (ZNS), wo EPO von Astrozyten produziert und EPO-R von Nervenzellen exprimiert wird, führte eine Verabreichung von löslichen EPO-R bei Ratten zu einer Ausdehnung ischämiebedingter Gewebsschäden, was zeigt, dass EPO eine wichtige Rolle in der Reaktion des Gehirns auf neuronale Verletzungen spielt [187].

Einer weiteren Studie zufolge scheint der EPO/EPO-R Signalweg an der pathologischen Angiogenese im Rahmen der proliferativen diabetischen Retinopathie beteiligt zu sein [188].

Die exogene Verabreichung von rHuEPO geht einher mit verschiedensten Auswirkungen auf Gewebearten, die nicht mit der Blutbildung in Verbindung stehen. So wird die Expression von EPO-R in der Niere, auf Muskelzellen und im Darm mit der Fähigkeit von rHuEPO, Zellproliferation zu induzieren, in Verbindung gebracht [189-191]. rHuEPO stimuliert die Proliferation und Migration von endothelialen Zellen [192] und diese proliferativen Effekte sind mit einem Anstieg von Endothelin-1 und zytosolischem freien Calcium [193] sowie einer Phosphorylierung von intrazellulären Proteinen wie STAT5 verbunden [194]. Viele Studien belegen, dass eine Gabe von rHuEPO die physiologische Reaktion des Körpers auf verschiedenste Arten der Gewebeverletzung beeinflusst und so als wichtiges gewebeschützendes Zytokin wirkt [195]. EPO kann die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und die Infiltration von Entzündungszellen verhindern [196]. Im ZNS fördert EPO das Überleben von Nervenzellen, indem es Apoptose und Entzündungsreaktion hemmt. Es konnte diesen schützenden Effekt in einer Reihe verschiedener Modelle zeigen, so bei der zerebralen Ischämie, beim Trauma und bei der Verletzung durch Excitotoxine [197]. Des weiteren zeigte ein klinischer Versuch an Patienten, die einen akuten ischämischen Hirninfarkt erlitten hatten, dass eine Verabreichung von rHuEPO positive Effekte auf den Genesungsprozess und den Ausgang der Erkrankung haben konnte [198]. In einer Anzahl präklinischer Studien konnte rHuEPO Kardiomyozyten vor ischämischen Einwirkungen schützen [199]. Außerdem wurde beschrieben, dass rHuEPO die Niere sowohl gegen ischämische als auch gegen toxische Angriffe schützen konnte [200, 201]. Bei Nagern mit proliferativer diabetischer Retinopathie konnte rHuEPO eine signifikante Besserung herbeiführen und es konnte ebenso die Entstehung der Retinopathie verhindern [202].

EPO gehört zur Typ 1 Zytokin Familie. So wird die zellschützende Wirkung von EPO nicht durch die Homodimerisierung von zwei EPO-R, wie sie im Rahmen der Erythropoese stattfindet, vermittelt. Der für den Gewebeschutz zuständige Rezeptor ist ein Heteromer, das aus einem EPO-R und einer β -Rezeptor Untereinheit (CD131) besteht. Die β -Rezeptor Untereinheit (β cR) vermittelt eine erhöhte Affinität des Liganden zum Rezeptorkomplex und ist für die Signaltransduktion zuständig. Diese Funktionen übernimmt β cR ebenfalls als Teil der Rezeptoren für GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor), IL-3 und IL-5. Bei Knockout-Mäusen, die kein β cR bilden konnten, war keine gewebeschützende Funktion von EPO im Nervensystem und im Herz nachweisbar, während die Hämatopoese ungestört ablief [203].

Drei Signaltransduktionswege scheinen hauptsächlich an der Vermittlung des zellschützenden Effektes beteiligt zu sein und im Gegensatz zur Erythropoese kann scheinbar keiner der einzelnen Wege entbehrt werden, da ein Ausfall eines einzelnen Weges grundsätzlich zum völligen Abbruch des gewebeschützenden Effekts führt. Dies sind der JAK-STAT-Bcl-2 Weg, die Aktivierung der extrazellulären signal-regulated Kinase (ERK) und von Akt sowie die JAK-2 abhängige Aktivierung des NF- κ B [204].

Die Serumkonzentration von EPO, die für einen gewebeschützenden Effekt nötig ist, ist viel höher als die für die Erythropoese benötigte Konzentration. Ein Grund hierfür ist, dass der Rezeptor, der den Zellschutz vermittelt, eine sehr viel geringere Affinität zum Ligand aufweist als der Rezeptor auf erythroiden Vorläuferzellen [205]. Da diese Rezeptoren bei einem normalen Plasmaspiegel von EPO nicht besetzt werden, scheint ein parakriner Wirkmechanismus vorzuliegen [204]. Ein weiterer Grund könnte das Vorhandensein von Barrieren wie etwa der Blut-Hirn-Schranke sein. Entgegen früheren Meinungen wurde aber gezeigt, dass EPO die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann [206]. Um einen gewebeschützenden Effekt zu erzielen, ist die minimal effektive Dosierung von EPO für Gewebe, die ein dichtes Endothel aufweisen (ZNS), sehr hoch und liegt bei etwa 500 U/kg. Ein Schutz anderer Gewebe wie etwa des Herzens oder der Nieren erfordert eine deutlich geringere Dosis. Diese liegt bei 10-50 U/kg und liegt damit im Bereich, der auch bei der Behandlung der Anämie üblich ist. Es ist nicht klar, ob EPO das Wachstum von Tumoren vorantreiben kann [175, 208]. EPO-R mRNA und/oder EPO-R Protein wurden in verschiedenen Tumorgeweben nachgewiesen, so zum Beispiel in Karzinomen der Brust, der Lunge und der Niere, in Tumoren der Zervix und anderer Organe des weiblichen Geschlechtraktes und in verschiedenen pädiatrischen Tumoren [166]. Eine neuere Studie hat jedoch gezeigt, dass die Antikörper, die für den Nachweis von EPO-R Protein benutzt werden, nicht spezifisch sind [209]. Außerdem konnten Effekte von EPO auf Tumorzellen in vitro grundsätzlich nur dann gesehen werden, wenn extrem hohe EPO Konzentrationen eingesetzt wurden. Solch hohe Konzentrationen überschreiten die Konzentration, die bei Krebspatienten nach einer Verabreichung von EPO erreicht werden, um etliche Größenordnungen [210-212]. Viele Studien konnten keinen Zusammenhang zwischen einer EPO-R Expression und einem tatsächlichen Tumorwachstum durch EPO feststellen [213-217].

Zwei neuere klinische Studien zeigen jedoch nachteilige Resultate, die mit einer Verabreichung von EPO in Verbindung zu stehen scheinen. Eine untersuchte Versuchsgruppe waren Patienten, die an Brustkrebs mit Metastasenbildung erkrankt

waren und Chemotherapie erhielten [221], die andere Gruppe bestand aus Patienten, die wegen Tumoren im Kopf- oder Halsbereich bestrahlt wurden [222]. In beiden Studien zeigte sich bei mit rHuEPO behandelten Patienten eine negative Auswirkung auf die Überlebensdauer und es kam zumindest teilweise zu einem gesteigerten Fortschreiten der Erkrankung. Zusätzlich schien bei der mit rHuEPO behandelten Gruppe der Brustkrebspatienten diese Behandlung mit einem erhöhten Vorkommen von tiefen Venenthrombosen in Verbindung zu stehen [175], ebenso bei wie bei einer Versuchsgruppe von Patienten mit Zervixkrebs [223]. Die Interpretation dieser beiden Versuchsanordnungen gestaltet sich allerdings schwierig, da es zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen große Unterschiede im Ausgangswert mehrerer für die Prognose entscheidender Faktoren gab, die ein besseres Abschneiden der Placebogruppe begünstigt haben könnten [224]. Außerdem konnten Mängel in der standardisierten Beurteilung und Dokumentation dieser für das Überleben wichtigen Faktoren festgestellt werden [225].

2.4 Tissue Protective Molecule (TPM)

ARA 284 stammt von der Firma ARAIM, New York, USA. ARA 284 ist ein Fragment von EPO, es besteht aus den Aminosäuren 14 bis 28 der Helix A. Dieser Abschnitt enthält eine Sequenz, von der vermutet wird, dass sie für die Aktivierung des gewebeschützenden Rezeptors verantwortlich ist [226]. Im weiteren wird ARA 284 als TPM bezeichnet.

In seiner parakrinen/autokrinen Rolle als zytoprotektive Substanz kann EPO die Apoptose in einer großen Anzahl von Zelltypen verhindern und viele Mechanismen aktivieren, die zu einem Schutz angegriffener Gewebe führen. Dies führt beispielsweise zu einer geringeren Entzündungsreaktion mit vermindertem lokalen Ödem [227]. Außerdem spielt EPO eine entscheidende Rolle während der Entwicklung [228]. Im adulten Organismus vermittelt EPO viele trophische Effekte, was zu einer beschleunigten Wundheilung und Regeneration der betroffenen Gewebe führt. Es wurde gezeigt, dass die Verabreichung von EPO die Kognition sowohl bei gesunden [229] als auch bei kranken [230] menschlichen Patienten verbessert.

Das molekulare Zusammenspiel von EPO mit dem erythropoetischen Rezeptor (EPOR)₂ wurde ausführlich untersucht und die Regionen, die mit dem EPO Rezeptor interagieren, wurden identifiziert. Diese beinhalten Teile der Helix A und C sowie auch

Teile der Helix D und der Schleife, die Helix A mit Helix B verbindet [231-234]. Chemische Veränderungen oder Mutationen der Aminosäuren in diesen Regionen verhindern die Bindung von EPO an (EPOR)₂, deshalb zeigen diese modifizierten EPO Varianten in vitro und in vivo keine hämatopoetischen Eigenschaften. Einige dieser modifizierten Varianten behalten allerdings ihre zytoprotektiven Eigenschaften [235]. Diese beiden Regionen, die essentiell für die Erythropoese sind, scheinen demnach für die zytoprotektive Funktion nicht benötigt zu werden [227].

Der Rezeptor, der die Zytoprotektion vermittelt, ist ein Heteromer bestehend aus EPO-R und CD131, dem β Rezeptor [203]. CD131 bildet auch Rezeptorkomplexe mit den α -Rezeptor Untereinheiten, die spezifisch sind für GM-CSF, IL-3 und IL-5 und wird deshalb als „gemeinsamer“ Rezeptor bezeichnet [236]. Ergebnisse aus Studien zeigen, dass chemische Modifikationen der Lysinreste oder der Austausch einzelner Aminosäuren innerhalb der beiden Regionen, die für die Interaktion mit (EPOR)₂ verantwortlich sind, die zytoprotektive Wirkung nicht beeinflussen. Dies legt nahe, dass andere Regionen von EPO die Sequenzen enthalten, die für die Bindung an den zytoprotektiven Rezeptor verantwortlich sind [227]. Im wässrigen Medium ist die Tertiärstruktur von EPO wegen der Interaktion zwischen den hydrophoben Anteilen der vier α -Helices relativ klar definiert, was dem Molekül eine kompakte, relativ starre kugelförmige Struktur verleiht. Wenn EPO an (EPOR)₂ bindet, zeigen die Helix B und Teile der Schleifen AB und CD von der von der homodimeren Bindungsstelle weg und zum wässrigen Medium hin [237]. Diese Regionen enthalten kein Lysin und sind daher von einer Carbamylierung von EPO nicht betroffen. Bei dieser Carbamylierung entsteht CEPO, das eine selektiv zytoprotektive Substanz darstellt [235]. Aufgrund dieser Beobachtungen entstand die Hypothese, dass die gewebesetzende Funktion im Gegensatz zur hämatopoetischen durch eine Region innerhalb der Helix B und /oder Schleife AB des EPO Moleküls vermittelt wird [227]. Basierend auf dieser Hypothese wurden verschiedene Helix B Peptide synthetisiert. HBP (Aminosäure 58-82) zeigte wie erwartet weder im UT-7 EPO Zellversuch noch in vivo eine hämatopoetische Aktivität, wies jedoch in vitro eine deutliche mit EPO oder auch CEPO vergleichbare neuroprotektive Aktivität in einem Motoneuronenmodell an der Ratte auf [238, 239]. Da HBP wegen seiner geringen Größe und größeren Angreifbarkeit durch Proteolyse und Clearance eine kürzere Plasmahalbwertszeit als EPO hat, war es von enormem Interesse, zu erforschen, ob solche gewebesetzenden Eigenschaften auch in vivo auftreten würden. HBP erwies sich als zellschützend in einem Rattenmodell, in dem ein Verschluss der mittleren zerebralen Arterie herbeigeführt worden war. EPO [206],

Asialo-EPO [240] und CEPO [235] zeigten hier ähnliche Effekte wie HBP. Eine einmalige intravenöse Verabreichung von 1.5 nmol/kg HBP führte zu einem reduzierten Ausmaß des Infarkts und zu höherer Futteraufnahme. Zusätzliche Verabreichungen von HBP an späteren Tagen des Versuchs erbrachten keine weiteren Verbesserungen [241]. Ratten, bei denen durch die Gabe von Streptozotocin ein diabetischer Status hervorgerufen wurde, wurde über einen Zeitraum von drei Wochen an fünf Tagen pro Woche 1.5 nmol/kg HBP intraperitoneal verabreicht. Während bei diesen Tieren die Retina nach drei Wochen keinen Unterschied zu der gesunder Tiere aufwies, hatten die unbehandelten Tiere ein signifikantes Ödem entwickelt [227]. HBP erwies sich hier als zytoprotektiv in vitro wie auch in vivo.

Ein weiteres Peptid, das in seiner Primärstruktur nicht mit EPO übereinstimmt, aber die Folge an Aminosäuren nachahmt, die sich auf der Helix B im wässrigen Medium zur wässrigen Phase nach außen hin ausrichten, ist HBSP. Es enthält 11 Aminosäuren und weist keine Bindungsstellen für (EPOR)₂ auf, demzufolge zeigte es weder in vitro noch in vivo hämatopoetische Effekte [227]. HBSP erwies sich ebenso wie HBP in einem Modell als hoch aktiv in der Reduktion der Verletzung des Ischiasnerves und führte zu vergleichbaren Ergebnissen wie EPO oder Asialo-EPO [235, 240].

Da das N-terminale Glutamin in HBSP leicht einer spontanen irreversiblen Zyklisierung zu Pyroglutamat unterliegen kann [242] und HBSP somit eine Mischform beider Varianten darstellt, erfolgte eine Synthetisierung der Pyroglutamat HBSP Variante (pHBSP), um deren biologische Aktivität zu überprüfen [227]. pHBSP, das keinen hämatopoetischen Einfluss zeigte, wurde in einem Nagetiermodell der renalen Ischämie/Reperfusion eingesetzt und zeigten einen nierenschützenden Effekt, der mit dem EPOs vergleichbar war [243]. Die Ergebnisse einer Verabreichung von pHBSP führte in einem Apoplexiemodell zu einer signifikanten Reduktion des Infarktausmaßes und einer Verbesserung der neurologischen Funktion [241]. Die subkutane Injektion von pHBSP über 10 Tage führte bei Ratten zu einer schnelleren Heilung von Biopsiewunden als bei unbehandelten Tieren [227]. Ratten, denen pHBSP verabreicht wurde, zeigten eine bessere Gedächtnisleistung als unbehandelte Ratten [244].

Ein 17 Aminosäuren langes Peptid aus EPOs AB Schleife (Aminosäuren 30 bis 47) scheint ebenfalls eine neurotrophe Aktivität aufzuweisen [245], hier ist jedoch nicht klar, ob dieses Peptid mit dem zellschützenden Rezeptor interagiert oder ob der biologische Effekt durch einen anderen Mechanismus vermittelt wird.

All diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die Helix B dieselbe gewebeschützende Aktivität aufweist wie das gesamte EPO Molekül.

Gegenüber allen Erwartungen zeigten aber auch manche Peptide, die aus anderen Regionen des EPO Moleküls stammen und nicht nach außen zeigen oder die Anteile der Bindungsstellen zu (EPOR)₂ beinhalten, zytoprotektive Aktivität [246]. So zeigt zum Beispiel ein Peptid, das aus dem N-terminalen Anteil der Helix A besteht (Aminosäuren 1 bis 23) und somit einen Teil der Bindungsstelle zum EPO-R besitzt (Aminosäuren 11-15) zytoprotektive Aktivität. Die Anwesenheit dieser für die Bindung zuständigen Aminosäuren scheint jedoch für die zytoprotektive Aktivität nicht verantwortlich zu sein, da ein Peptid, das aus den Aminosäuren 14-19 besteht, ebenfalls zytoprotektiv wirkt [246].

Das hier verwendete TPM, das aus den Aminosäuren 14-28 der Helix A besteht, soll ebenfalls zytoprotektiv wirken ohne eine hämatopoetische Aktivität zu zeigen.

2.5 Bisoprolol

Katecholamine (Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin), die sowohl Transmitter des sympathischen Nervensystems als auch aus dem Nebennierenmark stammende zirkulierende Hormone sind, bewirken eine Reihe physiologischer und metabolischer Effekte. Die Bindung der Katecholamine an Adrenozeptoren, die auf vielen verschiedenen Geweben lokalisiert sind, führt zu Effekten, die spezifisch für den Rezeptor und die Art des Gewebes sind. β -Blocker sind kompetitive Hemmer der Katecholaminbindung an Adrenozeptoren.

β_1 -Rezeptoren sind überwiegend im Herzen lokalisiert. β_2 -Rezeptoren kommen im Herzen, aber auch in der glatten Muskulatur der peripheren Blutgefäße und des Uterus sowie in den Bronchien vor [247]. Der β_3 -Rezeptor kommt hauptsächlich im Fettgewebe vor und scheint dort für die Lipolyse verantwortlich zu sein. So scheint der stimulierende Einfluss von lipid-mobilizing factor (LMF) und Zink α_2 -Glykoprotein (ZAG) auf die Lipolyse durch ein Zusammenwirken mit β_3 -Rezeptoren vermittelt zu werden. Eine gesteigerte Expression von UCP1 und UCP2 wird über den β_3 -Rezeptor vermittelt [36]. Die Stimulation von β_1 - und β_2 -Rezeptoren führt zu einer gesteigerten Kontraktilität des Myokardiums und zu einer erhöhten Herzfrequenz. β_1 -Rezeptoren finden sich hauptsächlich im und um den synaptischen Spalt, β_2 -Rezeptoren sind weiter entfernt von den adrenergen Nervenendigungen zu finden. Aus diesem Grund werden β_1 -Rezeptoren in erster Linie durch den Neurotransmitter Noradrenalin, β_2 -Rezeptoren mehr durch das zirkulierende Adrenalin aktiviert. Noradrenalin hat eine

höhere Affinität für β_1 -Rezeptoren, wohingegen Adrenalin für beide Rezeptoren eine ähnliche Affinität aufweist. Sowohl β_1 - als auch β_2 -Rezeptoren sind an stimulierende G-Proteine gekoppelt, die eine Adenylatzyklase aktivieren, wodurch cAMP freigesetzt wird. cAMP aktiviert die Proteinkinase A, die wiederum verschiedene Proteine phosphoryliert.

β -Blocker erniedrigen die Herzfrequenz und verringern die Kontraktilität des Myokardiums, was zu einer verminderten Auswurfleistung des Herzens führt. Der Blutdruck wird gesenkt. Der Blutfluss zu den meisten Organen, mit Ausnahme des Gehirns, wird reduziert, auch die Durchblutung der Niere und damit die glomeruläre Filtrationsrate können in geringem Umfang erniedrigt sein [247]. Da die Freisetzung von Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat durch eine sympathische Stimulation gefördert wird und β -Blocker zudem die Umwandlung von Prorenin zu Renin beeinträchtigen, kommt es zu einer Hemmung des Renin-Angiotensin-Aldosteron Systems [248].

Eine sympathische Aktivierung könnte zur Entstehung der Kachexie beitragen, indem sie zu einer verminderten Leptinsekretion, einer ausgeprägteren Insulin-Resistenz und einem vergrößerten Ruheenergieverbrauch führt und außerdem die Erzeugung von proinflammatorischen Zytokinen vorantreibt [1, 249-251].

Es konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit β -Blockern zu einer Erniedrigung des Ruheenergieverbrauchs, einer Hemmung der Lipolyse und einer verminderten Empfindlichkeit gegenüber Insulin führt [249, 250]. So steht eine chronische Behandlung mit β -Blockern bei Patienten mit Bluthochdruck mit einem kleinen Zuwachs an Körpergewicht in Zusammenhang [250].

In einer weiteren Studie führte eine Behandlung mit Bisoprolol bei kachektischen, an chronischer Herzinsuffizienz erkrankten Patienten zu einer Gewichtszunahme, erhöhten Spiegeln an Leptin und erniedrigten Spiegeln an Noradrenalin im Plasma. Der Mechanismus, der zu diesem Gewichtszuwachs führte, konnte allerdings in dieser Studie nicht vollständig geklärt werden. Es besteht die Möglichkeit, dass der in der Studie beobachtete Gewichtszuwachs allein auf einer Verbesserung der Hämodynamik, der Herzfunktion und des Ernährungsstatus, ausgelöst durch die Behandlung mit β -Blockern, nicht aber auf einem spezifischen adrenergen Effekt auf den Stoffwechsel beruht [252].

Vorläufige Analysen der COPERNICUS [253] und CIBIS II [254] Datenbanken zeigen bei Herzinsuffizienzpatienten, die Carvedilol oder Bisoprolol erhielten, gegenüber der Placebogruppe einen durchschnittlichen Gewichtszuwachs von 0,5 kg in 6 Monaten

und 1 kg in 12 Monaten. Diese Gewichtszunahme besteht zu größtem Teil aus Fett. Eine Therapie mit β -Blockern scheint demzufolge die Erhaltung der Energiereserven des Körpers zu fördern. Allerdings scheinen relativ hohe Dosierungen an β -Blockern nötig zu sein, um Auswirkungen auf die Körperzusammensetzung zu erzielen [255].

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Bisoprolol die LPS-induzierte TNF- α -Expression hemmt, welche zum Katabolismus der Kachexie beiträgt [256].

β -Blocker werden in drei Klassen eingeteilt. Die erste Generation von β -Blockern besetzt in gleichem Maße β_1 - wie auch β_2 -Rezeptoren und ist deshalb unspezifisch.

Die zweite Generation, zu der auch Bisoprolol gehört, zeigt eine deutlich höhere Affinität zu β_1 - als zu β_2 -Rezeptoren. Diese Substanzen werden als spezifische β -Blocker bezeichnet, da sie selektiv auf das Herz wirken ohne über eine Aktivierung von β_2 -Rezeptoren zu einer Vasodilatation oder Bronchodilatation zu führen. Eine dritte Generation von β -Blockern bindet zusätzlich an den α_1 -Rezeptor und führt dadurch zu einer Vasodilatation [257].

Bisoprolol ist ein β_1 -spezifischer β -Blocker, dessen Selektivität für den β_1 -Rezeptor etwa 120 mal stärker als für den β_2 -Rezeptor ist. Diese Selektivität ist allerdings dosisabhängig, so kommt es bei Dosierungen von mehr als 20 mg auch zu einer gewissen Blockade des β_2 -Rezeptors. Einige β -Blocker bewirken durch die Bindung eine leichte Aktivierung des β -Rezeptors, verhindern aber eine weitere Aktivierung des Rezeptors durch endogene oder zugeführte Katecholamine. Bisoprolol allerdings zeigt im Gegensatz zu diesen Substanzen keinen partiellen agonistischen Effekt. Bisoprolol wird schnell und fast vollständig gastrointestinal absorbiert. Der Abbau erfolgt zu gleichen Teilen in Niere und Leber und es besteht ein deutlicher First-Pass-Effekt. Bisoprolol wird routinemäßig zur Therapie des Bluthochdrucks verwendet [247].

3. Material und Methoden

Diese Studie lief als Teil einer großen Versuchsreihe, weshalb die Ergebnisse aus der Bisoprolol Monotherapie und die Werte der Placebo Tiere nicht ausschließlich in dieser Arbeit verwendet, sondern auch von anderen genutzt werden. Aus Gründen des Tierschutzes wurden die für die Sham Gruppen, die mit Placebo behandelte Tumorgruppe und die Bisoprolol Gruppe ermittelten Daten nur einmal erhoben und von allen Doktoranden genutzt, die an der Studie beteiligt waren (Kai Hartmann, Katja Schmidt, Valerie Flach).

3.1 Tiere und Tierhaltung

Im Rahmen der Versuche wurde mit männlichen Ratten der Rasse Wistar Hannover gearbeitet, die mit einem Gewicht von 200 Gramm im Alter von ca. sieben Wochen von der Firma Charles River, Sulzfeld, bezogen wurden.

Die Ratten wurden in Gruppen von zwei bis drei Tieren in Standardkäfigen (Makrolon Typ IV) im klimatisierten SPF Stall des Center for Cardiovascular Research der Charité, Campus Mitte, gehalten. Als Einstreu erhielten die Tiere Sägespäne und zur Anreicherung der Haltungsumwelt eine Plastikröhre pro Käfig.

Es bestand jederzeit freier Zugang zu Trinkwasser aus einer Nippelflasche und zu Futter, das über die Futterraufe angeboten wurde. Als Alleinfutter erhielten die Ratten „ssniff R/M-H“ der Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, D-59495 Soest.

Die Ratten wurden mindestens zweimal wöchentlich umgesetzt. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde mindestens zweimal täglich von Tierärzten kontrolliert.

Alle Experimente wurden nach Genehmigung durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit gemäß den Tierschutzrichtlinien durchgeführt (G0076/06).

3.2 Substanzen

3.2.1 Erythropoetin

In diesem Versuch wurde „Neo-Recormon“ (Epoetin beta 30000 IU/0,6 ml, F. Hoffmann-La Roche Ltd) in der Monotherapie in Dosierungen von 100, 500, 2500 und 5000 IU/kg/d zur täglichen Behandlung verwendet.

Anhand der erhobenen Werte wurde eine Dosierung von 100 IU/kg/d als effektive Dosis für die Kombinationstherapie ermittelt.

In der Kombinationstherapie mit Bisoprolol wurde eine Gruppe mit jeweils 75% der effektiven Dosierungen von EPO und Bisoprolol (EPO: 75 IU/kg/d, Bisoprolol: 3,75 mg/kg/d), eine weitere mit jeweils 25% der effektiven Dosierungen der beiden Medikamente (EPO: 25 IU/kg/d, Bisoprolol: 1,25 mg/kg/d) behandelt.

3.2.2 Tissue Protective Molecule (TPM)

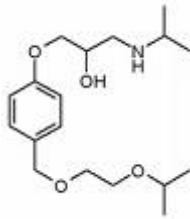
TPM stammt von der Firma ARAIM, New York, USA. Im Versuch wurden zwei Varianten des TPMs, ARA 284 und ARA 286, verwendet, die sich in ihrer Aminosäuresequenz unterschieden. ARA 286 diente als Negativkontrolle.

In der Monotherapie kamen beide Varianten jeweils in der Dosierung von 1,7 µg/kg/d und 0,17 µg/kg/d zum Einsatz.

1,7 µg/kg/d der TPM Variante 284 erwies sich als effektive Dosis für die Kombinationstherapie.

In der Kombinationstherapie mit Bisoprolol wurde eine Gruppe mit jeweils 75% der effektiven Dosierungen von TPM und Bisoprolol (TPM: 1,275 µg/kg/d, Bisoprolol: 3,75 mg/kg/d), eine weitere mit jeweils 25% der effektiven Dosierungen beider Medikamente (TPM: 0,425 µg/kg/d, Bisoprolol: 1,25 mg/kg/d) behandelt.

3.2.3 Bisoprolol



Bisoprolol ist ein herzspezifischer Beta-Rezeptorenblocker, der bei Hypertonie und Angina pectoris eingesetzt wird. In diesem Versuch wurde Concor 10 mg des Herstellers Merck Pharma GmbH, Darmstadt, Deutschland, in Dosierungen von 0,5, 2, 5 und 50 mg/kg/d in der Monotherapie verwendet.

Nach Auswertung der Daten wurde 5 mg/kg/d Bisoprolol als effektive Dosis für die Kombinationstherapie ermittelt. Wie bereits dargestellt, wurde Bisoprolol sowohl mit Epo als auch mit TPM in Kombination verabreicht.

3.2.4 Placebo

Placebotiere erhielten die der jeweiligen Dosierung des Medikaments entsprechende Menge an Kochsalzlösung entweder subkutan injiziert (EPO oder TPM) oder per Gavage verabreicht (Bisoprolol).

3.3 Applikation der Medikamente

Die Applikation der Medikamente erfolgte zwischen Tag 2 und Tag 16 des Versuchsprotokolls täglich immer zur gleichen Zeit (8-9 Uhr).

Erythropoetin sowie TPM wurden in einem Gesamtvolumen von 0,4 ml per subkutaner Injektion in die Nackenfalte verabreicht. Hierfür wurden 1 ml Spritzen (BD Plastipak, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien) sowie Kanülen der Größe 16 (100 Sterican, 0,6 x 25 mm, 23 G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verwendet.

Die Applikation von Bisoprolol erfolgte mittels Gavage. Dafür wurden 3 ml Spritzen (BD 3 ml Syringe, Luer-Lok Tip, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) benutzt, auf welche spezielle Gavagiernadeln (animal feeding needles, Popper, New Hyde Park, NJ, USA),

aufgesetzt wurden. Diese besitzen einen weichen Silikonkopf, der eine Verletzung der Tiere beim Einführen der Nadel in den Rachen verhindert.

3.4 Tumor

Die intraperitoneale Tumordinjektion erfolgte mit AH-130 Yoshida Hepatoma Zellen am Tag 1 des Versuchsprotokolls. Das Yoshida AH-130 Hepatoma Modell ist an der Ratte bereits etabliert und hat sich als hervorragendes Modell für die Tumorkachexie herausgestellt.

Jeder Ratte der Tumorgruppe wurde die Zellzahl von 10^8 Tumorzellen in einem Volumen von 1-3 ml injiziert. Kontrolltieren wurde stattdessen in gleicher Weise physiologische Kochsalzlösung injiziert.

Der Tumor für die jeweilige Injektion einer Tiergruppe wurde durch eine 10 tägige Passage in einem unbehandelten Tier gewonnen. Nach Tötung dieses Passagiertiers durch Genickbruch unter Ketamin -Xylazin Narkose wurde der Tumor entnommen, die Zellzahl durch Auszählen unter dem Mikroskop ermittelt und schließlich das errechnete Tumolvolumen den Tieren der jeweiligen Versuchsgruppe intraperitoneal injiziert.

Die Zellen wachsen ab dem Tag 2 bis zum Tag 7 exponentiell, danach erreichen sie ein Plateau. Die Zellmasse des Tumors macht ca. 1% des Körpergewichts bei einer 200 g Ratte aus. Zusätzlich kommt es zur Bildung von Ascites-Flüssigkeit von bis zu 150 ml.

Die Tiere verlieren im Verlauf der Untersuchungen Fettmasse und auch die Muskelmasse nimmt ab. Ab dem Tag 7 werden die Tiere matter, aber nicht apathisch, und zeigen keine Lähmungserscheinungen. Es kam zu keiner gesteigerten Aggressivität oder auffälligen Atembeschwerden. Die Körperhaltung selbst war normal.

Die Tiere wurden mindestens zweimal täglich (alle 12 Stunden), wie von der GV-SOLAS und von der UKCCCR gefordert, untersucht und bei Anzeichen von Schmerzen oder anderen Auffälligkeiten (Apathie, Zyanose, Blutungen, Lähmungserscheinungen, anhaltendem Durchfall) vorzeitig getötet.

Die Tiere starben unbehandelt ca. ab Tag 11 nach Tumordinjektion. Der Tag 16 galt als absolut maximaler Tag des Protokolls.

Auch wenn Tiere nicht terminal krank waren, z. B. Kontrolltiere, wurden sie an diesem Tag getötet.

3.5 Versuchsaufbau und Behandlungsprotokoll

Der Versuchsablauf zeigte folgenden Aufbau:

- Tag -1: Aktivitätsmessung 24 Stunden
- Tag 0: Echokardiographie
- Tag 1: Kernspinresonanz (NMR), wiegen, Tumorinokulation
- Tag 2: Randomisierung, Start Therapie
- Tag 3: NMR, wiegen
- Tag 5: NMR, wiegen
- Tag 7: NMR, wiegen
- Tag 9: NMR, wiegen
- Tag 10: Aktivitätsmessung 24 Stunden
- Tag 11: NMR, wiegen, Echokardiographie
- Tag 13: NMR, wiegen
- Tag 15: NMR, wiegen
- Tag 16: Ende der Therapie, NMR, wiegen, Echokardiographie, Tiertötung, Organ- und Blutentnahme

Es bestanden folgende Behandlungsgruppen:

Sham (S) Gruppen

Tabelle M1

Gruppe	Anzahl der Tiere
Placebo S	8
EPO 100 S	8
EPO 500 S	8
EPO 2500 S	8
EPO 5000 S	8
Bisoprolol 5 mg S	8
Bisoprolol 50 mg S	8
TPM-284 0,17 µg S	4
TPM-284 1,7 µg S	5

Tumor (T) Monotherapie Gruppen

Tabelle M2

Gruppe	Anzahl der Tiere
Placebo T	49
EPO 100 T	20
EPO 500 T	16
EPO 2500 T	14
EPO 5000 T	16
Bisoprolol 5 mg T	23
Bisoprolol 50 mg T	20
TPM-284 0,17 µg T	12
TPM-284 1,7 µg T	22

Tumor (T) Kombinationstherapie Gruppen

Tabelle M3

Gruppe	Anzahl der Tiere
K Biso-EPO 25 T	15
K Biso-EPO 75 T	15
K Biso-TPM 25 T	12
K Biso-TPM 75 T	9

K Biso-EPO 25 entspricht: 25 IU/kg/d EPO + 1,25 mg/kg/d Bisoprolol

K Biso-EPO 75 entspricht: 75 IU/kg/d EPO + 3,75 mg/kg/d Bisoprolol

K Biso-TPM 25 entspricht: 0,425 µg/kg/d TPM + 1,25 mg/kg/d Bisoprolol

K Biso-TPM 75 entspricht: 1,275 µg/kg/d TPM + 3,75 mg/kg/d Bisoprolol

Die Behandlung erfolgte ab Tag 2 bis zum Ende des Versuchs täglich zwischen 8 und 9 Uhr durch die betreuenden Tierärzte.

Die Studie wurde randomisiert und verblindet durchgeführt, die verschiedenen Gruppen und Medikamente bzw. Dosierungen wurden mit Farbcodes gekennzeichnet, so dass eine Behandlung nach Farben durchgeführt werden konnte.

In diesem Versuch wurden neben den hier behandelten Medikamenten noch weitere Substanzen getestet. Diese Ergebnisse werden in den Arbeiten von Kai Hartmann, Katja Schmidt und Valerie Flach vorgestellt. Aus Gründen des Tierschutzes wurden die für die Sham Gruppen, die mit Placebo behandelte Tumorgruppe und die Bisoprolol

Gruppe ermittelten Daten von der Arbeitsgruppe gemeinsam erhoben und auch in allen Arbeiten als gemeinsame Daten veröffentlicht. Im Folgenden werden Tabellen, welche Daten enthalten, die auch von weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe veröffentlicht werden, mit einer entsprechenden Fußnote ^(AG Anker) gekennzeichnet.

3.6 Gewichtsmessungen

Die Gewichtsmessungen aller Tiere einer Gruppe erfolgten, beginnend am Tag 1 des Versuchsprotokolls, jeden zweiten Tag direkt im Anschluß an die medikamentöse Behandlung. Sie wurden stets in Kombination mit den NMR Messungen durchgeführt. Die Tiere wurden hierfür in einen Plastikeimer gesetzt und auf der Waage CS 2000 (OHAUS Corporation, Pine Brook, NJ, USA) gewogen.

3.7 Echokardiographische Untersuchung

Echokardiographische Untersuchungen zur Messung und zur Darstellung der Herzmuskelfunktion wurden gemäß Versuchsprotokoll am Tag 0 und am Tag 11 durchgeführt.

Die Untersuchungen erfolgten unter Isoflurannarkose (Forene, Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland).

Zur Einleitung der Narkose wurde das jeweilige Tier in eine Kammer einer Anästhesieeinheit gesetzt und mit einem Verdampfer (Isofluran Verdampfer, VIP 3000, Matrx) mit 3,5% Isofluran begast. Nach Erlangen des gewünschten Narkosestadiums wurde das Tier aus der Kammer genommen und zur Erhaltung der Narkose über eine Maske mit 2% Isofluran begast.

Die Brust der Ratte wurde geschoren (Favorita II, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland), mit Enthaarungscreme (Veet, Reckitt Benckiser, Dansom Lane Hull, UK) enthaart und mit einem feuchten Tuch gereinigt.

Es erfolgte die Fixierung der Ratte in Rückenlage, wobei alle vier Pfoten mit Klebeband an die EKG Messelektroden des auf 39 °C erwärmten Untersuchungstisches angelegt wurden.

Die echokardiographische Untersuchung erfolgte mit dem Gerät Vevo 770 (High Resolution Imaging System, Visual Sonics, Toronto, Ontario, Canada) mit einem

speziell für Ratten konzipierten Schallkopf (RMV-710 B, 25 MHz, Auflösung 70 μm). Es wurde Ultraschallgel der Firma Comedical Saa (Mattarello, Italien) verwendet.

Hochfrequente Ultraschallwellen werden durch den im Schallkopf befindlichen Piezokristal ausgesendet und von den Oberflächen der Körpergewebe reflektiert, gebrochen oder absorbiert. Nur der reflektierte Anteil wird wieder vom Transducer empfangen und umgewandelt. Je größer der Unterschied in der Gewebsdichte zweier Gewebe ist, umso größer ist die Reflexion der Ultraschallwellen an der Grenzfläche dieser beiden Gewebe.

Im B-Mode (brightness-mode) wird durch ein senkrecht auftreffendes Schallwellen ein zweidimensionales Schnittbild des Herzens erzeugt, das eine Beurteilung der Bewegungsabläufe und der Größenverhältnisse des Herzens erlaubt.

Der M-Mode (motion-mode) erzeugt ein eindimensionales Bild der Herzstrukturen, indem es die aufgezeichneten echokardiographischen Ergebnisse gegen die Zeit abbildet. Hier lassen sich Wandstärken und Durchmesser bestimmen.

Die Dopplerechokardiographie kann sowohl die Richtung des Blutflusses als auch dessen Geschwindigkeit messen. Das Prinzip besteht darin, dass die von Schallkopf ausgesandten Ultraschallwellen von den sich bewegenden Blutzellen reflektiert werden, dafür müssen die Schallwellen zum Blutfluss parallel ausgerichtet sein.

Das Flussprofil der Mitralklappe zeigt sich M-förmig. Die erste höhere Welle (E-Welle) wird durch die schnelle Ventrikelfüllung verursacht, während die zweite niedrigere Welle (A-Welle) durch die nachfolgende atriale Kontraktion entsteht.

Bei allen Tieren wurde im B-Mode eine Aufnahme des linken Ventrikels und des linken Atriums (Zweikammerblick) in der langen Achse angefertigt, wofür der Schallkopf parasternal links angelegt wurde. Aus dieser Aufnahme erfolgte die diastolische sowie die systolische Bestimmung der Fläche des linken Ventrikels. Desweiteren wurde der Durchmesser der Aorta gemessen. Außerdem erfolgte zur Vermessung von Vorhof- und Kammerdiametern, der Wandstärken sowie der Bestimmung der Herzfrequenz eine Aufzeichnung des M-Modus.

Zusätzlich wurde bei allen Versuchstieren ein Vierkammerblick von apikal angefertigt. Hierfür wurde der Schallkopf von links und kaudoventral mit Druck unter den Rippenbogen geschoben. So konnte mittels PW-Dopplerechokardiographie der Mitralfloss dargestellt werden.

Alle Auswertungen erfolgten mit der Software Vevo 770, Version 2.3.0. von Visual Sonics. Neben dem dia- und systolischen Volumen des linken Ventrikels konnte so auch die Auswurfraction (ejection fraction), die Verkürzung des Herzens während des

Pump Vorgangs (fractional shortening), das Schlagvolumen (stroke volume) sowie der diastolische und systolische Diameter des linken Ventrikels bestimmt werden.

3.8 Magnetresonanztomographie (NMR)

Um die Entwicklung und die Veränderungen in der Körperzusammensetzung der Tiere erkennen und dokumentieren zu können, wurde jede Ratte an festgelegten Tagen einer Magnetresonanztomographie unterzogen (Echo MRI-500, Echo Medical Systems, Houston, Texas, USA).

Die erste Messung erfolgte am Tag der Tumorinokulation (Tag 1), dann jeden zweiten Tag verbunden mit der Ermittlung des Gewichts.

Die Tiere wurden wach in transparente Messröhren gesetzt, die Röhre wurde in das NMR Gerät eingelegt und ein NMR-Scan, der etwa 73 Sekunden dauert, wurde durchgeführt. Er ermittelt die Masse an Fett, Muskulatur, freiem Wasser und totalem Wassergehalt des Körpers der Ratte.

Die physikalische Grundlage der Magnetresonanztomographie bildet die Kernspinresonanz. Protonen und Neutronen haben einen Eigendrehimpuls (Spin), solche rotierende Kerne richten sich nach einem Magnetfeld aus (Präzessionsbewegung). Wird das äußere Feld wieder abgestellt, fällt der Kern in seine ursprüngliche Lage zurück (thermisches Gleichgewicht). Gewebe sind unterschiedlich empfindlich für elektromagnetische Wellen.

3.9 Aktivitätsmessung im Lokomotor-System

Die spontane Aktivität der Tiere wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden mittels des Supermex-Lokomotor-Systems (CompACT AMS INTERFACE DI-064W, Muromachi Kikai Co., Tokyo, Japan) gemessen, bei dem die Tiere einzeln in Typ III Standardkäfigen auf Sägespänen gehalten und die Bewegung mittels Infrarot-Messung dokumentiert wurde. Die Messung wurde einmal vor der Inokulation des Tumor (Tag - 1) und einmal am Tag 10 des Protokolls durchgeführt.

Die Tiere erhielten während der Messung freien Zugang zu Trinkwasser und einer abgewogenen Futtermenge von 100 Gramm.

Nach Beendigung der Messungen wurden die Tiere in ihre Gruppen zurückgesetzt und es erfolgte ein erneutes Wiegen des Futters, um die von jedem einzelnen Tier aufgenommene Futtermenge zu ermitteln.

3.10 Tötung und Organentnahme

Die Tötung der Tiere erfolgte an Tag 16, sofern sie nicht aufgrund von Schmerzen oder dem Auftreten von Krämpfen, Torkeln, Apathie oder Blut an den Körperöffnungen schon zu einem früheren Zeitpunkt getötet werden mussten.

Die Tötung erfolgte unter Ketamin-Xylazin Narkose. Hierfür wurden den Ratten 90 mg/kg Ketamin (Ketavet, 100mg/ml, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) und 10 mg/kg Xylazin (Rompun, 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland), aufgezogen in einer Mischspritze, intraperitoneal verabreicht. Nach der Injektion wurden sie bis zum vollständigen Eintritt der Narkose in ihren Käfig zurückgesetzt.

Erst wenn sowohl Lidreflex als auch Zwischenzehenreflex nicht mehr auslösbar waren, erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle. Dafür wurde mit einer Pinzette die Bauchdecke angehoben und mittels Scherenschlag eröffnet. Mit einer Pasteurpipette wurde die gesamte Tumorflüssigkeit abgesaugt und die genaue Menge ermittelt.

Nach Abschluss der NMR Messung wurde der Ratte mit einer Schere der Brustkorb eröffnet und unter Sichtkontrolle mittels einer heparinisierten Spritze (Heparin-Rotexmedica, Trittau, Deutschland) Blut aus der linken Herzkammer entnommen. Daraufhin erfolgte die Tötung durch Genickbruch.

Mit einem Teil des heparinisierten Blutes wurde sofort nach Entnahme eine Blutgasanalyse durchgeführt. Hierfür wurde das Gerät ABL 555 der Firma Radiometer Copenhagen, Brønshøj, Dänemark benutzt.

Damit wurden folgende Werte ermittelt: Natrium, Kalium, Glukose, Hämatokrit sowie die Hämoglobinkonzentration.

Der andere Teil des Blutes wurde in ein heparinisiertes Falcon verbracht und sofort in Eis gekühlt, bis es zur Gewinnung von Plasma bei 4 Grad mit 2000 Umdrehungen für 10 Minuten zentrifugiert wurde (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Nach Ende der Zentrifugation wurde das Plasma mit einer Pipette abpipettiert, in 2 ml Reaktionsgefäße gefüllt und bei -80 C° in nummerierten Kryoboxen eingefroren.

Es folgte die Organentnahme: Es wurden das Herz, die Lunge, beide Nieren und Nebennieren, die Leber, die Milz, das intraperitoneale Fett einer Seite sowie das braune Fett aus dem Nacken entnommen. Alle Organe wurden gewogen (Laborwaage APX-60, Denver Instrument, USA), einzeln in 2 ml Reaktionsgefäße verbracht und sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren, von wo aus die Proben dann zur vorläufigen Lagerung in einen -80 C° Gefrierschrank verbracht wurden.

Des Weiteren wurden an beiden Hinterbeinen die Mm. gastrocnemii, soleii, tibiales und extensores digitorum longus entnommen, ebenfalls gewogen und eingefroren.

Schließlich wurde noch die Tibia eines Beines entnommen und die Länge des Knochens gemessen, um Aufschluss über das Wachstum zu erhalten und damit die Muskel- und Organgewichte in ein Verhältnis setzen zu können.

Außerdem wurde, nachdem der gesamte Tumor noch einmal getrennt vom Tier einer NMR Messung unterzogen wurde, die Tumorzellzahl jedes Tieres durch Auszählen unter dem Mikroskop ermittelt.

3.11 Ermittlung der Tumorzellzahl

Hierfür wurden mittels einer Pipette 25 µl des Tumors abpipettiert, mit 875 µl Kochsalzlösung (Isotonische Kochsalzlösung, 0,9%, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) und 100 µl Farbstoff (Trypan Blue Solution, Fluka, Sigma Aldrich, Buchs, Schweiz) in ein Eppendorf Reaktionsgefäß verbracht und durch Schwenken vorsichtig durchmischt. Von dieser Mischung wurde ein Tropfen entnommen, auf eine vorbereitete Neubauer Zählkammer (Neubauer Superior, Paul Marienfeld GmbH & Co. Kg, Lauda-Königshofen, Deutschland) gegeben und nun unter dem Mikroskop (Leica DMIL, Leica Microsystems GmbH, Bensheim, Deutschland) bei einer Vergrößerung von 10x/0,22 durchmustert. Es wurden 24 Kästchen ausgezählt, die Werte addiert und dann durch 24 dividiert (=N).

Der ermittelte N – Wert wurde in folgende Formel eingesetzt:

$$\text{nrCells/ml} = N \times 16 \times 40 \times 10000 = \dots \times 10^6 \text{ cells/ml}$$

Somit wurde die Anzahl an Tumorzellen pro ml ermittelt.

3.12 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Um Gruppenunterschiede herauszufinden, wurden bei bis zu zwei Gruppen der ungepaarte t-Test, bei mehr als zwei Gruppen eine Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt.

Zur Darstellung der Überlebenswahrscheinlichkeiten wurden Kaplan-Meier Kurven erstellt. Bei normalverteilten Werten wurde ein p-Wert $<0,05$ als signifikant angesehen.

Alle Auswertungen erfolgten mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism 5 der Firma GraphPad Software, Inc. (San Diego, Kalifornien, USA).

3.13 Nutzung gemeinsam erhobener Daten der Arbeitsgruppe

Um die Anzahl der Versuchstiere möglichst gering zu halten wurden aus Gründen des Tierschutzes die für die Sham Gruppen, die mit Placebo behandelte Tumorgruppe und die Bisoprolol Gruppe ermittelten Daten von der Arbeitsgruppe Anker (Kai Hartmann, Katja Schmidt, Valerie Flach und Tanja Hamm) gemeinsam erhoben und auch in allen Arbeiten als gemeinsame Daten veröffentlicht. Im Folgenden werden Tabellen, welche Daten enthalten, die auch von weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe veröffentlicht werden, mit einer entsprechenden Fußnote als gemeinsame Daten der Arbeitsgruppe Anker ^(AG Anker) gekennzeichnet.

Daten, die in dieser Arbeit veröffentlicht werden und als gemeinsame Daten der Arbeitsgruppe Anker ^(AG Anker) gekennzeichnet sind, werden auch in folgenden Arbeiten verwendet:

Hartmann, Kai, *Der Einfluss der Xanthinoxidasehemmer Allopurinol und Oxypurinol auf Gewichtsverlauf, Körperzusammensetzung und spontane Aktivität in einem Rattenmodell der Tumorkachexie*, Dissertation, FU Berlin, 2010

Schmidt, Katja, *Der Einfluss von Bisoprolol und IGF-1 als alleinige Medikation und in Kombination auf Gewichtsverlauf, Körperzusammensetzung, spontane Aktivität und Herzfunktion in einem Rattenmodell der Tumor-Kachexie*, Dissertation, FU Berlin, 2011

Flach, Valerie, Dissertation in Vorbereitung

4. Ergebnisse

4.1 Sham Gruppen

Allen Ratten der mit Placebo behandelten Tumorgruppe wurden jeweils 10^8 Tumorzellen intraperitoneal injiziert. Tieren der Kontrollgruppe (Placebo Sham) wurde die entsprechende Menge an NaCl intraperitoneal injiziert. Der Einfluss des Yoshida AH-130 Hepatoms auf Tiere, denen lediglich Placebo verabreicht wurde, stellt sich folgendermaßen dar:

Die Tiere der mit Placebo behandelten Tumorgruppe verloren signifikant an Gewicht, der Verlust besteht sowohl aus Fett als auch aus fettfreier Masse. Außerdem zeigten sie eine geringere Futtermittelaufnahme und waren weniger aktiv als die Vergleichstiere der Placebo Sham Gruppe. Alle gewogenen Organe mit Ausnahme der Nebenniere zeigten ein signifikant niedrigeres Gewicht als die der Vergleichsgruppe.

Tabelle 1.1 Gewichte: Sham Gruppen (AG Anker)

	Placebo Sham	Placebo Tumor
Anzahl der Tiere (N)	8	37
Gewichtsveränderung excl. Tumor pro Tag [g]	3.88 ± 0.23	-4.74 ± 0.17 ***
Verlust an fettfreier M. pro Tag [g]	2.73 ± 0.22	-3.51 ± 0.15 ***
Verlust an Fett pro Tag [g]	0.60 ± 0.10	-0.99 ± 0.05 ***
Lebensqualität		
Futtermittelaufnahme Tag 10 [g]	20.75 ± 1.08	3.00 ± 0.51 ***
Aktivität Tag 0 / Tag 10 [%]	-0.18 ± 0.03	-0.71 ± 0.03 ***
Organgewichte in mg		
Herz	788.33 ± 19.77	505.21 ± 14.00 ***
Lunge	1302.79 ± 74.18	885.22 ± 29.57 ***
Leber	10709.48 ± 456.27	6093.39 ± 227.81 ***
Milz	623.36 ± 30.05	163.64 ± 10.01 ***
linke Niere	1138.75 ± 37.21	698.41 ± 16.58 ***
linke Nebenniere	28.65 ± 0.96	35.13 ± 1.77
weißes Fett	1324.00 ± 190.65	86.38 ± 26.43 ***
braunes Fett	218.26 ± 15.16	78.59 ± 3.14 ***
M. gastrocnemius	1290.79 ± 40.00	713.22 ± 14.07 ***
M. tibialis	466.99 ± 13.06	262.49 ± 6.10 ***
M. soleus	100.07 ± 3.00	69.73 ± 1.43 ***
M. EDL	109.95 ± 3.71	63.66 ± 1.48 ***

Placebo S vs Placebo S (t-test) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

Ergebnisse

Während an Tag 0 keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen auftraten, zeigte die mit Placebo behandelte Tumorgruppe an Tag 11 des Versuchs in allen Parametern außer IVS d und MV E / MV A Werte, die sich signifikant von denen der Placebo Sham Gruppe unterschieden.

Tabelle 1.2 Echokardiographie: Sham Gruppen ^(AG Anker)

Echokardiographie	Placebo Sham	Placebo Tumor
Anzahl der Tiere (N)	8	24
FS Tag 0 [%]	47.44 ± 2.21	49.17 ± 1.16
FS Tag 11 [%]	51.84 ± 1.97	28.13 ± 2.23 ***
EF Tag 0 [%]	74.65 ± 2.97	74.74 ± 1.47
EF Tag 11 [%]	77.22 ± 3.33	48.94 ± 2.77 ***
CO Tag 0 [ml/min]	74.46 ± 7.31	78.74 ± 2.91
CO Tag 11 [ml/min]	84.59 ± 7.99	30.94 ± 3.62 ***
IVS d Tag 0 [mm]	1.66 ± 0.13	1.57 ± 0.03
IVS d Tag 11 [mm]	1.70 ± 0.09	1.52 ± 0.05
IVS s Tag 0 [mm]	2.86 ± 0.14	2.75 ± 0.05
IVS s Tag 11 [mm]	2.99 ± 0.12	2.20 ± 0.07 ***
LVID d Tag 0 [mm]	6.18 ± 0.13	6.22 ± 0.08
LVID d Tag 11 [mm]	6.39 ± 0.10	5.48 ± 0.09 ***
LVID s Tag 0 [mm]	3.26 ± 0.19	3.17 ± 0.09
LVID s Tag 11 [mm]	3.09 ± 0.16	3.94 ± 0.13 **
LVPW d Tag 0 [mm]	1.94 ± 0.09	1.75 ± 0.05
LVPW d Tag 11 [mm]	2.23 ± 0.16	1.63 ± 0.04 ***
LVPW s Tag 0 [mm]	2.89 ± 0.10	2.78 ± 0.05
LVPW s Tag 11 [mm]	3.25 ± 0.15	2.11 ± 0.07 ***
MV E / MV A Tag 0	1.66 ± 0.09	1.55 ± 0.05
MV E / MV A Tag 11	1.61 ± 0.11	1.58 ± 0.31

Placebo S vs Placebo S (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

FS	fractional shortening
EF	ejection fraction
CO	cardiac output
IVS	interventrikuläres Septum
LVID	left ventricular intraventricular diameter
LVPW	left ventricular posterior wall
MV E / MV A	Maß für den Mitralfluss

Die folgende Tabelle zeigt die Auswirkungen einer Verabreichung von Erythropoetin oder TPM in verschiedenen Dosierungen (100, 500, 2500 bzw. 5000 IU/kg/d) auf gesunde Ratten ohne Tumor im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (Placebo Sham): Eine Verabreichung von 100 IU/kg/d EPO verursachte lediglich einen signifikanten Anstieg des Milzgewichts sowie gering signifikante Erniedrigungen der Gewichte des M. gastrocnemius, des M. tibialis und des M. EDL im Vergleich zur Placebo Sham Gruppe. Tiere, die 500 IU/kg/d EPO oder 2500 IU/kg/d EPO erhielten, nahmen gering (500) bzw. mittelgradig (2500) signifikant weniger an Gewicht zu, was sich in der fettfreien Masse und in einer signifikant geringeren Futteraufnahme zeigt. Neben einer hoch signifikant schwereren Milz und signifikant verminderten Muskelgewichten, mit Ausnahme des M. soleus, wiesen sie im Vergleich zur mitnPlacebo behandelten Sham Gruppe zusätzlich verminderte Gewichte der Niere und Nebenniere (500) auf.

Die Gruppe, der 5000 IU/kg/d EPO verabreicht wurde, zeigt im Vergleich zur Placebo Sham Gruppe eine signifikant geringere Gewichtszunahme. Neben einem geringeren Zuwachs an fettfreier Masse kam es hier auch zu einer verringerten Zunahme an Fett. Tiere dieser Gruppe nahmen signifikant weniger Futter auf als Kontrolltiere. Neben den wie bereits bei den anderen Gruppen auftretenden Veränderungen von Milz, Niere und den Muskeln, die bei dieser Dosierung deutlich signifikant ausfallen, zeigte sich zusätzlich ein signifikant kleineres Herzgewicht. Der M. soleus, der in den anderen Gruppen keine Veränderung zeigte, wies in dieser Gruppe ein signifikant kleineres Gewicht auf.

Tiere, denen 0,17 µg/kg/d TPM-284 verabreicht wurde, zeigten im Vergleich zur Placebo Sham Gruppe ein signifikant niedrigeres Gewicht von Lunge, Niere, Nebenniere und M. tibialis. Das braune Fett dieser Tiere war signifikant schwerer als das der Placebo Sham Gruppe.

Die mit 1,7 µg/kg/d TPM-284 behandelte Gruppe wies im Vergleich zur Placebo Sham Gruppe signifikant verminderte Gewichte von Nebenniere, M. gastrocnemius und M. EDL auf. Das Gewicht von Leber und M. tibialis war signifikant niedriger als das der Vergleichsgruppe.

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden TPM Behandlungsgruppen bestanden bei den Parametern Zunahme an fettfreier Masse, braunem Fett und M. EDL.

In keiner der Gruppen kam es zu signifikanten Veränderungen in der Aktivität der Tiere oder in den Gewichten von Lunge, Leber, weißem und braunem Fett.

Ergebnisse

Signifikante Unterschiede innerhalb der einzelnen Behandlungsgruppen zeigten sich bei den Parametern Gewichtsveränderung, Zunahme an Fett und fettfreier Masse, Herz, Milz, weißes Fett, M. gastrocnemius und M. EDL.

Tabelle 2.1 Gewichte: Behandlungsgruppen ohne Tumor

	Placebo Sham	EPO 100	EPO 500	EPO 2500	EPO 5000	TPM-284 0.17	TPM-284 1.7	ANOVA / Kruskal-Wallis
Anzahl der Tiere	8	8	8	8	8	5	4	-
Gewichtsveränd. excl. Tumor pro Tag [g]	3.88 ± 0.23	4.10 ± 0.26	3.16 ± 0.14	2.82 ± 0.26	2.22 ± 0.19	4.13 ± 0.31	3.59 ± 0.11	(A ***) P<0.0001
Zunahme an fettfreier M. pro Tag [g]	2.73 ± 0.22	2.73 ± 0.20	2.07 ± 0.09	1.92 ± 0.18	1.58 ± 0.15	2.71 ± 0.14	2.24 ± 0.06	(A ***) P<0.0001
Zunahme an Fett pro Tag [g]	0.60 ± 0.10	0.62 ± 0.06	0.45 ± 0.06	0.41 ± 0.06	0.26 ± 0.05	0.72 ± 0.18	0.55 ± 0.07	(A ***) P=0.0073
Lebensqualität								
Futteraufnahme Tag 10 [g]	20.75 ± 1.08	19.88 ± 1.60	16.00 ± 1.31	15.75 ± 0.88	15.75 ± 0.45	17.25 ± 2.17	20.20 ± 1.07	(A **) P=0.0091
Aktivität Tag 0 / Tag 10 [%]	18 ± 0.03	15 ± 0.05	17 ± 0.06	22 ± 0.04	15 ± 0.05	22 ± 0.03	13 ± 0.03	(A ns) P=0.8176
Organgewichte in mg								
Herz	788.33 ± 19.77	773.94 ± 17.78	739.85 ± 15.33	761.33 ± 9.48	693.29 ± 14.99	749.93 ± 16.30	728.36 ± 20.94	(A **) P=0.0032
Lunge	1302.79 ± 74.18	1373.34 ± 152.88	1186.35 ± 37.71	1313.16 ± 81.56	1170.66 ± 28.38	1089.15 ± 35.00	1188.64 ± 136.71	(A ns) P=0.3306
Leber	10709.48 ± 456.27	10807.75 ± 357.44	9986.10 ± 292.45	10357.90 ± 472.61	9883.59 ± 349.77	9636.27 ± 606.04	9218.04 ± 240.49	(A ns) P=0.2546
Milz	623.36 ± 30.05	1001.50 ± 44.07	144.68 ± 168.41	3129.36 ± 221.27	4083.64 ± 340.95	632.07 ± 47.38	672.74 ± 57.69	(A ***) P<0.0001
linke Niere	1138.75 ± 37.21	1035.76 ± 46.33	965.16 ± 28.04	990.17 ± 30.55	909.05 ± 26.88	928.88 ± 52.07	1010.84 ± 49.37	(A **) P=0.0021
li. Nebenniere	28.65 ± 0.96	25.35 ± 1.23	24.38 ± 1.77	27.29 ± 1.23	25.76 ± 1.22	22.62 ± 0.76	24.30 ± 1.68	(A ns) P=0.0696
weißes Fett	1324.00 ± 190.65	1277.02 ± 96.46	1344.61 ± 112.55	1218.34 ± 104.51	973.99 ± 82.98	1540.88 ± 232.84	1286.04 ± 84.28	(A ns) P=0.2048
braunes Fett	218.26 ± 15.16	202.79 ± 18.60	202.24 ± 8.02	201.97 ± 14.34	188.05 ± 13.32	283.58 ± 10.45	216.14 ± 12.67	(A **) P=0.0045
M. gastrocn.	1290.79 ± 40.00	1165.09 ± 19.52	1129.54 ± 23.18	1095.67 ± 45.35	1049 ± 16.92	1189.37 ± 34.27	1158.60 ± 30.69	(A ***) P<0.0001
M. tibialis	468.99 ± 13.06	395.36 ± 27.28	392.04 ± 12.30	395.23 ± 5.74	370.47 ± 11.27	414.12 ± 5.10	410.46 ± 6.51	(A **) P=0.0016
M. soleus	100.07 ± 3.00	98.00 ± 4.25	92.14 ± 3.19	92.50 ± 3.80	83.54 ± 3.23	91.05 ± 1.74	95.36 ± 1.52	(A *) P=0.0273
M. EDL	109.95 ± 3.71	98.04 ± 2.33	94.20 ± 1.88	93.34 ± 1.53	86.19 ± 1.88	101.52 ± 0.71	92.20 ± 3.98	(A ***) P<0.0001

t-test: ns: p>0.05, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 Placebo Sham (Ag Anker)

* = vs. Placebo Sham (A) = ANOVA (KW) = Kruskal-Wallis-Test

entsprechend gilt: □ = vs. EPO 500 Sham ◇ = vs. EPO 2500 Sham

○ = vs. EPO 5000 Sham Δ = vs. TPM-284 0.17 Sham ■ = vs. TPM-284 1.7 Sham

Ergebnisse

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede in den Ausgangswerten (Tag 0) zwischen den einzelnen Gruppen

Alle Dosierungen von EPO verursachten keine signifikanten Veränderungen der Herzfunktion im Vergleich zur Placebo Sham Gruppe.

Die niedrige Dosierung von TPM-284 zeigte keine wesentlichen Auswirkungen auf die Herzfunktion an Tag 11.

Die Gabe von 1,7 µg/kg/d TPM-284 führte zu signifikanten Unterschieden der Werte der EF, IVS s, LVID s und LVPW s im Vergleich zur Placebo Sham Gruppe an Tag 11.

Diese Werte waren signifikant schlechter als die der Vergleichstiere.

FS und LVPW d sowie die LV Mass corr. unterschieden sich an Tag 11 signifikant von den Werten der Placebo Sham Gruppe, auch hier verschlechterten sich die Werte in der Behandlungsgruppe.

Tabelle 2.2 Echokardiographie: Behandlungsgruppen ohne Tumor

Echo	Placebo Sham	EPO 100	EPO 500	EPO 2500	EPO 5000	TPM-284 0.17	TPM-284 1.7	ANOVA / Kruskal-Wallis
Anzahl der Tiere (N)	8	8	8	8	8	5	4	-
FS Tag 0 [%]	47.44 ± 2.21	47.40 ± 1.53	47.40 ± 2.67	44.27 ± 1.69 ■	47.69 ± 1.61	44.99 ± 1.28 ■	51.23 ± 2.19	(A ns) P=0.4837
FS Tag 11 [%]	51.84 ± 1.97	50.44 ± 3.14	48.15 ± 3.23	45.93 ± 1.50	47.24 ± 2.51	51.39 ± 2.53 ■	43.84 ± 1.35	(A ns) P=0.3734
EF Tag 0 [%]	74.65 ± 2.97	80.22 ± 2.41 Δ	78.73 ± 2.52 Δ	74.83 ± 2.33	78.70 ± 1.31 Δ	63.74 ± 5.81	71.09 ± 4.41	(A*) P=0.0119
EF Tag 11 [%]	77.22 ± 3.33	81.07 ± 3.17 ■	77.37 ± 2.65 ■	79.15 ± 2.48 ■	77.39 ± 1.87 ■	72.76 ± 2.08 ■	64.76 ± 1.30	(A*) P=0.0262
CO Tag 0 [ml/min]	74.46 ± 7.31	86.07 ± 7.29 Δ	75.64 ± 6.10	68.18 ± 3.62	70.62 ± 7.33	56.84 ± 9.61	65.20 ± 6.34	(A ns) P=0.1754
CO Tag 11 [ml/min]	84.59 ± 7.99	153.99 ± 30.37	106.69 ± 16.28	114.16 ± 16.06	105.08 ± 19.00	79.28 ± 5.06	65.31 ± 6.15	(A ns) P=0.0647
IVS d Tag 0 [mm]	1.66 ± 0.13	1.61 ± 0.07	1.57 ± 0.04	1.50 ± 0.08	1.52 ± 0.08	1.65 ± 0.16	1.55 ± 0.09	(A ns) P=0.8452
IVS d Tag 11 [mm]	1.70 ± 0.09	1.70 ± 0.10	1.68 ± 0.06	1.67 ± 0.09	1.72 ± 0.09	1.51 ± 0.12	1.51 ± 0.04	(A ns) P=0.6116
IVS s Tag 0 [mm]	2.86 ± 0.14	2.88 ± 0.10	2.82 ± 0.10	2.50 ± 0.09 ◊	2.92 ± 0.15	2.61 ± 0.10	2.81 ± 0.13	(A ns) P=0.1359
IVS s Tag 11 [mm]	2.99 ± 0.12	2.95 ± 0.15	3.00 ± 0.12	2.87 ± 0.10	2.97 ± 0.12	2.82 ± 0.20	2.67 ± 0.06	(A ns) P=0.7266
LVID d Tag 0 [mm]	6.18 ± 0.13	6.13 ± 0.11	6.08 ± 0.16	6.32 ± 0.13	6.30 ± 0.17	6.23 ± 0.27	6.15 ± 0.18	(A ns) P=0.9083
LVID d Tag 11 [mm]	6.39 ± 0.10	6.16 ± 0.19	6.30 ± 0.17	6.26 ± 0.12 ■	5.95 ± 0.09	6.42 ± 0.17	6.77 ± 0.12	(A*) P=0.0423
LVID s Tag 0 [mm]	3.26 ± 0.19	3.22 ± 0.11	3.21 ± 0.21	3.52 ± 0.14	3.30 ± 0.14	3.42 ± 0.15	3.00 ± 0.18	(A ns) P=0.5723
LVID s Tag 11 [mm]	3.09 ± 0.16	3.07 ± 0.27	3.28 ± 0.25	3.38 ± 0.11 ■	3.15 ± 0.17 ■	3.13 ± 0.24	3.80 ± 0.14	(A ns) P=0.3896
LVPW d Tag 0 [mm]	1.94 ± 0.09	1.65 ± 0.05	1.90 ± 0.10 Δ	1.92 ± 0.10 Δ	1.96 ± 0.15	1.53 ± 0.11	1.77 ± 0.16	(A ns) P=0.0728
LVPW d Tag 11 [mm]	2.23 ± 0.16	2.10 ± 0.13 ■	2.20 ± 0.12 ■	2.27 ± 0.08 Δ ■	2.44 ± 0.15 Δ ■	1.85 ± 0.13	1.56 ± 0.08	(A*) P=0.0053
LVPW s Tag 0 [mm]	2.89 ± 0.10	2.63 ± 0.09	2.83 ± 0.12	2.85 ± 0.14	2.90 ± 0.13	2.65 ± 0.12	2.92 ± 0.22	(A ns) P=0.5467
LVPW s Tag 11 [mm]	3.25 ± 0.15	3.10 ± 0.14	3.03 ± 0.15	3.08 ± 0.03 ■	3.10 ± 0.08 ■	3.03 ± 0.21	2.67 ± 0.15	(A ns) P=0.2946
MV E / MV A Tag 0	1.66 ± 0.09	1.62 ± 0.06	1.63 ± 0.13	1.59 ± 0.07	1.55 ± 0.08	1.31 ± 0.16	1.66 ± 0.09	(A ns) P=0.3326
MV E / MV A Tag 11	1.61 ± 0.11	3.63 ± 2.08	1.40 ± 0.08	1.56 ± 0.06 Δ	1.66 ± 0.11 Δ	1.24 ± 0.10	1.49 ± 0.09	(A ns) P=0.5173
LV Mass corr. Tag 0 [mg]	588.72 ± 35.89	504.06 ± 27.90	543.63 ± 23.73	564.55 ± 27.65	574.76 ± 35.03	495.73 ± 12.97	519.50 ± 43.28	(A ns) P=0.2712
LV Mass corr. Tag 11 [mg]	709.49 ± 50.17	636.35 ± 40.92	677.24 ± 29.12 Δ ■	689.25 ± 32.54 Δ ■	697.38 ± 49.28	564.77 ± 37.21	537.97 ± 12.93	(A ns) P=0.0787

t-test: ns: p>0.05, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 Placebo Sham (AG Anker)

* = vs. Placebo Sham (A) = ANOVA (KW) = Kruskal-Wallis-Test

entsprechend gilt: □ = vs. EPO 500 Sham ◊ = vs. EPO 2500 Sham

○ = vs. EPO 5000 Sham Δ = vs. TPM-284 0.17 Sham ■ = vs. TPM-284 1.7 Sham

4.2 Monotherapie: Erythropoetin und Tissue Protective Molecule

Die EPO 100 T Gruppe zeigte einen deutlich geringeren Gewichtsverlust sowohl an Fett als auch an fettfreier Masse als die Placebo T Gruppe. Aktivität, Futteraufnahme wie auch Überlebenszeit waren deutlich höher. Außer bei Leber, Niere, Nebenniere und braunem Fett waren auch die Organgewichte höher als die der Placebo T Gruppe. Tiere mit Tumor, die mit 500 IU/kg/d EPO behandelt wurden, zeigten einen geringeren Gewichtsverlust als die unbehandelten Vergleichstiere. Dieser bestand aus einem geringeren Verlust an fettfreier Masse, nicht aber an Fett. Die Tiere wiesen eine höhere Aktivität und Futteraufnahme sowie eine verlängerte Überlebenszeit vor. Alle Muskeln außer dem M. soleus waren schwerer als die der Vergleichstiere, auch Herz, Lunge, Milz und braunes Fett waren schwerer.

Die mit 2500 IU/kg/d behandelte Tumorgruppe verlor deutlich weniger an Gewicht als die Placebo T Gruppe, sowohl Fett als auch fettfreie Masse blieben in größerem Umfang erhalten als bei den Vergleichstieren. Aktivität, Futteraufnahme und Überlebensdauer wiesen ebenfalls bessere Werte auf. Das Gewicht von Niere, Nebenniere, braunem und weißem Fett war nicht signifikant höher als das der Vergleichstiere, während die weiteren Organe sowie alle Muskeln schwerer waren.

Die EPO 5000 T Gruppe zeigte wie alle anderen Behandlungsgruppen einen geringeren Gewichtsverlust, der sich aus einem geringeren Verlust an fettfreier Masse, nicht aber an Fett, begründet. Tiere dieser Gruppe zeigten eine deutlich erhöhte Aktivität und Überlebenszeit wie auch eine erhöhte Futteraufnahme im Vergleich zur Placebo T Gruppe. Außer einer gering signifikanten Erhöhung des Gewichts des M. gastrocnemius zeigte sich in dieser Dosierung keine Auswirkung auf das Gewicht der Muskeln. Ebenfalls bestanden keine deutlichen Unterschiede im Gewicht von Herz, Nebenniere und weißem Fett zwischen diesen Tieren und der Vergleichsgruppe.

Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen EPO Behandlungsgruppen bestanden lediglich beim Gewicht der Lunge und vor allem der Milz.

Die TPM-284 0,17 T Gruppe zeigte im Vergleich zur Placebo T Gruppe keine signifikanten Unterschiede im Bezug auf Gewichtsverlust, Fettverlust, Verlust an fettfreier Masse, Aktivität, Futteraufnahme und Überlebenszeit. Signifikante Unterschiede zu Placebo T waren beim Gewicht von Milz, weißem und braunem Fett sowie allen Muskeln zu sehen.

Ergebnisse

Die TPM-284 1,7 T Gruppe zeigte gegenüber der Placebo T Gruppe einen signifikant geringeren Gewichtsverlust. Es wurde weniger Fett, aber vor allem weniger fettfreie Masse abgebaut. Die Tiere nahmen deutlich mehr Futter auf, waren aktiver und hatten eine signifikant höhere Überlebensdauer als die Tiere der Placebo T Gruppe. Signifikante Unterschiede zeigten sich in den Gewichten von Herz, Leber, Milz, weißem und braunem Fett, M. gastrocnemius und M. tibialis. Zwischen beiden TPM Dosierungen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 3.1 Gewichte: Monotherapie

	Placebo	EPO 100	EPO 500	EPO 2500	EPO 5000	TPM-284 0,17	TPM-284 1,7	ANOVA / Kruskal-Wallis
Anzahl der Tiere (N)	37	20	16	14	16	12	22	-
Gewichtsveränderung excl. Tumor pro T [g]	-4,74 ± 0,17	-2,51 ± 0,72 ***	-3,15 ± 0,69 **	-2,35 ± 0,77 ***	-3,58 ± 0,48 **	-3,40 ± 1,21	-2,24 ± 0,73 ***	(A *) P=0,0107
Verlust an fettfreier M. pro T [g]	-3,51 ± 0,15	-1,91 ± 0,54 ***	-2,39 ± 0,52 **	-1,74 ± 0,59 ***	-2,65 ± 0,36 *	-2,55 ± 0,88	-1,62 ± 0,56 ***	(A *) P=0,0140
Verlust an Fett pro T [g]	-0,99 ± 0,05	-0,69 ± 0,13 **	-0,81 ± 0,12	-0,65 ± 0,12 **	-0,89 ± 0,08	-0,78 ± 0,23	-0,66 ± 0,14 *	(A ns) P=0,1184
Lebensqualität								
Futteraufnahme Tag 10 [g]	3,00 ± 0,51	7,85 ± 1,66 **	6,56 ± 1,73 *	6,57 ± 1,89 *	5,39 ± 1,19 *	5,92 ± 2,75	9,92 ± 2,82 **	(A ns) P=0,0577
Aktivität Tag 0 / Tag 10 [%]	71 ± 0,03	49 ± 0,06 ***	54 ± 0,05 **	46 ± 0,09 **	48 ± 0,05 ***	61 ± 0,10	52 ± 0,06 **	(A **) P=0,0051
Organgewichte in mg								
Herz	505,21 ± 14,00	565,02 ± 20,95 *	554,88 ± 17,36 *	621,01 ± 60,78 *	532,51 ± 15,05	543,53 ± 44,18	666,00 ± 25,10 *	(A ns) P=0,0744
Lunge	885,22 ± 26,57	1052,23 ± 61,55 **	993,30 ± 28,16	1077,97 ± 37,67 ***	1166,95 ± 40,34 ***	906,72 ± 48,02	982,05 ± 44,59	(A ***) P<0,0001
Leber	6093,39 ± 227,91	6863,17 ± 371,23	6920,76 ± 95,19	7398,11 ± 393,29 **	7174,69 ± 211,73 **	6890,32 ± 193,32	7431,62 ± 439,16 **	(A ns) P=0,0647
Milz	163,64 ± 10,01	350,09 ± 60,99 ***	475,38 ± 88,76 ***	1597,75 ± 266,97 ***	1598,18 ± 146,37 ***	285,74 ± 67,21 *	299,75 ± 41,51 ***	(A ***) P<0,0001
linke Niere	698,41 ± 16,58	745,85 ± 23,61	742,21 ± 21,22	746,64 ± 22,94	776,36 ± 18,85 **	773,46 ± 57,86	750,26 ± 32,63	(A ns) P=0,2851
li. Nebenniere	35,13 ± 1,77	30,58 ± 0,97	32,92 ± 1,90	30,34 ± 1,63	32,90 ± 2,11	33,53 ± 2,02	35,99 ± 2,66	(A ns) P=0,3517
weißes Fett	86,38 ± 26,43	329,67 ± 116,76 *	197,71 ± 72,60	208,00 ± 87,27	78,30 ± 43,99 Δ	342,49 ± 128,65 **	486,69 ± 121,40 ***	(A **) P=0,0030
braunes Fett	78,59 ± 3,14	92,29 ± 9,98	100,67 ± 9,47 **	92,17 ± 13,12	92,64 ± 7,53	103,27 ± 17,40 *	97,79 ± 10,06	(A ns) P=0,3742
M. gastrocnemius	713,22 ± 14,07	894,53 ± 41,64 ***	841,61 ± 36,45 ***	849,91 ± 50,85 ***	776,44 ± 32,92 *	812,13 ± 72,35 *	833,33 ± 48,74 **	(A *) P=0,0249
M. tibialis	262,49 ± 6,10	305,81 ± 15,32 **	295,34 ± 12,65 **	309,97 ± 20,07 **	286,34 ± 12,49	306,34 ± 27,16 *	303,50 ± 17,72 *	(A ns) P=0,0813
M. soleus	69,73 ± 1,43	71,06 ± 2,88	74,76 ± 2,34	78,61 ± 3,32	74,18 ± 2,10	78,85 ± 5,35	74,01 ± 3,07	(A ns) P=0,1270
M. EDL	63,66 ± 1,48	75,38 ± 2,97 ***	73,39 ± 3,12 **	73,69 ± 4,51 **	66,30 ± 3,66	74,61 ± 4,96 **	70,28 ± 4,36	(A *) P=0,0388

t-test: ns: p>0.05, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 Placebo (AG Anker)

* = vs. Placebo Tumor (A) = ANOVA (KW) = Kruskal-Wallis-Test

entsprechend gilt: □ = vs. EPO 500 Tumor ◇ = vs. EPO 2500 Tumor

○ = vs. EPO 5000 Tumor Δ = vs. TPM-284 0.17 T ■ = vs. TPM-284 1.7 Tumor

Einige der Gruppen zeigten bereits signifikante Unterschiede in den Ausgangswerten (Tag 0), dies betraf die Parameter EF, IVS, LVID, LVPW sowie LV Mass Corr..

Die EPO 100 T Gruppe zeigte im Vergleich zur Placebo T Gruppe an Tag 11 eine signifikante Verbesserung der Herzfunktion bei den Werten von CO, IVS d, IVS s, LVPW d sowie LV Mass corr.. Tiere der EPO 500 T Gruppe wiesen im Vergleich zur Placebo T Gruppe in allen Parametern der Herzfunktion an Tag 11 außer LVID d und MV E / MV A signifikante Unterschiede auf. Auch die EPO 2500 T Gruppe zeigte Verbesserungen der Herzparameter an Tag 11 im Vergleich zur Placebo T Gruppe bei allen Werten außer LVID s, LVPW und MV E / MV A. In der Gruppe EPO 5000 T waren im Vergleich zur Kontrollgruppe ebenfalls signifikante Unterschiede bei den meisten Werten des Tages 11 zu sehen, ausgeschlossen davon sind die Parameter IVS, LVID s und MV E / MV A. Keine der eingesetzten Dosierungen zeigte einen deutlichen Einfluss auf MV E / MV A. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bestanden bei IVS, LVID, LVPW und MV E / MV A.

Mit Ausnahme von CO bestanden keine signifikanten Unterschiede in den Ausgangswerten an Tag 0. Im Vergleich zur Placebo T Gruppe zeigte die TPM-284 0,17 T Gruppe signifikante Unterschiede bei den Parametern IVS s und LV Mass corr. an Tag 11. Die Werte der TPM-284 1,7 T Gruppe unterschieden sich an Tag 11 in den Parametern CO, IVS s, LVID d und LV Mass corr. von den Werten der Placebo T Gruppe. Zwischen beiden TPM Dosierungen bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 3.2 Echokardiographie: Monotherapie

Echo	Placebo	EPO 100	EPO 500	EPO 2500	EPO 5000	TPM-284 0.17	TPM-284 1.7	ANOVA / Kruskal-Wallis
Anzahl der Tiere (N)	24	18	16	13	16	11	19	-
FS Tag 0 [%]	49.17 ± 1.16	49.55 ± 2.03	52.06 ± 1.82	49.20 ± 1.54	47.88 ± 1.87	49.49 ± 1.77	47.38 ± 1.40	(KW ns) P=0.6791
FS Tag 11 [%]	28.13 ± 2.23	34.99 ± 2.73	37.40 ± 2.22	36.28 ± 2.56	35.75 ± 2.57	34.87 ± 4.66	38.83 ± 3.83*	(A ns) P=0.0720
EF Tag 0 [%]	74.74 ± 1.47	76.15 ± 2.09 ■	81.54 ± 1.15 ** Δ ■ ■ ■	79.97 ± 2.39 Δ ■ ■	77.56 ± 1.89 ■	70.01 ± 3.18	70.74 ± 1.73	(KW **) P=0.0010
EF Tag 11 [%]	48.94 ± 2.77	58.31 ± 3.71	64.56 ± 3.38 ***	63.33 ± 3.56	63.69 ± 3.32	59.20 ± 5.40	57.16 ± 4.97	(KW *) P=0.0349
CO Tag 0 [ml/min]	78.74 ± 2.91	77.07 ± 2.87 ■	78.26 ± 5.10	79.97 ± 5.28 Δ ■	74.54 ± 3.73	63.90 ± 4.98	67.15 ± 3.28	(KW *) P=0.0821
CO Tag 11 [ml/min]	30.94 ± 3.62	69.92 ± 12.46	60.81 ± 12.20	69.14 ± 5.84 *** Δ	65.77 ± 6.41 *** Δ	41.01 ± 10.74	52.24 ± 9.52	(KW **) P=0.0012
IVS d Tag 0 [mm]	1.57 ± 0.03	1.55 ± 0.05	1.77 ± 0.12	1.69 ± 0.07	1.75 ± 0.07	1.54 ± 0.08	1.53 ± 0.05	(A *) P=0.0226
IVS d Tag 11 [mm]	1.52 ± 0.05	1.83 ± 0.10	1.85 ± 0.08	1.74 ± 0.09	1.55 ± 0.06	1.68 ± 0.10	1.59 ± 0.05	(KW **) P=0.0084
IVS s Tag 0 [mm]	2.75 ± 0.05	2.93 ± 0.07	2.96 ± 0.14	2.85 ± 0.11*	2.93 ± 0.09	2.82 ± 0.13	2.77 ± 0.08	(KW ns) P=0.2083
IVS s Tag 11 [mm]	2.20 ± 0.07	2.72 ± 0.14 ***	2.70 ± 0.10 *** ○	2.59 ± 0.10 **	2.39 ± 0.09	2.60 ± 0.16	2.60 ± 0.14	(A **) P=0.0019
LVID d Tag 0 [mm]	6.22 ± 0.08	6.18 ± 0.10	6.00 ± 0.10	6.35 ± 0.08 ○	5.95 ± 0.11 ■	6.22 ± 0.12	6.35 ± 0.09	(KW *) P=0.0192
LVID d Tag 11 [mm]	5.48 ± 0.09	5.60 ± 0.16	5.68 ± 0.21	5.85 ± 0.20	5.87 ± 0.14	5.71 ± 0.19	6.03 ± 0.15	(KW ns) P=0.1253
LVID s Tag 0 [mm]	3.17 ± 0.09	3.08 ± 0.11	2.88 ± 0.15 ■	3.23 ± 0.11	3.11 ± 0.14	3.14 ± 0.13	3.34 ± 0.10	(KW ns) P=0.2752
LVID s Tag 11 [mm]	3.94 ± 0.13	3.61 ± 0.15	3.49 ± 0.17	3.71 ± 0.17	3.77 ± 0.17	3.68 ± 0.26	3.65 ± 0.21	(KW ns) P=0.5483
LVPW d Tag 0 [mm]	1.75 ± 0.05	1.85 ± 0.10	2.02 ± 0.09 ** ■ ■	1.82 ± 0.07 ○	2.16 ± 0.12 *** Δ ■ ■	1.84 ± 0.07	1.75 ± 0.04	(A **) P=0.0016
LVPW d Tag 11 [mm]	1.63 ± 0.04	1.89 ± 0.09 ** ■ ■	2.11 ± 0.15 *** Δ ■ ■	1.86 ± 0.09 ** ■	1.89 ± 0.09 ** ■ ■	1.71 ± 0.04	1.59 ± 0.06	(A ***) P<0.0001
LVPW s Tag 0 [mm]	2.78 ± 0.05	2.80 ± 0.08	3.06 ± 0.10	2.80 ± 0.09	3.03 ± 0.11	2.90 ± 0.09	2.85 ± 0.07	(KW ns) P=0.1961
LVPW s Tag 11 [mm]	2.11 ± 0.07	2.41 ± 0.14	2.57 ± 0.11 ***	2.41 ± 0.12	2.47 ± 0.11 **	2.33 ± 0.16	2.37 ± 0.13	(KW ns) P=0.0687
MV E / MV A Tag 0	1.55 ± 0.05	1.47 ± 0.06	1.65 ± 0.06 □	1.49 ± 0.05	1.43 ± 0.04	1.44 ± 0.06	1.55 ± 0.08	(A ns) P=0.2592
MV E / MV A Tag 11	1.58 ± 0.31	1.19 ± 0.08	1.39 ± 0.07	1.18 ± 0.13	2.06 ± 0.76	1.48 ± 0.15	1.35 ± 0.09	(A ns) P=0.6417
LV Mass corr. Tag 0 [mg]	527.13 ± 12.32	544.51 ± 23.96	616.01 ± 42.70	592.14 ± 28.14	633.82 ± 39.66	542.91 ± 28.76	534.91 ± 12.08	(A **) P=0.0094
LV Mass corr. Tag 11 [mg]	401.74 ± 10.88	549.21 ± 37.46 ***	586.96 ± 39.48 ** ■ ■	542.30 ± 33.88 ***	507.13 ± 28.12 ***	480.23 ± 32.23 **	475.43 ± 24.18 **	(A ***) P<0.0001

t-test: ns: p>0.05, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 Placebo (AG Anker)

* = vs. Placebo Tumor (A) = ANOVA (KW) = Kruskal-Wallis-Test

entsprechend gilt: □ = vs. EPO 500 Tumor ◇ = vs. EPO 2500 Tumor

○ = vs. EPO 5000 Tumor Δ = vs. TPM-284 0.17 T ■ = vs. TPM-284 1.7 Tumor

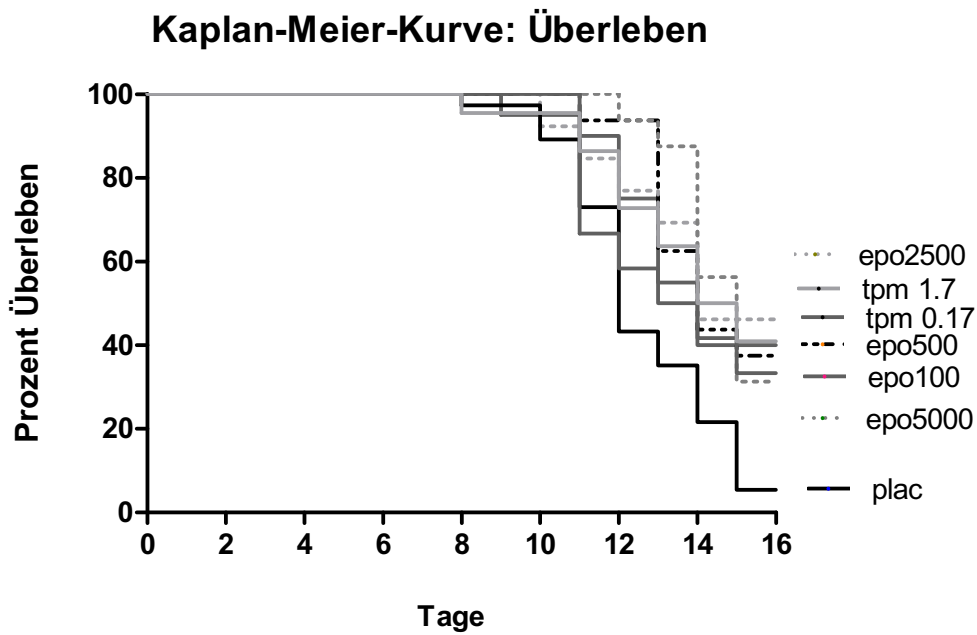


Abbildung 1 Log-Rank Test $P=0.0112$ * Placebo (AG Anker)

Placebo – EPO 100 : $P=0.0070$ ** Hazard Ratio=0.4003 95% CI=0.2059 – 0.7783

Placebo – EPO 500: $P=0.0043$ ** Hazard Ratio=0.3630 95% CI=0.1811 – 0.7275

Placebo – EPO 2500: $P=0.0072$ ** Hazard Ratio=0.3585 95% CI=0.1697 – 0.7574

Placebo – EPO 5000: $P=0.0011$ ** Hazard Ratio=0.3080 95% CI=0.1520 – 0.6243

Placebo – TPM 0.17: $P=0.0911$ Hazard Ratio=1.970 95% CI=0.8971 – 4.327

Placebo – TPM 1.7: $P=0.0025$ ** Hazard Ratio=2.745 95% CI=1.425 – 5.288

Die Behandlungsgruppen unterschieden sich im Endgewicht signifikant zur Placebo Tumor Gruppe:

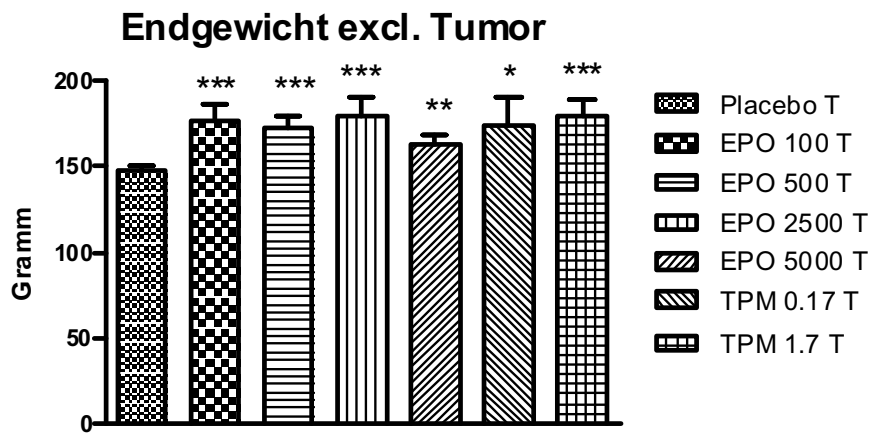


Abbildung 2 ANOVA P=0.0143 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Endgewicht excl. Tumor : 268.38 ± 5.30)

Außer EPO 5000 T und TPM 0.17 T zeigten beim Gewichtsverlust excl. Tumor alle Behandlungsgruppen signifikante Unterschiede zur Placebo T Gruppe:

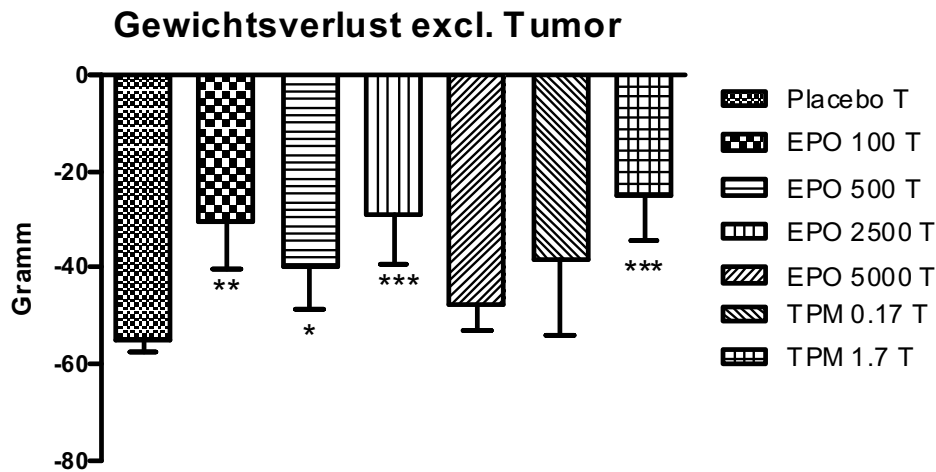


Abbildung 3 ANOVA P=0.0328 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Gewichtszuwachs: 58.25 ± 5.30)

Alle Behandlungsgruppen außer TPM 0.17 T zeigten einen signifikant geringeren Gewichtsverlust pro Tag im Vergleich zu Placebo T:

Gewichtsverlust excl. Tumor pro Tag

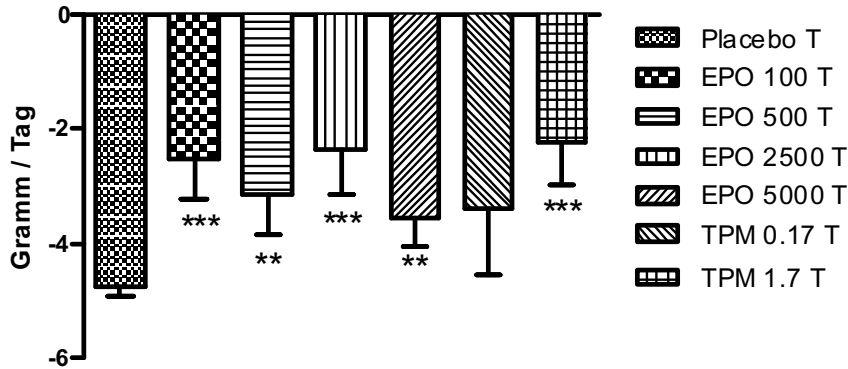


Abbildung 4 ANOVA $P=0.0096$ ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

(Placebo Sham – Gewichtszuwachs pro Tag : 3.88 ± 0.23)

EPO 2500 T, EPO 5000 T und TPM 0.17 T wiesen ein signifikant geringeres Tumolvolumen auf:

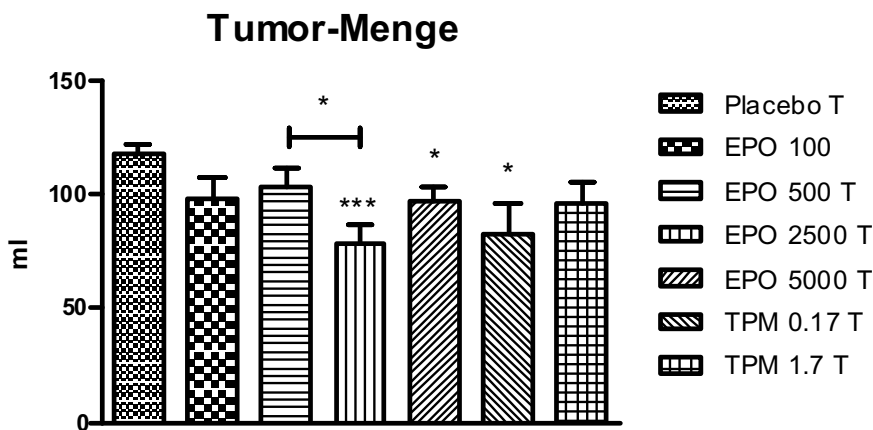


Abbildung 5 Kruskal-Wallis $P=0.0095$ ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

EPO 100 T zeigte einen signifikanten Unterschied in der Tumorzellzahl:

Tabelle 3.3 Tumorzellzahl

	Placebo T	EPO 100 T	EPO 500 T	EPO 2500 T	EPO 5000 T	TPM-284 0.17 T	TPM-284 1.7 T
Tierzahl	37	20	16	14	16	12	22
Tumor-zellzahl	2213.51 ± 227.27	3027.04 ± 290.47 * Δ	2805.93 ± 255.96	2759.65 ± 317.11	2153.19 ± 246.66	1894.07 ± 372.13	2613.64 ± 420.42

Kruskal-Wallis P=0.1211 ns Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

Δ = vs. TPM-284 0.17 T

EPO 100 T, EPO 500 T und TPM 1.7 T zeigten gegenüber Placebo T signifikante Unterschiede im Bezug auf den totalen Fettverlust als auch den Fettverlust pro Tag (Abbildung 7):

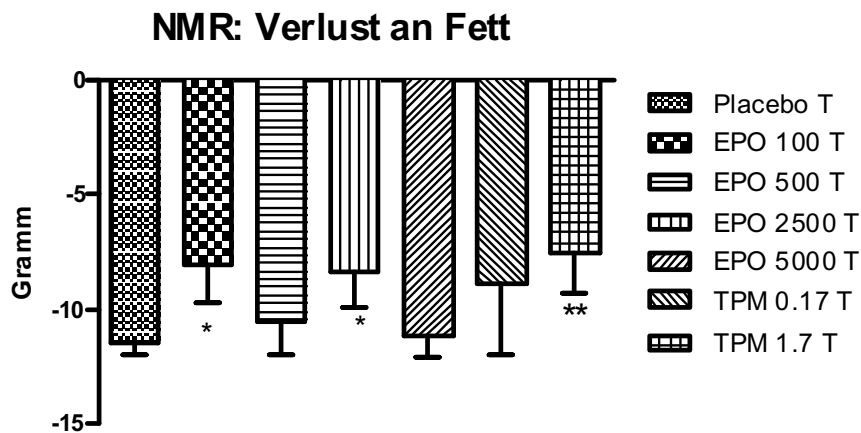


Abbildung 6 ANOVA P=0.1793 ns Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – NMR: Zunahme an Fett : 8.93 ± 1.57)

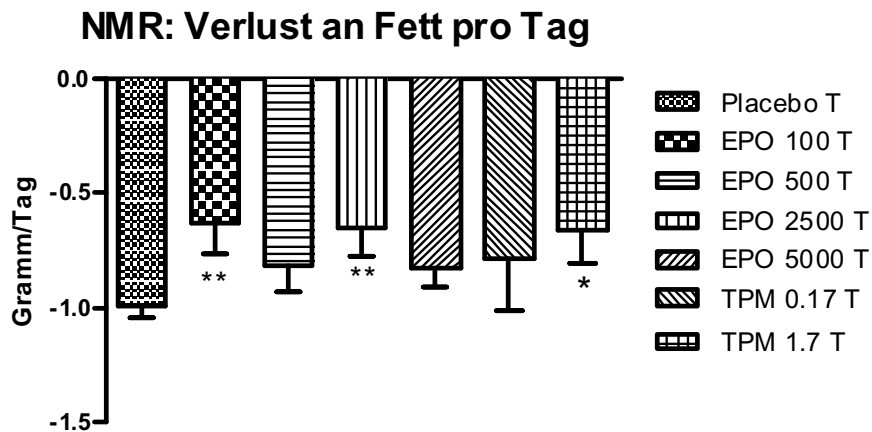


Abbildung 7 ANOVA P=0.1184 ns Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – NMR: Zunahme an Fett pro Tag : 0.60 ± 0.10)

EPO 100 T, EPO 2500 T, TPM 1.7 T sowie in geringerem Maße EPO 500 T zeigten beim Verlust an fettfreier Masse signifikante Unterschiede zur Placebo T Gruppe:

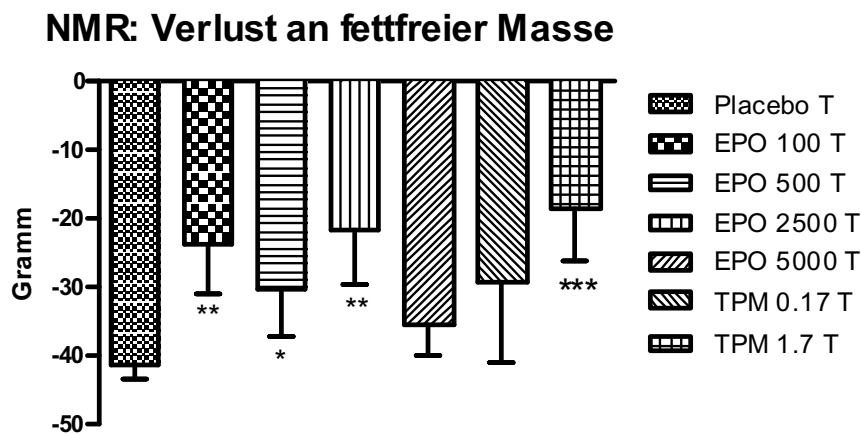


Abbildung 8 ANOVA P=0.0472 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – NMR: Zunahme an fettfreier Masse : 41.02 ± 3.37)

Alle Behandlungsgruppen außer TPM 0.17 T, vor allem aber EPO 100 T und EPO 500 T, zeigten signifikante Unterschiede zu Placebo T:

NMR: Verlust an fettfreier Masse pro Tag

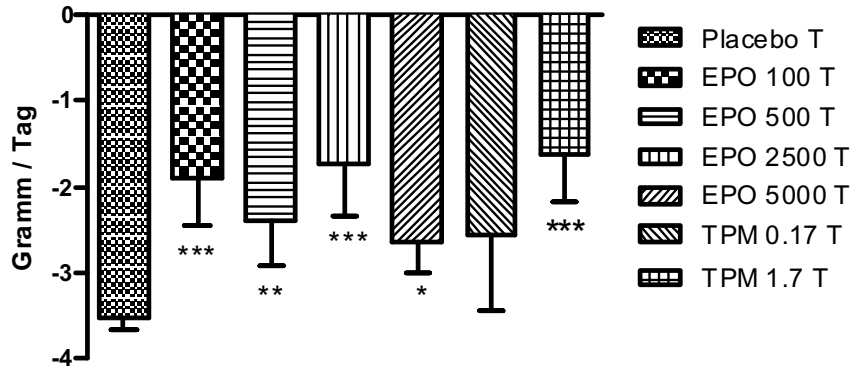


Abbildung 9 ANOVA P=0.0140 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – NMR: Zunahme an fettfreier Masse pro Tag : 2.73 ± 0.22)

An Tag 0 waren keine signifikanten Unterschiede in der Futteraufnahme ersichtlich:

Tabelle 3.4 Futteraufnahme

	Placebo T	EPO 100 T	EPO 500 T	EPO 2500 T	EPO 5000 T	TPM-284 0,17 T	TPM-284 1,7 T
Tierzahl	37	20	16	14	16	12	22
Futteraufnahme Tag 0 [g]	19.81 ± 0.60	21.00 ± 0.47	20.90 ± 0.53	20.85 ± 0.58	20.25 ± 0.43	20.50 ± 0.65	20.67 ± 0.51

ANOVA P= 0.6709 ns Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Futteraufnahme Tag 10 : 20.75 ± 1.08)

Alle Behandlungsgruppen, insbesondere EPO 100 T und TPM 1.7 T, nahmen deutlich mehr Futter auf als die Placebo T Gruppe:

Futteraufnahme Tag 10

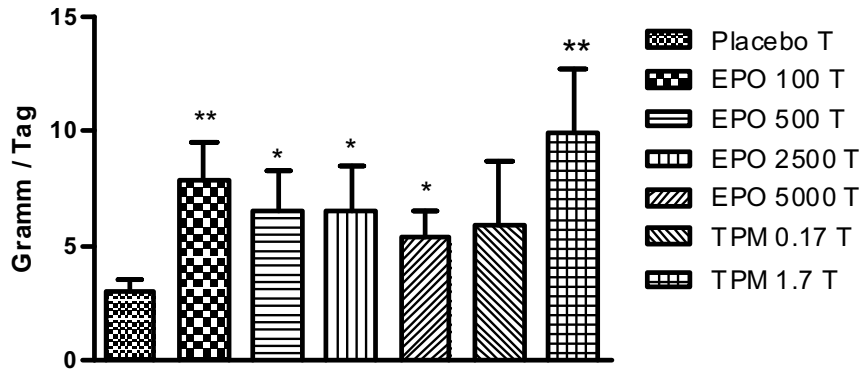


Abbildung 10 ANOVA P=0.0577 ns Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Futteraufnahme Tag 10 : 20.75 ± 1.08)

Alle Behandlungsgruppen außer TPM 0.17 T zeigten einen geringeren Aktivitätsverlust als Placebo T:

Prozentualer Aktivitäts-Verlust Tag 10/ Tag 0

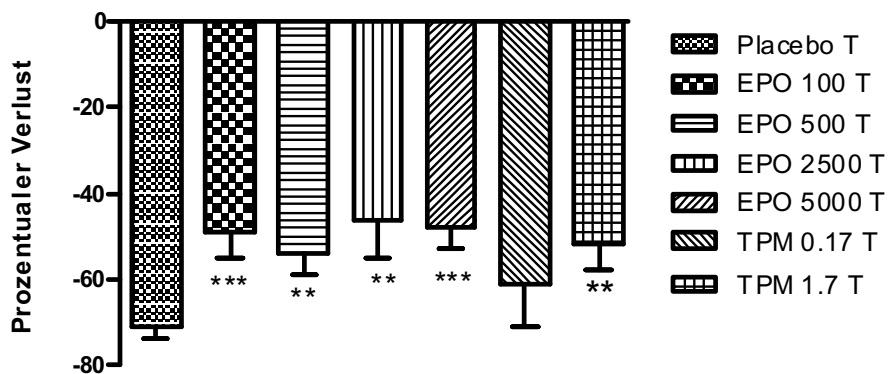


Abbildung 11 ANOVA P=0.0051 ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Proz. Aktivitätsverlust : -18.00 ± 0.03)

Mit Ausnahme von EPO 5000 T und TPM 0.17 T zeigten die Behandlungsgruppen höhere Herzgewichte als Placebo T:

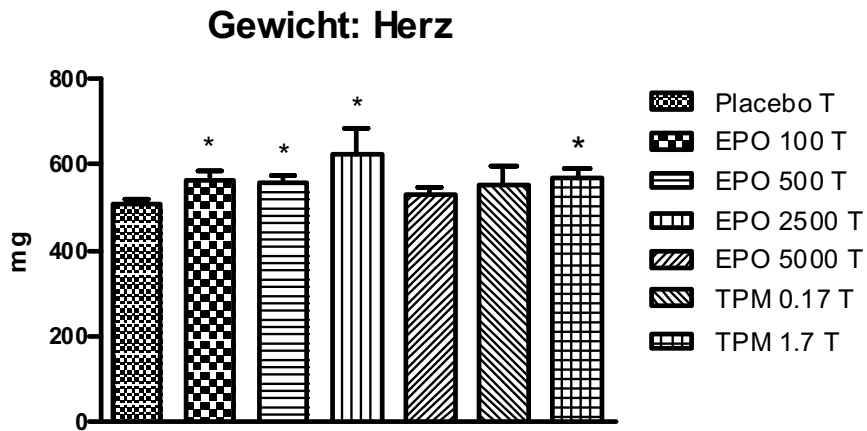


Abbildung 12 ANOVA P=0.0744 ns Placebo T (AG Anker)
 Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001
 (Placebo Sham – Gewicht: Herz : 788.33 ± 19.77)

EPO 100 T sowie beide TPM Gruppen wiesen im Gegensatz zu den weiteren Behandlungsgruppen keinen signifikanten Unterschied zur Placebo T Gruppe auf:

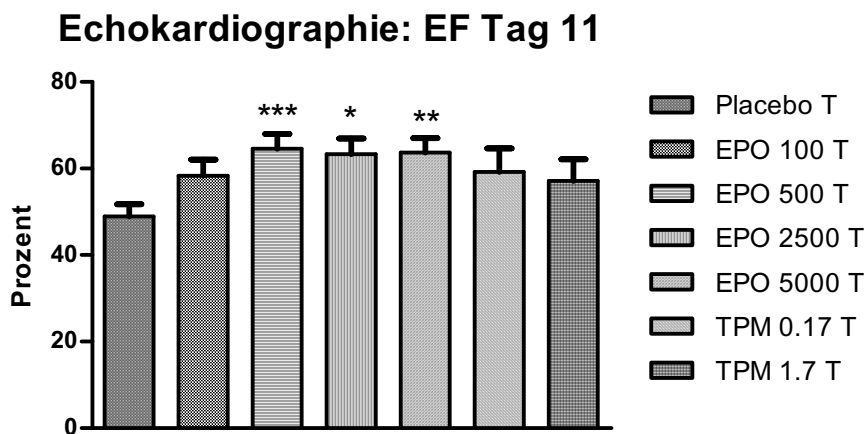


Abbildung 13 Kruskal-Wallis P=0.0349 * Placebo T (AG Anker)
 Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001
 (Placebo Sham – EF Tag 11 : 77.22 ± 3.33)

EPO 100 T sowie beide TPM Gruppen wiesen im Gegensatz zu den weiteren Behandlungsgruppen keinen signifikanten Unterschied zur Placebo T Gruppe auf:

Echokardiographie: FS Tag 11

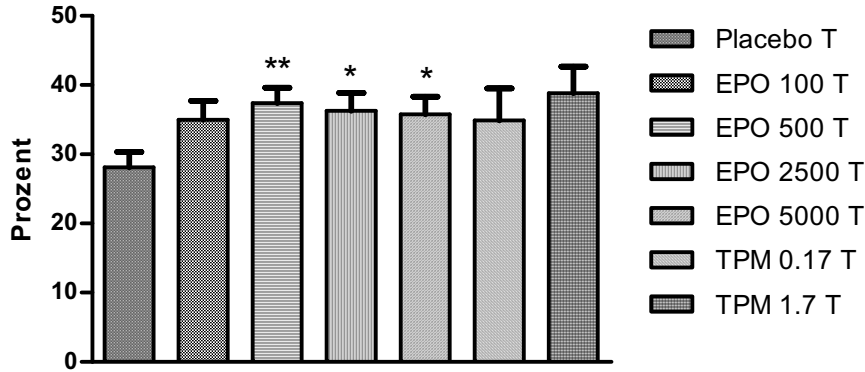


Abbildung 14 Kruskal-Wallis P=0.1117 ns Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – FS Tag 11 : 51.84 ± 1.97)

Alle Behandlungsgruppen mit Ausnahme der TPM Gruppen, insbesondere EPO 2500 T und EPO 5000 T, wiesen signifikante Unterschiede zur Placebo T Gruppe auf:

Echokardiographie: CO Tag 11

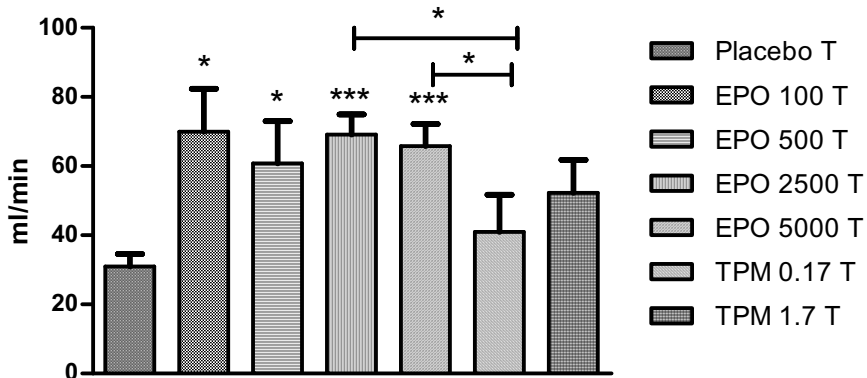


Abbildung 15 Kruskal-Wallis P=0.0012 ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs EPO T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – CO Tag 11 : 98.47 ± 21.05)

4.3 Kombinationstherapie: Erythropoetin + Bisoprolol

Die EPO 100 T Gruppe zeigte einen geringeren Gewichtsverlust sowohl an Fett als auch an fettfreier Masse als die Placebo T Gruppe. Aktivität, Futteraufnahme wie auch Überlebenszeit waren deutlich höher. Außer bei Leber, Niere, Nebenniere und braunem Fett waren auch die Organgewichte höher als die der Placebo T Gruppe

Die Behandlung mit Bisoprolol führte zu deutlichen Verbesserungen einiger Werte im Vergleich zur Placebo Tumor Gruppe. Die Tiere der Behandlungsgruppe verloren deutlich weniger an Gewicht, sowohl an Fett als auch an fettfreier Masse. Sie zeigten eine deutlich höhere Aktivität als unbehandelte Tiere und eine höhere Überlebensdauer. Milz, weißes und braunes Fett waren signifikant schwerer als bei den unbehandelten Tieren, auch das Herz und der M. tibialis wiesen ein signifikant höheres Gewicht auf.

Die EPO/Biso 25% T Gruppe zeigte zur Placebo T Gruppe einen signifikanten Unterschied im Gewichtsverlust, ein deutlicher Unterschied im Verlust an Fett oder fettfreier Masse war nicht erkennbar. Die Futteraufnahme, Aktivität und Überlebensdauer waren signifikant erhöht. Ein signifikanter Unterschied in den Organgewichten zeigte sich bei Milz, braunem Fett, M. gastrocnemius und M. tibialis.

Die EPO/Biso 75% T Gruppe zeigte im Vergleich zu Placebo T einen signifikant geringeren Gewichtsverlust, verbunden mit einem deutlich geringeren Verlust an fettfreier Masse und auch Fett. Sowohl Futteraufnahme wie auch Aktivität waren im Vergleich zu Placebo T signifikant erhöht, auch die Überlebensdauer war höher. Alle Organgewichte mit Ausnahme der Nebenniere waren im Vergleich zu Placebo T signifikant erhöht.

Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bestanden bei Leber, Nebenniere, braunem Fett und M. EDL.

Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Kombinationsgruppen bestanden lediglich bei Leber und M. EDL.

Ergebnisse

Tabelle 4.1 Gewichte: Kombinationstherapie Erythropoetin

	Placebo T	EPO 100 T	Bisoprolol 5 T	EPO/Biso. 25% T	EPO/Biso. 75% T	ANOVA/ Kruskal- Wallis
Anzahl der Tiere (N)	37	20	8	14	15	
Gewichtsver-änd. excl. Tumor pro T [g]	-4.74 ± 0.17	-2.51 ± 0.72 ***	-2.03 ± 1.54 **	-3.68 ± 0.68 *	-1.90 ± 0.86 ***	(A **) P=0.0015
Verlust an fett- freier M. pro T [g]	-3.51 ± 0.15	-1.91 ± 0.54 ***	-1.36 ± 1.09 ***	-2.84 ± 0.48	-1.51 ± 0.68 ***	(A **) P=0.0022
Verlust an Fett pro T [g]	-0.99 ± 0.05	-0.63 ± 0.13 **	-0.41 ± 0.26 ***	-0.85 ± 0.16	-0.58 ± 0.19 **	(A *) P=0.0150
Lebens- qualität						
Futteraufnah- me Tag 10 [g]	3.00 ± 0.51	7.85 ± 1.66 **	10.75 ± 3.07 ***	13.27 ± 6.36 *	10.60 ± 1.99 ***	(A *) P=0.0239
Aktivität Tag 0/ Tag 10 [%]	-71 ± 0.03	-49 ± 0.06 **	-42 ± 0.09 **	-47 ± 0.07 **	-41 ± 0.07 ***	(KW ***) P=0.0004
Organgewichte in mg						
Herz	505.21 ± 14.00	565.02 ± 20.95 **	618.44 ± 47.90 *	539.76 ± 33.76	568.17 ± 27.81 *	(KW *) P=0.0284
Lunge	885.22 ± 29.57	1052.29 ± 61.55 **	976.30 ± 54.39	912.85 ± 45.97	944.59 ± 36.15 *	(KW *) P=0.0256
Leber	6093.39 ± 227.81	6963.17 ± 371.23	7247.81 ± 829.46	6512.33 ± 434.68 ○	7634.51 ± 355.05 **	(KW *) P=0.0237
Milz	163.64 ± 10.01	350.09 ± 60.99 ***	416.56 ± 123.42 ***	234.66 ± 43.69 *	363.28 ± 59.56 ***	(A ***) P=0.0005
linke Niere	698.41 ± 16.58	745.85 ± 23.61	751.10 ± 44.94	756.09 ± 35.55	801.68 ± 22.80 **	(KW *) P=0.0152
li. Nebenniere	35.13 ± 1.77	30.56 ± 0.97 ◇◇	27.73 ± 1.76 ◇◇◇	35.59 ± 1.07	32.92 ± 2.10	(A ns) P=0.0637
weißes Fett	86.38 ± 26.43	329.67 ± 116.76 *	532.47 ± 209.90 ***	210.18 ± 122.38	417.23 ± 127.90 ***	(A *) P=0.0151
braunes Fett	78.59 ± 3.14	92.29 ± 9.58 ○	128.55 ± 26.56 ***	106.45 ± 16.69 *	180.66 ± 48.65 **	(A **) P=0.0038
M. gastrocnemius	713.22 ± 14.07	854.53 ± 41.64 ***	806.27 ± 143.40	807.57 ± 40.64 **	937.07 ± 59.05 ***	(A **) P=0.0026
M. tibialis	262.49 ± 06. Okt	305.81 ± 15.32 **	309.27 ± 34.03 *	291.24 ± 16.17 *	325.61 ± 20.12 ***	(A **) P=0.0090
M. soleus	69.73 ± 1.43	77.06 ± 2.88 *	74.31 ± 6.45	72.47 ± 2.93	81.41 ± 3.81 ***	(A *) P=0.0237
M. EDL	63.66 ± 1.48	75.39 ± 2.97 ***	72.81 ± 7.81	69.16 ± 3.62 ○	81.13 ± 4.51 ***	(A ***) P=0.0007

t-test: ns: p>0.05, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 Placebo T (AG Anker)

* = vs. Placebo Tumor (A) = ANOVA (KW) = Kruskal-Wallis-Test

entsprechend gilt:

□ = vs. Biso 5 T ◇ = vs. EPO/Biso 25% T ○ = vs. EPO/Biso 75% T

Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten sich bereits in folgenden Ausgangswerten (Tag 0): EF, CO, IVS s, LVID d, LVPW und MV E / MV A.

Die EPO 100 T Gruppe zeigte im Vergleich zur Placebo T Gruppe an Tag 11 eine signifikante Verbesserung der Herzfunktion bei den Werten von CO, IVS d, IVS s, LVPW d sowie LV Mass corr..

An Tag 11 zeigte sich ein signifikanter Unterschied der LV Mass corr. und ein signifikanter Unterschied der IVS d zwischen Bisoprolol 5 T und Placebo T.

EPO/Biso 25% T zeigte im Vergleich mit der Placebo T Gruppe signifikante Unterschiede bei den Werten FS, EF, IVS s und LV Mass corr. an Tag 11.

Tiere der EPO/Biso 75% T Gruppe wiesen bei den Werten FS, EF, IVS s, LVPW s und LV Mass corr. an Tag 11 signifikante Unterschiede zur Placebo T Gruppe auf.

Zwischen den beiden Kombinationsgruppen bestanden an Tag 11 keine signifikanten Unterschiede.

Ergebnisse

Tabelle 4.2 Echokardiographie: Kombinationstherapie Erythropoetin

	Placebo T	EPO 100 T	Bisoprolol 5 T	EPO/Biso. 25% T	EPO/Biso. 75% T	ANOVA/ Kruskal-Wallis
Echokardiographie						
Anzahl der Tiere (N)	24	18	7	14	14	
FS Tag 0 [%]	49.17 ± 1.16	49.55 ± 2.03	49.95 ± 2.80	55.34 ± 2.54	47.57 ± 1.94	(KW ns) P=0.3111
FS Tag 11 [%]	28.13 ± 2.23	34.99 ± 2.73	27.71 ± 5.37 ○	36.23 ± 2.25 **	39.75 ± 2.47 **	(KW *) P=0.0124
EF Tag 0 [%]	74.74 ± 1.47	76.15 ± 2.09	79.95 ± 1.32 ◇	74.19 ± 1.32	77.53 ± 1.46	(A ns) P=0.3634
EF Tag 11 [%]	48.94 ± 2.77	58.31 ± 3.71	54.77 ± 7.06	58.50 ± 3.54 *	64.56 ± 3.13 **	(KW *) P=0.0341
CO Tag 0 [ml/min]	78.74 ± 2.91	77.07 ± 2.87 □	93.37 ± 4.36 * ◇◇	72.91 ± 4.49	83.52 ± 4.57	(KW *) P=0.0406
CO Tag 11 [ml/min]	30.94 ± 3.62	69.92 ± 12.46 * ◇	30.96 ± 11.65	33.02 ± 4.61	44.67 ± 7.68	(KW ns) P=0.0711
IVS d Tag 0 [mm]	1.57 ± 0.03	1.55 ± 0.05	1.45 ± 0.11	1.58 ± 0.06	1.49 ± 0.05	(KW ns) P=0.5439
IVS d Tag 11 [mm]	1.52 ± 0.05	1.83 ± 0.10 **	1.81 ± 0.21 *	1.64 ± 0.12	1.59 ± 0.07	(A *) P=0.0472
IVS s Tag 0 [mm]	2.75 ± 0.05	2.93 ± 0.07 *	2.78 ± 0.15	2.94 ± 0.09 *	2.77 ± 0.09	(KW ns) P=0.1566
IVS s Tag 11 [mm]	2.20 ± 0.07	2.72 ± 0.14 **	2.49 ± 0.15	2.56 ± 0.14 *	2.58 ± 0.10 **	(KW *) P=0.0164
LVID d Tag 0 [mm]	6.22 ± 0.08	6.18 ± 0.10 ○	6.50 ± 0.21	6.40 ± 0.15	6.52 ± 0.12	(KW ns) P=0.1493
LVID d Tag 11 [mm]	5.48 ± 0.09	5.60 ± 0.16	5.85 ± 0.54	5.82 ± 0.17	5.81 ± 0.22	(A ns) P=0.4367
LVID s Tag 0 [mm]	3.17 ± 0.09	3.13 ± 0.15	3.27 ± 0.25	2.88 ± 0.20	3.43 ± 0.17	(KW ns) P=0.4219
LVID s Tag 11 [mm]	3.94 ± 0.13	3.61 ± 0.15	4.06 ± 0.18	3.70 ± 0.15	3.51 ± 0.19	(KW ns) P=0.1327
LVPW d Tag 0 [mm]	1.75 ± 0.05	1.85 ± 0.10 □ ○	1.47 ± 0.11 *	1.75 ± 0.08	1.57 ± 0.05 *	(A *) P=0.0286
LVPW d Tag 11 [mm]	1.63 ± 0.04	1.89 ± 0.09 ** ○	1.66 ± 0.19	1.67 ± 0.08	1.62 ± 0.07	(A ns) P=0.0568
LVPW s Tag 0 [mm]	2.78 ± 0.05	2.80 ± 0.08	2.67 ± 0.12 ◇	3.09 ± 0.11 * ○○	2.66 ± 0.08	(KW *) P=0.0337
LVPW s Tag 11 [mm]	2.11 ± 0.07	2.41 ± 0.14	2.28 ± 0.13	2.28 ± 0.08	2.43 ± 0.10 **	(KW ns) P=0.1176
MV E / MV A Tag 0	1.55 ± 0.05	1.47 ± 0.06 ○	1.54 ± 0.09	1.42 ± 0.06	1.65 ± 0.08	(KW ns) P=0.2885
MV E / MV A Tag 11	1.58 ± 0.31	1.19 ± 0.08 □□ ○○○	1.82 ± 0.22	1.47 ± 0.12	1.71 ± 0.11	(A ns) P=0.6739

t-test: ns: p>0.05, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 Placebo T (AG Anker)

* = vs. Placebo Tumor (A) = ANOVA (KW) = Kruskal-Wallis-Test

entsprechend gilt:

□ = vs. Biso 5 T ◇ = vs. EPO/Biso 25% T ○ = vs. EPO/Biso 75% T

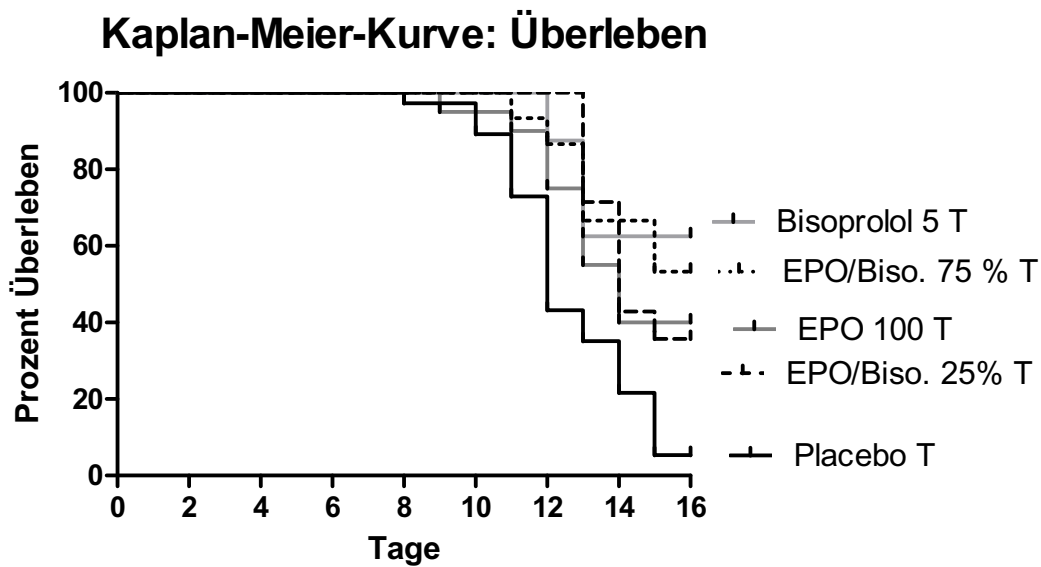


Abbildung 16 Log-Rank Test $P=0.0008$ *** Placebo T (AG Anker)
 Placebo – Biso 5: $P=0.0029$ ** Hazard Ratio=0.2736 95% CI=0.1167 – 0.6416
 Placebo – EPO 100: $P=0.0070$ ** Hazard Ratio=0.4003 95% CI=0.2059 – 0.7783
 Placebo – Kombi 25: $P=0.0041$ ** Hazard Ratio=0.3500 95% CI=0.1708 – 0.7171
 Placebo – Kombi 75: $P=0.0003$ *** Hazard Ratio=0.2700 95% CI=0.1317 – 0.5535

Das Endgewicht aller Behandlungsgruppen unterschied sich signifikant von Placebo T:

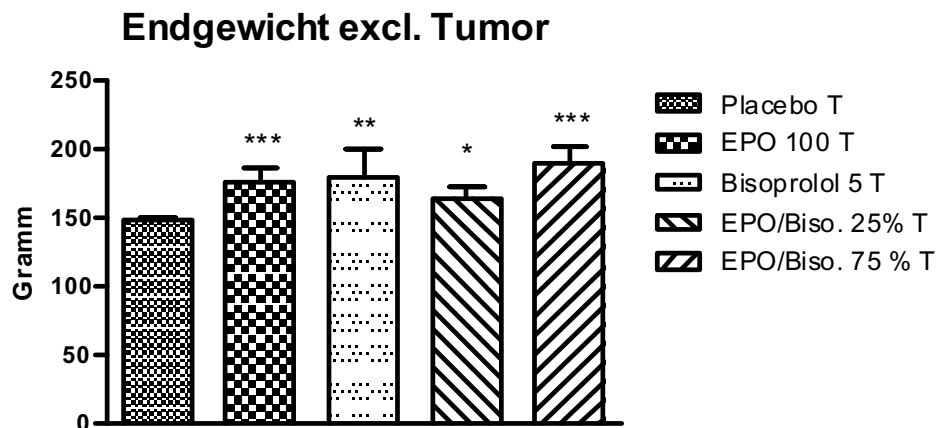


Abbildung 17 ANOVA $P=0.0008$ *** Placebo T (AG Anker)
 Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$
 (Placebo Sham – Endgewicht excl. Tumor : 268.38 ± 5.30)

Mit Ausnahme von EPO/Biso 25% T zeigten alle Behandlungsgruppen einen signifikant geringeren Gewichtsverlust als Placebo T:

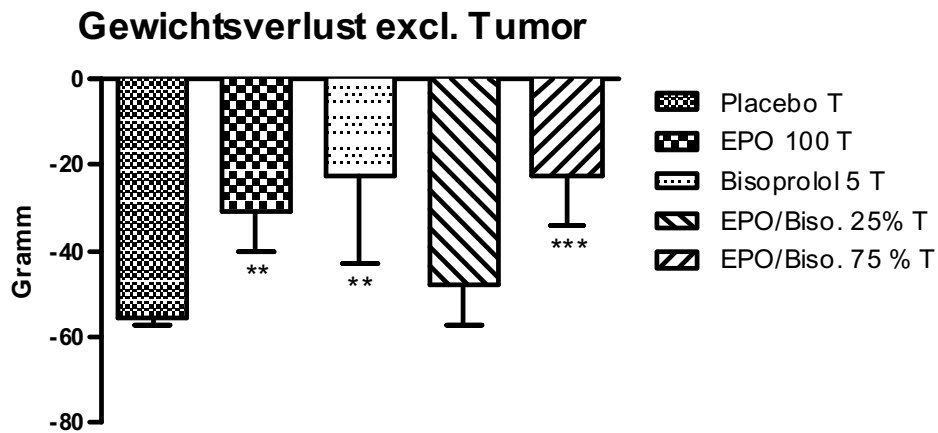


Abbildung 18 ANOVA P=0.0082 ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001
(Placebo Sham – Gewichtszuwachs: 58.25 ± 5.30)

Alle Behandlungsgruppen zeigten beim Gewichtsverlust pro Tag einen signifikanten Unterschied zur Placebo T Gruppe:

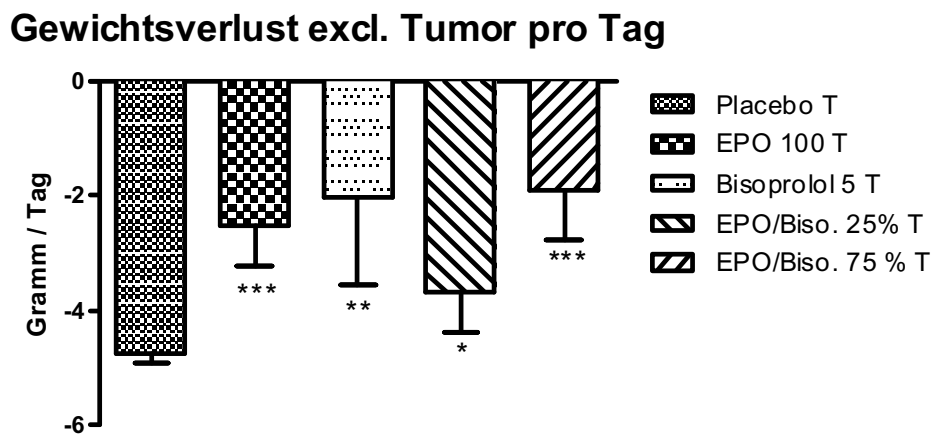


Abbildung 19 ANOVA P=0.0015 ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001
(Placebo Sham – Gewichtszuwachs pro Tag : 3.88 ± 0.23)

Mit Ausnahme von EPO/Biso 25% T wiesen alle Behandlungsgruppen ein signifikant kleineres Tumorumfangen auf:

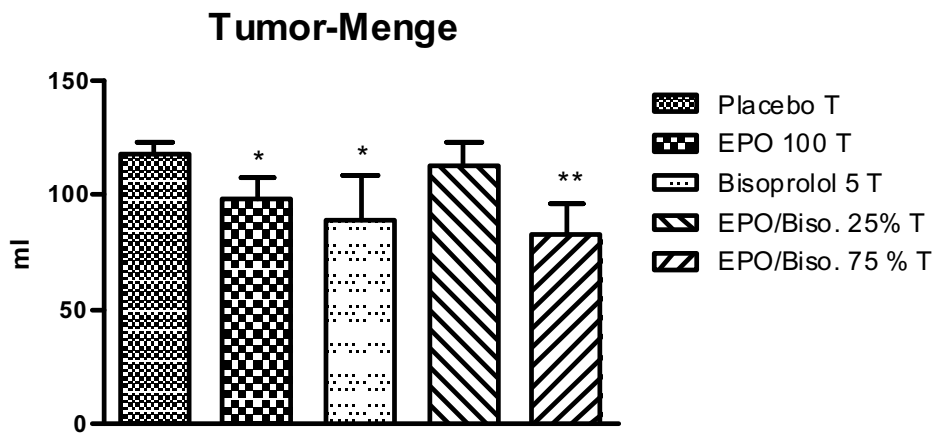


Abbildung 20 ANOVA P=0.0432 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

Zwischen den Gruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede in der Tumorzellzahl:

Tabelle 4.3 Tumorzellzahl

	Placebo T	EPO 100 T	Bisoprolol 5 T	EPO/Biso. 25% T	EPO/Biso. 75 % T
Tierzahl	37	20	8	14	15
Tumorzellzahl	2213.51 ± 227.27	3027.04 ± 290.47 *	3171.21 ± 496.62	3105.58 ± 1505.93	2162.63 ± 272.58

ANOVA P=0.6036 ns Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

Alle Behandlungsgruppen außer EPO/Biso 25% T zeigten im Vergleich zu Placebo T einen signifikant geringeren Verlust an Fett:

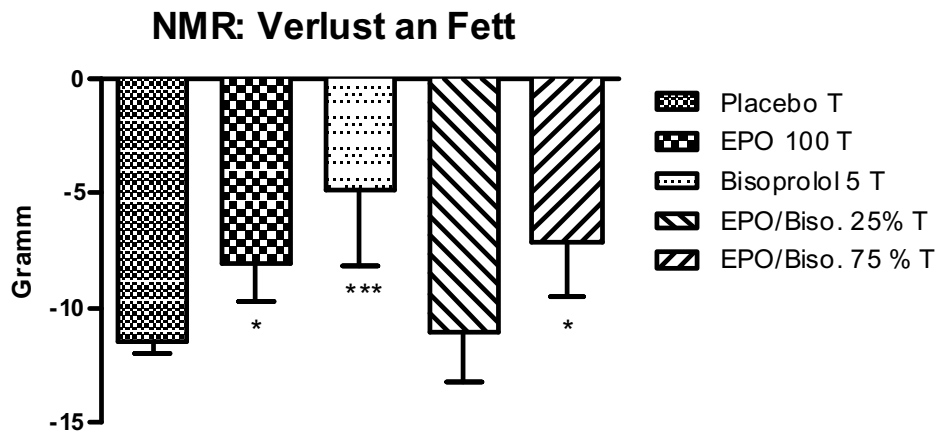


Abbildung 21 ANOVA P=0.0471 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001
(Placebo Sham – NMR: Zunahme an Fett : 8.93 ± 1.57)

Alle Behandlungsgruppen außer EPO/Biso 25% T zeigten im Vergleich zu Placebo T einen signifikant geringeren Verlust an Fett pro Tag:

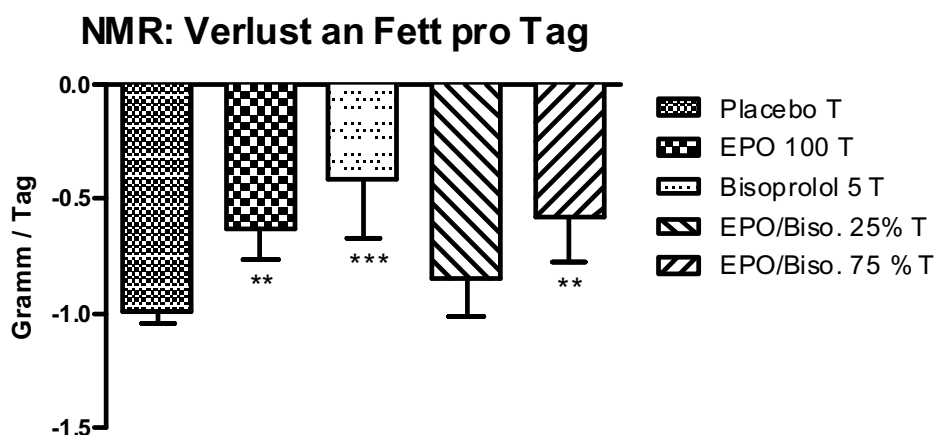


Abbildung 22 ANOVA P=0.0150 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001
(Placebo Sham – NMR: Zunahme an Fett pro Tag : 0.60 ± 0.10)

Alle Behandlungsgruppen außer EPO/Biso 25% T zeigten im Vergleich zu Placebo T einen signifikant geringeren Verlust an fettfreier Masse:

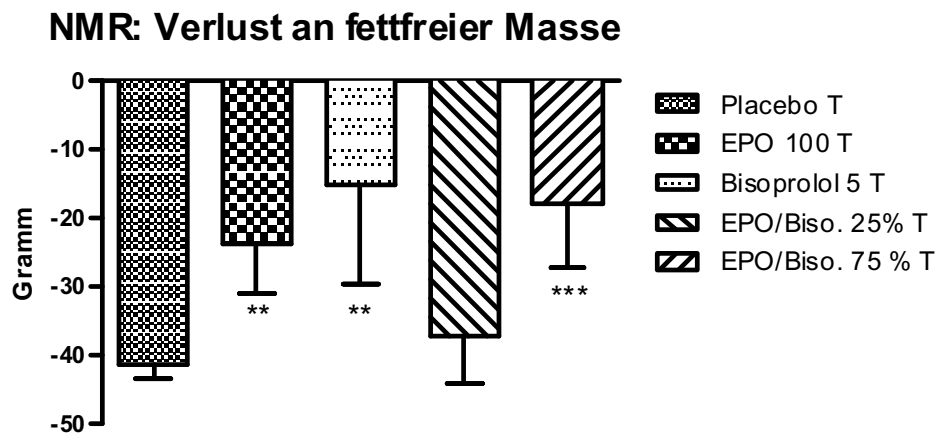


Abbildung 23 ANOVA P=0.0101 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test): * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

(Placebo Sham – NMR: Zunahme an fettfreier Masse : 41.02 ± 3.37)

Alle Behandlungsgruppen außer EPO/Biso 25% T zeigten im Vergleich zu Placebo T einen deutlich signifikant geringeren Verlust an fettfreier Masse pro Tag:

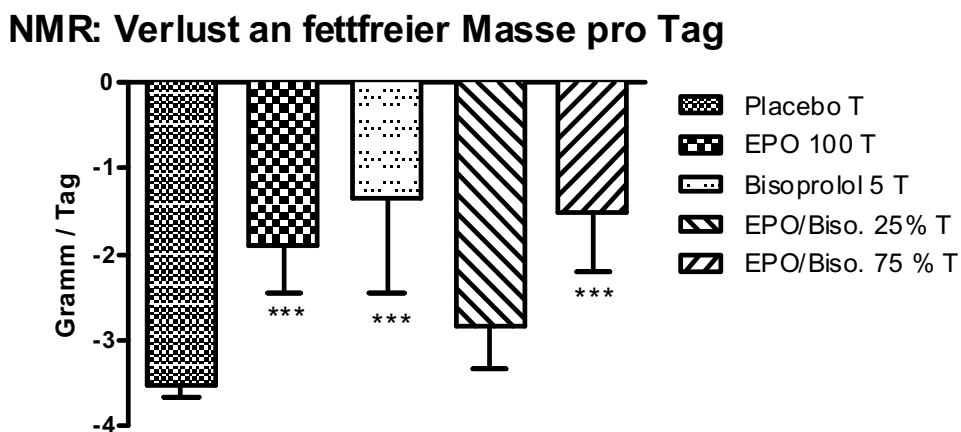


Abbildung 24 ANOVA P=0.0022 ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test): * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001

(Placebo Sham – NMR: Zunahme an fettfreier Masse pro Tag : 2.73 ± 0.22)

Bei der Futteraufnahme an Tag 0 zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen EPO 100 T und Biso 5 T sowie zwischen EPO 100 T und EPO/Biso 25% T:

Tabelle 4.4 Futteraufnahme

	Placebo T	EPO 100 T	Bisoprolol 5 T	EPO/Biso. 25 % T	EPO/Biso. 75% T
Anzahl der Tiere	37	20	8	14	15
Futteraufnahme Tag 0 [g]	19.81 ± 0.60	21.00 ± 0.47 ns □ ◇	19.00 ± 0.85	19.56 ± 0.38	20.57 ± 0.57

ANOVA P=0.3283 ns Placebo T (AG Anker)

t-test: ns: p>0.05, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

* = vs. Placebo Tumor (A) = ANOVA (KW) = Kruskal-Wallis-Test

entsprechend gilt:

□ = vs. Biso 5 T ◇ = vs. EPO/Biso 25% T ○ = vs. EPO/Biso 75% T

Am Tag 10 nahmen die Tiere aller Behandlungsgruppen signifikant mehr Futter auf als die Tiere der Placebo T Gruppe:

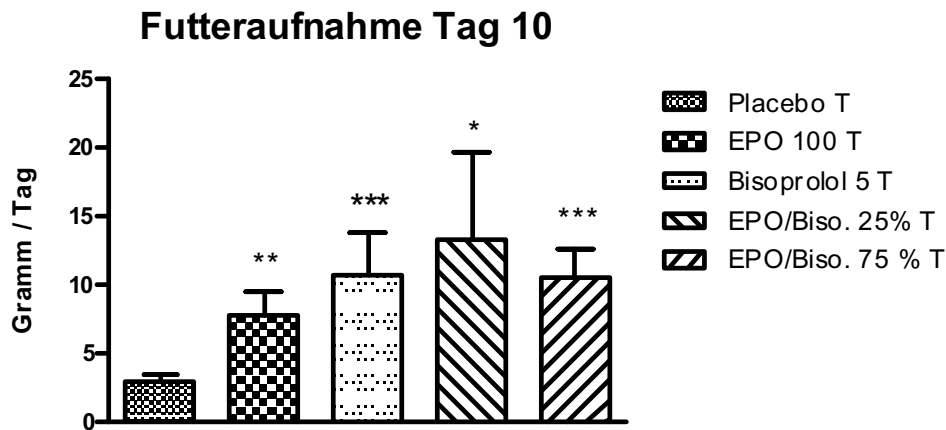


Abbildung 25 ANOVA P=0.0239 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Futteraufnahme Tag 10 : 20.75 ± 1.08)

Alle Behandlungsgruppen wiesen einen signifikant geringeren Aktivitätsverlust als Placebo T auf:

Prozentualer Aktivitäts-Verlust Tag 10/ Tag 0

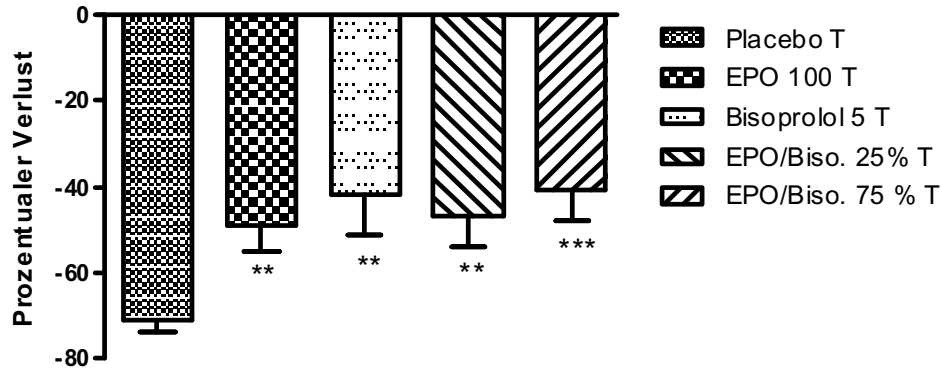


Abbildung 26 Kruskal-Wallis P=0.0004 *** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Proz. Aktivitätsverlust : -18.00 ± 0.03)

Mit Ausnahme von EPO/Biso 25% T hatten alle Behandlungsgruppen ein höheres Herzgewicht als Placebo T:

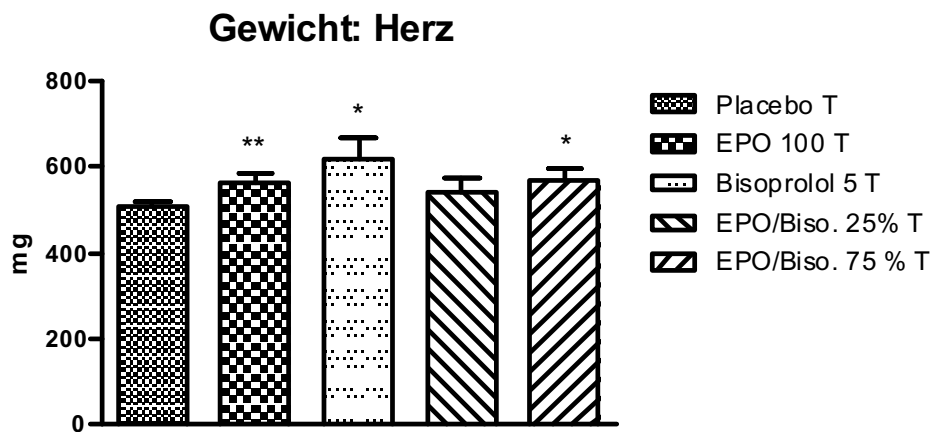


Abbildung 27 Kruskal-Wallis P=0.0284 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Gewicht: Herz : 788.33 ± 19.77)

Beide Kombinationsgruppen wiesen eine signifikant höhere EF auf als Placebo T:

Echokardiographie: EF Tag 11

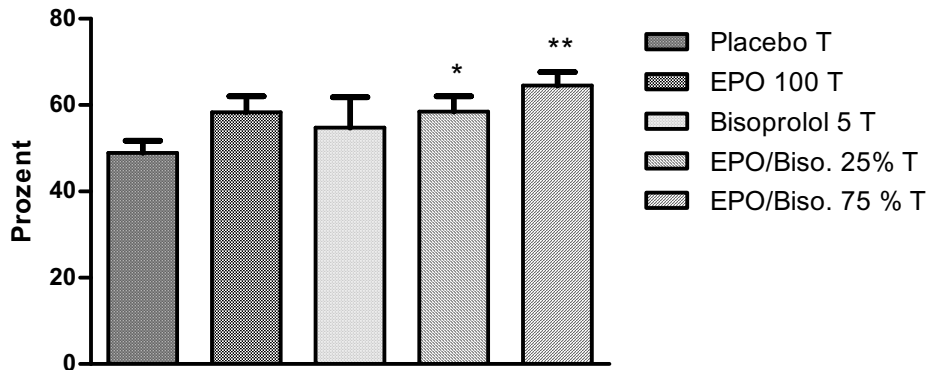


Abbildung 28 Kruskal-Wallis P=0.0341 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – EF Tag 11 : 77.22 ± 3.33)

Beide Kombinationsgruppen wiesen eine signifikant höheres FS auf als Placebo T. Zwischen Biso 5 T und EPO/Biso 75% T bestand ebenfalls ein signifikanter Unterschied:

Echokardiographie: FS Tag 11

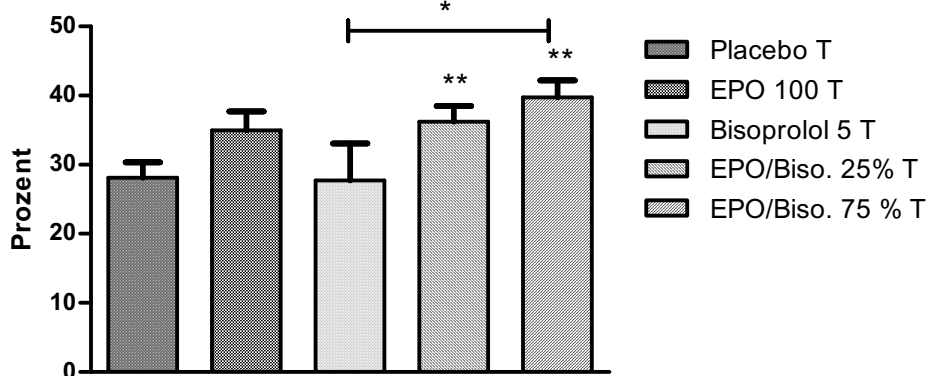


Abbildung 29 Kruskal-Wallis P=0.0124 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – FS Tag 11 : 51.84 ± 1.97)

Es bestand ein signifikanter Unterschied sowohl zwischen EPO 100 T und Placebo T als auch zwischen EPO 100 T und EPO/Biso 75% T:

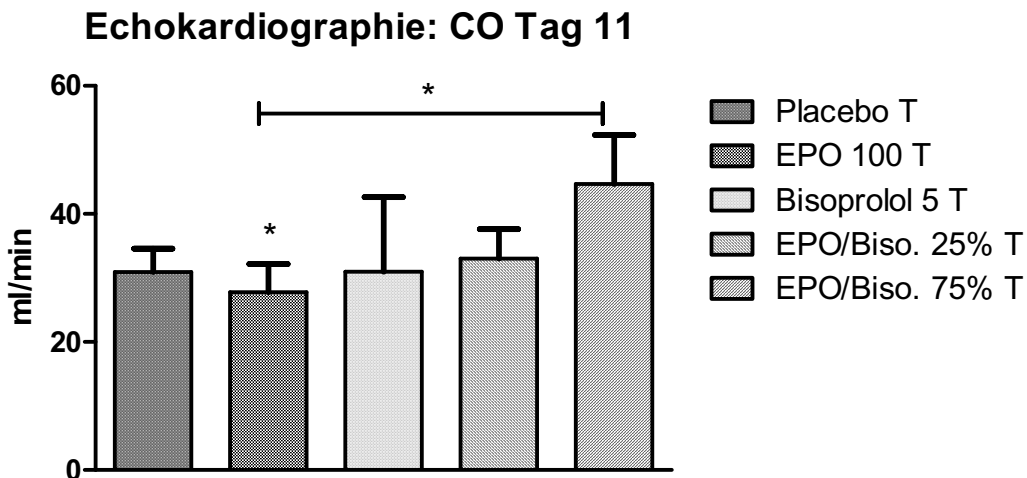


Abbildung 30 Kruskal-Wallis P=0.0711 ns Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – CO Tag 11 : 98.47 ± 21.05)

4.4 Kombinationstherapie: Tissue Protective Molecule + Bisoprolol

Die TPM-284 1,7 T Gruppe zeigte gegenüber der Placebo T Gruppe einen signifikant geringeren Gewichtsverlust. Es wurde weniger Fett aber vor allem weniger fettfreie Masse abgebaut. Die Tiere nahmen deutlich mehr Futter auf, waren aktiver und hatten eine signifikant höhere Überlebensdauer als die Tiere der Placebo T Gruppe. Signifikante Unterschiede zeigten sich in den Gewichten von Herz, Leber, Milz, weißem und braunem Fett, M gastrocnemius und M. tibialis.

Die Behandlung mit Bisoprolol führte zu deutlichen Verbesserungen im Vergleich zur Placebo Tumor Gruppe. Die Tiere der Behandlungsgruppe verloren weniger an Gewicht, sowohl an Fett als auch an fettfreier Masse. Sie zeigten eine höhere Aktivität als unbehandelte Tiere und eine höhere Überlebensdauer. Milz, weißes und braunes Fett waren signifikant schwerer als bei den unbehandelten Tieren, auch das Herz und der M. tibialis wiesen ein deutlich höheres Gewicht auf.

Ergebnisse

Die TPM/Biso 25% T Gruppe wies einen geringeren Gewichtsverlust auf als die Placebo T Gruppe, diesem lag ein geringerer Verlust an fettfreier Masse, nicht aber an Fett zugrunde. Tiere dieser Gruppe zeigten gegenüber der Vergleichsgruppe keine signifikante Veränderung in der Aktivität, sie nahmen aber mehr Futter auf und überlebten länger. Signifikant höhere Organgewichte traten bei Milz, weißem und braunem Fett sowie bei allen Muskeln mit Ausnahme des M. soleus auf.

TPM/Biso 75% T zeigte gegenüber Placebo T einen signifikant geringeren Gewichtsverlust, fettfreie Masse aber auch Fett wurden deutlich weniger abgebaut.

Aktivität, Futteraufnahme sowie Überlebenszeit waren deutlich höher als bei der Vergleichsgruppe. Außer bei Herz, Lunge und Nebenniere kam es bei allen Organen zu signifikant erhöhten Organgewichten.

Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen bestanden bei den Parametern Todestag, Niere und Nebenniere.

Ergebnisse

Tabelle 5.1 Gewichte: Kombinationstherapie Tissue Protective Molecule

	Placebo T	TPM-284 1,7 T	Bisoprolol 5 T	TPM/Biso. 25% T	TPM/Biso. 75% T	ANOVA/ Kuskal- Wallis
Anzahl der Tiere (N)	37	22	8	12	9	
Gewichtsver- änderung excl. Tumor pro T [g]	-4.74 ± 0.17	-2.24 ± 0.73 ***	-2.03 ± 1.54 **	-2.75 ± 1.01 **	-1.06 ± 1.24 ***	(A **) P=0.0010
Verlust an fett- freier M. pro T [g]	-3.51 ± 0.15	-1.62 ± 0.56 ***	-1.36 ± 1.09 ***	-2.49 ± 0.72 *	-0.83 ± 0.97 ***	(A **) P=0.0013
Verlust an Fett pro T [g]	-0.99 ± 0.05	-0.66 ± 0.14 *	-0.41 ± 0.26 ***	-0.87 ± 0.15	-0.51 ± 0.21 **	(A *) P=0.0105
Lebens- qualität						
Futterauf- nahme Tag 10 [g]	3.00 ± 0.51	9.92 ± 2.82 **	10.75 ± 3.07 ***	7.83 ± 2.33 **	13.56 ± 2.97 ***	(A **) P=0.0024
Aktivität Tag 0/ Tag 10 [%]	-0.71 ± 0.03	-0.52 ± 0.06 *	-0.42 ± 0.09 **	-0.55 ± 0.07	-0.41 ± 0.09 **	(KW **) P=0.0035
Organgewichte in mg						
Herz	505.21 ± 14.00	568.00 ± 25.10 *	618.44 ± 47.90 *	523.53 ± 37.30 ◊	612.73 ± 52.29	(KW *) P=0.0423
Lunge	885.22 ± 29.57	962.05 ± 44.59	976.30 ± 54.39	926.20 ± 71.70	996.36 ± 72.72	(KW ns) P=0.1945
Leber	6093.39 ± 227.81	7431.52 ± 439.16 *	7247.81 ± 829.46	6902.03 ± 685.26	8174.17 ± 700.31 **	(KW *) P=0.0276
Milz	163.64 ± 10.01	299.75 ± 41.51 ***	416.56 ± 123.42 ***	264.58 ± 63.39 *	344.40 ± 73.77 ***	(A **) P=0.0014
linke Niere	698.41 ± 16.58	750.26 ± 32.63 ◊	751.10 ± 44.94	739.70 ± 27.83	816.62 ± 29.62 **	(KW *) P=0.0319
li. Nebenniere	35.13 ± 1.77	35.99 ± 2.66	27.73 ± 1.76 ◊◊	31.35 ± 2.35	34.99 ± 1.68	(A ns) P=0.2726
weißes Fett	86.38 ± 26.43	486.69 ± 121.40 ***	532.47 ± 209.90 ***	323.46 ± 127.86 **	449.60 ± 180.79 ***	(A **) P=0.0030
braunes Fett	78.59 ± 3.14	97.79 ± 10.06 *	128.55 ± 26.56 ***	113.47 ± 18.79 **	135.50 ± 22.14 ***	(A **) P=0.0037
M. gastrocnemius	713.22 ± 14.07	833.33 ± 48.74 **	806.27 ± 143.40	841.10 ± 66.13 **	1000.54 ± 89.17 ***	(A **) P=0.0061
M. tibialis	262.49 ± 6.10	303.50 ± 17.72 *	309.27 ± 34.03 *	306.50 ± 25.06 *	353.99 ± 37.70 ***	(A *) P=0.0112
M. soleus	69.73 ± 1.43	74.01 ± 3.07	74.31 ± 6.45	75.20 ± 3.86	82.98 ± 5.47 **	(A ns) P=0.0865
M. EDL	63.66 ± 1.48	70.28 ± 4.36	72.81 ± 7.81	74.86 ± 5.39 **	83.01 ± 7.67 ***	(A *) P=0.0231

t-test: ns: p>0.05, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 Placebo T (AG Anker)

* = vs. Placebo Tumor (A) = ANOVA (KW) = Kruskal-Wallis-Test

entsprechend gilt:

◻ = vs. Biso 5 T ◊ = vs. TPM/Biso 25% T ◊ = vs. TPM/Biso 75% T

Ergebnisse

Bei den Werten von EF, CO, LVPW d, MV E / MV A und LV Mass corr. bestanden an Tag 0 signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Die Werte der TPM-284 1,7 T Gruppe unterschieden sich an Tag 11 in den Parametern CO, IVS s, LVID d und LV Mass corr. von den Werten der Placebo T Gruppe.

An Tag 11 zeigte sich ein signifikanter Unterschied der LV Mass corr. und ein signifikanter Unterschied der IVS d zwischen Bisoprolol 5 T und Placebo T.

TPM/Biso 25% T unterschied sich am Tag 11 nur im Wert LVID d signifikant von der Placebo T Gruppe.

Tiere der TPM/Biso 75% Gruppe unterschieden sich an Tag 11 in den Parametern FS, EF, CO, IVS s, LVID d und LV Mass corrected.

Signifikante Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bestanden an Tag 11 bei MV E / MV A.

Ergebnisse

Tabelle 5.2 Echokardiographie : Kombinationstherapie Tissue Protective Molecule

Echokardiographie	Placebo T	TPM-284 1,7 T	Bisoprolol 5 T	TPM/Biso. 25% T	TPM/Biso. 75% T	ANOVA/ Kruskal- Wallis
Anzahl der Tiere (N)	24	19	7	12	9	
FS Tag 0 [%]	49.17 ± 1.16	47.38 ± 1.40	49.95 ± 2.80	47.21 ± 1.65	50.57 ± 2.58	(KW ns) P=0.7761
FS Tag 11 [%]	28.13 ± 2.23	38.83 ± 3.83	27.71 ± 5.37	35.04 ± 3.49	42.17 ± 3.21 **	(KW *) P=0.0327
EF Tag 0 [%]	74.74 ± 1.47	70.74 ± 1.73 □□	79.95 ± 1.32 ◇◇	72.17 ± 2.05	75.03 ± 1.84	(KW *) P=0.0341
EF Tag 11 [%]	48.94 ± 2.77	57.16 ± 4.97	54.77 ± 7.06	54.44 ± 3.91	63.60 ± 3.33 **	(KW ns) P=0.1650
CO Tag 0 [ml/min]	78.74 ± 2.91	67.15 ± 3.28 ** □□□ ◇ ○	93.37 ± 4.36 * ◇	79.42 ± 2.39	82.67 ± 4.13	(KW **) P=0.0013
CO Tag 11 [ml/min]	30.94 ± 3.62	52.24 ± 9.52 *	30.96 ± 11.65	40.07 ± 9.94	55.98 ± 8.88 **	(A ns) P=0.0706
IVS d Tag 0 [mm]	1.57 ± 0.03	1.53 ± 0.05	1.45 ± 0.11	1.53 ± 0.03	1.56 ± 0.06	(A ns) P=0.6383
IVS d Tag 11 [mm]	1.52 ± 0.05	1.59 ± 0.05	1.81 ± 0.21 *	1.51 ± 0.05	1.48 ± 0.05	(A ns) P=0.1266
IVS s Tag 0 [mm]	2.75 ± 0.05	2.77 ± 0.08	2.78 ± 0.15	2.73 ± 0.05	2.95 ± 0.12	(KW ns) P=0.5514
IVS s Tag 11 [mm]	2.20 ± 0.07	2.60 ± 0.14 *	2.49 ± 0.15	2.37 ± 0.14	2.65 ± 0.10 **	(KW *) P=0.0475
LVID d Tag 0 [mm]	6.22 ± 0.08	6.35 ± 0.09	6.50 ± 0.21	6.47 ± 0.06	6.48 ± 0.09	(A ns) P=0.2188
LVID d Tag 11 [mm]	5.48 ± 0.09	6.03 ± 0.15 **	5.85 ± 0.54	5.97 ± 0.16 **	6.38 ± 0.21 ***	(A **) P=0.0057
LVID s Tag 0 [mm]	3.17 ± 0.09	3.34 ± 0.10	3.27 ± 0.25	3.42 ± 0.13	3.20 ± 0.17	(KW ns) P=0.4980
LVID s Tag 11 [mm]	3.94 ± 0.13	3.65 ± 0.21	4.06 ± 0.18	3.87 ± 0.22	3.65 ± 0.14	(KW ns) P=0.4937
LVPW d Tag 0 [mm]	1.75 ± 0.05	1.75 ± 0.04 □□	1.47 ± 0.11 *	1.63 ± 0.05	1.63 ± 0.04	(A *) P=0.0368
LVPW d Tag 11 [mm]	1.63 ± 0.04	1.59 ± 0.06	1.66 ± 0.19	1.59 ± 0.09	1.54 ± 0.05	(A ns) P=0.8961
LVPW s Tag 0 [mm]	2.78 ± 0.05	2.85 ± 0.07	2.67 ± 0.12	2.79 ± 0.09	2.77 ± 0.05	(KW ns) P=0.3905
LVPW s Tag 11 [mm]	2.11 ± 0.07	2.37 ± 0.13	2.28 ± 0.13	2.28 ± 0.16	2.36 ± 0.12	(KW ns) P=0.3704
MV E / MV A Tag 0	1.55 ± 0.05	1.55 ± 0.08	1.54 ± 0.09	1.34 ± 0.05 *	1.38 ± 0.09	(KW ns) P=0.1636
MV E / MV A Tag 11	1.58 ± 0.31	1.35 ± 0.09 □	1.82 ± 0.22 ◇	1.24 ± 0.10	1.37 ± 0.08	(A ns) P=0.8255

t-test: ns: p>0.05, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 Placebo T (AG Anker)

* = vs. Placebo Tumor (A) = ANOVA (KW) = Kruskal-Wallis-Test

entsprechend gilt:

□ = vs. Biso 5 T ◇ = vs. TPM/Biso 25% T ○ = vs. TPM/Biso 75% T

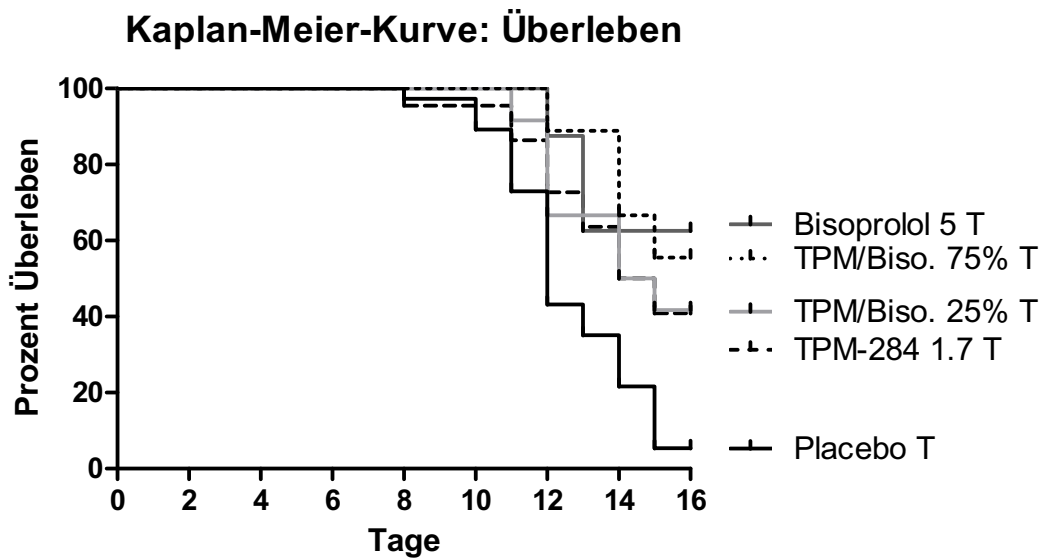


Abbildung 31 Log-Rank Test $P=0.0018^{**}$ Placebo T (AG Anker)
 Placebo – Biso 5: $P=0.0029^{**}$ Hazard Ratio=0.2736 95% CI=0.1167 – 0.6416
 Placebo – TPM 1.7: $P=0.0025^{**}$ Hazard Ratio=0.3643 95% CI=0.1891 – 0.7017
 Placebo – Kombi 25: $P=0.0096^{**}$ Hazard Ratio=0.3611 95% CI=0.1670 – 0.7808
 Placebo – Kombi 75: $P=0.0012^{**}$ Hazard Ratio=0.2588 95% CI=0.1142 – 0.5869

Alle Behandlungsgruppen unterschieden sich im Endgewicht signifikant von Placebo T:

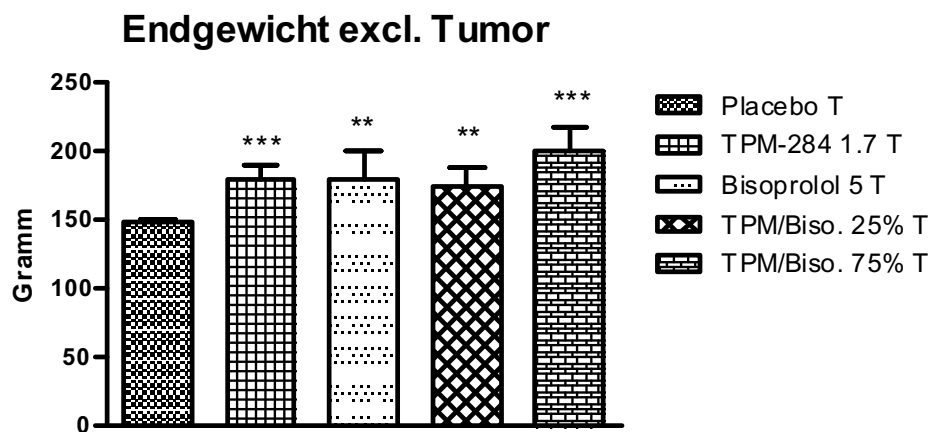


Abbildung 32 ANOVA $P=0.0020^{**}$ Placebo T (AG Anker)
 Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test): $p<0.05$, $**$: $p<0.01$, $***$: $p<0.001$
 (Placebo Sham – Endgewicht excl. Tumor : 268.38 ± 5.30)

TPM/Biso 25% T zeigte im Gegensatz zu den anderen Behandlungsgruppen keinen signifikanten Unterschied zu Placebo T:

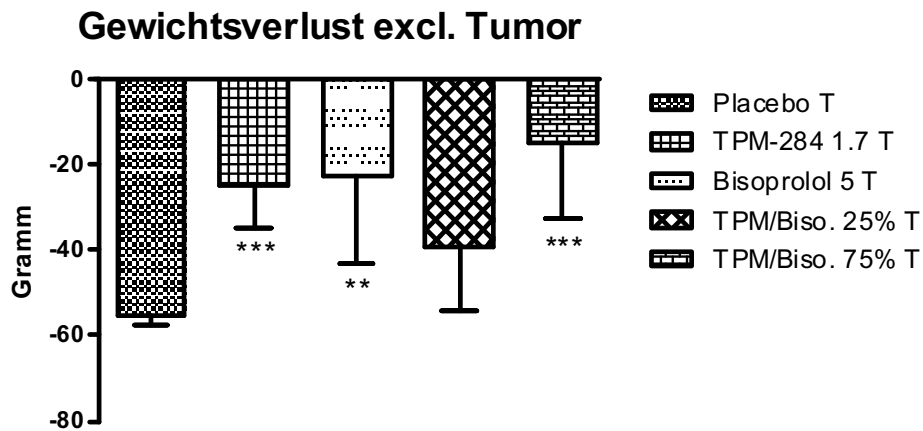


Abbildung 33 ANOVA P=0.0094 ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Gewichtszuwachs: 58.25 ± 5.30)

Alle Behandlungsgruppen verloren signifikant weniger Gewicht pro Tag als die Placebo T Gruppe:

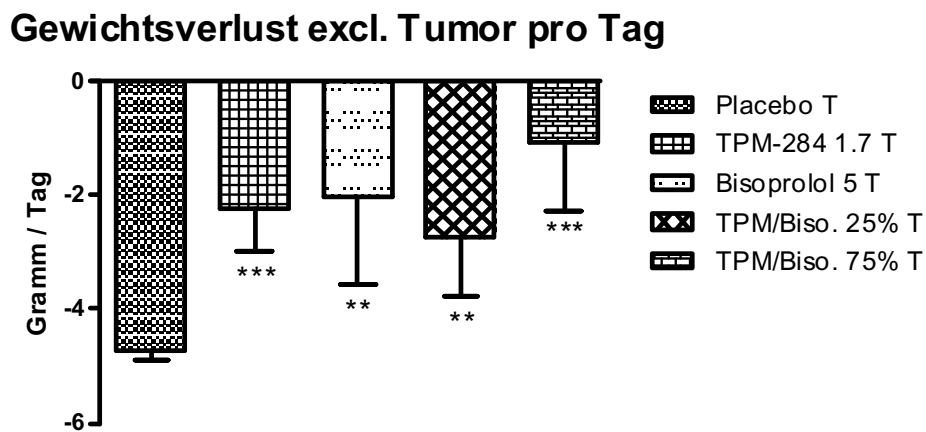


Abbildung 34 ANOVA P=0.0010 ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Gewichtszuwachs pro Tag : 3.88 ± 0.23)

TPM-284 1.7 T und Bisoprolol 5 T hatten ein signifikant geringeres Tumolvolumen als Placebo T:

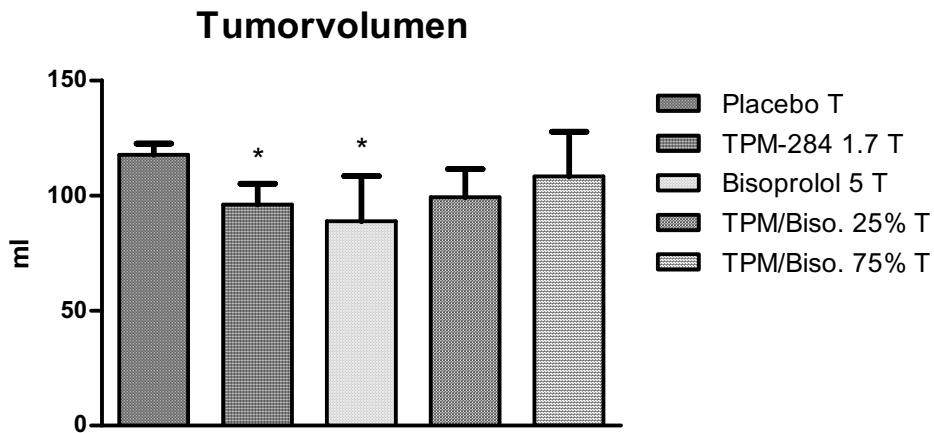


Abbildung 35 ANOVA P=0.1902 Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

Es bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Tumorzellzahl:

Tabelle 5.3 Tumorzellzahl

	Placebo T	TPM-284 1.7 T	Bisoprolol 5 T	TPM/Biso. 25% T	TPM/Biso. 75 % T
Tierzahl	37	22	8	12	9
Tumor-zellzahl	2213.51 ± 227.27	2613.64 ± 420.42	3171.21 ± 496.62	2512.83 ± 535.60	3353.64 ± 548.04

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

Kruskal-Wallis P=0.3177 ns Placebo T (AG Anker)

Alle Behandlungsgruppen außer TPM/Biso 25% T verloren signifikant weniger Fett als Placebo T:

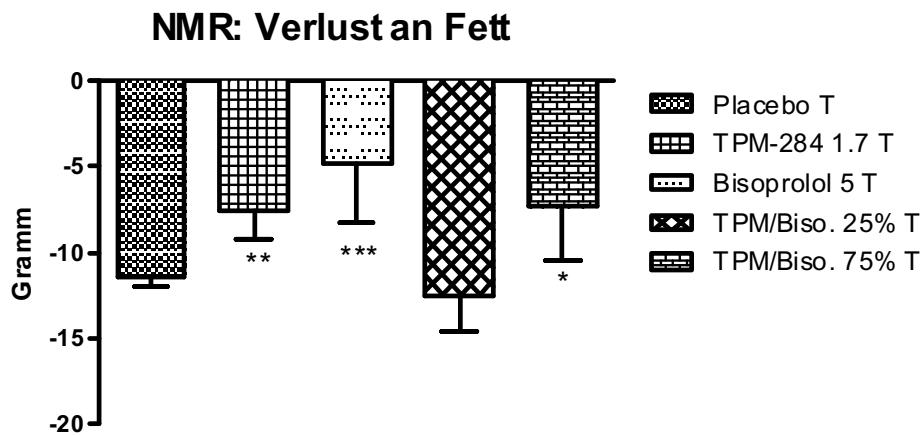


Abbildung 36 ANOVA P=0.0166 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – NMR: Zunahme an Fett : 8.93 ± 1.57)

Alle Behandlungsgruppen außer TPM/Biso 25% T verloren signifikant weniger Fett pro Tag als Placebo T:

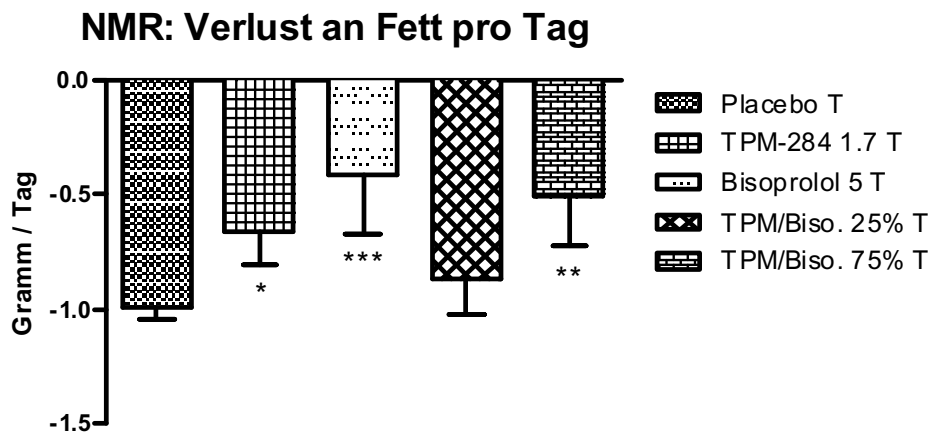


Abbildung 37 ANOVA P=0.0105 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – NMR: Zunahme an Fett pro Tag : 0.60 ± 0.10)

Alle Behandlungsgruppen außer TPM/Biso 25% T verloren signifikant weniger fettfreie Masse als Placebo T:

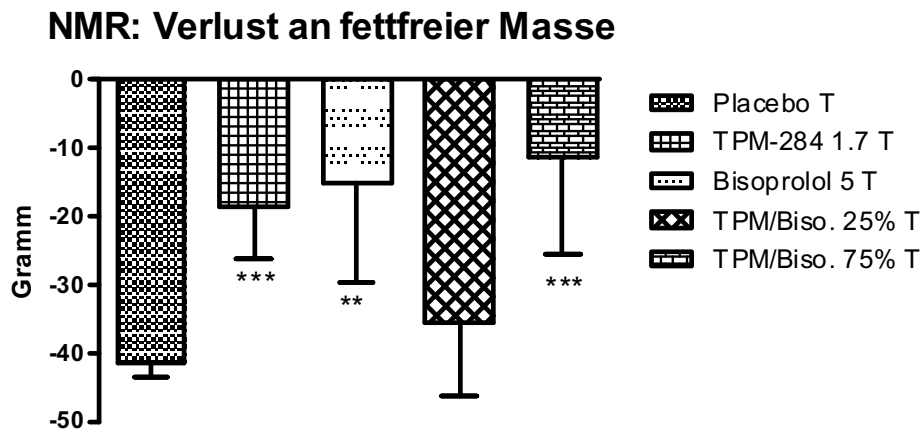


Abbildung 38 ANOVA P=0.0079 ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – NMR: Zunahme an fettfreier Masse : 41.02 ± 3.37)

Alle Behandlungsgruppen verloren signifikant weniger fettfreie Masse als Placebo T:

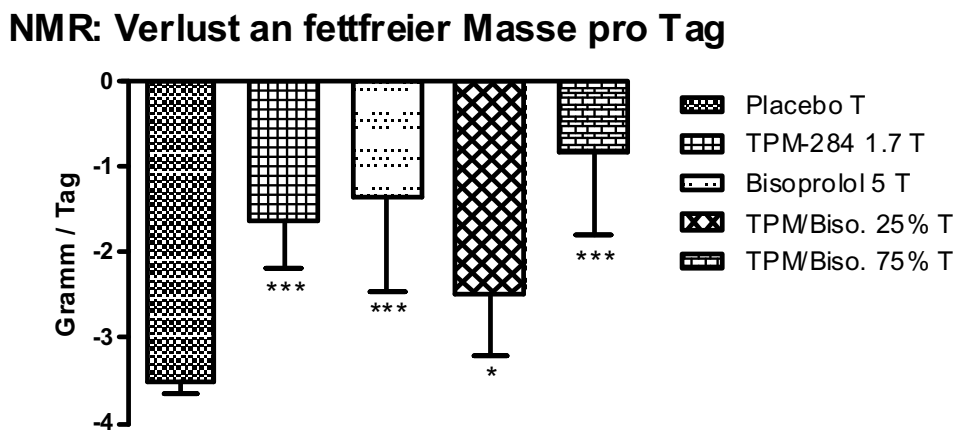


Abbildung 39 ANOVA P=0.0013 ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – NMR: Zunahme an fettfreier Masse pro Tag : 2.73 ± 0.22)

An Tag 0 bestanden keine deutlich signifikanten Unterschiede in der Futteraufnahme:

Tabelle 5.4 Futteraufnahme

	Placebo T	TPM-284 1.7 T	Bisoprolol 5 T	TPM/Biso. 25 % T	TPM/Biso. 75% T
Anzahl der Tiere	37	22	8	12	9
Futteraufnahme Tag 0 (A ns)	19.81 ± 0.60	20.67 ± 0.51	19.00 ± 0.85 ◊	21.08 ± 0.56	21.00 ± 0.50

ANOVA P=0.3651 ns Placebo T (AG Anker)

t-test: ns: p>0.05, *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

* = vs. Placebo Tumor (A) = ANOVA (KW) = Kruskal-Wallis-Test

entsprechend gilt:

□ = vs. Biso 5 T ◊ = vs. TPM/Biso 25% T ○ = vs. TPM/Biso 75% T

Alle Behandlungsgruppen zeigen eine signifikant höhere Futteraufnahme als Placebo:

Futteraufnahme Tag 10

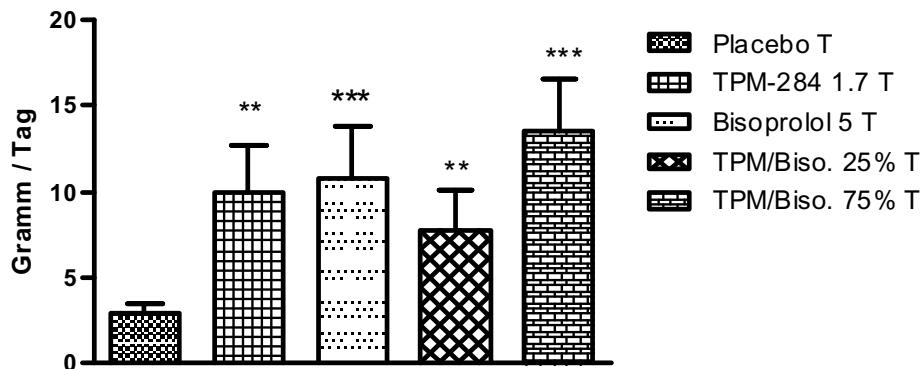


Abbildung 40 ANOVA P=0.0024 ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Futteraufnahme Tag 10 : 20.75 ± 1.08)

TPM/Biso 25% T zeigte im Gegensatz zu den anderen Behandlungsgruppen keine signifikant höhere Aktivität als Placebo T:

Prozentualer Aktivitäts-Verlust Tag 10/ Tag 0

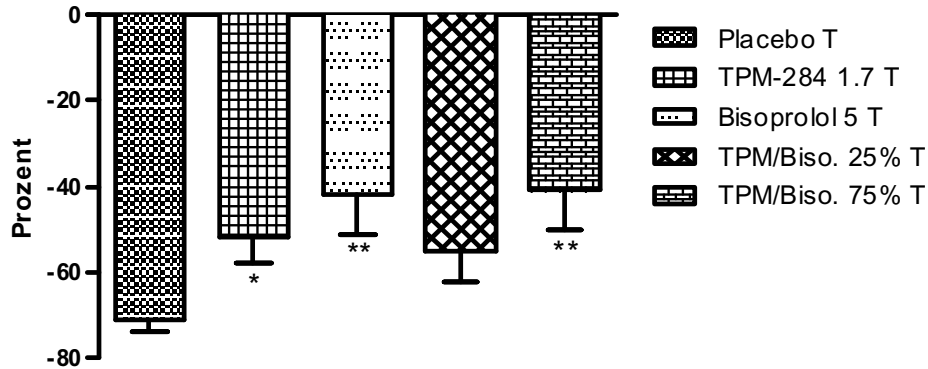


Abbildung 41 Kruskal-Wallis P=0.0035 ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Proz. Aktivitätsverlust : -18.00 ± 0.03)

Das Herzgewicht beider Kombinationsgruppen war nicht signifikant höher als das der Placebo T Gruppe, es bestand aber ein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen:

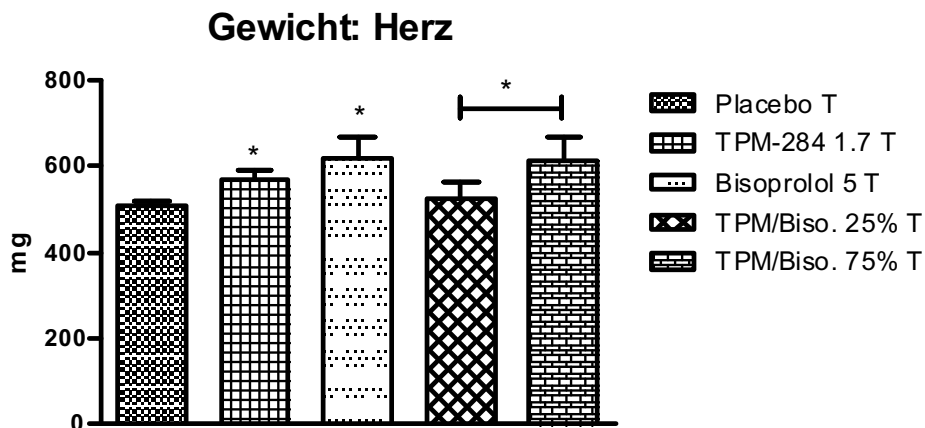


Abbildung 42 Kruskal-Wallis P=0.0423 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Gewicht: Herz : 788.33 ± 19.77)

Nur TPM/Biso 75% T unterschied sich an Tag 11 signifikant von Placebo T.:

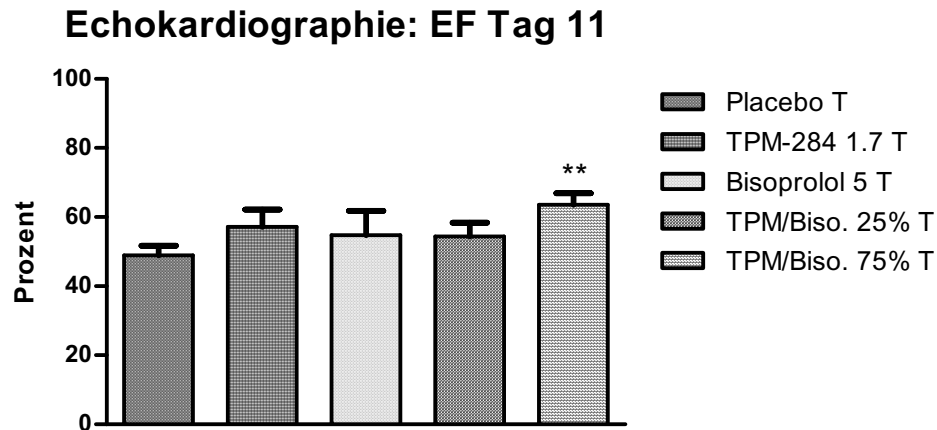


Abbildung 43 Kruskal-Wallis $P=0.1650$ no Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

(Placebo Sham – EF Tag 11 : 77.22 ± 3.33)

Nur TPM/Biso 75% T unterschied sich an Tag 11 signifikant von Placebo T.:

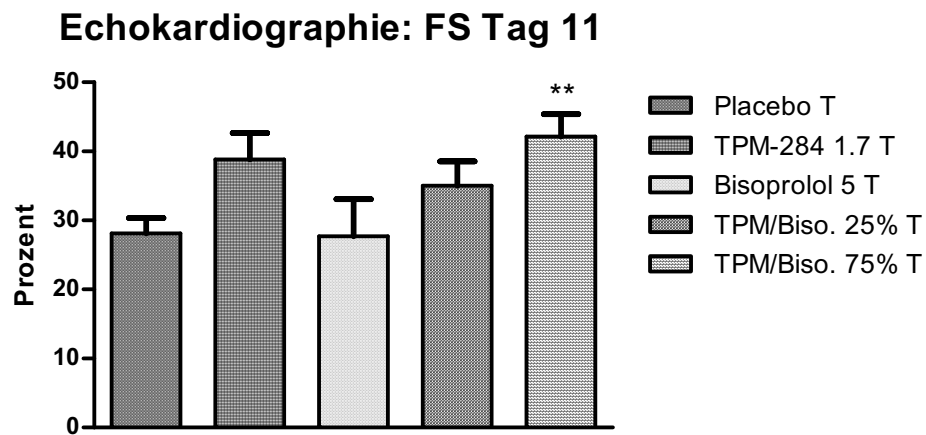


Abbildung 44 Kruskal-Wallis $P=0.0327$ * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

(Placebo Sham – FS Tag 11 : 51.84 ± 1.97)

TPM-284 1.7 T und TPM/Biso 75% T unterschieden sich an Tag 11 signifikant von Placebo T:

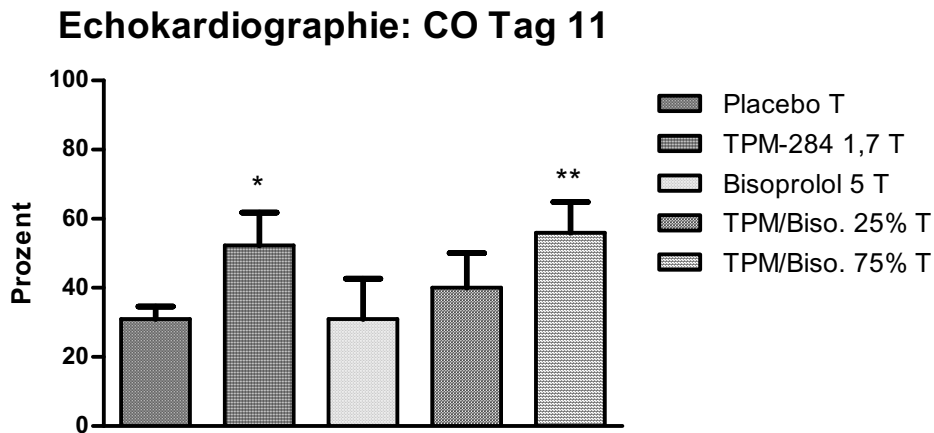


Abbildung 45 ANOVA P=0.0706 ns Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test): *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – CO Tag 11 : 98.47 ± 21.05)

4.5 Vergleich von Erythropoetin und Tissue Protective Molecule

4.5.1 Erythropoetin 500 mg/kg/d - Tissue Protective Molecule 0.17 µg/kg/d

Eine Dosierung von 500 mg/kg/d Erythropoetin entspricht einer Dosierung von 0.17 µg/kg/d TPM, somit kann ein Vergleich zwischen beiden Medikamenten erfolgen. Signifikante Unterschiede oder eine deutliche Tendenz zeigten sich in folgenden Bereichen:

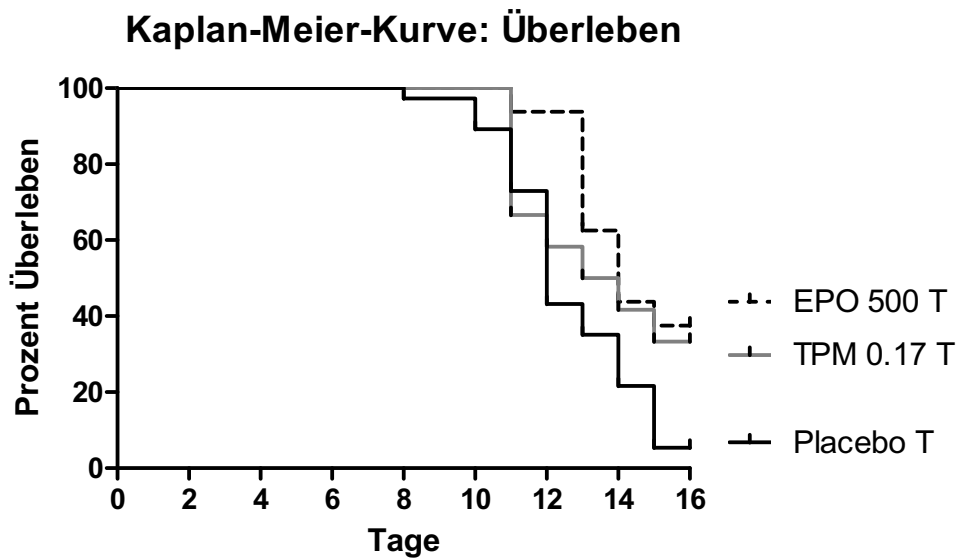


Abbildung 46 Log-Rank Test $P=0.0345$ * Placebo T (AG Anker)
 Placebo – EPO 500: $P=0.0043$ ** Hazard Ratio=0.3630 95% CI=0.1811 – 0.7275
 Placebo – TPM 0.17: $P=0.0911$ Hazard Ratio=0.5076 95% CI=0.2311 – 1.115
 EPO 500 – TPM 0.17: $P=0.4954$ Hazard Ratio=0.6929 95% CI=0.2413 – 1.989

Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen TPM und EPO, allerdings zeigte sich eine deutliche Tendenz:

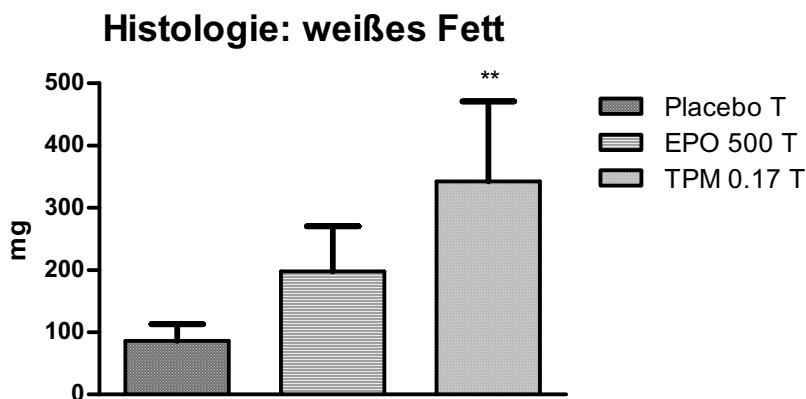


Abbildung 47 ANOVA $P=0.0162$ * Placebo T (AG Anker)
 Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$
 (Placebo Sham – Histo: weißes Fett : 1324.00 ± 190.65)

Das Milzgewicht war in der TPM Gruppe deutlich geringer als in der EPO Gruppe:

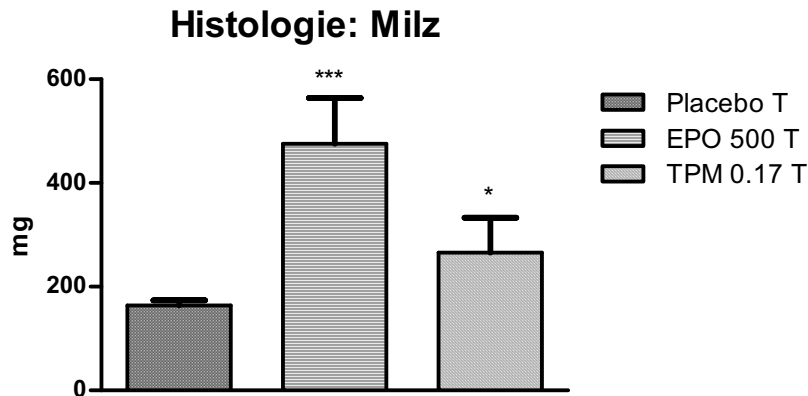


Abbildung 48 ANOVA $P < 0.0001$ *** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

(Placebo Sham – Histo: Milz : 623.36 ± 30.05)

4.5.2 Erythropoetin 5000 mg/kg/d - Tissue Protective Molecule 1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$

Eine Dosierung von 5000 mg/kg/d Erythropoetin entspricht einer Dosierung von 1.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ TPM, auch hier kann ein direkter Vergleich erfolgen. Signifikante Unterschiede oder eine deutliche Tendenz zeigten sich in folgenden Bereichen:

In der TPM Gruppe zeigte sich eine deutliche Tendenz zu geringerem Gewichtsverlust als in der EPO Gruppe:

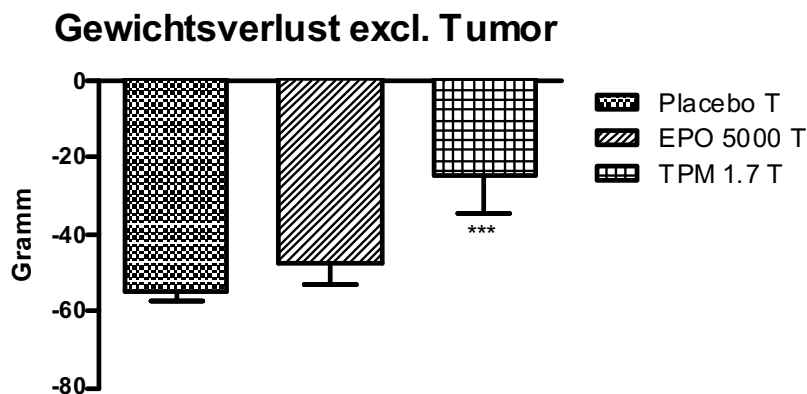


Abbildung 49 ANOVA $P = 0.0007$ *** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

(Placebo Sham – Gewichtszuwachs : 58.25 ± 3.40)

TPM zeigte einen tendenziell geringeren Fettverlust als EPO:

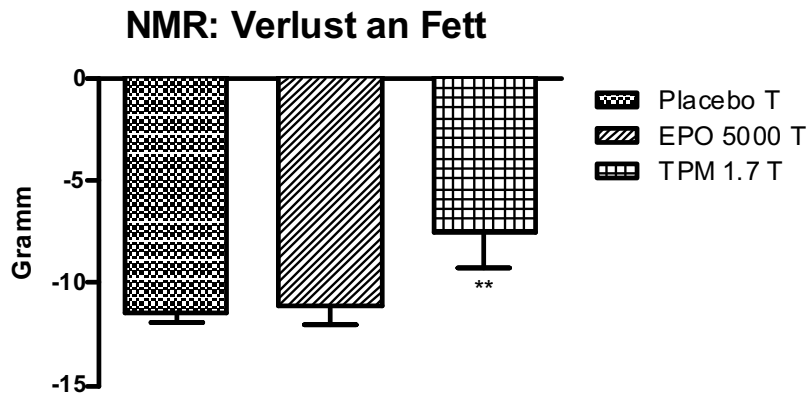


Abbildung 50 ANOVA P=0.0141 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – NMR: Zunahme an Fett : 8.93 ± 1.57)

TPM zeigte einen tendenziell geringeren Verlust an fettfreier Masse als EPO:

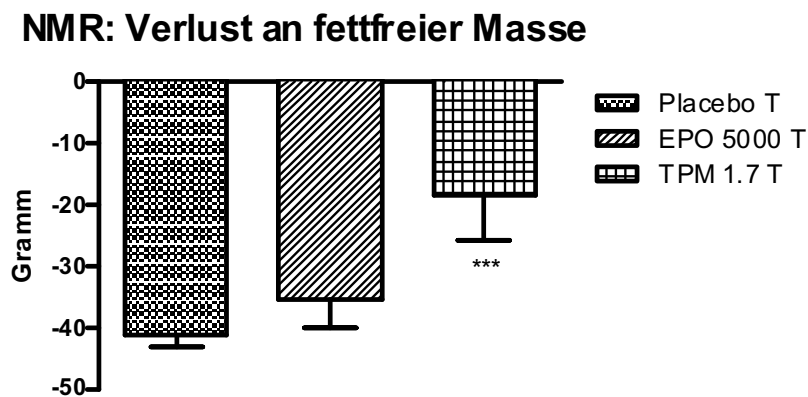


Abbildung 51 ANOVA P=0.0014 ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – NMR: Zunahme an fettfreier Masse : 41.02 ± 3.37)

Die Futteraufnahme war in der TPM Gruppe tendenziell höher als in der EPO Gruppe:

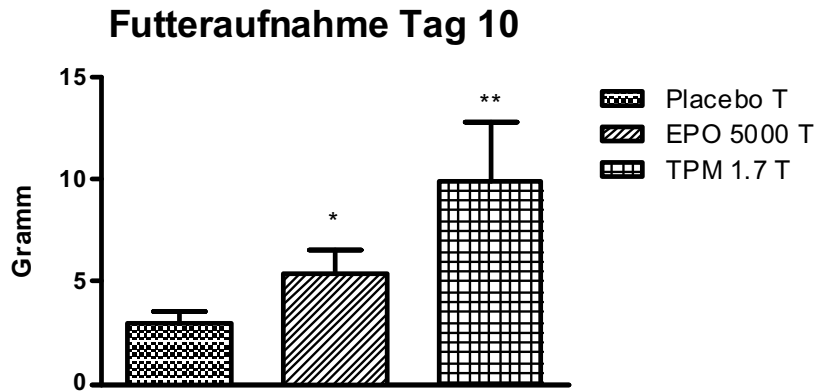


Abbildung 52 ANOVA $P=0.0062$ ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

(Placebo Sham – Futteraufnahme Tag 10 : 20.75 ± 1.08)

TPM 1.7 T wies eine signifikant größere Menge an weißem Fett als EPO 5000 T auf:

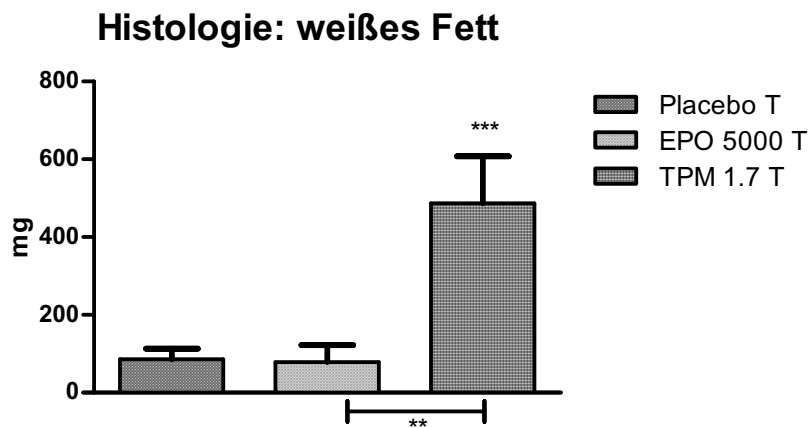


Abbildung 53 ANOVA $P<0.0001$ *** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

(Placebo Sham – Histo: weißes Fett : 1324.00 ± 190.65)

Zwischen EPO und TPM bestand ein deutlich signifikanter Unterschied im Milzgewicht:

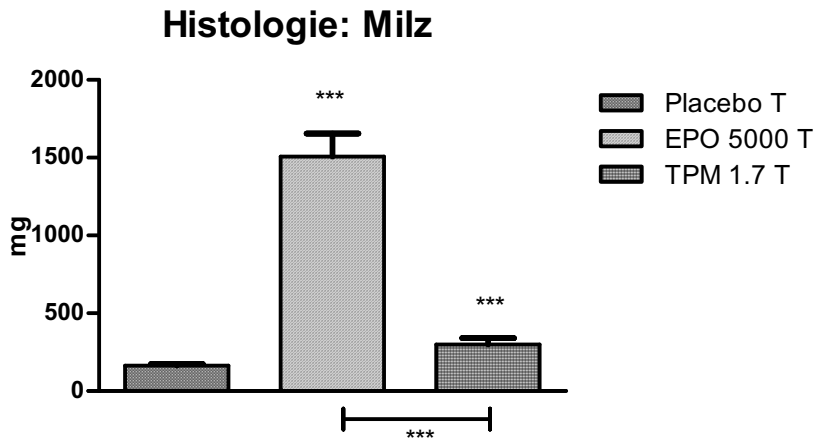


Abbildung 54 ANOVA $P < 0.0001$ *** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

(Placebo Sham – Histo: Milz : 623.36 ± 30.05)

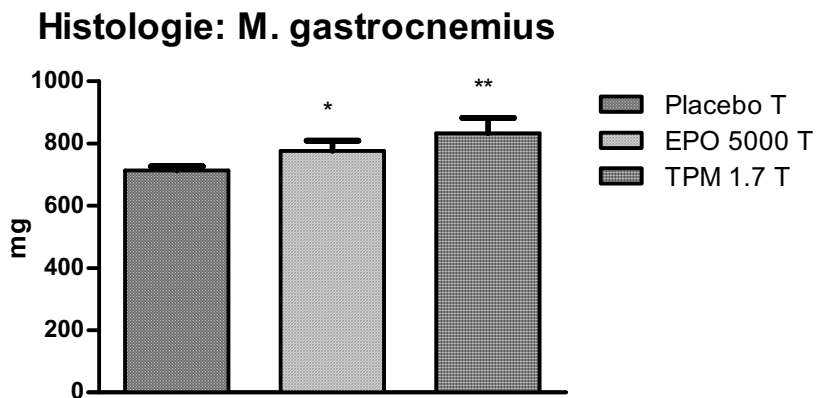


Abbildung 55 ANOVA $P = 0.0142$ * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

(Placebo Sham – Histo: M. gastrocnemius : 1290.79 ± 40.00)

4.5.3 Erythropoetin / Bisoprolol 25% - Tissue Protective Molecule / Bisoprolol 25%

Der Vergleich der Kombinationstherapie von Erythropoetin/Bisoprolol mit TPM/Bisoprolol in einer Dosierung von 25% der jeweils effektiven Dosen ergab folgende signifikante Unterschiede oder deutliche Tendenzen:

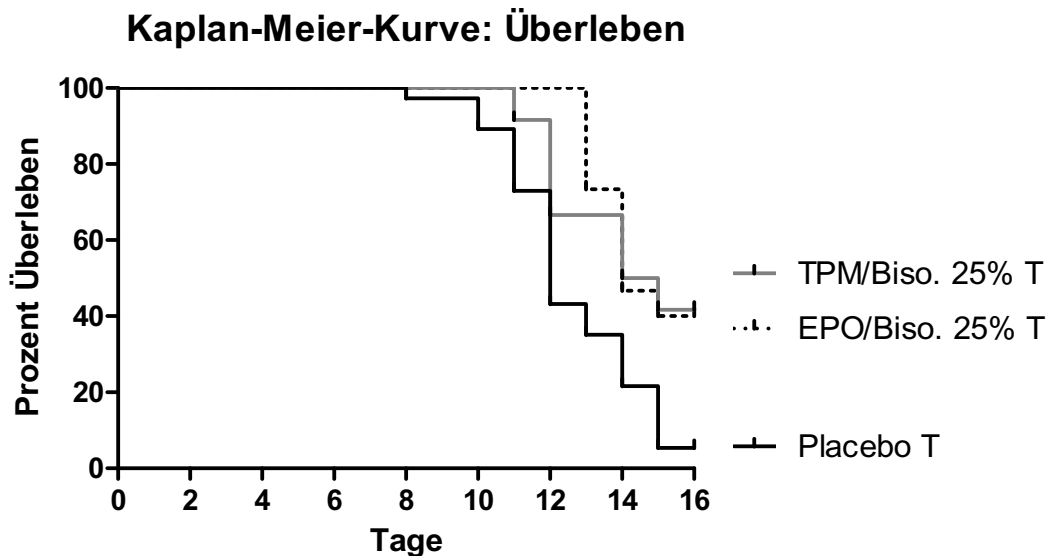


Abbildung 56 Log-Rank Test $P=0.0063^{**}$ Placebo T (AG Anker)

Placebo – Kombi EPO: $P=0.0016^{**}$ Hazard Ratio=0.3216 95% CI=0.1588 – 0.6513

Placebo – Kombi TPM: $P=0.0096^{**}$ Hazard Ratio=0.3611 95% CI=0.1670 – 0.7808

Kombi EPO – Kombi TPM: $P=0.8038$ Hazard Ratio=0.8706 95% CI=0.2919 – 2.597

TPM/Biso 25% T verlor tendenziell weniger Gewicht pro Tag als EPO/Biso 25% T:

Gewichtsverlust excl. Tumor pro Tag

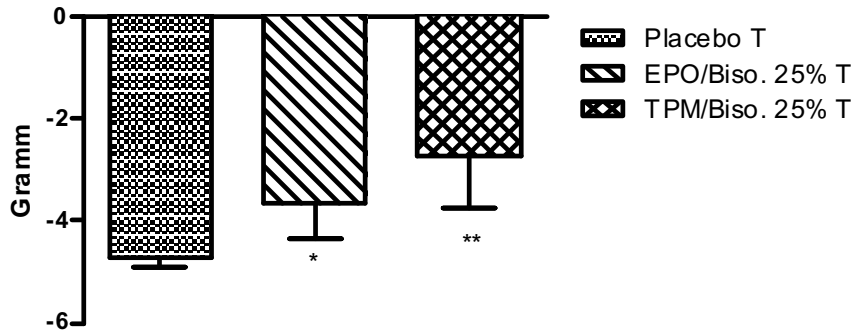


Abbildung 57 ANOVA P=0.0154 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Gewichtszuwachs pro Tag : 3.88 ± 0.23)

TPM/Biso 25% T zeigte einen Trend zu einer geringeren Futteraufnahme als EPO/Biso 25% T:

Futteraufnahme Tag 10

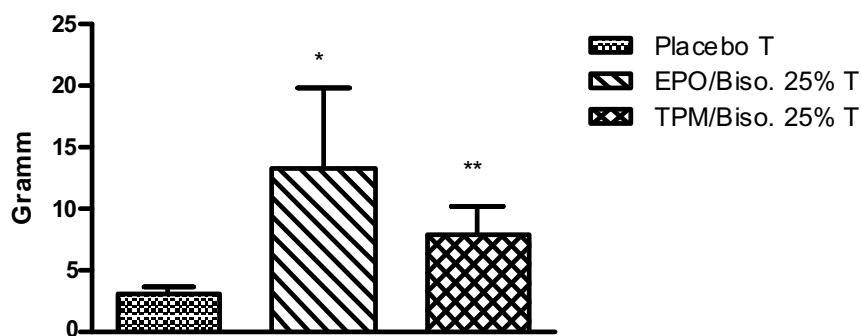


Abbildung 58 ANOVA P=0.0304 * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Futteraufnahme Tag 10 : 20.75 ± 1.08)

Es zeigte sich die Tendenz zu einem höheren Gewicht an weißem Fett bei TPM/Biso 25% T im Vergleich zu EPO/Biso 25% T:

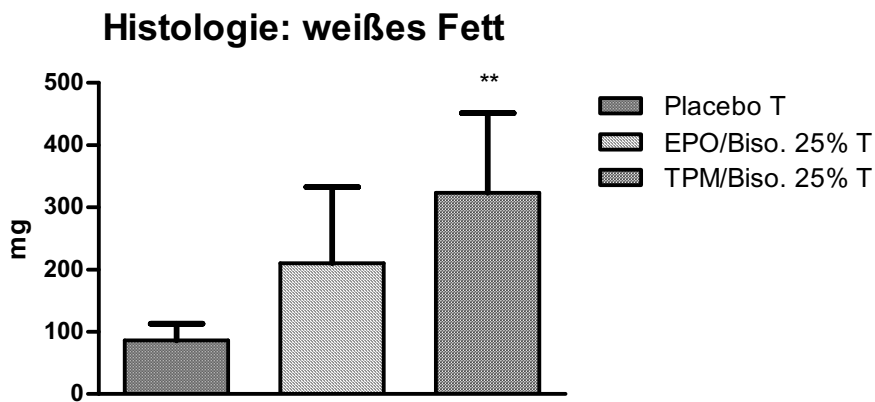


Abbildung 59 ANOVA P=0.0729 Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Histo: weißes Fett : 1324.00 ± 190.65)

Tabelle 5.5 Hämatokrit

	EPO/Biso 25%	TPM/Biso 25%
Anzahl der Tiere	15	12
Hämatokrit %	59,7	53,5

4.5.4 Erythropoetin / Bisoprolol 75% - Tissue Protective Molecule / Bisoprolol 75%

Der Vergleich der Kombinationstherapie von Erythropoetin/Bisoprolol mit TPM/Bisoprolol in einer Dosierung von 75% der jeweils effektiven Dosen ergab folgende signifikante Unterschiede:

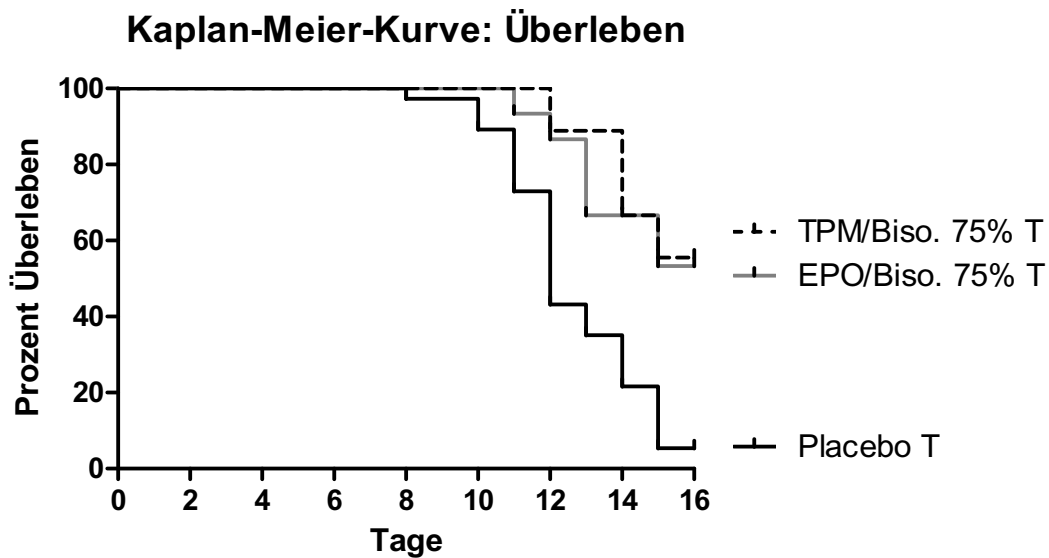


Abbildung 60 Log-Rank Test $P=0.0006$ *** Placebo T (AG Anker)
 Placebo – Kombi EPO: $P=0.0003$ *** Hazard Ratio=0.2700 95% CI=0.1317 – 0.5535
 Placebo – Kombi TPM: $P=0.0012$ ** Hazard Ratio=0.2588 95% CI=0.1142 – 0.5869
 Kombi EPO –
 Kombi TPM: $P=0.8392$ Hazard Ratio=1.140 95% CI=0.3217 – 4.040

TPM/Biso 75% T verlor tendenziell weniger Gewicht als EPO/Biso 75% T:

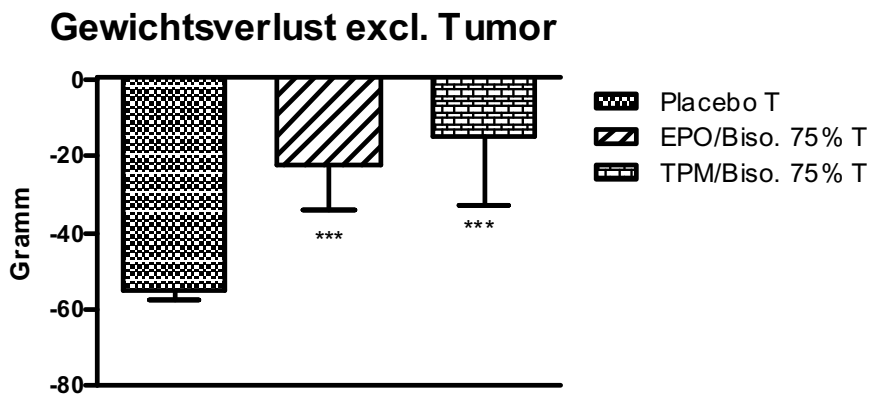


Abbildung 61 ANOVA $P=0.0003$ *** Placebo T (AG Anker)
 Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$
 (Placebo Sham – Gewichtszuwachs : 58.25 ± 3.40)

TPM/Biso 75% T verlor tendenziell weniger fettfreie Masse pro Tag als EPO/Biso 75% T:

NMR: Verlust an fettfreier Masse pro Tag

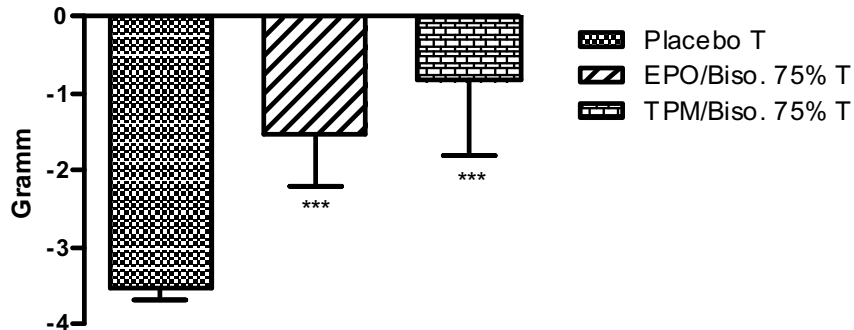


Abbildung 62 ANOVA $P < 0.0001$ *** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

(Placebo Sham – NMR: Zunahme an fettfreier Masse pro Tag : 2.73 ± 0.22)

TPM/Biso 75% T nahm tendenziell mehr Futter auf als EPO/Biso 75% T:

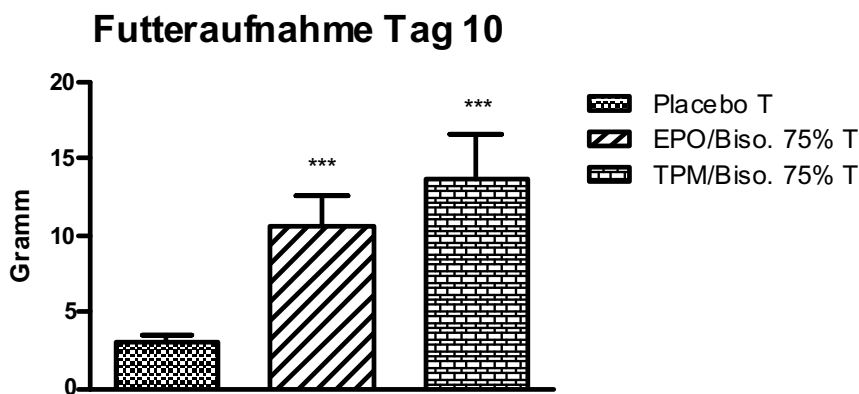


Abbildung 63 ANOVA $P < 0.0001$ *** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

(Placebo Sham – Futteraufnahme Tag 10 : 20.75 ± 1.08)

Es bestand die Tendenz zu einem höheren Gewicht des M. gastrocnemius in der TPM/Biso 75% T Gruppe:

Histologie: M. gastrocnemius

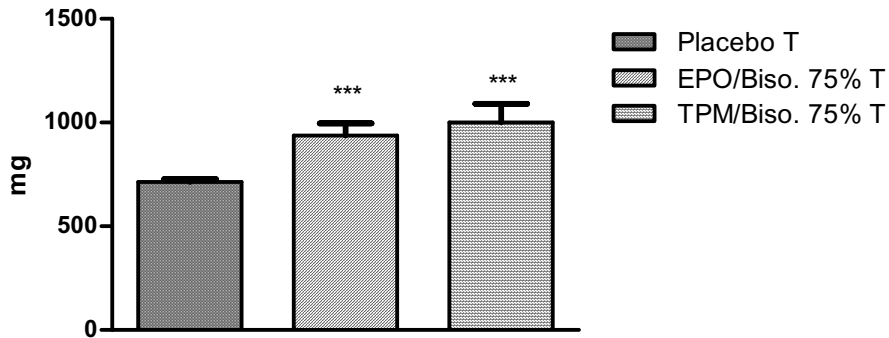


Abbildung 64 ANOVA $P < 0.0001$ *** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

(Placebo Sham – Histo: M. gastrocnemius : 1290.79 ± 40.00)

Das Herzgewicht der TPM/Biso 75% T Gruppe lag tendenziell über dem der EPO/Biso 75% T Gruppe:

Histologie: Herz

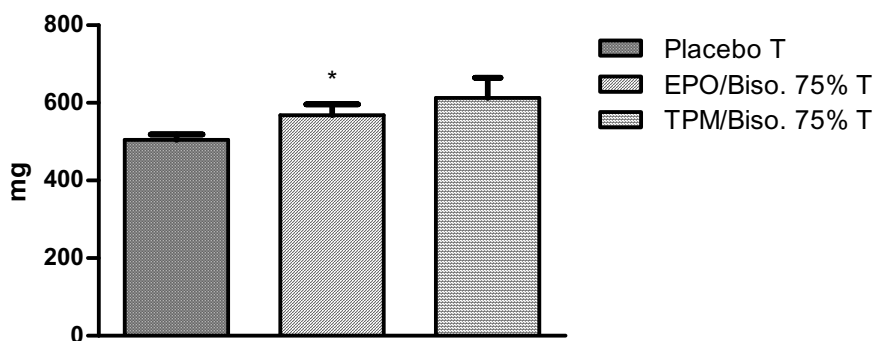


Abbildung 65 Kruskal-Wallis $P = 0.0419$ * Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

(Placebo Sham – Gewicht: Herz : 788.33 ± 19.77)

Es bestand die Tendenz zu einem höheren Gewicht der Leber in der TPM/Biso 75% T Gruppe:

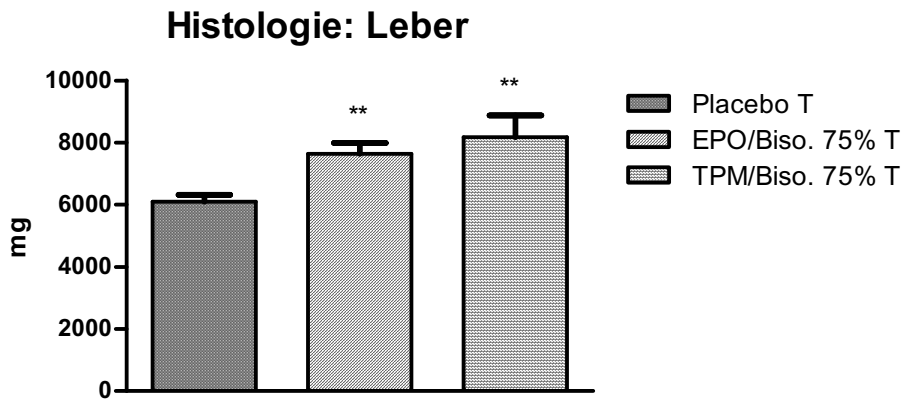


Abbildung 66 Kruskal-Wallis $P=0.0007$ *** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

(Placebo Sham – Histo: Leber : 10709.48 ± 456.27)

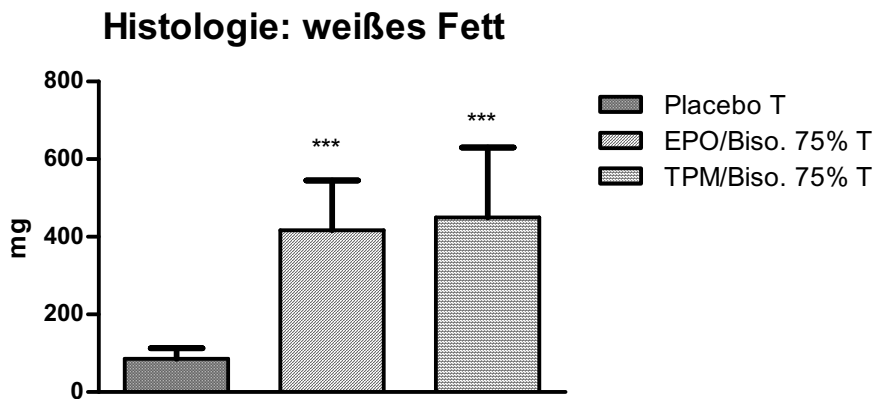


Abbildung 67 ANOVA $P=0.0014$ ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: $p<0.05$, **: $p<0.01$, ***: $p<0.001$

(Placebo Sham – Histo: weißes Fett : 1324.00 ± 190.65)

Das Gewicht des braunes Fettes war in der EPO/Biso 75% T Gruppe tendenziell höher als in der TPM/Biso 75% T Gruppe:

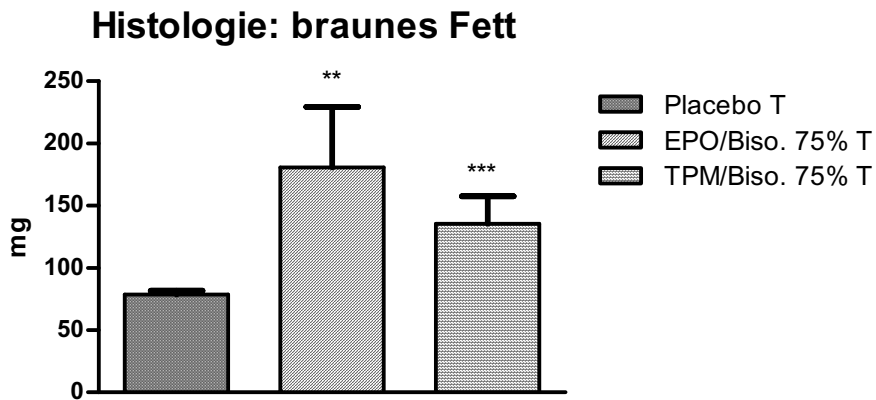


Abbildung 68 ANOVA P=0.0036 ** Placebo T (AG Anker)

Placebo T vs Behandlungsgruppen T (t-test) *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001

(Placebo Sham – Histo: braunes Fett : 218.26 ± 15.16)

Tabelle 5.6 Hämatokrit

	EPO/Biso 75%	TPM/Biso 75%
Anzahl der Tiere	15	9
Hämatokrit %	64,1	44,3

5. Diskussion

In dieser Studie wurden die Effekte von Erythropoetin oder TPM in Monotherapie sowie jeweils in Kombination mit Bisoprolol auf Ratten eines Tumor-Kachexie Modells getestet. Neben der Mortalität wurden vor allem Einflüsse auf Organgewichte, Aktivität und Herzfunktion untersucht.

5.1 Kachexiemodell

Das Yoshida AH-130 Hepatoma Modell an der Ratte ist bereits etabliert und hat sich als hervorragendes Modell für die Tumorkachexie herausgestellt. Es ist international weit verbreitet. Es führt bei der Ratte zu einer ausgeprägten Kachexie und zu hohen Konzentrationen an im Blut zirkulierenden proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α , IL-1 und IL-6 [104]. Die im Bereich kardialer Kachexie gewonnenen Daten zur Körperzusammensetzung können gegebenenfalls als Vergleichswerte hinzugezogen werden. Der Vorteil dieses Modells ist die große Reproduzierbarkeit des Tumors und des Verlaufs der Erkrankung, durch die eine geringere Variabilität auftritt und damit die benötigten Tierzahlen im Vergleich zu anderen Modellen zugunsten des Tierschutzes reduziert werden können.

5.2 Ergebnisse des Vergleichs von Placebo Sham gegen Placebo Tumor

Das Yoshida AH-130 Hepatoma bewirkt in der Ratte einen schnellen, progressiven Verlust an Körpergewicht und Gewebe, vor allem an Muskelgewebe [258]. Die Tumorzellen vermehren sich nach der Inokulation während der ersten sechs Tage exponential, mit einer Verdopplungszeit von einem Tag. Dann verlangsamt sich das Wachstum des Tumors und erreicht an Tag 8 eine stationäre Phase. In Versuchsreihen führte das Yoshida AH-130 Hepatoma bei 200 Gramm schweren Ratten 14-16 Tage nach Inokulation zum Tod [258]. In dieser Studie zeigte sich bei tumortragenden Ratten ein Rückgang des Körpergewichts, exklusive Tumor, auf 50% des Gewichts der

gesunden Kontrolltiere am Tag 10 des Versuchs. Der Gewichtsverlust verlief nicht linear. Das Gewicht des M. gastrocnemius machte an Tag 10 nur noch 37-40% des Gewichts beim gesunden Kontrolltier aus. Das Lebergewicht der Tumorgruppe zeigte nach einer kurzen Phase, in der es zu einem geringen Anstieg des Gewichts um 10-15% (Tag 4) kam, an Tag 10 einen Rückgang auf 80-85% des Lebergewichts der Kontrolltiere [258]. In einem Versuch, bei dem 100 Gramm schweren Wistar Ratten 10^7 Zellen des Yoshida AH-130 Hepatomas injiziert wurden, führte der Tumor bereits während der ersten sieben Tage zu einer deutlich geringeren Futtermittelaufnahme. Während die Ratten an Tag 0 noch etwa neun Gramm Futter aufnahmen, fraßen sie an Tag sieben nur noch weniger als sieben Gramm [259]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in weiteren Studien [104, 260]. Desweiteren kam es bei diesen Tieren zu einem deutlichen Rückgang des Gewichts des M. tibialis, gastrocnemius, soleus und vastus, die Werte betrug etwa 70% der Werte der gesunden Kontrollgruppe. Der Tumor verursachte auch einen Rückgang des Fettgewebes, die kachektischen Ratten zeigten zum Ende des Versuchs noch etwa 50% des weißen Fettes im Vergleich zur Kontrollgruppe und etwa 40% des braunen Fettes [259]. In diesem Versuch überlebten 26% der tumortragenden unbehandelten Tiere bis Tag 28 [259]. In einer Studie von Argiles et al. [261], in der fünf Wochen alten Wistar Ratten 10^8 Yoshida Hepatoma Zellen intraperitoneal verabreicht wurden, zeigte sich nach sieben Tagen ein Rückgang des Körpergewichts um 28% in der Tumorgruppe. Diese Tiere nahmen 20% weniger Futter auf als gesunde Kontrolltiere. Hier kam es zu einem deutlichen Rückgang der Muskelgewichte: Der M. gastrocnemius wog 30%, der M. EDL 29%, der M. tibialis 28% und der M. soleus 21% weniger als die entsprechenden Muskeln der Kontrolltiere. In einer weiteren Studie von Argiles et al. [262] kam es bei gleichem Versuchsaufbau zu einer um 34% geringeren Futtermittelaufnahme in der Tumorgruppe im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Der M. tibialis war um 35%, der M. gastrocnemius um 30%, der M. soleus um 29% und der M. EDL um 29% leichter als die entsprechenden Muskeln der gesunden Tiere. Das weiße Fett verringerte sich um 48%, das braune um 54%. Auch die Organe der Tumorgruppe waren deutlich leichter als die der gesunden: Das Gewicht der Leber war um 37%, das der Nieren um 29% geringer als bei der Kontrollgruppe. Das Herz war um 29% und die Milz um 70% leichter als bei den gesunden Tieren. Ein anderer Versuch [263] zeigte bei 200 Gramm schweren Wistar Ratten, denen 10^8 Tumorzellen des Yoshida Hepatoms injiziert wurden, einen Rückgang der Futtermittelaufnahme von 20 Gramm an Tag 0 auf 9 Gramm an Tag 10 des Versuchs. Das Körpergewicht der Tiere der Tumorgruppe betrug an Tag 10 nur noch

50% des Gewichts der Kontrolltiere, das Gewicht des M. gastrocnemius nur noch 41%. Das Herz der kranken Tiere wog an Tag 10 noch 56% des Gewichts dessen gesunder Tiere.

In unserem Versuch kam es durch die Inokulation des Tumors zu ähnlichen Effekten. Die Tiere der Tumorgruppe zeigten einen mittleren Gewichtsverlust von 4.74 ± 0.17 g pro Tag, was einem prozentualen Rückgang um 27% entspricht, während die Kontrolltiere 3.88 ± 0.23 g/d zunahmen. Tumortragende Tiere zeigten pro Tag einen Verlust an fettfreier Masse von -3.51 ± 0.15 g und einen Verlust an Fettmasse von -0.99 ± 0.05 g. Dies entspricht einem prozentualen Rückgang um 26% (fettfreie Masse) bzw. 65% (Fett) pro Tag. Ein großer Verlust an Körperfett, letztlich bis zu 85%, ist ein typisches Merkmal der Tumorkachexie [81] und zeigte sich hier sehr deutlich. Das mittlere Gewicht des weißen Fetts betrug bei der Organentnahme der tumortragenden Tiere in unserem Versuch nur noch 86.38 ± 26.43 mg, während gesunde Tiere der Sham Gruppe 1324.00 ± 190.65 mg weißes Fett aufwiesen. Dies entspricht sogar einem prozentualen Rückgang um 93%. Tiere der Tumorgruppe wiesen 78.59 ± 3.14 mg , gesunde Tiere 218.26 ± 15.16 mg braunes Fett auf. Hier zeigte sich ein Rückgang um 64%. Der Verlust an Muskelgewebe kann im fortgeschrittenen Stadium der Kachexie bis zu 75% betragen [26], dieser Verlust zeigte sich hier deutlich, aber weniger stark ausgeprägt als beim Fett. Das mittlere Gewicht der Muskeln zeigte in der Tumorgruppe deutliche Abweichungen zu denen der Kontrollgruppe: der M. gastrocnemius wog 713.22 ± 14.07 mg (-45% im Vergleich zur Kontrollgruppe), der M. tibialis wog 262.49 ± 6.10 (-44% im Vergleich zur Kontrollgruppe), der M. soleus wog 69.73 ± 1.43 (-30% im Vergleich zur Kontrollgruppe) und der M. EDL zeigte ein Gewicht von 63.66 ± 1.48 (-42% im Vergleich zur Kontrollgruppe).

Tiere der Tumorgruppe nahmen am Tag 10 des Versuchs im Durchschnitt 3.00 ± 0.51 Gramm Futter auf. Sie fraßen somit 86% weniger als die Tiere der Kontrollgruppe. Während die Aktivität gesunder Tiere im Laufe des Versuchs um 18% zurückging, was sich darauf zurückführen lässt, dass die Tiere beim ersten Aufenthalt im unbekanntem Lokomotor System deutlich aufgeregter und somit unruhiger waren als bei der zweiten Messung an Tag 10 des Versuchs, zeigten die Tiere der Tumorgruppe einen Aktivitätsrückgang um 71%. Ein so deutlicher Rückgang der Aktivität spricht für eine starke Einschränkung der Lebensqualität.

Während sich das Gewicht der Nebenniere bei den tumortragenden Tieren im Vergleich zu den gesunden um 22% erhöhte, was mit der Ermittlung erhöhter Plasmaspiegel von Adrenalin, Noradrenalin und Cortisol bei Patienten mit kardialer

Kachexie korreliert [12], zeigten alle anderen Organe deutlich geringere Gewichte als bei den gesunden Kontrolltieren: Das Herz war um 36%, die Lunge um 32%, die Leber um 43%, die Milz um 74% und die Nieren um 39% leichter als bei den gesunden Tieren. Diese Werte machen deutlich, dass auch die Organe in großem Ausmaß von der Kachexie betroffen sind. Sie zeigten eine große Ähnlichkeit mit den Werten, die in anderen Versuchen ermittelt wurden.

Die tumortragenden Tiere dieses Versuches zeigten eine durchschnittliche Überlebensdauer von 12.76 ± 0.33 Tagen bei einer Versuchsdauer von 16 Tagen. Die Überlebenszeit war hier deutlich kürzer als bei anderen Studien [258], die in unserem Versuch ermittelten Werte sprechen für einen sehr ausgeprägten Verlauf der Kachexie. Auch das Herz ist von der Kachexie betroffen. Es kam nicht nur zu einer Gewichtsreduktion des Herzens um 36% im Vergleich zum gesunden Kontrolltier, sondern auch zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Herzfunktion. Dies wird anhand der Echokardiographie Werte ersichtlich. Eine Herzinsuffizienz, wie sie hier beobachtet wurde, kann durch eine mesenteriale venöse Kongestion, durch ein Ödem der Darmwand und eine erhöhte Permeabilität zu einer bakteriellen Translokation und Endotoxin Absorption in die Blutbahn führen, was zu einer starken Entzündungsreaktion führt und damit das Fortschreiten der Kachexie begünstigt [264]. Die aus dem Ultraschall ermittelte Masse des linken Ventrikels betrug bei den Tieren der Tumorgruppe am Tag 11 im Mittel 401.74 ± 10.88 mg, während die Masse bei den gesunden 709.49 ± 50.17 mg ausmachte, somit war der linke Ventrikel der tumortragenden Tiere um 43% leichter. Auch das interventrikuläre Septum und die Hinterwand zeigten bei den Tieren der Tumorgruppe deutliche Veränderungen: An Tag 11 waren die in der Systole ermittelten Wanddicken beim Septum um 26%, bei der hinteren Wand um 35% geringer als bei den gesunden Sham Tieren. Der intraventrikuläre Durchmesser des linken Ventrikels war während der Diastole zwar um 14% kleiner als beim gesunden Tier, während der Systole aber um 28% größer, was auf eine verminderte systolische Funktion des Herzens hinweist, da dieses sich nicht mehr im gleichen Ausmaß wie beim gesunden Tier kontrahieren kann. Das Fractional Shortening (FS) zeigte beim tumortragenden Tier einen im Vergleich zum gesunden Tier um 46% verringerten Wert und zeigt so ebenfalls die geringere Kontraktilität.

Demzufolge zeigten sich bei den Tumor-Tieren auch Defizite in der Auswurfleistung: Das Herzminutenvolumen (CO) war bei diesen Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe um 63%, die Auswurffraktion pro Herzschlag (EF) um 37% verringert. Die Tumorkachexie, die hier durch das Yoshida AH-130 Hepatoma verursacht wurde,

führte also auch zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Herzfunktion und damit zu einer ausgeprägten Herzinsuffizienz.

Der Vergleich von Placebo Sham mit Placebo Tumor zeigte deutlich die kachektische Wirkung des im Versuch verwendeten Yoshida AH-130 Hepatoms. Die unbehandelte Tumorguppe eignet sich somit als Kontrollgruppe zur Ermittlung anti-kachektischer Effekte der im Versuch verwendeten Medikamente.

5.3 Ergebnisse des Vergleichs von Placebo Sham mit Erythropoetin Sham und Tissue Protective Molecule Sham

Die Verabreichung von EPO oder TPM in verschiedenen Dosierungen zeigte die Auswirkungen, die beide Medikamente auf gesunde Tiere haben. Neben einer ausgeprägten Splenomegalie, die bei allen EPO Dosierungen in Relation zur verabreichten Menge des Medikaments auftrat und die sich durch die hämatopoetische Wirkung des EPOs [166] und die dadurch hervorgerufene extramedullären Hämatopoese erklären lässt [265], zeigten Tiere, denen TPM verabreicht wurde, keine Veränderung in der Milzgröße. Die Verabreichung von 5000 IU/kg/d EPO führte zu einem mittleren Milzgewicht von 4083.64 mg, während gesunde Tiere der Kontrollgruppe ein Milzgewicht von 623.36 mg aufwiesen. Aber auch schon die niedrigste eingesetzte Dosierung von 100 IU/kg/d führte zu einer Erhöhung des Milzgewichts auf 1001.50 mg.

Die niedrigste verwendete Dosierung von EPO (100 IU/kg/d) führte neben der deutlichen Veränderung des Milzgewichts auch zu im Vergleich zur Kontrollgruppe geringeren Gewichten der einzelnen Muskeln mit Ausnahme des M. soleus. Es kam zu keinen signifikanten Änderungen in Gewichts- und Futteraufnahme oder der Aktivität.

Tiere, denen 500 oder 2500 IU/kg/d EPO verabreicht wurden, zeigten eine noch stärkere Gewichtsabnahme der Muskeln mit Ausnahme des M. soleus als die Tiere aus der 100 IU/kg/d EPO Gruppe. Es zeigte sich in diesen beiden Gruppen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant geringere Gewichtszunahme, die sich aus einer geringeren Zunahme an fettfreier Masse, nicht aber an Fett begründete. Weder weißes noch braunes Fett zeigten gegenüber der Kontrollgruppe verminderte Gewichte. Beide Gruppen zeigten eine unveränderte Aktivität, nahmen aber signifikant weniger Futter auf als gesunde unbehandelte Tiere. Es kam es zu einer Reduktion des Nierengewichts. Diese Veränderungen lassen darauf schließen, dass eine durch EPO

verursachte Erythrozytose in diesen Dosierungen negative Effekte auf Gewichtszuwachs und Lebensqualität zeigt [266].

Eine Verabreichung von 5000 IU/kg/d EPO zeigte negative Einflüsse auf fast alle erhobenen Parameter. Die Tiere nahmen deutlich weniger an Gewicht zu als die Tiere der Kontrollgruppe oder der anderen Behandlungsgruppen. Auch hier war in erster Linie die fettfreie Masse vom geringeren Zuwachs betroffen, es zeigte sich aber im Gegensatz zu allen anderen Gruppen auch eine verminderte Zunahme an Fett. Auch die Futterraufnahme war im Vergleich zur Kontrollgruppe um 24% reduziert, es kam allerdings zu keiner signifikanten Abnahme der Aktivität. Während alle anderen Dosierungen keinen Einfluss auf das Gewicht des Herzens nahmen, kam es in dieser Gruppe zu einer signifikanten Verminderung des Herzgewichts um 12% im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Niere war um 20% leichter als bei den Kontrolltieren. Während das Gewicht des weißen und braunen Fetts von den anderen Dosierungen kaum beeinflusst wurde, zeigten sich in dieser Gruppe deutliche Veränderungen: Das braune Fett war um 14%, das weiße sogar um 26% leichter als in der Kontrollgruppe. Ein hoch signifikanter Unterschied zwischen den Kontrolltieren und den Tieren, die mit 5000 IU/kg/d EPO behandelt wurden, zeigte sich bei den Gewichten der Muskeln. Alle Muskeln, auch der M. soleus, zeigten ein geringeres Gewicht als bei den gesunden unbehandelten Tieren. Die Verabreichung von EPO in einer solch hohen Dosierung an gesunde Tiere zeigte hier negative Auswirkungen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass EPO den Hämatokrit extrem erhöht, dadurch die Blutviskosität vermindert wird und der Blutdruck steigt [166], wodurch es zu einer enormen Belastung des Organismus kommt.

Die Verabreichung von TPM in beiden hier verwendeten Dosierungen zeigte nur geringe Effekte. So führte eine Gabe von 0.17 µg/kg/d TPM zu einer mäßigen Verringerung des Gewichts von Lunge, Niere, Nebenniere und M. tibialis sowie einer Erhöhung des Gewichts des braunen Fetts im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Verabreichung von 1.7 µg/kg/d TPM führte zu im Vergleich zur Kontrollgruppe zu niedrigeren Gewichten von Leber, Nebenniere sowie der Muskeln mit Ausnahme des M. soleus.

Bei beiden Dosierungen zeigten sich keine signifikanten Auswirkungen auf Gewichtszunahme, Futterraufnahme oder Aktivität.

Alle Dosierungen von EPO sowie die niedrige Dosierung von TPM zeigten keine wesentlichen Auswirkungen auf die Herzfunktion.

Tiere, denen 1.7 µg/kg/d TPM verabreicht wurde, zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe einige Abweichungen in der Herzfunktion: Sowohl FS als auch EF waren an Tag 11 deutlich geringer als bei den Kontrolltieren oder den Tieren aller anderen Behandlungsgruppen. Die Masse des linken Ventrikels war an Tag 11 deutlich kleiner als bei allen anderen Gruppen und auch die Hinterwand des linken Ventrikels war dünner. Somit zeigte sich durch die hohe Medikation an TPM ein negativer Einfluss auf die Herzfunktion bei gesunden Tieren.

5.4 Ergebnisse des Vergleichs von Placebo mit Erythropoetin und Tissue Protective Molecule

In diesem Versuch sollten mögliche antikachektische Einflüsse verschiedener Dosierungen von EPO oder TPM auf Ratten des Yoshida AH-130 Hepatoma Modells untersucht werden. Versuche anderer Arbeitsgruppen, die antikachektische Effekte verschiedener Medikamente in diesem Tumormodell untersuchten, weisen unterschiedliche Rahmenbedingungen auf, weshalb ein direkter Vergleich der erhobenen Werte nur begrenzt möglich ist. Es wurden bisher keine Studien angefertigt, die eine zytoprotektive Wirkung von EPO (wird bei Tumorpatienten gegen Anämie eingesetzt) oder nicht hämatopoetisch wirksamen EPO Derivaten auf Ratten des Yoshida AH-130 Hepatoma Modells oder andere Tumormodelle untersuchten. Zum Vergleich stehen lediglich Studien zur Verfügung, die zytoprotektive Einflüsse von EPO und Derivaten bei anderen Indikationen wie Herzinfarkt, Schlaganfall oder anderen Erkrankungen untersuchten.

In diesen Studien konnte durch die Verabreichung von EPO eine Aktivierung der Zytoprotektion, eine Reduktion der Entzündungsreaktion, ein Schutz der Gefäße und die Mobilisierung von Stammzellen, einschließlich der Proliferation und Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen nachgewiesen werden. In verschiedenen Studien zum myokardialen Infarkt am Nagetier-Modell schützte eine Verabreichung von EPO die Kardiomyozyten vor Apoptose und verringerte das Ausmaß des Infarkts. Demzufolge könnte EPO auch bei den verschiedenen Formen der Herzinsuffizienz einen positiven Effekt zeigen, indem es zum einen vor der Apoptose schützt, zum anderen endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mobilisiert und einen anti-hypertrophen Effekt zeigt [267].

Miller et al. [268] wiesen erstmals nach, dass die Konzentration an zirkulierendem EPO bei vielen erwachsenen Krebspatienten sehr niedrig ist. EPO wird bei Krebspatienten eingesetzt, um den Hämoglobinwert in einer Höhe zu halten, die keine Transfusionen notwendig macht, um die Leistungsfähigkeit zu verbessern, die Erschöpfung zu verhindern und die Parameter der Lebensqualität zu verbessern [269-271]. Außerdem scheint die anti-anämische Behandlung mit EPO sich positiv auf den Ausgang von Bestrahlung und Chemotherapie auszuwirken [272]. Eine hämatopoetische Stimulation von anämischen Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz verbessert die Herzfunktion und die Leistungsfähigkeit [273, 274].

In dieser Studie war es nicht möglich, die durch EPO erzielten positiven Effekte allein auf die hämatopoetische oder die zytoprotektive Wirkungsweise des Medikaments zurückzuführen. Durch den Vergleich mit TPM, das keine hämatopoetische Wirksamkeit aufweist, konnte aber eine gewisse Abgrenzung erfolgen. Es sind viele Studien zu finden, in denen der Einfluss einer andauernden Verabreichung von EPO an Patienten untersucht wurde, im Gegensatz dazu gibt es fast keine Studien, die den zytoprotektiven Effekt einer akuten EPO Verabreichung untersuchten [204]. Eine Ausnahme stellt ein Versuch dar, bei dem EPO beim Schlaganfall des Menschen verabreicht wurde. In dieser Studie wurde EPO in der Dosis von 100000 IU/kg/d intravenös und über drei Tage verteilt verabreicht und verursachte eine Verbesserung des vorläufigen klinischen Ausgangs bei Patienten mit einem Infarkt der mittleren zerebralen Arterie ohne jeglichen Anstieg der Hämoglobinkonzentration [198].

Die Behandlung der Ratten mit EPO und TPM zeigte in vielen untersuchten Parametern positive Effekte. Dies entspricht den Ergebnissen aus anderen Studien, in denen ein zytoprotektiver Effekt von EPO bei Organ- und Gewebeschädigungen im Allgemeinen nachgewiesen wurden [204, 275].

5.4.1 Überlebenszeitraum und Tumorgroße

Eine Verlängerung der Überlebenszeit zeigte sich auch in einer Studie, in der eine niedrige Dosis von EPO, die zu keiner Erhöhung des Hämatokrits führte, über einen längeren Zeitraum an Ratten, denen 5/6 der Nieren entfernt worden waren, verabreicht wurde. Nach 6 Wochen lebten hier noch 63% der mit EPO behandelten Tiere, während nur noch 23% der unbehandelten Tiere am Leben waren [276]. Außerdem zeigten die mit EPO behandelten Tiere eine geringere Schädigung des Endothels und eine

bessere Nierenfunktion. Mäusen, denen ein Kolon 26 Adenokarzinom injiziert worden war, zeigten an Tag 14 bis 16 nach Inokulation eine deutlich höhere Überlebensrate in der mit EPO (100 IU/kg/d) behandelten Gruppe als in der unbehandelten [277].

Ein signifikant geringeres Tumolvolumen als bei Placebo zeigte sich in den Gruppen TPM 0.17, EPO 5000 und besonders EPO 2500. Sogar in diesen extrem hohen Dosierungen zeigte sich in diesem Tumormodell kein begünstigender Einfluss von EPO auf das Tumorstadium, wie er bei anderen Tumoren beschrieben wurde [211, 212]. Der hier verwendete Tumor scheint keine EPO Rezeptoren auszubilden, da keine Anzeichen einer wachstumsbegünstigenden Wirkung auf den Tumor zu erkennen waren, wurde hier auf einen Nachweis von EPO Rezeptoren verzichtet.

Eine Erhöhung der Tumorzellzahl, die jedoch nicht signifikant war, zeigte sich lediglich in der Gruppe EPO 100, es kam jedoch im Vergleich zu Placebo zu keiner Vergrößerung des Tumolvolumens.

5.4.2 Gewichtsverlust

Alle verwendeten Medikationen wirkten dem durch den Tumor verursachten Gewichtsverlust, wie er beim unbehandelten Tier zu sehen war, entgegen, konnten aber auch keinen Gewichtszuwachs, wie er beim gesunden wachsenden Tier stattfindet (3.88 ± 0.23 g/d), herbeiführen. Vor allem EPO 100 (-2.51 ± 0.72 g/d), EPO 2500 (-2.35 ± 0.77 g/d) und TPM 1.7 (-2.24 ± 0.73 g/d) führten zu einem im Vergleich zur Placebo Gruppe deutlich geringeren mittlerem Gewichtsverlust pro Tag. In einem Versuch, in dem Mäuse, denen ein Kolon 26 Adenokarzinom injiziert worden war, mit 100 IU/kg EPO behandelt wurden, zeigte sich an Tag 12 bei den mit EPO behandelten Tieren ein deutlich höheres Körpergewicht als bei unbehandelten. Während die unbehandelte Gruppe einen Gewichtsverlust von 19% zeigte, machte dieser in der mit EPO behandelten Gruppe nur 12% aus. Zwischen beiden Gruppen zeigte sich kein Unterschied im Bezug auf Tumorstadium oder Futteraufnahme [277].

Ebenso zeigten alle Behandlungsgruppen einen geringeren Verlust an Fett und vor allem an fettfreier Masse als Placebo. Dies zeigt sich wiederum vor allem in den Gruppen EPO 100, EPO 2500 und TPM 1.7. EPO 100 verlor pro Tag 46% weniger fettfreie Masse und 36% weniger Fett als Placebo, EPO 2500 verlor 50% weniger fettfreie Masse und 34% weniger Fett als Placebo und TPM 1.7 verlor 54% weniger fettfreie Masse und 33% weniger Fett als Placebo. EPO 500 und EPO 5000 zeigten

hier ebenfalls positive Einflüsse, diese fielen aber weniger deutlich aus als bei den beiden anderen Dosierungen, was sich bei einer Dosierung von 5000 IU/kg/d durch die übermäßige Belastung des Organismus aufgrund des stark erhöhten Hämatokrits und Blutdrucks erklären lässt.

Lediglich TPM 0.17 zeigte in diesen Parametern keine signifikanten Verbesserungen, aber doch einen positiven Trend.

5.4.3 Futtermittelaufnahme

Auch bei der Futtermittelaufnahme zeigte sich bei allen Gruppen eine signifikante Verbesserung gegenüber der Placebo Gruppe, nur bei TPM 0.17 war wieder lediglich ein positiver Trend erkennbar. Vor allem EPO 100 (7.85 ± 1.66 Gramm) und TPM 1.7 (9.92 ± 2.82 Gramm) nahmen an Tag 10 des Versuchs deutlich mehr Futter auf als Placebo (3 ± 0.51 Gramm), dennoch zeigte sich eine enorme Differenz zu der Futtermittelaufnahme eines gesunden Tieres von 20.75 ± 1.08 Gramm pro Tag. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich in einer Studie, in der HBP, das wie TPM ebenfalls ein Fragment von EPO darstellt, an Ratten mit einem Verschluss der mittleren zerebralen Arterie verabreicht wurde. Neben einem reduzierten Ausmaß des Infarkts kam es hier in der Behandlungsgruppe zu einer im Vergleich zu Placebo deutlich gesteigerten Futtermittelaufnahme. Während unbehandelte Tiere 24.6 ± 2 Gramm weniger Futter aufnahmen als gesunde, waren es in der Gruppe, die einmalig mit HBP behandelt wurde 16.4 ± 2 Gramm weniger und in der Gruppe, die vier mal HBP erhielt, sogar nur 14.5 ± 0.9 Gramm weniger als bei gesunden Tieren [227].

5.4.4 Aktivität

Ähnliches zeigt sich bei der Messung der Aktivität an Tag 10. Bis auf TPM 0.17, wo sich wieder nur ein positiver Trend zeigte, wiesen alle anderen Behandlungsgruppen einen signifikant geringeren Aktivitätsverlust auf als Placebo. Die Behandlung verlängerte also nicht nur die Lebenszeit, sondern erhöhte offensichtlich ebenfalls die Lebensqualität der Tiere, was anhand der geringeren Gewichtsverluste, der erhöhten Futtermittelaufnahme und größeren Aktivität ersichtlich wurde. Die besten Ergebnisse wurden bei EPO in den Dosierungen 100 und 2500 IU/kg/d und bei TPM in der

Dosierung 1.7 µg/kg/d erreicht. Es besteht eine deutliche Korrelation zwischen der Hämoglobinkonzentration und der Lebensqualität bei Krebspatienten [149, 278, 279]. Eine Verbesserung der Leistungsfähigkeit und der Lebensqualität kann bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz oder anderen Erkrankungen, die zu einer Anämie führen, durch EPO erreicht werden, indem es zu einer Erhöhung des Hämatokrits und damit zu einer besseren Sauerstoffversorgung der einzelnen Gewebe kommt [274]. Allerdings zeigten sich hier auch in der TPM 1.7 Gruppe deutliche Verbesserungen, was darauf schließen lässt, dass diesen Verbesserungen zumindest teilweise ein zytoprotektiver Mechanismus zugrunde liegt.

5.4.5 Organgewichte

Auch auf die Organgewichte zeigten alle hier verwendeten Medikationen positive Einflüsse. Das Yoshida 130-AH Hepatom führt zu einer andauernden Entzündungsreaktion, in der es charakteristischerweise zu einer Produktion von Zytokinen, wie etwa TNF α , IL-1 β , IL-6, IFN γ und CNTF und zu einer APR kommt. Katecholamine und Zytokine stimulieren die Produktion von freien Radikalen, die sowohl oxidativen Stress als auch die Expression von iNOS induzieren [280]. EPO wie auch TPM antagonisieren die Aktivität dieser proinflammatorischen Zytokine und können so Organe schützen [204]. Ebenso können EPO und TPM in zahlreichen Organen und Geweben vor Schäden schützen, die durch eine permanente oder vorübergehende Ischämie entstehen [204]. EPO schützt vor hochreaktiven freien Radikalen, die als Nebenprodukte des zellulären Metabolismus unter solchen hypoxischen Bedingungen entstehen, wie sie auch im Rahmen der Tumorkachexie auftreten [282]. Beim Herzgewicht zeigte sich in den Gruppen EPO 5000 und TPM 0.17 ein positiver Trend, in allen anderen Gruppen kam es zu signifikant höheren Herzgewichten als bei Placebo. So zeigte sich in der Gruppe EPO 2500 das höchste Herzgewicht unter den Behandlungsgruppen, welches nur 21% unter dem Gewicht eines gesunden Tieres lag, während das Herz der Placebo Tiere im Mittel 36% weniger wog als das Herz eines gesunden Tieres. Bei EPO könnte eine Erhöhung der Erythrozytenanzahl, die so auch in einigen Studien zur myokardialen Verletzung beobachtet wurde, zum Schutz des Herzens beitragen [283], allerdings zeigte sich der schützende Effekt auch bei TPM 1.7. So weisen auch einige Studien darauf hin, dass EPOs kardioprotektiver Effekt nicht von der Erythrozytenerhöhung abhängt. So zeigte

sich EPO, das lediglich einmalig verabreicht wurde, schon zu einer Zeit aktiv, zu der noch keine Erhöhung der Erythrozytenzahl auftritt [284]. Isolierte Kardiomyozyten ebenso wie isolierte perfundierte Herzen, die mit EPO in Kontakt gebracht wurden, zeigen sich gegenüber der Hypoxie widerstandsfähiger [283, 285, 286]. Außerdem zeigen EPO-Derivate wie CEPO, denen jegliche hämatopoetische Aktivität fehlt, ebenfalls gewebesetzende Funktionen [235] und einen kardioprotektiven Effekt sowohl bei der permanenten Ischämie [287] als auch bei Ischämie mit anschließender Reperfusion [288].

Die Lunge war in den Gruppen EPO 2500 und EPO 5000 deutlich schwerer als bei Placebo oder den anderen Behandlungsgruppen, auch in den beiden niedrig dosierten EPO Gruppen zeigte sich eine Erhöhung des Lungengewichts. Auch die Leber war in den Gruppen EPO 2500 und 5000 sowie in der Gruppe TPM 1.7 im Gegensatz zu Placebo stark vergrößert. In der Studie von Kanazaki et al. zum Einfluss von EPO auf Mäuse mit dem Kolon 26 Adenokarzinom zeigt sich ebenfalls eine im Vergleich zu Placebo deutlich vergrößerte Leber. Sie erreichte ein Gewicht, das 66% des Lebergewichts eines gesunden Tieres entspricht, während die unbehandelte Gruppe nur 58% ausmachte [277]. Durch die hämatopoetische Wirkung von EPO kommt es dosisabhängig bei allen Dosierungen zu einer massiven Vergrößerung der Milz, diese fiel demzufolge in den Dosierungen EPO 2500 und 5000 extrem aus, hier wog die Milz in beiden Fällen im Mittel mehr als 1500 mg im Gegensatz zu einem Milzgewicht von 163.64 ± 10.01 mg bei Placebo und einem Milzgewicht von 623.36 ± 30.05 mg beim gesunden Tier. Doch auch in den TPM Gruppen zeigte sich gegenüber Placebo eine signifikante Vergrößerung der Milz, da dieses Medikament jedoch keine hämatopoetische Wirkung besitzt, fiel die Vergrößerung weit weniger stark aus. So wog die Milz bei TPM 0.17 im Mittel 265.74 ± 67.21 mg, bei TPM 1.7 299.75 ± 41.51 mg. Derselbe Effekt auf die Milz zeigte sich auch in der Studie von Kanazaki et al., in der EPO an Mäuse mit einem Kolon 26 Adenokarzinom verabreicht wurde. Hier macht das Milzgewicht der mit EPO behandelten Tiere 450% des Gewichts der Milz eines gesunden Kontrolltieres aus [277]. Eine signifikante Vergrößerung der Nieren zeigte sich nur bei der Behandlung mit EPO 5000 IU/kg/d, hier wog die Niere 776.36 ± 18.85 mg und entsprach damit 68% des Nierengewichts eines gesunden Tieres, während die Niere bei Placebo nur 61% des normalen Nierengewichts entsprach. Allerdings war auch in den anderen Behandlungsgruppen der Trend zu einem höheren Nierengewicht erkennbar. Eine Expression von EPOR konnte sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen auf der kompletten Niere einschließlich der proximalen und distalen

Tubuluszellen nachgewiesen werden, allerdings weisen diese Rezeptoren nur eine geringe Affinität zu EPO auf, die weit unter dem normalen Plasmaspiegel von EPO liegt [190]. Diese geringe Affinität könnte erklären, warum erst die extrem hohe Dosierung von EPO 5000 IU/kg/d zu einem gewissen Schutz der Niere führte. So konnte auch in anderen präklinischen Modellen, in denen EPO in hohen Dosierungen von 300 bis 5000 IU/kg/d intraperitoneal verabreicht wurde, ein Schutz vor durch Ischämie bedingten Schädigungen erzielt werden, was anhand der Nierenfunktion und histologischer Marker nachgewiesen werden konnte [207]. Dieser Schutz resultiert aus der starken Unterdrückung der Entzündungsreaktion und der reduzierten Produktion proinflammatorischer Zytokine, die durch EPO erreicht wird. In weiteren Studien konnte EPO die Niere ebenfalls vor Toxinen wie Cyclosporin und Cisplatin schützen [207]. Bei all diesen akuten Studien kam es zu keinem Anstieg der Hämoglobinkonzentration, so dass sich hier nur der direkte zytoprotektive Effekt EPOs auf die Niere zeigte [207]. Die Verabreichung einer niedrigen Dosis von Darbopoetin an teil-nephrektomierte Ratten führte zu einem geringeren endothelialen Schaden und einer verbesserten Nierenfunktion [276]. In einem Versuch mit Mäusen, bei denen eine Ischämie der Niere mit anschließender Reperfusion erzeugt worden war, führte die Verabreichung von pHBSP, das wie TPM ein Fragment von EPO darstellt, zu einem dosisabhängigen nierenschützenden Effekt [227]. Sowohl EPO als auch CEPO konnten durch eine reduzierte Entzündungsreaktion sowie eine verminderte interstitielle Fibrose und tubuläre Apoptose den durch eine Obstruktion der Urethra verursachten Gewebeschaden bei Ratten deutlich begrenzen [289].

Auf das Gewicht der Nebenniere zeigten sich durch keine der Medikationen signifikante Auswirkungen, alle Werte (30.34 ± 1.63 mg bis 35.99 ± 2.66 mg) lagen leicht über dem Wert eines gesunden Tieres (28.65 ± 0.96 mg).

5.4.6 Fett

In beiden TPM Gruppen sowie bei EPO 100 kam es zu signifikant erhöhten Werten beim weißen Fett. Während die Placebo Gruppe im Mittel nur 86.38 ± 26.43 mg weißes Fett besaß, hatte EPO 100 329.67 ± 116.78 mg, TPM 0.17 hat 342.49 ± 128.65 mg und TPM 1.7 sogar 486.69 ± 121.40 mg weißes Fett. Dies waren im Vergleich zu Placebo deutliche Steigerungen, es zeigte sich aber dennoch ein großer Unterschied zum Wert eines gesunden Tieres, der bei 1324.00 ± 190.65 mg lag. Allein in der

Gruppe EPO 5000 zeigte sich gegenüber Placebo keine Erhöhung des Fettgewichts, sondern sogar eine geringfügige Verschlechterung. In der Studie von Kanazaki et al. [277] zum Einfluss von EPO auf Mäuse mit dem Kolon 26 Adenokarzinom zeigte sich ebenfalls ein positiver Effekt auf den Erhalt des Fettgewebes. Hier wiesen gesunde Tiere an Tag 10 des Versuchs ein Fettgewicht von 160 mg auf, wohingegen unbehandelte tumortragende Tiere nur noch 10 mg weißes Fett hatten. Tiere, denen 100 IU/Tag EPO verabreicht wurde, zeigten ein Fettgewicht von 50 mg und zeigten somit ähnliche Verbesserungen wie die Tiere im hier vorliegenden Versuch.

Beim braunen Fett zeigte sich in allen Behandlungsgruppen eine Verbesserung gegenüber Placebo (78.59 ± 3.14 mg), signifikant fiel diese in den Gruppen EPO 500 (100.67 ± 9.47 mg) und EPO 5000 (92.64 ± 7.53 mg) sowie in beiden TPM Gruppen (103.27 ± 17.40 mg bzw. 97.79 ± 10.06 mg) aus. EPO 500 erreichte hier den besten Wert, das Gewicht des braunen Fettes lag hier 54% unter dem Wert eines gesunden Tieres, während es bei Placebo 64% darunter lag. Im Hinblick auf den Erhalt der Fettmasse zeigte die Behandlung mit EPO 100 IU/kg/d sowie mit TPM 0.17 und vor allem TPM 1.7 insgesamt den größten positiven Effekt.

5.4.7 Muskeln

Deutliche durch die Therapie verursachte Effekte zeigten sich auch auf die Gewichte der Muskeln. Während EPO 5000 nur einen sehr geringen Einfluss auf die Veränderung der Muskelgewichte zeigte und nur beim M. gastrocnemius zu einer signifikanten Gewichtserhöhung gegenüber Placebo führte, zeigten die anderen Behandlungsgruppen im Vergleich zu Placebo signifikante Gewichtserhöhungen aller Muskeln. Alle Medikationen führten zu signifikanten Gewichtserhöhungen des M. gastrocnemius, den positivsten Effekt erzielte EPO 100 mit 854.53 ± 41.64 mg im Vergleich zu 713.22 ± 14.07 mg bei Placebo. Damit wog der M. gastrocnemius in dieser Gruppe 34% weniger als beim gesunden Vergleichstier, während der M. gastrocnemius des unbehandelten Placebo Tiers 45% weniger wog als der des gesunden. In der Studie von Kanazaki et al. [277] zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Hier wog der M. gastrocnemius beim unbehandelten tumortragenden Tier 65% weniger als beim gesunden Kontrolltier, in der mit 100 IU/Tag EPO behandelten Gruppe waren es nur 35% weniger als beim gesunden Tier.

Beim M. tibialis kam es in allen Behandlungsgruppen mit Ausnahme von EPO 5000 zu signifikanten Gewichtserhöhungen, eine besonders deutliche Verbesserung zeigte sich bei EPO 2500 mit einem Wert von 309.97 ± 20.07 mg im Vergleich zu Placebo mit 262.49 ± 6.10 mg. Somit lag der Wert von EPO 2500 34%, der Wert von Placebo 44% unter dem mittleren Wert der Sham Gruppe. Eine signifikante Gewichtserhöhung des M. soleus zeigte sich bei den Gruppen EPO 100 (77.06 ± 2.88 mg), EPO 2500 (78.61 ± 3.32 mg) und TPM 0.17 (78.85 ± 5.35 mg), bei den anderen Gruppen war ein positiver Trend zu verzeichnen. Allerdings bestand auch in diesen Gruppen noch eine große Differenz zum mittleren Gewicht des M. soleus bei gesunden Tieren (100.07 ± 3.00 mg). Der M. EDL zeigte den größten Gewichtsanstieg in der Gruppe EPO 100 (75.39 ± 2.97 mg), aber auch in den Gruppen EPO 500, EPO 2500 und TPM 0.17 kam es zu signifikanten Verbesserungen. Somit lag das Gewicht des M. EDL in der Gruppe EPO 100 31%, der von Placebo 42% unter dem mittleren Wert aus der gesunden Sham Gruppe.

Durch die Behandlung mit EPO in allen Dosierungen mit Ausnahme von EPO 5000 konnte deutlich mehr Muskelmasse erhalten werden als bei unbehandelten Tieren. Dies galt ebenfalls für TPM, wo sich in der niedrigen Dosierung ein stärkerer positiver Effekt zeigte als in der hohen.

Unter Berücksichtigung aller erhobenen Parameter zeigen sich die besten Ergebnisse in den Gruppen EPO 100, EPO 2500 und TPM 1.7.

5.4.8 Herzfunktion

Auf die Herzfunktion lassen sich durch die Medikation bedingt positive Effekte erkennen. Van der Meer et al. [290] verabreichten nach myokardialem Infarkt über einen Zeitraum von 9 Wochen alle 3 Wochen EPO, was zu einer Neovaskularisation und zu einer verbesserten Herzfunktion führte. Nishiya et al. [291] berichteten über eine Verbesserung der Hämodynamik und der Herzfunktion nach vierwöchiger EPO Verabreichung, die sich in einer verstärkten Angiogenese und reduzierter Apoptose-rate im Myokard manifestierte.

EPO oder TPM vermitteln einen Schutz des Herzens durch verschiedene Signalwege, von denen jeder einzelne nicht ersetzbar ist. Für einen vollständigen Schutz müssen all diese Signalwege intakt sein [292]. Ein Signalweg, der den Schutz von Kardiomyozyten vermittelt, ist das JAK-STAT System. Dieser das Zell-Überleben fördernde Signalweg

stellt einen möglichen Mechanismus für den herzschtützenden Effekt EPOs dar und wurde beim isolierten Kaninchenherzen anhand der Phosphorylierung und Aktivierung von Jak1/2, STAT3 und STAT5 nachgewiesen [293].

EPO wirkt ebenfalls über den Phosphatidylinositol (PI)3-Kinase Signalweg und führt hier zu einer Aktivierung von Akt. Akt phosphoryliert Bad und stabilisiert so das mitochondriale Membranpotential und verhindert die Freisetzung von Cytochrome C [294]. Eine von EPO ausgelöste Aktivierung des PI 3-Kinase Signalwegs in vivo wurde beim Kaninchen [293] und bei der Ratte [286] nachgewiesen und ist verantwortlich für einen Anstieg der Akt Aktivität und Reduktion der myokardialen Apoptose und Caspase-3 Aktivierung, die durch Ischämie und anschließende Reperfusion im isolierten, künstlich durchbluteten Rattenherz ausgelöst wurde. EPO vermittelt außerdem über eine Aktivierung der Protein-Kinase C einen Anstieg an intrazellulärem freiem Calcium bei einer Anzahl von Zellen, so zum Beispiel bei Erythroblasten [295], Nervenzellen [296] und Kardiomyozyten [297]. Dieser Signalweg wurde an isolierten Kaninchenherzen nachgewiesen und zeigt sich, indem es zur Aktivierung von Ca^{2+} und K^+ Kanälen führt, ebenfalls am Schutz des Herzens beteiligt [298]. Der Mitogen aktivierte Protein Kinase (MAPK) Signalweg ist besonders wichtig für Überleben, Wachstum und Differenzierung von Zellen. Es wurde gezeigt, dass EPO am Herzen den Raf-MAPK Signalweg aktiviert, was zur Zytoprotektion führt [292]. NFκB ist ein Haupt-Regulator der Entzündungsreaktion infolge einer Verletzung, es wurde gezeigt, dass NFκB infolge einer myokardialen Ischämie ansteigt [299]. EPO und dessen nicht hämatopoetisch wirksamen Derivate wie TPM zeigen starke antiinflammatorische Effekte [300], so auch am von einer Ischämie betroffenen Herzen [301]. Eine Verabreichung von EPO in einer einzelnen Dosis 24 Stunden vor dem Herbeiführen der Ischämie und Reperfusion konnte in hohem Maße die Höhe an NFκB wie auch an AP-1, einem weiteren wichtigen Mediator der Entzündung, verringern. Es zeigte sich in dieser Studie eine deutliche Unterdrückung der proinflammatorischen Zytokine TNFα und IL-6 und ein Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 [301]. All diese Mechanismen könnten auch in der hier vorliegenden Studie zum Tragen kommen und zu einem gewissen Schutz des Herzens führen, es erfolgten allerdings keine Nachweise.

Ein weiterer Effekt von EPO, der vermutlich auch in dieser Studie zum Schutz des Herzens beitrug, ist der Einfluss auf die Reaktivität der glatten Muskulatur und auf die mitotische Aktivität, die den regionalen Blutfluss verändern und direkt die Stickstoffmonoxidproduktion beeinflussen könnte [302]. Somit könnte der durch EPO

erreichte Schutz des Herzens auch zum Teil auf der Verbesserung des kardialen Blutflusses beruhen [267].

Alle eingesetzten Dosierungen führten in unterschiedlichem Maße zu Verbesserungen, wobei TPM in der Dosierung von 0.17 µg/kg/d die wenigsten positiven Ergebnisse zeigte. Hier zeigte sich lediglich eine signifikante Erhöhung der Dicke des interventrikulären Septums in der Systole sowie eine größere Masse des linken Ventrikels im Vergleich zu Placebo. Bei allen anderen Parametern war zumindest ein positiver Trend erkennbar.

Eine signifikante Erhöhung der FS an Tag 11 zeigte sich in den Gruppen EPO 500 (37.4 ± 2.2 %), EPO 2500 (36.3 ± 2.6 %) und TPM 1.7 (38.8 ± 3.8 %), während sich in den übrigen Gruppen zumindest ein positiver Trend abzeichnete. Placebotiere zeigten hier einen mittleren Wert von 28.13 ± 2.23 %, gesunde Tiere der Kontrollgruppe hingegen hatten ein FS von 51.84 ± 1.97 %. In einer anderen Studie an Ratten, bei denen ein myokardialer Infarkt induziert worden war, zeigte sich eine Erhöhung des FS bei den Tieren, die wiederholt mit niedrigen Dosen EPO (750 IU/kg) behandelt wurden (26.9 %), während unbehandelte (17.8 %) oder mit hohen Dosierungen behandelte Tiere (19.5 % bei einmaliger EPO Gabe bzw. 22.3 % bei wiederholter hochdosierter EPO Gabe) einen Rückgang des FS zeigten [303].

Die EF lag bei gesunden Tieren an Tag 11 bei 77.22 ± 3.33 %, bei unbehandelten Tieren der Placebo Gruppe nur bei 48.94 ± 2.77 %. Es zeigte sich bei allen verwendeten Dosierungen ein positiver Effekt auf die EF, eine signifikante Verbesserung wurde in den Gruppen EPO 500 (64.56 ± 3.38 %), EPO 2500 (63.33 ± 3.56 %) und EPO 5000 (63.69 ± 3.32 %) ersichtlich. Die erhöhte Auswurfleistung des Herzens in diesen Gruppen resultierte offensichtlich nicht aus zytoprotektiven Effekten, sondern lässt sich durch die blutbildende Wirkung von Erythropoetin erklären. Behandelte Tiere verfügen über eine höhere Blutmenge als unbehandelte, bei denen die Tumorerkrankung oft mit einer Anämie einhergeht. Auch der Blutdruck steigt durch die Behandlung mit EPO an und trägt zu einer verbesserten Herzleistung bei. In einer anderen Studie an Ratten, denen ein myokardialer Infarkt zugefügt wurde, zeigte sich acht Wochen nach dem Infarkt bei der mit EPO behandelten Gruppe (40 µg/kg alle drei Wochen, beginnend drei Wochen nach dem Infarkt) eine EF von 58%, während unbehandelte Tiere eine EF von 40% aufwiesen. Gesunde Kontrolltiere hatten in diesem Versuch eine EF von etwa 80% [304]. Silverberg et al. zeigten ebenfalls, dass eine Behandlung von herzinsuffizienten Patienten mit EPO zu einer im Vergleich mit der Kontrollgruppe erhöhten EF führte [273, 305].

Dieselben Effekte zeigten sich beim CO. Der Wert gesunder Kontrolltiere lag an Tag 11 bei 84.59 ± 7.99 ml pro Minute, kranke Tiere hatten im Mittel einen CO von 30.94 ± 3.62 ml/min. In den hohen EPO Dosierungen kam es zu Werten von 69.14 ± 5.84 ml/min (EPO 2500) und 65.77 ± 6.41 ml/min (EPO 5000). Doch auch in den beiden niedrigen EPO Dosierungen sowie bei TPM 1.7 kam es zu signifikanten Erhöhungen des CO. Auch hier scheint die hämatopoetische Wirkung von EPO für die verbesserten Werte verantwortlich zu sein, trotzdem zeigte auch TPM eine Verbesserung des Wertes, dem eine andere Wirkungsweise zugrunde liegen muss.

Den stärksten Einfluss auf die Parameter der Herzfunktion zeigten EPO 500 und 2500. In einer anderen Studie zeigte sich der positive Effekt EPOs auf die Herzfunktion nach einem induzierten myokardialen Infarkt zumindest teilweise unabhängig von einer Erhöhung des Hämatokrits. Eine EPO Verabreichung in einer Dosis, die keine Erhöhung des Hämatokrits verursachen konnte, führte zu einer deutlichen Verbesserung der Herzfunktion, was sich in einem stark verbesserten linksventrikulären Druck und verbesserten Kontraktilitäts- und Relaxationswerten äußerte. Diese stand in Verbindung mit der Induktion einer Neovaskularisation und einer verminderten Umwandlung zur unerwünschten langsamen β -MHC Isoform des Rezeptors. Allerdings zeigten sich die meisten dieser positiven Effekte in der sehr niedrig verabreichten EPO Dosierung etwas schwächer ausgeprägt als in einer höheren Dosierung, was darauf hinweisen könnte, dass manche der positiven Effekte in Verbindung mit dem erhöhten Hämatokrit und der dadurch verbesserten Sauerstoffversorgung stehen [306]. Eine Studie von Schneider et al. [307] zeigte allerdings, dass eine endokardiale EPO Injektion, die in keiner Weise zu einer Erhöhung des Hämatokrits führt, die Kontraktilität des Myokards verbessert.

Auch bei den Wandstärken des Herzens und dem Diameter des linken Ventrikels zeigten sich durch die Behandlung verursachte Veränderungen. So war das interventrikuläre Septum in allen Gruppen außer EPO 5000 deutlich breiter als bei Placebo. Dies zeigte sich besonders in der Systole. Die deutlichsten Auswirkungen zeigten sich bei EPO 100 (2.72 ± 0.14 mm) und EPO 500 (2.70 ± 0.10 mm) im Vergleich zu Placebo (2.20 ± 0.07 mm). Gesunde Tiere zeigten hier einen mittleren Wert von 2.99 ± 0.12 mm. Dieser Verbesserung könnte ein zytoprotektiver Effekt von EPO zugrunde liegen. So zeigte sich in anderen Versuchen nach der Gabe von EPO eine deutlich reduzierte Anzahl von apoptotischen Zellen in der Herzen behandelte Ratten oder Kaninchen, die eine ischämische Verletzung oder eine Ischämie mit anschließender Reperfusion erlitten hatten. EPO konnte hier das Ausmaß des

myokardialen Infarkts begrenzen und die funktionelle Erholung des Herzens verbessern [284, 288, 290, 304, 308-311].

Auch die Hinterwand des linken Ventrikels zeigte in allen Gruppen eine größere Breite als bei Placebo, bei allen EPO Dosierungen waren diese Veränderungen in der Diastole signifikant. Den größten Effekt zeigte EPO 500 mit einer Wanddicke von 2.11 ± 0.15 mm, im Vergleich zu Placebo mit 1.63 ± 0.04 mm. Ein gesundes Tier zeigte in der Diastole eine Hinterwanddicke von 2.23 ± 0.16 mm.

Der Diameter des linken Ventrikels in Systole und Diastole zeigt an, in wieweit sich der Ventrikel kontrahieren und ausdehnen kann. So zeigte ein gesundes Tier einen mittleren Wert von 6.39 ± 0.10 mm in der Diastole und einen Wert von 3.09 ± 0.16 mm in der Systole. In der Placebo Gruppe zeigte sich eine stark eingeschränkte Funktion mit Werten von 5.48 ± 0.09 mm in der Diastole und 3.94 ± 0.13 mm in der Systole. Der Unterschied zwischen maximaler Kontraktion und maximaler Ausdehnung des Ventrikels war viel geringer als beim gesunden Tier, die Funktion des Herzens war durch die Auswirkungen des Tumors stark beeinträchtigt. Die verwendeten Medikationen konnten dieser Entwicklung zumindest ansatzweise entgegenwirken, signifikante Verbesserungen zeigten sich in den diastolischen Werten aber nur bei EPO 2500 (5.85 ± 0.20 mm), EPO 5000 (5.85 ± 0.14 mm) und vor allem TPM 1.7 (6.03 ± 0.15), allerdings zeigte sich in diesen Gruppen keine signifikante Verbesserung des systolischen Wertes. Eine Verbesserung des systolischen Wertes stellte sich nur bei EPO 500 (3.49 ± 0.17 mm) dar. In einer anderen Studie führte eine Verabreichung von EPO an Ratten, bei denen ein myokardialer Infarkt induziert worden war, zu einer im Vergleich zu unbehandelten Tieren verbesserten Kontraktilität und Relaxation des linken Ventrikels [306]. Es zeigten sich aber in allen Gruppen, insbesondere in allen vier EPO Gruppen, signifikante positive Auswirkungen auf die Masse des linken Ventrikels. Das beste Ergebnis zeigte EPO 500 mit einem Wert von 586.96 ± 39.48 mg und war somit nur 17% leichter als der linke Ventrikel des gesunden Kontrolltiers, wohingegen der Wert des Ventrikels aus der Placebo Gruppe um 43% geringer war. Obwohl die Behandlung also offensichtlich in der Lage war, der Kachexie entgegenzuwirken und den Herzmuskel in stärkerem Umfang zu erhalten, gab es doch Einschränkungen in der Kontraktilität und damit Funktion, die nicht in gleichem Masse aufrechterhalten werden konnten. Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass EPO nach Hypoxie oder Ischämie des Herzens die Apoptose des Gewebes um 30-50% reduzieren kann [283, 284, 310, 312]. Außerdem kann EPO den durch freie Radikale verursachten Gewebeschaden reduzieren [313], was zu einem Schutz der

Kardiomyozyten vor oxidativem Stress führt, der eine entscheidende Rolle beim durch Reperfusion verursachten myokardialen Schaden hat [314].

Weder der Tumor noch die Behandlung mit EPO oder TPM zeigte Auswirkungen auf den Parameter MV E / MV A = diastolische Funktion. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen allen erhobenen Werten. In der Studie von Ben-Dor et al. [303] konnten bei Ratten, die einen myokardialen Infarkt erlitten hatten, hier ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen mit hohen oder niedrigen Dosen an EPO behandelten Tieren und unbehandelten Tieren gefunden werden.

Insgesamt zeigten sich die meisten positiven Effekte auf die Herzfunktion in der Gruppe EPO 2500. Doch auch alle übrigen Dosierungen von EPO sowie TPM in der Dosierung von 1.7 µg/kg/d beeinflussten die Herzfunktion positiv. Allerdings muss eine chronische Verabreichung von EPO an Patienten mit Herzerkrankungen nicht zwangsläufig zu einem verbesserten klinischen Status führen [315], so zeigte sich in einer großen prospektiven klinischen Studie mit Patienten, die an Niereninsuffizienz litten, ein klarer Anstieg an nachteiligen kardiovaskulären Vorkommnissen bei denjenigen Patienten, die einer durch EPO vermittelten Normalisierung der Hämoglobinkonzentration im Serum unterzogen wurden [316]. Retrospektive Studien über Dialysepatienten zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen der EPO Dosierung und einer erhöhten Mortalität [317]. Demzufolge könnten die durch EPO verursachten potentiellen Probleme, die dosisabhängig scheinen, die therapeutische Wirksamkeit einer chronischen EPO Verabreichung, wie sie für die effektive Behandlung einer Herzinsuffizienz nötig wäre, einschränken. Die bei EPO beobachteten Nebenwirkungen wie ein erhöhtes Thromboserisiko, Polyzytämie und Bluthochdruck treten bei den neuen, nicht hämatopoetisch wirksamen EPO Derivaten wie CEPO oder auch TPM nicht auf. Diese Substanzen stellen somit die bessere Wahl für eine chronische Behandlung dar [267].

5.5 Ergebnisse der Erythropoetin Kombinations-Therapie

In der Kombinationstherapie mit Bisoprolol wurde eine Gruppe mit jeweils 75% der effektiven Dosierungen von EPO und Bisoprolol (EPO: 75 IU/kg/d, Bisoprolol: 3,75 mg/kg/d), eine weitere mit jeweils 25% der effektiven Dosierungen der beiden Medikamente (EPO: 25 IU/kg/d, Bisoprolol: 1,25 mg/kg/d) behandelt. Anhand der erhobenen Werte wurde eine Dosierung von 100 IU/kg/d EPO als effektive Dosis für

die Kombinationstherapie ermittelt. Die höheren Dosierungen führen durch den hämatopoetischen Effekt des Medikaments zu einer Belastung des Organismus, verursacht durch einen stark erhöhten Hämatokrit, erhöhten Blutdruck und verminderte Blutviskosität. Durch die Hämokonzentration steigt auch das Thromboserisiko [169]. Zwar zeigte auch eine Dosierung von 100 IU/kg/d diesen hämatopoetischen Effekt, aber in geringerem Ausmaß. Dennoch zeigte sich hier bereits eine Erhöhung des Hämatokrits, in der Kombi 25% auf 59.7%, in der Kombi 75% sogar auf 64.1 %.

β -Blocker wie Bisoprolol führen bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zu einer signifikanten Reduktion des Mortalitätsrisikos [318, 319]. Metabolische Effekte der Behandlung mit β -Blockern beinhalten einen verringerten Ruheenergieverbrauch, eine Inhibition der Lipolyse und eine verminderte Insulinsensitivität [249, 250]. Eine chronische Verabreichung von β -Blockern steht in Zusammenhang mit einem kleinen Zuwachs an Körpergewicht bei Patienten mit Bluthochdruck [250]. Ob dieser Effekt sich auch bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zeigt ist noch unklar. Es besteht die Annahme, dass eine Abschwächung der sympathischen Aktivierung, wie sie während einer chronischen β -Blocker Therapie entsteht, verschiedene Auswirkungen auf das Gewicht und die anabol oder katabol wirksamen Hormone bei kachektischen Patienten mit Herzinsuffizienz haben könnte [252]. Dieselben Auswirkungen könnten sich möglicherweise auch bei Patienten mit Tumorkachexie und daraus resultierender Herzinsuffizienz zeigen.

Die Kombination von EPO mit Bisoprolol 75% führte zu sehr guten Ergebnissen und zeigte sich der Kombination 25% sowie der Monotherapie mit EPO 100 oder Bisoprolol 5 in fast allen Parametern überlegen.

5.5.1 Überlebenszeitraum und Tumolvolumen

Alle Gruppen zeigten gegenüber Placebo eine signifikante Erhöhung der Überlebenszeit, die hohe EPO Kombination zeigte jedoch, obwohl es hier zu einer Erhöhung des Hämatokrits kam, ein deutlich besseres Ergebnis als die niedrige. Ein Rückgang der Mortalität bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz konnte nach der Medikation mit Bisoprolol nachgewiesen werden [320]. Diese Patienten zeigten im Vergleich zu jenen, die keine β -Blocker erhielten, eine um 32% geringere Mortalität und eine um 43% reduzierte Rate an plötzlichen Todesfällen [247]. Ein weiterer Grund

für das längere Überleben könnte auch die im Vergleich zu den anderen Gruppen signifikant geringeres Tumolvolumen sein, die zu einer geringeren Belastung des Tieres führt. In der Gruppe EPO/Biso 25% zeigte sich im Vergleich zu Placebo keine Verminderung des Tumolvolumens, aber auch keine erhöhte Menge. Auch in der Tumorzellzahl zeigten sich in beiden Kombinationsgruppen keine signifikanten Erhöhungen. In diesem Versuch bestand also keine Hinweise darauf, dass EPO das Wachstum des hier verwendeten Tumors begünstigt.

5.5.2 Gewichtsverlust

Die Kombination von EPO mit Bisoprolol konnte die Kachexie nicht verhindern, es zeigte sich mit -1.90 ± 0.86 g/d in der hohen Kombination aber ein geringerer Verlust an Körpergewicht als in den Monotherapien. Auswertungen der COPERNICUS [253] und CIBIS II [254] Studien zeigten, dass Patienten, die Carvedilol oder Bisoprolol erhalten hatten, im Vergleich zur Placebogruppe im Durchschnitt 0.5 kg mehr Körpergewicht nach 6 Monaten und 1.0 kg mehr Körpergewicht nach 12 Monaten aufwiesen. Ein ähnlicher Effekt zeigte sich auch in einer Studie von Hryniewicz et al. [252], in der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz über 6 Monate β -Blocker verabreicht wurden. Hier zeigten die so behandelten Patienten einen deutlich größeren Gewichtszuwachs (5.2 ± 9.6 kg) als die unbehandelten (0.8 ± 5.0 kg). Allerdings könnte der Gewichtszuwachs zumindest teilweise eher auf einer Verbesserung der Hämodynamik, der Herzfunktion und des Ernährungsstatus, die sich in Folge einer β -Blocker Therapie zeigen, beruhen als auf einem tatsächlich spezifischen adrenergen Effekt auf den Metabolismus [252]. Hier könnte eine Kombination mit EPO zu noch besseren Ergebnissen führen. Die niedrige Kombination hingegen zeigte ein schlechteres Ergebnis als beide Monotherapien (-3.68 ± 0.68 g/d).

5.5.3 Fett

Auch beim Verlust von Fett und fettfreier Masse blieb die niedrige Kombination hinter den Ergebnissen der jeweiligen Monotherapie zurück, in beiden Parametern zeigte sich auch keine signifikante Verbesserung gegenüber Placebo. EPO/Biso 75% hingegen zeigte in beiden Parametern gute Ergebnisse, wobei jedoch beide etwas schlechter

ausfielen als die Ergebnisse der Bisoprolol Monotherapie. Die Ergebnisse anderer Studien weisen darauf hin, dass der Gewichtszuwachs, der durch eine Medikation mit Bisoprolol erzeugt wird, zu einem Großteil aus Körperfett besteht. Eine Therapie mit β -Blockern scheint die Erhaltung der Energiereserven zu fördern [255]. Die Mechanismen, die den Gewichtszuwachs durch β -Blocker zustande bringen, beinhalten eine Reduzierung der basalen metabolischen Rate [321], eine Reduktion der Antwort auf thermische Stimuli [322, 323] und eine Inhibition der Lipolyse [324]. Allerdings scheinen höhere Dosierungen an β -Blocker nötig zu sein, um solche Effekte auf die Körperzusammensetzung erzeugen [255]. Daher wäre zu prüfen, ob eine Erhöhung der Dosis von Bisoprolol in der Kombination zu noch besseren Ergebnissen führen könnte. In einer Studie von Hryniewicz et al. [252], in der Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz über 6 Monate β -Blocker verabreicht wurden, zeigte sich eine Erhöhung des Leptinspiegels, der mit einer Erhöhung des Fettgewebes einherging. In einer anderen Studie zeigte sich, dass eine Verabreichung von β -Blockern an Patienten mit schwerwiegenden Verbrennungen den enormen Proteinkatabolismus aufhalten konnte [249].

5.5.4 Aktivität und Lebensqualität

In Bezug auf die Lebensqualität zeigte EPO/Biso 75% bessere Ergebnisse als die niedrige Kombination und die entsprechenden Monotherapien. Tiere dieser Gruppe nahmen an Tag 10 im Mittel 10.60 ± 1.99 Gramm Futter auf und zeigten einen Aktivitätsverlust von 41 %. Patienten, die wegen chronischer Herzinsuffizienz 6 Monate mit β -Blockern behandelt wurden, zeigten ebenfalls einen Anstieg der Aktivität und einen verbesserten Ernährungsstatus [325].

5.5.5 Organgewichte

Das Herzgewicht war bei EPO/Biso 75% im Vergleich zu Placebo erhöht, höhere Werte wiesen hier aber EPO 100 und Biso 5 auf. Bisoprolol kann zu einer Inhibition der durch Karecholamine induzierten Nekrose bzw. Apoptose führen [326]. EPO/Biso 25% zeigte keine signifikante Erhöhung des Herzgewichts gegenüber Placebo. Die Lunge war bei EPO 100 schwerer als in beiden Kombinationsgruppen, doch auch in der

hohen Kombination war die Lunge signifikant schwerer als bei Placebo. EPO/Biso 75% zeigte im Vergleich zu Placebo signifikant höhere Gewichte von Leber (7634.51 ± 355.05 mg) und Niere (801.68 ± 22.80 mg), die anderen Behandlungsgruppen konnten hier keine signifikanten Erhöhungen vorweisen. Auch das Milzgewicht war bei EPO/Biso 75% signifikant erhöht (363.28 ± 59.56 mg), doch auch EPO 100 und Biso 5 wiesen hier ähnlich hohe Werte auf. Beide Kombinationen führten, wie auch schon die Monotherapien, zu keinen signifikanten Veränderungen im Gewicht der Nebenniere. Den stärksten positiven Einfluss auf den Erhalt von Fett zeigte Bisoprolol mit Werten von 532.47 ± 209.90 mg beim weißen Fett und 128.55 ± 26.56 mg beim braunen Fett. Dies entspricht Ergebnissen aus anderen Studien, wo die Gabe von β -Blockern zu einem Anstieg der Körperfettmasse und dem Fettanteil bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz führte [255]. Die ebenfalls positiven Einflüsse von EPO/Biso 75% mit Werten von 417.23 ± 127.90 mg beim weißen und 180.66 ± 48.65 mg beim braunen Fett könnten eventuell durch eine etwas höhere Dosierung von Bisoprolol in der Kombination noch weiter verbessert werden [255].

Bei den Muskelgewichten zeigte sich EPO/Biso 75% der niedrigen Kombination und den jeweiligen Monotherapien klar überlegen. Es konnte gezeigt werden, dass Bisoprolol die LPS-induzierte TNF- α -Expression hemmt, welche zum Katabolismus der Kachexie beiträgt [256], dieser Effekt Bisoprolols schien auch hier zum Tragen zu kommen. Es zeigten sich hoch signifikante Gewichtserhöhungen von allen vier Muskeln, die deutlich über allen in den anderen Behandlungsgruppen erzielten Werten lagen. So erreichte der M. gastrocnemius ein Gewicht von 937.07 ± 59.05 mg und lag damit nur 27% unter dem entsprechenden Gewicht eines gesunden Kontrolltieres. Der M. tibialis lag 30%, der M. soleus 19% und der M. EDL 26% unter den entsprechenden Werten der Sham Gruppe.

5.5.6 Herzfunktion

Auch auf die Herzfunktion zeigten sich positive Einflüsse. Beide EPO Kombinationen führten zu gegenüber Placebo signifikant verbesserten Werten bei FS und EF an Tag 11. Die Gabe von β -Blockern führte zu einer dosisabhängigen Verbesserung der Herzfunktion [247]. So zeigte EPO/Biso 25% ein FS von $36.23 \pm 2.25\%$ und eine EF von $58.50 \pm 3.54\%$. Bei EPO/Biso 75% kam es zu noch größeren Verbesserungen: Das FS lag bei $39.75 \pm 2.47\%$, die EF bei $64.56 \pm 3.13\%$. Vergleicht man diese

Ergebnisse mit den Werten gesunder Tiere (FS $51.4 \pm 1.97\%$; EF $77.22 \pm 3.33\%$) zeigten sich hier zwar immer noch Funktionseinschränkungen, dennoch konnten in diesen Gruppen im Gegensatz zur Monotherapie mit EPO 100 oder Biso 5 zumindest Verbesserungen erzielt werden. Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zeigten nach sechs monatiger β -Blocker Therapie eine deutliche Erhöhung der EF [325]. Beim CO zeigte sich allerdings in beiden Kombinationsgruppen keine signifikante Verbesserung. Hier erzielte EPO 100 den besten Wert. Allerdings steht dieser Wert in Abhängigkeit zur Herzfrequenz. Diese war in der Gruppe EPO 100 mit 559 sehr viel höher als in den Kombinationsgruppen mit 266 und 289 Herzschlägen pro Minute. Daher scheint dieser hohe Wert nicht wirklich aussagekräftig zu sein, da er allein durch die viel höhere Herzfrequenz bedingt war. β -Blocker führen durch eine Verminderung der Herzfrequenz und einer dadurch reduzierten Belastung des Herzens, durch die Senkung des systolischen Blutdrucks und der ventrikulären Kontraktilität zu einer Verbesserung der Herzfunktion und zu einer Erhöhung des CO [326]. Auf die Dicke des interventrikulären Septums zeigten beide Kombinationen zumindest beim systolischen Wert signifikante positive Einflüsse, wobei die hohe Kombination einen stärkeren Effekt erzielte (2.58 ± 0.10 mm). Allerdings zeigte sich bei diesem Parameter eine noch größere Verbesserung in der Gruppe EPO 100 (2.72 ± 0.14 mm). Der Grund hierfür könnte ein stärkerer zytoprotektiver Effekt der höheren Dosierung von EPO sein, der die Myozyten vor Apoptose und schädlichen Einwirkungen der Zytokine schützt [267]. Die Hinterwand des linken Ventrikels wies in der Systole lediglich in der Kombination EPO/Biso 75% eine signifikant größere Breite als bei Placebo auf (2.43 ± 0.10 mm). Die Werte von EPO/Biso 75% entsprachen damit jeweils 86% (IVS s) und 75% (LVPW s) der Werte gesunder Kontrolltiere. Keine der Kombinationen oder der jeweiligen Monotherapien erzielte signifikante Auswirkungen auf die Parameter LVID oder MV E / MV A. Die stärksten Effekte auf das Gewicht des linken Ventrikels zeigte EPO 100, was wiederum für dessen stärkere zytoprotektive Potenz spricht. Doch auch Bisoprolol 5 und beide Kombinationen führten zu einem gegenüber Placebo stärkeren Erhalt der Masse des linken Ventrikels, was auf die Fähigkeit Bisoprolols zurückgeführt werden könnte, eine Inhibition der durch Katecholamine induzierten Nekrose bzw. Apoptose zu bewirken [326].

5.6 Ergebnisse der Tissue Protective Molecule Kombinations-Therapie

In der Monotherapie kam TPM in der Dosierung von 1,7 µg/kg/d und 0,17 µg/kg/d zum Einsatz. 1,7 µg/kg/d der TPM Variante 284 erwies sich aufgrund der deutlich besseren Resultate als effektive Dosis für die Kombinationstherapie. Obwohl TPM als Fragment von EPO keine hämatopoetischen Eigenschaften hat und somit Nebenwirkungen wie Blutdruckerhöhung, erhöhte Blutviskosität und die erhöhte Neigung zu Thrombosen [169] vermieden werden können, wirkt es wie dieses zytoprotektiv [227].

In der Kombinationstherapie mit Bisoprolol wurde eine Gruppe mit jeweils 75% der effektiven Dosierungen von TPM und Bisoprolol (TPM: 1,275 µg/kg/d, Bisoprolol: 3,75 mg/kg/d), eine weitere mit jeweils 25% der effektiven Dosierungen beider Medikamente (TPM: 0,425 µg/kg/d, Bisoprolol: 1,25 mg/kg/d) behandelt.

In der Kombination von TPM mit Bisoprolol zeigte sich eine Dosierung von 75% der niedrigen Dosierung in allen Parametern deutlich überlegen und führte im Vergleich zu Placebo und auch zu den jeweiligen Monotherapien zu hervorragenden Ergebnissen. Die Kombination mit 25% zeigte zwar im Vergleich zu Placebo Verbesserungen, diese fielen aber deutlich geringer aus als diejenigen, welche in den jeweiligen Monotherapien erzielt wurden.

5.6.1 Überlebenszeitraum und Tumormenge

Alle Gruppe zeigten gegenüber Placebo eine signifikante Erhöhung der Überlebenszeit. Es bestanden diesbezüglich noch keine Daten für TPM, Bisoprolol hingegen führte in mehreren Studien zu einen Rückgang der Mortalität [247, 320]. Während sowohl TPM 1.7 als auch Bisoprolol 5 ein signifikant geringeres Tumolvolumen als Placebo aufwiesen, war in beiden Kombinationsgruppen kein signifikanter Unterschied in der Menge des Tumor gegenüber Placebo zu beobachten. Trotz des großen Tumolvolumens und der daraus resultierenden Belastung der Tiere zeigten sich die besten Ergebnisse in der TPM/Biso 75% Gruppe. In keiner der Gruppen kam es zu signifikanten Unterschieden in der Tumorzellzahl. Es bestanden demzufolge keinerlei Hinweise darauf, dass eines der hier eingesetzten Medikamente das Tumorwachstum begünstigen könnte, was bei der Verabreichung von EPO bei

verschiedenen Tumoren beobachtet worden war [211, 212]. Obwohl TPM keine hämatopoetische Wirkungsweise aufweist [227], zeigte sich in der Gruppe TPM/Biso 25% ein erhöhter Hämatokrit von 53.5%, der durch eine Dehydratation bedingt sein könnte. In der Gruppe TPM/Biso 75% lag der Hämatokrit bei 44.3% und somit im physiologischen Bereich.

5.6.2 Gewichtsverlust

Sowohl beim mittleren Gewichtsverlust pro Tag (-1.06 ± 1.24 g/d) als auch beim Verlust an fettfreier Masse pro Tag (-0.83 ± 0.97 g/d) zeigte TPM/Biso 75% Resultate, die weit über denen lagen, die TPM oder Bisoprolol in der Monotherapie erzielen konnten. Da Bisoprolol schon in anderen Studien einen positiven Einfluss auf die Gewichtsentwicklung zeigte [253, 320], schien Bisoprolol in großem Umfang zu diesem guten Ergebnis beizutragen. Hier kamen offensichtlich synergistische Effekte zum Tragen. Lediglich beim Verlust an Fett pro Tag zeigte Bisoprolol in der Monotherapie (-0.41 ± 0.26 g/d) ein noch besseres Ergebnis als TPM/Biso 75% (-0.51 ± 0.21 g/d). Die Verabreichung von Bisoprolol führte zu einer Inhibition der Lipolyse, der positive Effekt auf den Erhalt des Fettgewebes zeigte sich bereits in anderen Studien [252].

Auch durch die Kombination von TPM mit Bisoprolol konnte das Fortschreiten der Kachexie nicht verhindert, aber doch deutlich gemildert werden.

5.6.3 Futteraufnahme und Aktivität

Bei der Futteraufnahme und der Aktivität zeigte sich in der TPM/Biso 75% Gruppe ein signifikant geringerer Rückgang als bei Placebo. Die Tiere nahmen an Tag 10 13.56 ± 2.97 Gramm Futter auf, was 65% der Futteraufnahme eines gesunden Kontrolltieres entspricht, während in der Placebo Gruppe nur eine Futteraufnahme von 3.00 ± 0.51 Gramm (14% der Futteraufnahme eines gesunden Kontrolltieres) zu verzeichnen war. Ähnliche positive Einflüsse auf die Futteraufnahme zeigten sich nach einer Behandlung mit HBP, welches wie TPM ein Fragment von EPO darstellt. Hier zeigten die so behandelten Tiere einen deutlich geringeren Rückgang der Futteraufnahme als unbehandelte [227]. Tiere der TPM/Biso 75% Gruppe zeigten an Tag 10 gegenüber Tag 0 einen Aktivitätsrückgang von 41%, bei Placebo Tieren machte dieser 71% aus,

bei gesunden 18%. Ein Anstieg der Aktivität zeigte sich auch bei Herzinsuffizienz Patienten, die mit β -Blockern behandelt wurden [324]. Im Bezug auf die Lebensqualität zeigten sich bei EPO/Biso 75% enorme Verbesserungen, EPO/Biso 25% fiel auch hier hinter die Ergebnisse der einzelnen Monotherapien zurück.

5.6.4 Organgewichte

Außer bei Lunge und Nebenniere, wo sich in keiner Behandlungsgruppe ein signifikanter Unterschied zu Placebo zeigte, und beim Herzen, wo TPM 1.7 (568.00 ± 25.10 mg) und Bisoprolol 5 (618.44 ± 47.90 mg) ein höheres Organgewicht erzielten als TPM/Biso 75% (612.73 ± 52.29 mg), zeigten sich die besten Ergebnisse in den Organgewichten stets in der Gruppe TPM/Biso 75%. Die Leber lag mit 8174.17 ± 700.31 mg 24% unter dem Lebergewicht aus der Kontrollgruppe, die Milz mit 344.40 ± 73.77 mg 45% und die Niere mit 816.62 ± 29.62 mg 28% unter den entsprechenden Organgewichten der Kontrollgruppe. Ein deutlicher nierenschützender Effekt zeigte sich auch nach Verabreichung eines TPM ähnlichen Peptids an Ratten, bei denen eine Ischämie der Niere hervorgerufen worden war [227]. Hoch signifikant zeigten sich bei TPM/Biso 75% auch die positiven Einflüsse auf den Erhalt des Fettes. Das weiße Fett erreichte einen Wert von 449.60 ± 180.79 mg (66% weniger als beim gesunden Tier), das braune Fett wog 135.50 ± 22.14 mg (38% weniger als beim gesunden Tier). Allerdings zeigten beim weißen Fett TPM 1.7 (486.69 ± 121.40 mg) und Bisoprolol (532.47 ± 209.90 mg), das auch in anderen Studien ähnlich gute Effekte auf den Erhalt des Fettgewebes zeigte [255], in der Monotherapie ebenfalls hoch signifikante Verbesserungen, die sogar noch etwas deutlicher waren als in der hohen Kombination. Eine Erhöhung beider Dosierungen in der Kombination könnte hier einen vielleicht noch größeren Effekt auf den Erhalt des weißen Fettes erzielen [255]. Auch auf den Erhalt des braunen Fettes zeigte Bisoprolol in der Monotherapie (128.55 ± 26.56 mg) ein ähnlich gutes Ergebnis wie die Kombination, hier fiel TPM in der Monotherapie (97.79 ± 10.06 mg) deutlich zurück. Einen sehr guten Effekt zeigte eine Behandlung mit TPM/Biso 75% auf die Muskelgewichte, hier wurden deutlich höhere Gewichte als bei den entsprechenden Monotherapien erzielt, hier sind synergistische Effekte ersichtlich. So zeigte der M. gastrocnemius in dieser Gruppe ein Gewicht von 1000.54 ± 89.17 mg und lag damit nur 22% unter dem Wert gesunder Kontrolltiere. Der M. tibialis wog bei TPM/Biso 75% 353.99 ± 37.70 mg (24% weniger als bei gesunden

Kontrolltieren), der M. soleus 82.98 ± 5.47 mg (17% weniger) und der M. EDL 83.01 ± 7.67 mg (25% weniger). Es ist bekannt, dass Bisoprolol die LPS-induzierte TNF- α -Produktion hemmt, welche zum Katabolismus der Kachexie beiträgt [255], dieser Mechanismus könnte sich auch in diesem Versuch positiv auf den Erhalt der Muskelmasse auswirken haben. Für TPM sind noch keine Daten im Bezug auf den Erhalt der Muskelmasse vorhanden [246].

5.6.5 Herzfunktion

Auch auf die Herzfunktion zeigte TPM/Biso 75% positive Auswirkungen. Die Verabreichung von β -Blockern führte zu einer dosisabhängigen Verbesserung der Herzfunktion [247] und trug so zumindest anteilig zu diesem guten Ergebnis bei. Für TPM liegen noch keine Daten zum Einfluss auf die Herzfunktion vor [246], die zum Vergleich herangezogen werden können. TPM/Biso 25% hingegen zeigte lediglich einen im Vergleich zu Placebo vergrößerten Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole und konnte so der durch den Tumor verursachten Herzinsuffizienz nicht entgegenwirken. TPM und Bisoprolol, die in der Monotherapie zumindest geringe Auswirkungen auf die Herzfunktion zeigten, schienen in der Kombination mit 25% zu niedrig dosiert zu sein. TPM/Biso 75% führte durch synergistische Effekte zu besseren Ergebnissen, als in der Monotherapie der beiden Medikamente erzielt werden konnten. So waren hier sowohl FS ($42.17 \pm 3.21\%$) als auch EF ($63.60 \pm 3.33\%$) und CO (55.98 ± 8.88 ml/min) signifikant höher als bei Placebo und den entsprechenden Monotherapien. Eine deutliche Erhöhung der EF zeigte sich nach β -Blocker Therapie bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz [324], eine Kombination mit TPM schien diesen positiven Effekt noch zu verstärken. Durch die Verminderung der Herzfrequenz führen β -Blocker auch zu einer Erhöhung des CO [325]. Im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren (FS $51.84 \pm 1.97\%$, EF $77.22 \pm 3.33\%$, CO 84.59 ± 7.99 ml/min) zeigte sich aber trotz deutlicher Verbesserungen noch immer eine erhebliche Beeinträchtigung der Herzfunktion. Weitere positive Auswirkungen zeigte TPM/Biso 75% auf die Breite des interventrikulären Septums in der Systole (2.65 ± 0.10 mm) und den Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole (6.38 ± 0.21 mm). Keine signifikanten Vorteile der Verabreichung von TPM/Biso 75% zeigten sich in den Parametern LVPW und MV E / MV A. Es kam in dieser Gruppe in gleichem Maße wie

bei den jeweiligen Monotherapien zu einer im Vergleich zu Placebo signifikanten Erhöhung des Gewichts des linken Ventrikels (481.31 ± 25.26 mg).

5.7 Vergleich der Ergebnisse von Erythropoetin und Tissue Protective Molecule

Eine Dosierung von 500 IU/kg/d Erythropoetin entspricht einer Dosierung von 0.17 µg/kg/d TPM, somit kann ein Vergleich zwischen beiden Medikamenten erfolgen. Zwischen beiden Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der einzelnen Parameter. EPO 500 zeigte tendenziell bessere Ergebnisse als TPM 0.17 in den Bereichen Gewichtsverlust, Lebensqualität, Gewicht von Herz, Lunge, Milz, M. gastrocnemius und M. tibialis. EPO 500 wirkte sich tendenziell besser auf die Herzfunktion aus als TPM 0.17. TPM 0.17 wirkte sich hingegen tendenziell besser auf den Erhalt des Fettgewebes und M. soleus und EDL aus.

Eine Dosierung von 5000 IU/kg/d Erythropoetin entspricht einer Dosierung von 1.7 µg/kg/d TPM, auch hier kann ein direkter Vergleich erfolgen.

Hier bestanden zwischen beiden Gruppen signifikante Unterschiede beim Gewicht von Lunge, Milz und weißem Fett. Die Lunge erreichte bei EPO 5000 ein signifikant höheres Gewicht als bei TPM 1.7. Die Milz erreicht bei EPO 5000 ein hohes Gewicht von 1508.18 ± 146.37 mg, was sich durch den starken hämatopoetischen Effekt von EPO in dieser hohen Dosierung erklären lässt. TPM 1.7, zeigte ein Milzgewicht von 299.75 ± 41.51 mg. Beim weißen Fett zeigte TPM 1.7 ein signifikant höheres Gewicht (486.69 ± 121.40 mg) als EPO 5000 (78.30 ± 43.99 mg). EPO 5000 wies tendenziell stärkere positive Einflüsse auf die Herzfunktion auf als TPM 1.7, insgesamt zeigte jedoch TPM 1.7 tendenziell bessere Ergebnisse als EPO 5000.

Der Vergleich der Kombinationstherapie von Erythropoetin/Bisoprolol mit TPM/Bisoprolol in einer Dosierung von 25% der jeweils effektiven Dosen ergab zwischen beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Parametern. EPO/Biso 25% zeigte einen Hämatokrit von 59.7%, TPM/Biso 25% einen Hämatokrit von 53.5%. TPM/Biso 25% zeigte bei den meisten Werten tendenziell bessere Ergebnisse als EPO/Biso 25%, nicht jedoch im Bezug auf die Herzfunktion. Allerdings wiesen beide Gruppen deutlich schlechtere Werte auf, als die, welche in den

Kombinationen mit 75% oder in den einzelnen Monotherapien erreicht wurden. Hier schienen die Dosierungen der einzelnen Substanzen zu niedrig zu sein, um der Kachexie effektiv entgegen zu wirken. Synergistische Effekte konnten hier nicht gezeigt werden. Eine Kombinationstherapie mit EPO/Biso 25% oder TPM/Biso 25% erschien hier nicht sinnvoll.

Der Vergleich der Kombinationstherapie von Erythropoetin/Bisoprolol mit TPM/Bisoprolol in einer Dosierung von 75% der jeweils effektiven Dosen ergab ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Parametern. Beide zeigten sich den niedrigen Kombinationen und den einzelnen Monotherapien insgesamt deutlich überlegen, hier zeigten sich die erwünschten synergistischen Effekte. Allerdings führte die Verabreichung von EPO/Biso 75% zu einer Erhöhung des Hämatokrits auf 64.1%, während der Hämatokrit in der Gruppe TPM/Biso 75% bei 44.3% lag. Dies mag ein möglicher Grund dafür sein, dass TPM/Biso 75% bei allen Parametern mit Ausnahme der Milz und des braunen Fettes tendenziell höhere Gewichte als EPO/Biso 75% zeigte. Auch auf die Herzfunktion liesen sich bei TPM/Biso 75% tendenziell stärkere positive Einflüsse erkennen.

6. Zusammenfassung

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine tierexperimentelle Studie mit Ratten, bei denen durch die Inokulation des Yoshida AH-130 Hepatoms eine Tumorkachexie ausgelöst wurde. Die Signalwege, die an der Entstehung der Tumorkachexie beteiligt sind, sind noch nicht vollständig verstanden. Die Anwesenheit eines Tumors führt zu einer in der Literatur beschriebenen andauernden Entzündungsreaktion, in der es charakteristischerweise zu einer Produktion von Zytokinen durch T1-Helferzellen, wie etwa $\text{TNF}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IFN γ und CNTF und zu einer APR kommt. Beim Krebspatienten führt der durch den Tumor hervorgerufene Status einer chronischen Entzündung zur Entstehung der Kachexie. In dieser Dissertationsschrift wurden die therapeutischen Effekte einer Medikation mit den zytoprotektiven Substanzen EPO und TPM auf die Ausprägung einer induzierten Tumorkachexie untersucht. Desweiteren wurde die kombinierte Verabreichung von EPO oder TPM mit dem β_1 -Adrenozeptoren-Inhibitor Bisoprolol in gleicher Weise untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Gabe von EPO als auch von TPM der tumorassoziierten Kachexie entgegen wirken kann. Zusätzlich zeigten sich positive Effekte auf die Erhaltung der Herzfunktion sowie eine Verbesserung des Allgemeinbefindens. Bekannte Nebenwirkungen einer Therapie mit EPO wie ein erhöhtes Thromboserisiko, Hypertonie oder Polyzythämie traten bei einer Behandlung mit TPM nicht auf.

Die besten Ergebnisse zeigten sich bei beiden Substanzen in der hoch dosierten Kombination mit Bisoprolol, wobei sich TPM, das keine hämatopoetischen Eigenschaften besitzt, EPO überlegen zeigte.

Die Verabreichung von EPO oder TPM, besonders in der Kombination mit Bisoprolol, konnte bei Ratten mit Yoshida AH-130 Hepatom die Ausprägung einer Kachexie abschwächen und den Krankheitsverlauf positiv beeinflussen. Zur Ermittlung der besten Dosierung sollten weitere Untersuchungen erfolgen.

7. Summary

Influence of erythropoietin and tissue protective molecule on the course of body weight, on body composition and spontaneous activity in a rat model of tumour cachexia

This doctoral thesis is about an animal experimental study in which tumour cachexia was caused by inoculating Yoshida AH-130 hepatomas into rats. The signals pointing to and involved in the development of tumour cachexia are not yet fully understood. A developed tumour leads to a continuous inflammation reaction, during which characteristically an APR develops because of the production of cytokines by T1 helper cells such as, for example $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , $\text{IFN}\gamma$ and CNTF. The status caused by the tumour leads to a chronic inflammation and cachexia in cancer patients. Investigated were the effects of medication with EPO and TPM cytoprotective substances on the behaviour of an induced tumour cachexia. Moreover, the combined administration of EPO and TPM with the β_1 -adrenoceptor inhibitor bisoprolol was studied identically.

It could be shown that the administration of EPO or TPM can counteract the cachexia associated with the tumour. Positive effects on maintaining heart function and an improvement in the general condition were also proven. Well-known adverse reactions of a therapy with EPO like an increased risk of thrombosis, high blood pressure or polycythemia do not appear under a treatment with TPM.

The best results were given by the two substances in the high combination with bisoprolol; TPM, which has no haemopoietic characteristics, was shown to be superior to EPO.

Administration of EPO and TPM, especially in combination with bisoprolol, could reduce a cachexia and influence the illness progression positively in rats with a Yoshida AH-130 hepatoma. Further investigative studies should be undertaken to determine the best dosage.

8. Literaturverzeichnis

1. Anker, S.D. and R. Sharma, *The syndrome of cardiac cachexia*. Int J Cardiol, 2002. **85**(1): p. 51-66.
2. Yeh, S.S. and M.W. Schuster, *Geriatric cachexia: the role of cytokines*. Am J Clin Nutr, 1999. **70**(2): p. 183-97.
3. Argiles, J.M., S. Busquets, and F.J. Lopez-Soriano, *The pivotal role of cytokines in muscle wasting during cancer*. Int J Biochem Cell Biol, 2005. **37**(10): p. 2036-46.
4. Lelbach, A., G. Muzes, and J. Feher, *Current perspectives of catabolic mediators of cancer cachexia*. Med Sci Monit, 2007. **13**(9): p. RA168-173.
5. Tisdale, M.J., *Pathogenesis of cancer cachexia*. J Support Oncol, 2003. **1**(3): p. 159-68.
6. Morley, J.E., D.R. Thomas, and M.M. Wilson, *Cachexia: pathophysiology and clinical relevance*. Am J Clin Nutr, 2006. **83**(4): p. 735-43.
7. Gordon, J.N., S.R. Green, and P.M. Goggin, *Cancer cachexia*. Qjm, 2005. **98**(11): p. 779-88.
8. Thomas, D.R., *Loss of skeletal muscle mass in aging: examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia*. Clin Nutr, 2007. **26**(4): p. 389-99.
9. Thomas, D.R., *Distinguishing starvation from cachexia*. Clin Geriatr Med, 2002. **18**(4): p. 883-91.
10. von Haehling, S., et al., *Cachexia: a therapeutic approach beyond cytokine antagonism*. Int J Cardiol, 2002. **85**(1): p. 173-83.
11. Katz, A. and P. Katz, *Diseases of the heart in works of Hippocrates*. Br Heart J, 1962. **24**: p. 256-264.
12. Anker, S. and A. Coats, *Cardiac cachexia: a syndrome with impaired survival and immune and neuroendocrine activation*. Chest, 1999. **155**: p. 836-847.
13. Rosenbaum, K., et al., *Time-dependent variation in weight and body composition in healthy adults*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2000. **24**(2): p. 52-5.
14. Kotler, D.P., *Cachexia*. Ann Intern Med, 2000. **133**(8): p. 622-34.
15. Anker, S.D., et al., *Prognostic importance of weight loss in chronic heart failure and the effect of treatment with angiotensin-converting-enzyme inhibitors: an observational study*. Lancet, 2003. **361**(9363): p. 1077-83.
16. Anker, S.D., et al., *CACHEXIA: A NEW DEFINITION*, in *Cachexia Consensus Conference*. 2007: Washington, DC, USA.
17. Sharma, R. and S.D. Anker, *Cardiac cachexia is a world-wide problem*. Int J Cardiol, 1999. **71**(2): p. 113-4.
18. Mitch, W.E. and A.L. Goldberg, *Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway*. N Engl J Med, 1996. **335**(25): p. 1897-905.
19. Argiles, J.M., S. Busquets, and F.J. Lopez-Soriano, *Cytokines in the pathogenesis of cancer cachexia*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2003. **6**(4): p. 401-6.

20. Cerami, A., et al., *Weight loss associated with an endotoxin-induced mediator from peritoneal macrophages: the role of cachectin (tumor necrosis factor)*. Immunol Lett, 1985. **11**(3-4): p. 173-7.
 21. Zumbach, M.S., et al., *Tumor necrosis factor increases serum leptin levels in humans*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4080-2.
 22. Tsujinaka, T., et al., *Interleukin 6 receptor antibody inhibits muscle atrophy and modulates proteolytic systems in interleukin 6 transgenic mice*. J Clin Invest, 1996. **97**(1): p. 244-9.
 23. Ferlay, J., et al., *Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006*. Ann Oncol, 2007. **18**(3): p. 581-92.
 24. Jagoe, R.T., et al., *Skeletal muscle mRNA levels for cathepsin B, but not components of the ubiquitin-proteasome pathway, are increased in patients with lung cancer referred for thoracotomy*. Clin Sci (Lond), 2002. **102**(3): p. 353-61.
 25. Warren, S., *The immediate cause of death in cancer*. Am J Med Sci, 1932. **184**: p. 610-613.
 26. Inui, A., *Cancer anorexia-cachexia syndrome: current issues in research and management*. CA Cancer J Clin, 2002. **52**(2): p. 72-91.
 27. MacDonald, N., et al., *Understanding and managing cancer cachexia*. J Am Coll Surg, 2003. **197**(1): p. 143-61.
 28. Tisdale, M.J., *Tumor-host interactions*. J Cell Biochem, 2004. **93**(5): p. 871-7.
 29. Fearon, K.C.H., *The mechanisms and treatment of weight loss in cancer*. Proc Nutr Soc, 1992. **51**: p. 251-265.
 30. Barber, M.D., et al., *Effect of a fish oil-enriched nutritional supplement on metabolic mediators in patients with pancreatic cancer cachexia*. Nutr Cancer, 2001. **40**(2): p. 118-24.
 31. Slaviero, K.A., et al., *Baseline nutritional assessment in advanced cancer patients receiving palliative chemotherapy*. Nutr Cancer, 2003. **46**(2): p. 148-57.
 32. Dewys, W.D., et al., *Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. Eastern Cooperative Oncology Group*. Am J Med, 1980. **69**(4): p. 491-7.
 33. Ng, E.H. and S.F. Lowry, *Nutritional support and cancer cachexia. Evolving concepts of mechanisms and adjunctive therapies*. Hematol Oncol Clin North Am, 1991. **5**(1): p. 161-84.
 34. Argiles, J.M., B. Alvarez, and F.J. Lopez-Soriano, *The metabolic basis of cancer cachexia*. Med Res Rev, 1997. **17**(5): p. 477-98.
 35. Tisdale, M.J., *Cancer cachexia*. Langenbecks Arch Surg, 2004. **389**(4): p. 299-305.
 36. Tisdale, M.J., *Molecular pathways leading to cancer cachexia*. Physiology (Bethesda), 2005. **20**: p. 340-8.
 37. Bossola, M., et al., *Cancer cachexia: it's time for more clinical trials*. Ann Surg Oncol, 2007. **14**(2): p. 276-85.
 38. Davis, M.P., et al., *Appetite and cancer-associated anorexia: a review*. J Clin Oncol, 2004. **22**(8): p. 1510-7.
 39. Baracos, V.E., *Cancer-associated cachexia and underlying biological mechanisms*. Annu Rev Nutr, 2006. **26**: p. 435-61.
 40. Broberger, C., *Brain regulation of food intake and appetite: molecules and networks*. J Intern Med, 2005. **258**(4): p. 301-27.
 41. Laviano, A., et al., *VMN/LHA functional inhibition in tumor-bearing rats suggests hypothalamic involvement in cancer anorexia*. Nutr Neurosci, 2002. **5**(6): p. 443-56.
 42. Laviano, A., F. Rossi Fanelli, and M.M. Meguid, *Serotonin and cancer anorexia: myths or facts?* J Clin Oncol, 2005. **23**(9): p. 2111-2; author reply 2112.
-

-
43. Ramos, E.J., et al., *Changes in hypothalamic neuropeptide Y and monoaminergic system in tumor-bearing rats: pre- and post-tumor resection and at death*. Surgery, 2004. **136**(2): p. 270-6.
 44. Argiles, J.M., et al., *Targets in clinical oncology: the metabolic environment of the patient*. Front Biosci, 2007. **12**: p. 3024-51.
 45. Makarenko, I.G., et al., *Decreased NPY innervation of the hypothalamic nuclei in rats with cancer anorexia*. Brain Res, 2003. **961**(1): p. 100-8.
 46. Wisse, B.E., et al., *Reversal of cancer anorexia by blockade of central melanocortin receptors in rats*. Endocrinology, 2001. **142**(8): p. 3292-301.
 47. Markison, S., et al., *The regulation of feeding and metabolic rate and the prevention of murine cancer cachexia with a small-molecule melanocortin-4 receptor antagonist*. Endocrinology, 2005. **146**(6): p. 2766-73.
 48. Watanobe, H. and K. Takebe, *Intravenous administration of tumor necrosis factor-alpha stimulates corticotropin releasing hormone secretion in the push-pull cannulated median eminence of freely moving rats*. Neuropeptides, 1992. **22**(2): p. 81-4.
 49. Plata-Salaman, C.R., *Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome*. Nutrition, 2000. **16**(10): p. 1009-12.
 50. Zhang, Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-32.
 51. Lopez-Soriano, J., et al., *Leptin and tumor growth in rats*. Int J Cancer, 1999. **81**(5): p. 726-9.
 52. Sato, T., et al., *Does leptin really influence cancer anorexia?* Nutrition, 2002. **18**(1): p. 82-3.
 53. Kowalczyk, A., et al., *[Plasma concentration of leptin, neuropeptide Y and tumor necrosis factor alpha in patients with cancers, before and after radio- and chemotherapy]*. Pol Arch Med Wewn, 2001. **106**(2): p. 657-68.
 54. Brown, D.R., D.E. Berkowitz, and M.J. Breslow, *Weight loss is not associated with hyperleptinemia in humans with pancreatic cancer*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(1): p. 162-6.
 55. Tessitore, L., et al., *Leptin expression in colorectal and breast cancer patients*. Int J Mol Med, 2000. **5**(4): p. 421-6.
 56. Aleman, M.R., et al., *Leptin role in advanced lung cancer. A mediator of the acute phase response or a marker of the status of nutrition?* Cytokine, 2002. **19**(1): p. 21-6.
 57. Mantovani, G., et al., *Serum values of proinflammatory cytokines are inversely correlated with serum leptin levels in patients with advanced stage cancer at different sites*. J Mol Med, 2001. **79**(7): p. 406-14.
 58. Laviano, A., et al., *Neurochemical mechanisms for cancer anorexia*. Nutrition, 2002. **18**(1): p. 100-5.
 59. Freitas, J.J., et al., *Walker-256 tumor growth causes oxidative stress in rat brain*. J Neurochem, 2001. **77**(2): p. 655-63.
 60. Bing, C., et al., *Cachexia in MAC16 adenocarcinoma: suppression of hunger despite normal regulation of leptin, insulin and hypothalamic neuropeptide Y*. J Neurochem, 2001. **79**(5): p. 1004-12.
 61. Ockenga, J., et al., *[Tumour anorexia--tumour cachexia in case of gastrointestinal tumours: standards and visions]*. Z Gastroenterol, 2002. **40**(11): p. 929-36.
 62. Falconer, J.S., et al., *Cytokines, the acute-phase response, and resting energy expenditure in cachectic patients with pancreatic cancer*. Ann Surg, 1994. **219**(4): p. 325-31.
-

63. Jatoi, A., et al., *Do patients with nonmetastatic non-small cell lung cancer demonstrate altered resting energy expenditure?* Ann Thorac Surg, 2001. **72**(2): p. 348-51.
 64. Nixon, D.W., et al., *Resting energy expenditure in lung and colon cancer.* Metabolism, 1988. **37**(11): p. 1059-64.
 65. Knox, L.S., et al., *Energy expenditure in malnourished cancer patients.* Ann Surg, 1983. **197**(2): p. 152-62.
 66. Fredrix, E.W., et al., *Effect of different tumor types on resting energy expenditure.* Cancer Res, 1991. **51**(22): p. 6138-41.
 67. Beck, S.A. and M.J. Tisdale, *Effect of cancer cachexia on triacylglycerol/fatty acid substrate cycling in white adipose tissue.* Lipids, 2004. **39**(12): p. 1187-9.
 68. Eden, E., et al., *Glucose flux in relation to energy expenditure in malnourished patients with and without cancer during periods of fasting and feeding.* Cancer Res, 1984. **44**(4): p. 1718-24.
 69. Shaw, J.H. and R.R. Wolfe, *Glucose and urea kinetics in patients with early and advanced gastrointestinal cancer: the response to glucose infusion, parenteral feeding, and surgical resection.* Surgery, 1987. **101**(2): p. 181-91.
 70. Holm, E., et al., *Substrate balances across colonic carcinomas in humans.* Cancer Res, 1995. **55**(6): p. 1373-8.
 71. Holroyde, C.P., et al., *Altered glucose metabolism in metastatic carcinoma.* Cancer Res, 1975. **35**(12): p. 3710-4.
 72. Zylicz, Z., et al., *Metabolic response to enteral food in different phases of cancer cachexia in rats.* Oncology, 1990. **47**(1): p. 87-91.
 73. Shellock, F.G., M.S. Riedinger, and M.C. Fishbein, *Brown adipose tissue in cancer patients: possible cause of cancer-induced cachexia.* J Cancer Res Clin Oncol, 1986. **111**(1): p. 82-5.
 74. Collins, P., et al., *Muscle UCP-3 mRNA levels are elevated in weight loss associated with gastrointestinal adenocarcinoma in humans.* Br J Cancer, 2002. **86**(3): p. 372-5.
 75. Busquets, S., et al., *Hyperlipemia: a role in regulating UCP3 gene expression in skeletal muscle during cancer cachexia?* FEBS Lett, 2001. **505**(2): p. 255-8.
 76. Fearon, K.C. and A.G. Moses, *Cancer cachexia.* Int J Cardiol, 2002. **85**(1): p. 73-81.
 77. Nielsen, H.J., et al., *Association between plasma concentrations of plasminogen activator inhibitor-1 and survival in patients with colorectal cancer.* Bmj, 1998. **316**(7134): p. 829-30.
 78. Moshage, H., *Cytokines and the hepatic acute phase response.* J Pathol, 1997. **181**(3): p. 257-66.
 79. Vidal-Vanaclocha, F., et al., *Interleukin-1 receptor blockade reduces the number and size of murine B16 melanoma hepatic metastases.* Cancer Res, 1994. **54**(10): p. 2667-72.
 80. Mathupala, S.P., A. Rempel, and P.L. Pedersen, *Glucose catabolism in cancer cells. Isolation, sequence, and activity of the promoter for type II hexokinase.* J Biol Chem, 1995. **270**(28): p. 16918-25.
 81. De Blaauw, I., N.E.P. Deutz, and M.F. Von Meyenfeldt, *Metabolic changes in cancer cachexia.* Clin. Nutr., 1997. **16**: p. 169-176.
 82. Fearon, K.C. and T. Preston, *Body composition in cancer cachexia.* Infusionstherapie, 1990. **17 Suppl 3**: p. 63-6.
 83. Cohn, S.H., et al., *Body composition and dietary intake in neoplastic disease.* Am J Clin Nutr, 1981. **34**(10): p. 1997-2004.
-

-
84. Drott, C., H. Persson, and K. Lundholm, *Cardiovascular and metabolic response to adrenaline infusion in weight-losing patients with and without cancer*. Clin Physiol, 1989. **9**(5): p. 427-39.
 85. Berg, M., D.L. Fraker, and H.R. Alexander, *Characterization of differentiation factor/leukaemia inhibitory factor effect on lipoprotein lipase activity and mRNA in 3T3-L1 adipocytes*. Cytokine, 1994. **6**(4): p. 425-32.
 86. Vlassara, H., et al., *Reduced plasma lipoprotein lipase activity in patients with malignancy-associated weight loss*. Horm Metab Res, 1986. **18**(10): p. 698-703.
 87. Thompson, M.P., et al., *Increased expression of the mRNA for hormone-sensitive lipase in adipose tissue of cancer patients*. Biochim Biophys Acta, 1993. **1180**(3): p. 236-42.
 88. Todorov, P.T., et al., *Purification and characterization of a tumor lipid-mobilizing factor*. Cancer Res, 1998. **58**(11): p. 2353-8.
 89. Bing, C., et al., *Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed in adipocytes and is up-regulated in mice with cancer cachexia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(8): p. 2500-5.
 90. Bao, Y., et al., *Zinc-alpha2-glycoprotein, a lipid mobilizing factor, is expressed and secreted by human (SGBS) adipocytes*. FEBS Lett, 2005. **579**(1): p. 41-7.
 91. Sanders, P.M. and M.J. Tisdale, *Effect of zinc-alpha2-glycoprotein (ZAG) on expression of uncoupling proteins in skeletal muscle and adipose tissue*. Cancer Lett, 2004. **212**(1): p. 71-81.
 92. Costelli, P. and F.M. Baccino, *Mechanisms of skeletal muscle depletion in wasting syndromes: role of ATP-ubiquitin-dependent proteolysis*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2003. **6**(4): p. 407-12.
 93. Emery, P.W., et al., *Protein synthesis in muscle measured in vivo in cachectic patients with cancer*. Br Med J (Clin Res Ed), 1984. **289**(6445): p. 584-6.
 94. Tisdale, M.J., *Cachexia in cancer patients*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(11): p. 862-71.
 95. Gomes, M.D., et al., *Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(25): p. 14440-5.
 96. Bodine, S.C., et al., *Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1704-8.
 97. Lecker, S.H., et al., *Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression*. Faseb J, 2004. **18**(1): p. 39-51.
 98. Tintignac, L.A., et al., *Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase*. J Biol Chem, 2005. **280**(4): p. 2847-56.
 99. Kwak, K.S., et al., *Regulation of protein catabolism by muscle-specific and cytokine-inducible ubiquitin ligase E3alpha-II during cancer cachexia*. Cancer Res, 2004. **64**(22): p. 8193-8.
 100. Tisdale, M.J., *Cancer cachexia: metabolic alterations and clinical manifestations*. Nutrition, 1997. **13**(1): p. 1-7.
 101. Lundholm, K., et al., *A comparative study of the influence of malignant tumor on host metabolism in mice and man: evaluation of an experimental model*. Cancer, 1978. **42**(2): p. 453-61.
 102. Loberg, R.D., et al., *The lethal phenotype of cancer: the molecular basis of death due to malignancy*. CA Cancer J Clin, 2007. **57**(4): p. 225-41.
 103. Oliff, A., et al., *Tumors secreting human TNF/cachectin induce cachexia in mice*. Cell, 1987. **50**(4): p. 555-63.
 104. Costelli, P., et al., *Tumor necrosis factor-alpha mediates changes in tissue protein turnover in a rat cancer cachexia model*. J Clin Invest, 1993. **92**(6): p. 2783-9.
-

-
105. Langstein, H.N., et al., *The roles of gamma-interferon and tumor necrosis factor alpha in an experimental rat model of cancer cachexia*. *Cancer Res*, 1991. **51**(9): p. 2302-6.
 106. Strassmann, G., et al., *Evidence for the involvement of interleukin 6 in experimental cancer cachexia*. *J Clin Invest*, 1992. **89**(5): p. 1681-4.
 107. Murray, S., et al., *Tumor growth, weight loss and cytokines in SCID mice*. *Cancer Lett*, 1997. **111**(1-2): p. 111-5.
 108. De Blaauw, I., A.M.M. Eggermont, and N.E.P. Deutz, *TNF- α has no direct in vivo metabolic effect in human muscle*. *int J Cancer*, 1997. **71**: p. 148-154.
 109. Busquets, S., et al., *In the rat, tumor necrosis factor alpha administration results in an increase in both UCP2 and UCP3 mRNAs in skeletal muscle: a possible mechanism for cytokine-induced thermogenesis?* *FEBS Lett*, 1998. **440**(3): p. 348-50.
 110. Wigmore, S.J., J.A. Ross, and K. Fearon, *IL-8 and IL-6 are produced constitutively by human pancreatic cancer cell lines*. *Gut*, 1994. **35**: p. 539.
 111. Matthys, P., et al., *Anti-interferon-gamma antibody treatment, growth of Lewis lung tumours in mice and tumour-associated cachexia*. *Eur J Cancer*, 1991. **27**(2): p. 182-7.
 112. Strassmann, G. and T. Kambayashi, *Inhibition of experimental cancer cachexia by anti-cytokine and anti-cytokine-receptor therapy*. *Cytokines Mol Ther*, 1995. **1**(2): p. 107-13.
 113. Guttridge, D.C., et al., *NF-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia*. *Science*, 2000. **289**(5488): p. 2363-6.
 114. Maltoni, M., et al., *Serum levels of tumour necrosis factor alpha and other cytokines do not correlate with weight loss and anorexia in cancer patients*. *Support Care Cancer*, 1997. **5**(2): p. 130-5.
 115. Wigmore, S.J., et al., *Characteristics of patients with pancreatic cancer expressing a novel cancer cachectic factor*. *Br J Surg*, 2000. **87**(1): p. 53-8.
 116. Schaur, R.J., et al., *Tumor host relations. I. Increased plasma cortisol in tumor-bearing humans compared with patients with benign surgical diseases*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 1979. **93**(3): p. 281-5.
 117. Knapp, M.L., et al., *Hormonal factors associated with weight loss in patients with advanced breast cancer*. *Ann Clin Biochem*, 1991. **28** (Pt 5): p. 480-6.
 118. Baumann, H. and J. Gauldie, *The acute phase response*. *Immunol Today*, 1994. **15**(2): p. 74-80.
 119. Shintani, F., et al., *Role of interleukin-1 in stress responses. A putative neurotransmitter*. *Mol Neurobiol*, 1995. **10**(1): p. 47-71.
 120. Bessey, P.Q., et al., *Combined hormonal infusion simulates the metabolic response to injury*. *Ann Surg*, 1984. **200**(3): p. 264-81.
 121. Watters, J.M., et al., *Both inflammatory and endocrine mediators stimulate host responses to sepsis*. *Arch Surg*, 1986. **121**(2): p. 179-90.
 122. Todorov, P., et al., *Characterization of a cancer cachectic factor*. *Nature*, 1996. **379**(6567): p. 739-42.
 123. Wieland, B.M., et al., *Is there a human homologue to the murine proteolysis-inducing factor?* *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(17): p. 4984-92.
 124. Hirai, K., et al., *Biological evaluation of a lipid-mobilizing factor isolated from the urine of cancer patients*. *Cancer Res*, 1998. **58**(11): p. 2359-65.
 125. Russell, S.T., et al., *Induction of lipolysis in vitro and loss of body fat in vivo by zinc-alpha2-glycoprotein*. *Biochim Biophys Acta*, 2004. **1636**(1): p. 59-68.
 126. Tisdale, M.J., *The 'cancer cachectic factor'*. *Support Care Cancer*, 2003. **11**(2): p. 73-8.
-

-
127. Ishiko, O., et al., *Lipolytic activity of anemia-inducing substance from tumor-bearing rabbits*. Nutr Cancer, 1999. **33**(2): p. 201-5.
 128. Wyke, S.M., S.T. Russell, and M.J. Tisdale, *Induction of proteasome expression in skeletal muscle is attenuated by inhibitors of NF-kappaB activation*. Br J Cancer, 2004. **91**(9): p. 1742-50.
 129. Watchorn, T.M., et al., *Proteolysis-inducing factor regulates hepatic gene expression via the transcription factors NF-(kappa)B and STAT3*. Faseb J, 2001. **15**(3): p. 562-4.
 130. Barber, M.D., et al., *A polymorphism of the interleukin-1 beta gene influences survival in pancreatic cancer*. Br J Cancer, 2000. **83**(11): p. 1443-7.
 131. Halma, M.A., et al., *Interferon-gamma polymorphisms correlate with duration of survival in pancreatic cancer*. Hum Immunol, 2004. **65**(11): p. 1405-8.
 132. Ovesen, L., et al., *Effect of dietary counseling on food intake, body weight, response rate, survival, and quality of life in cancer patients undergoing chemotherapy: a prospective, randomized study*. J Clin Oncol, 1993. **11**(10): p. 2043-9.
 133. Barber, M.D., J.A. Ross, and K.C. Fearon, *Cancer cachexia*. Surg Oncol, 1999. **8**(3): p. 133-41.
 134. Barber, M.D., et al., *Should cancer patients with incurable disease receive parenteral or enteral nutritional support?* Eur J Cancer, 1998. **34**(3): p. 279-85.
 135. Willox, J.C., et al., *Prednisolone as an appetite stimulant in patients with cancer*. Br Med J (Clin Res Ed), 1984. **288**(6410): p. 27.
 136. Simons, J.P., et al., *Effects of medroxyprogesterone acetate on food intake, body composition, and resting energy expenditure in patients with advanced, nonhormone-sensitive cancer: a randomized, placebo-controlled trial*. Cancer, 1998. **82**(3): p. 553-60.
 137. Bruera, E., et al., *Effectiveness of megestrol acetate in patients with advanced cancer: a randomized, double-blind, crossover study*. Cancer Prev Control, 1998. **2**(2): p. 74-8.
 138. Loprinzi, C.L., et al., *Body-composition changes in patients who gain weight while receiving megestrol acetate*. J Clin Oncol, 1993. **11**(1): p. 152-4.
 139. McMillan, D.C., et al., *A prospective randomized study of megestrol acetate and ibuprofen in gastrointestinal cancer patients with weight loss*. Br J Cancer, 1999. **79**(3-4): p. 495-500.
 140. Jho, D., et al., *Omega-3 fatty acids: implications for the treatment of tumor-associated inflammation*. Am Surg, 2003. **69**(1): p. 32-6.
 141. Wigmore, S.J., K.C. Fearon, and J.A. Ross, *Modulation of human hepatocyte acute phase protein production in vitro by n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids*. Ann Surg, 1997. **225**(1): p. 103-11.
 142. Barber, M.D., et al., *The effect of an oral nutritional supplement enriched with fish oil on weight-loss in patients with pancreatic cancer*. Br J Cancer, 1999. **81**(1): p. 80-6.
 143. Barber, M.D., et al., *Fish oil-enriched nutritional supplement attenuates progression of the acute-phase response in weight-losing patients with advanced pancreatic cancer*. J Nutr, 1999. **129**(6): p. 1120-5.
 144. Wigmore, S.J., et al., *Effect of oral eicosapentaenoic acid on weight loss in patients with pancreatic cancer*. Nutr Cancer, 2000. **36**(2): p. 177-84.
 145. Mitchelson, F., *Pharmacological agents affecting emesis. A review (Part II)*. Drugs, 1992. **43**(4): p. 443-63.
 146. Garcia, J., *A phase II randomized, placebo-controlled, double-blind study of the efficacy and safety of RC-1291 (RC) for the treatment of cancer cachexia*. Clin. Oncol., 2007. **25**: p. 9133.
-

-
147. Argiles, J.M., F.J. Lopez-Soriano, and S. Busquets, *Novel approaches to the treatment of cachexia*. Drug Discovery Today, 2008. **13**: p. 73-78.
 148. Daneryd, P., *Epoetin alfa for protection of metabolic and exercise capacity in cancer patients*. Semin Oncol, 2002. **29**(3 Suppl 8): p. 69-74.
 149. Daneryd, P., et al., *Protection of metabolic and exercise capacity in unselected weight-losing cancer patients following treatment with recombinant erythropoietin: a randomized prospective study*. Cancer Res, 1998. **58**(23): p. 5374-9.
 150. Torelli, G.F., et al., *Use of recombinant human soluble TNF receptor in anorectic tumor-bearing rats*. Am J Physiol, 1999. **277**(3 Pt 2): p. R850-5.
 151. Trikha, M., et al., *Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(13): p. 4653-65.
 152. Eleutherakis-Papaiakovou, V., A. Bamias, and M.A. Dimopoulos, *Thalidomide in cancer medicine*. Ann Oncol, 2004. **15**(8): p. 1151-60.
 153. Eichhorst, S.T., et al., *Suramin inhibits death receptor-induced apoptosis in vitro and fulminant apoptotic liver damage in mice*. Nat Med, 2004. **10**(6): p. 602-9.
 154. Cangiano, C., et al., *Effects of administration of oral branched-chain amino acids on anorexia and caloric intake in cancer patients*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(8): p. 550-2.
 155. Laviano, A., et al., *Therapy insight: Cancer anorexia-cachexia syndrome--when all you can eat is yourself*. Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2**(3): p. 158-65.
 156. Smith, H.J., N.A. Greenberg, and M.J. Tisdale, *Effect of eicosapentaenoic acid, protein and amino acids on protein synthesis and degradation in skeletal muscle of cachectic mice*. Br J Cancer, 2004. **91**(2): p. 408-12.
 157. Carnot, P. and C. Deflandre, *Haemopoietic activity of the serum in blood regeneration*. R Acad Sci, 1906. **143**: p. 384-386.
 158. Bonsdorff, E. and E. Jalavisto, *A humoral mechanism in anoxic erythrocytosis*. Acta Physiol Scand, 1948. **16**: p. 150-170.
 159. Miyake, T., C.K. Kung, and E. Goldwasser, *Purification of human erythropoietin*. J Biol Chem, 1977. **252**(15): p. 5558-64.
 160. Lin, F.K., et al., *Cloning and expression of the human erythropoietin gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(22): p. 7580-4.
 161. Jacobs, K., et al., *Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin*. Nature, 1985. **313**(6005): p. 806-10.
 162. Watkins, P.C., et al., *Regional assignment of the erythropoietin gene to human chromosome region 7pter---q22*. Cytogenet Cell Genet, 1986. **42**(4): p. 214-8.
 163. Sasaki, R., S. Masuda, and M. Nagao, *Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis*. Biosci Biotechnol Biochem, 2000. **64**(9): p. 1775-93.
 164. Lappin, T.R., A.P. Maxwell, and P.G. Johnston, *EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions*. Stem Cells, 2002. **20**(6): p. 485-92.
 165. Farrell, F. and A. Lee, *The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues*. Oncologist, 2004. **9 Suppl 5**: p. 18-30.
 166. Jelkmann, W., *Erythropoietin after a century of research: younger than ever*. Eur J Haematol, 2007. **78**(3): p. 183-205.
 167. Jelkmann, W., *Molecular biology of erythropoietin*. Intern Med, 2004. **43**(8): p. 649-59.
 168. Maxwell, P.H., et al., *Sites of erythropoietin production*. Kidney Int, 1997. **51**(2): p. 393-401.
 169. Coleman, T. and M. Brines, *Science review: recombinant human erythropoietin in critical illness: a role beyond anemia?* Crit Care, 2004. **8**(5): p. 337-41.
-

170. Ebert, B.L. and H.F. Bunn, *Regulation of the erythropoietin gene*. Blood, 1999. **94**(6): p. 1864-77.
171. Jelkmann, W., *Erythropoietin: structure, control of production, and function*. Physiol Rev, 1992. **72**(2): p. 449-89.
172. Koury, M.J. and M.C. Bondurant, *The molecular mechanism of erythropoietin action*. Eur J Biochem, 1992. **210**(3): p. 649-63.
173. Udupa, K.B., *Functional significance of erythropoietin receptor on tumor cells*. World J Gastroenterol, 2006. **12**(46): p. 7460-2.
174. Youssoufian, H., et al., *Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor*. Blood, 1993. **81**(9): p. 2223-36.
175. Hardee, M.E., et al., *Erythropoietin biology in cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(2): p. 332-9.
176. Johnson, D.W., C. Forman, and D.A. Vesey, *Novel renoprotective actions of erythropoietin: new uses for an old hormone*. Nephrology (Carlton), 2006. **11**(4): p. 306-12.
177. Yi, T., et al., *Hematopoietic cell phosphatase associates with erythropoietin (Epo) receptor after Epo-induced receptor tyrosine phosphorylation: identification of potential binding sites*. Blood, 1995. **85**(1): p. 87-95.
178. Verdier, F., et al., *Proteasomes regulate the duration of erythropoietin receptor activation by controlling down-regulation of cell surface receptors*. J Biol Chem, 2000. **275**(24): p. 18375-81.
179. Chikuma, M., et al., *Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2000. **279**(6): p. E1242-8.
180. Bahlmann, F.H., et al., *Erythropoietin: is it more than correcting anaemia?* Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(1): p. 20-2.
181. Wu, H., et al., *Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor*. Cell, 1995. **83**(1): p. 59-67.
182. Kertesz, N., et al., *The role of erythropoietin in regulating angiogenesis*. Dev Biol, 2004. **276**(1): p. 101-10.
183. Wu, H., et al., *Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis*. Development, 1999. **126**(16): p. 3597-605.
184. Suzuki, N., et al., *Erythroid-specific expression of the erythropoietin receptor rescued its null mutant mice from lethality*. Blood, 2002. **100**(7): p. 2279-88.
185. Yasuda, Y., et al., *Estrogen-dependent production of erythropoietin in uterus and its implication in uterine angiogenesis*. J Biol Chem, 1998. **273**(39): p. 25381-7.
186. Haroon, Z.A., et al., *A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response*. Am J Pathol, 2003. **163**(3): p. 993-1000.
187. Sakanaka, M., et al., *In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(8): p. 4635-40.
188. Watanabe, D., et al., *Erythropoietin as a retinal angiogenic factor in proliferative diabetic retinopathy*. N Engl J Med, 2005. **353**(8): p. 782-92.
189. Ogilvie, M., et al., *Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts*. J Biol Chem, 2000. **275**(50): p. 39754-61.
190. Westenfelder, C., D.L. Biddle, and R.L. Baranowski, *Human, rat, and mouse kidney cells express functional erythropoietin receptors*. Kidney Int, 1999. **55**(3): p. 808-20.
191. Juul, S.E., et al., *Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine*. Gut, 2001. **49**(2): p. 182-9.

-
192. Anagnostou, A., et al., *Erythropoietin has a mitogenic and positive chemotactic effect on endothelial cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(15): p. 5978-82.
 193. Carlini, R.G., et al., *Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) increases endothelin-1 release by endothelial cells*. Kidney Int, 1993. **43**(5): p. 1010-4.
 194. Haller, H., et al., *Signal transduction of erythropoietin in endothelial cells*. Kidney Int, 1996. **50**(2): p. 481-8.
 195. Maiese, K., F. Li, and Z.Z. Chong, *New avenues of exploration for erythropoietin*. Jama, 2005. **293**(1): p. 90-5.
 196. Agnello, D., et al., *Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Brain Res, 2002. **952**(1): p. 128-34.
 197. Grasso, G., et al., *Erythropoietin as a tissue-protective cytokine in brain injury: what do we know and where do we go?* Neuroscientist, 2004. **10**(2): p. 93-8.
 198. Ehrenreich, H., et al., *Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial*. Mol Med, 2002. **8**(8): p. 495-505.
 199. Hanlon, P.R., et al., *Mechanisms of erythropoietin-mediated cardioprotection during ischemia-reperfusion injury: role of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling*. Faseb J, 2005. **19**(10): p. 1323-5.
 200. Vesey, D.A., et al., *Erythropoietin protects against ischaemic acute renal injury*. Nephrol Dial Transplant, 2004. **19**(2): p. 348-55.
 201. Bagnis, C., et al., *Erythropoietin enhances recovery after cisplatin-induced acute renal failure in the rat*. Nephrol Dial Transplant, 2001. **16**(5): p. 932-8.
 202. Bianchi, R., et al., *Erythropoietin both protects from and reverses experimental diabetic neuropathy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(3): p. 823-8.
 203. Brines, M., et al., *Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(41): p. 14907-12.
 204. Brines, M. and A. Cerami, *Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise*. Kidney Int, 2006. **70**(2): p. 246-50.
 205. Masuda, S., et al., *Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 11208-16.
 206. Brines, M.L., et al., *Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10526-31.
 207. Chatterjee, P.K., *Pleiotropic renal actions of erythropoietin*. Lancet, 2005. **365**(9474): p. 1890-2.
 208. Glaspy, J.A., *Cancer patient survival and erythropoietin*. J Natl Compr Canc Netw, 2005. **3**(6): p. 796-804.
 209. Elliott, S., et al., *Anti-Epo receptor antibodies do not predict Epo receptor expression*. Blood, 2006. **107**(5): p. 1892-5.
 210. Acs, G., et al., *Erythropoietin and erythropoietin receptor expression in human cancer*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3561-5.
 211. Westenfelder, C. and R.L. Baranowski, *Erythropoietin stimulates proliferation of human renal carcinoma cells*. Kidney Int, 2000. **58**(2): p. 647-57.
 212. Batra, S., et al., *Pediatric tumor cells express erythropoietin and a functional erythropoietin receptor that promotes angiogenesis and tumor cell survival*. Lab Invest, 2003. **83**(10): p. 1477-87.
 213. LaMontagne, K.R., et al., *Recombinant epoetins do not stimulate tumor growth in erythropoietin receptor-positive breast carcinoma models*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(2): p. 347-55.
-

-
214. Westphal, G., et al., *Erythropoietin and G-CSF receptors in human tumor cells: expression and aspects regarding functionality*. Tumori, 2002. **88**(2): p. 150-9.
215. Dillard, D.G., et al., *Immunolocalization of erythropoietin and erythropoietin receptor in vestibular schwannoma*. Acta Otolaryngol, 2001. **121**(2): p. 149-52.
216. Selzer, E., et al., *Erythropoietin receptor expression in human melanoma cells*. Melanoma Res, 2000. **10**(5): p. 421-6.
217. Rosti, V., et al., *Effect of recombinant human erythropoietin on hematopoietic and non-hematopoietic malignant cell growth in vitro*. Haematologica, 1993. **78**(4): p. 208-12.
218. Liu, W.M., et al., *Effect of haemopoietic growth factors on cancer cell lines and their role in chemosensitivity*. Oncogene, 2004. **23**(4): p. 981-90.
219. Acs, G., et al., *Hypoxia-inducible erythropoietin signaling in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the uterine cervix and its potential role in cervical carcinogenesis and tumor progression*. Am J Pathol, 2003. **162**(6): p. 1789-806.
220. Kumar, S.M., et al., *Functional erythropoietin autocrine loop in melanoma*. Am J Pathol, 2005. **166**(3): p. 823-30.
221. Leyland-Jones, B., et al., *Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study*. J Clin Oncol, 2005. **23**(25): p. 5960-72.
222. Henke, M., et al., *Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet, 2003. **362**(9392): p. 1255-60.
223. Wun, T., et al., *Increased incidence of symptomatic venous thrombosis in patients with cervical carcinoma treated with concurrent chemotherapy, radiation, and erythropoietin*. Cancer, 2003. **98**(7): p. 1514-20.
224. Osterborg, A., et al., *Preclinical studies of erythropoietin receptor expression in tumour cells: impact on clinical use of erythropoietic proteins to correct cancer-related anaemia*. Eur J Cancer, 2007. **43**(3): p. 510-9.
225. Leyland-Jones, B., *Breast cancer trial with erythropoietin terminated unexpectedly*. Lancet Oncol, 2003. **4**(8): p. 459-60.
226. Brines, M. 2008.
227. Brines, M., et al., *Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(31): p. 10925-30.
228. Juul, S.E., *Nonerythropoietic roles of erythropoietin in the fetus and neonate*. Clin Perinatol, 2000. **27**(3): p. 527-41.
229. Miskowiak, K., U. O'Sullivan, and C.J. Harmer, *Erythropoietin enhances hippocampal response during memory retrieval in humans*. J Neurosci, 2007. **27**(11): p. 2788-92.
230. Ehrenreich, H., et al., *Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin*. Mol Psychiatry, 2007. **12**(2): p. 206-20.
231. Boissel, J.P., et al., *Erythropoietin structure-function relationships. Mutant proteins that test a model of tertiary structure*. J Biol Chem, 1993. **268**(21): p. 15983-93.
232. Cheetham, J.C., et al., *NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(10): p. 861-6.
233. Elliott, S., et al., *Mapping of the active site of recombinant human erythropoietin*. Blood, 1997. **89**(2): p. 493-502.
-

-
234. Wen, D., et al., *Erythropoietin structure-function relationships. Identification of functionally important domains*. J Biol Chem, 1994. **269**(36): p. 22839-46.
235. Leist, M., et al., *Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic*. Science, 2004. **305**(5681): p. 239-42.
236. Murphy, J.M. and I.G. Young, *IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor*. Vitam Horm, 2006. **74**: p. 1-30.
237. Syed, R.S., et al., *Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation*. Nature, 1998. **395**(6701): p. 511-6.
238. Mennini, T., et al., *Nonhematopoietic erythropoietin derivatives prevent motoneuron degeneration in vitro and in vivo*. Mol Med, 2006. **12**(7-8): p. 153-60.
239. De Paola, M., et al., *Chemokine MIP-2/CXCL2, acting on CXCR2, induces motor neuron death in primary cultures*. Neuroimmunomodulation, 2007. **14**(6): p. 310-6.
240. Erbayraktar, S., et al., *Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(11): p. 6741-6.
241. Villa, P., et al., *Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007. **27**(3): p. 552-63.
242. Yu, L., et al., *Investigation of N-terminal glutamate cyclization of recombinant monoclonal antibody in formulation development*. J Pharm Biomed Anal, 2006. **42**(4): p. 455-63.
243. Patel, N.S., et al., *Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo*. Kidney Int, 2004. **66**(3): p. 983-9.
244. Miskowiak, K., et al., *Differential effects of erythropoietin on neural and cognitive measures of executive function 3 and 7 days post-administration*. Exp Brain Res, 2008. **184**(3): p. 313-21.
245. Campana, W.M., R. Misasi, and J.S. O'Brien, *Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin*. Int J Mol Med, 1998. **1**(1): p. 235-41.
246. Brines, M., *Tissue protective peptides and uses thereof*. 2007.
247. Reiter, M.J., *Cardiovascular drug class specificity: beta-blockers*. Prog Cardiovasc Dis, 2004. **47**(1): p. 11-33.
248. Blumenfeld, J.D., et al., *Beta-adrenergic receptor blockade as a therapeutic approach for suppressing the renin-angiotensin-aldosterone system in normotensive and hypertensive subjects*. Am J Hypertens, 1999. **12**(5): p. 451-9.
249. Herndon, D.N., et al., *Reversal of catabolism by beta-blockade after severe burns*. N Engl J Med, 2001. **345**(17): p. 1223-9.
250. Sharma, A.M., et al., *Hypothesis: Beta-adrenergic receptor blockers and weight gain: A systematic analysis*. Hypertension, 2001. **37**(2): p. 250-4.
251. Donahoo, W.T., et al., *Isoproterenol and somatostatin decrease plasma leptin in humans: a novel mechanism regulating leptin secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): p. 4139-43.
252. Hryniewicz, K., et al., *Partial reversal of cachexia by beta-adrenergic receptor blocker therapy in patients with chronic heart failure*. J Card Fail, 2003. **9**(6): p. 464-8.
253. Anker, S.D., et al., *Does Carvedilol prevent and reverse cardiac cachexia in patients with severe heart failure? Results of the COPERNICUS study*. Eur Heart J, 2002. **23**: p. 394.
-

254. Anker, S.D., P. Lechat, and H.J. Dargie, *Prevention of cachexia in patients with chronic heart failure by bisoprolol: results from the CIBIS-II study*. J Am Coll Cardiol, 2003. **41**: p. 156A-157A.
255. Lainscak, M., I. Keber, and S.D. Anker, *Body composition changes in patients with systolic heart failure treated with beta blockers: a pilot study*. Int J Cardiol, 2006. **106**(3): p. 319-22.
256. von Haehling, S., et al., *Effect of noradrenaline and isoproterenol on lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha production in whole blood from patients with chronic heart failure and the role of beta-adrenergic receptors*. Am J Cardiol, 2005. **95**(7): p. 885-9.
257. Weber, M.A., *The role of the new beta-blockers in treating cardiovascular disease*. Am J Hypertens, 2005. **18**(12 Pt 2): p. 169S-176S.
258. Costelli, P., et al., *Muscle protein waste in tumor-bearing rats is effectively antagonized by a beta 2-adrenergic agonist (clenbuterol). Role of the ATP-ubiquitin-dependent proteolytic pathway*. J Clin Invest, 1995. **95**(5): p. 2367-72.
259. Cremades, O., et al., *Nutritional treatment of cancer cachexia in rats. Use of a diet formulated with a crayfish enzymatic extract*. Eur J Nutr, 2007. **46**(6): p. 347-53.
260. Mitch, W.E. and S.R. Price, *Mechanisms activating proteolysis to cause muscle atrophy in catabolic conditions*. J Ren Nutr, 2003. **13**(2): p. 149-52.
261. Fuster, G., et al., *Are peroxisome proliferator-activated receptors involved in skeletal muscle wasting during experimental cancer cachexia? Role of beta2-adrenergic agonists*. Cancer Res, 2007. **67**(13): p. 6512-9.
262. Meijnsing, B., et al., *Effects of the phosphodiesterase-IV inhibitor EMD 95832/3 on tumour growth and cachexia in rats bearing the Yoshida AH-130 ascites hepatoma*. Cancer Lett, 2002. **188**(1-2): p. 53-8.
263. Tessitore, L., et al., *Cancer cachexia, malnutrition, and tissue protein turnover in experimental animals*. Arch Biochem Biophys, 1993. **306**(1): p. 52-8.
264. Anker, S.D., et al., *Elevated soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure*. Am J Cardiol, 1997. **79**(10): p. 1426-30.
265. *Polycythemia vera: the natural history of 1213 patients followed for 20 years. Gruppo Italiano Studio Policitemia*. Ann Intern Med, 1995. **123**(9): p. 656-64.
266. Cervantes, F., et al., *Acute transformation in nonleukemic chronic myeloproliferative disorders: actuarial probability and main characteristics in a series of 218 patients*. Acta Haematol, 1991. **85**(3): p. 124-7.
267. Latini, R., M. Brines, and F. Fiordaliso, *Do non-hemopoietic effects of erythropoietin play a beneficial role in heart failure?* Heart Fail Rev, 2008. **13**(4): p. 415-23.
268. Miller, C.B., et al., *Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer*. N Engl J Med, 1990. **322**(24): p. 1689-92.
269. Barosi, G., M. Marchetti, and N.L. Liberato, *Cost-effectiveness of recombinant human erythropoietin in the prevention of chemotherapy-induced anaemia*. Br J Cancer, 1998. **78**(6): p. 781-7.
270. Glaspy, J., et al., *Impact of therapy with epoetin alfa on clinical outcomes in patients with nonmyeloid malignancies during cancer chemotherapy in community oncology practice. Procrit Study Group*. J Clin Oncol, 1997. **15**(3): p. 1218-34.
271. Demetri, G.D., et al., *Quality-of-life benefit in chemotherapy patients treated with epoetin alfa is independent of disease response or tumor type: results from a prospective community oncology study. Procrit Study Group*. J Clin Oncol, 1998. **16**(10): p. 3412-25.

272. Dunst, J., *Hemoglobin level and anemia in radiation oncology: prognostic impact and therapeutic implications*. Semin Oncol, 2000. **27**(2 Suppl 4): p. 4-8; discussion 16-7.
273. Silverberg, D.S., et al., *The effect of correction of mild anemia in severe, resistant congestive heart failure using subcutaneous erythropoietin and intravenous iron: a randomized controlled study*. J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(7): p. 1775-80.
274. Mancini, D.M., et al., *Effect of erythropoietin on exercise capacity in patients with moderate to severe chronic heart failure*. Circulation, 2003. **107**(2): p. 294-9.
275. Lipsic, E., et al., *Protective effects of erythropoietin in cardiac ischemia: from bench to bedside*. J Am Coll Cardiol, 2006. **48**(11): p. 2161-7.
276. Bahlmann, F.H., et al., *Low-dose therapy with the long-acting erythropoietin analogue darbepoetin alpha persistently activates endothelial Akt and attenuates progressive organ failure*. Circulation, 2004. **110**(8): p. 1006-12.
277. Kanzaki, M., et al., *Erythropoietin attenuates cachectic events and decreases production of interleukin-6, a cachexia-inducing cytokine*. Cytokine, 2005. **32**(5): p. 234-9.
278. Quirt, I., et al., *Epoetin alfa therapy increases hemoglobin levels and improves quality of life in patients with cancer-related anemia who are not receiving chemotherapy and patients with anemia who are receiving chemotherapy*. J Clin Oncol, 2001. **19**(21): p. 4126-34.
279. Libretto, S.E., et al., *Improvement in quality of life for cancer patients treated with epoetin alfa*. Eur J Cancer Care (Engl), 2001. **10**(3): p. 183-91.
280. Das, U.N., *Free radicals, cytokines and nitric oxide in cardiac failure and myocardial infarction*. Mol Cell Biochem, 2000. **215**(1-2): p. 145-52.
281. Doehner, W., et al., *Uric acid in cachectic and noncachectic patients with chronic heart failure: relationship to leg vascular resistance*. Am Heart J, 2001. **141**(5): p. 792-9.
282. Maxwell, P., *HIF-1: an oxygen response system with special relevance to the kidney*. J Am Soc Nephrol, 2003. **14**(11): p. 2712-22.
283. Calvillo, L., et al., *Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(8): p. 4802-6.
284. Parsa, C.J., et al., *A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart*. J Clin Invest, 2003. **112**(7): p. 999-1007.
285. Tramontano, A.F., et al., *Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **308**(4): p. 990-4.
286. Cai, Z. and G.L. Semenza, *Phosphatidylinositol-3-kinase signaling is required for erythropoietin-mediated acute protection against myocardial ischemia/reperfusion injury*. Circulation, 2004. **109**(17): p. 2050-3.
287. Moon, C., et al., *Erythropoietin, modified to not stimulate red blood cell production, retains its cardioprotective properties*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **316**(3): p. 999-1005.
288. Fiordaliso, F., et al., *A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(6): p. 2046-51.
289. Srisawat, N., et al., *Erythropoietin and its non-erythropoietic derivative: Do they ameliorate renal tubulointerstitial injury in ureteral obstruction?* Int J Urol, 2008.

-
290. van der Meer, P., et al., *Erythropoietin induces neovascularization and improves cardiac function in rats with heart failure after myocardial infarction*. J Am Coll Cardiol, 2005. **46**(1): p. 125-33.
291. Nishiya, D., et al., *Effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction*. J Pharmacol Sci, 2006. **101**(1): p. 31-9.
292. Baker, J.E., *Erythropoietin mimics ischemic preconditioning*. Vascul Pharmacol, 2005. **42**(5-6): p. 233-41.
293. Rafiee, P., et al., *Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways*. Basic Res Cardiol, 2005. **100**(3): p. 187-97.
294. Chong, Z.Z., J.Q. Kang, and K. Maiese, *Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases*. Circulation, 2002. **106**(23): p. 2973-9.
295. von Lindern, M., et al., *Protein kinase C alpha controls erythropoietin receptor signaling*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34719-27.
296. Kawakami, M., et al., *Erythropoietin inhibits calcium-induced neurotransmitter release from clonal neuronal cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **279**(1): p. 293-7.
297. Wald, M.R., E.S. Borda, and L. Sterin-Borda, *Mitogenic effect of erythropoietin on neonatal rat cardiomyocytes: signal transduction pathways*. J Cell Physiol, 1996. **167**(3): p. 461-8.
298. Shi, Y., et al., *Acute cardioprotective effects of erythropoietin in infant rabbits are mediated by activation of protein kinases and potassium channels*. Basic Res Cardiol, 2004. **99**(3): p. 173-82.
299. Maulik, N., et al., *Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors*. FEBS Lett, 2000. **485**(1): p. 7-12.
300. Brines, M. and A. Cerami, *Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(6): p. 484-94.
301. Liu, X., et al., *Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion*. Life Sci, 2006. **78**(19): p. 2255-64.
302. Burger, D., et al., *Erythropoietin protects cardiomyocytes from apoptosis via up-regulation of endothelial nitric oxide synthase*. Cardiovasc Res, 2006. **72**(1): p. 51-9.
303. Ben-Dor, I., et al., *Repeated low-dose of erythropoietin is associated with improved left ventricular function in rat acute myocardial infarction model*. Cardiovasc Drugs Ther, 2007. **21**(5): p. 339-46.
304. Westenbrink, B.D., et al., *Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularization*. Eur Heart J, 2007. **28**(16): p. 2018-27.
305. Silverberg, D.S., D. Wexler, and A. Iaina, *The importance of anemia and its correction in the management of severe congestive heart failure*. Eur J Heart Fail, 2002. **4**(6): p. 681-6.
306. Lipsic, E., et al., *Low-dose erythropoietin improves cardiac function in experimental heart failure without increasing haematocrit*. Eur J Heart Fail, 2008. **10**(1): p. 22-9.
307. Schneider, C., et al., *Attenuation of cardiac remodelling by endocardial injection of erythropoietin: ultrasonic strain-rate imaging in a model of hibernating myocardium*. Eur Heart J, 2007. **28**(4): p. 499-509.
308. Nishihara, M., et al., *Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(2): p. H748-55.
-

-
309. Lipsic, E., et al., *Timing of erythropoietin treatment for cardioprotection in ischemia/reperfusion*. J Cardiovasc Pharmacol, 2004. **44**(4): p. 473-9.
310. Moon, C., et al., *Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11612-7.
311. Parsa, C.J., et al., *Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts*. J Biol Chem, 2004. **279**(20): p. 20655-62.
312. Cai, Z., et al., *Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury*. Circulation, 2003. **108**(1): p. 79-85.
313. Chattopadhyay, A., et al., *Protective effect of erythropoietin on the oxidative damage of erythrocyte membrane by hydroxyl radical*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(4): p. 419-25.
314. Dhalla, N.S., et al., *Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury*. Cardiovasc Res, 2000. **47**(3): p. 446-56.
315. Strippoli, G.F., et al., *Haemoglobin targets: we were wrong, time to move on*. Lancet, 2007. **369**(9559): p. 346-50.
316. Singh, A.K., et al., *Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease*. N Engl J Med, 2006. **355**(20): p. 2085-98.
317. Cotter, D.J., et al., *Hematocrit was not validated as a surrogate end point for survival among epoetin-treated hemodialysis patients*. J Clin Epidemiol, 2004. **57**(10): p. 1086-95.
318. Packer, M., et al., *The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure*. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. N Engl J Med, 1996. **334**(21): p. 1349-55.
319. Packer, M., et al., *Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure*. N Engl J Med, 2001. **344**(22): p. 1651-8.
320. *CIBIS III trial: Bisoprolol treatment for CHF leads to 46% reduction in sudden death after one year*. Cardiovasc J S Afr, 2006. **17**(5): p. 278.
321. Welle, S., R.G. Schwartz, and M. Statt, *Reduced metabolic rate during beta-adrenergic blockade in humans*. Metabolism, 1991. **40**(6): p. 619-22.
322. Astrup, A., et al., *Epinephrine mediates facultative carbohydrate-induced thermogenesis in human skeletal muscle*. Am J Physiol, 1989. **257**(3 Pt 1): p. E340-5.
323. de Jonge, L. and G.A. Bray, *The thermic effect of food and obesity: a critical review*. Obes Res, 1997. **5**(6): p. 622-31.
324. Koch, G., I.W. Franz, and F.W. Lohmann, *Effects of short-term and long-term treatment with cardio-selective and non-selective beta-receptor blockade on carbohydrate and lipid metabolism and on plasma catecholamines at rest and during exercise*. Clin Sci (Lond), 1981. **61 Suppl 7**: p. 433s-435s.
325. Fisher, M.L., et al., *Beneficial effects of metoprolol in heart failure associated with coronary artery disease: a randomized trial*. J Am Coll Cardiol, 1994. **23**(4): p. 943-50.
326. Cruickshank, J.M., *Are we misunderstanding beta-blockers*. Int J Cardiol, 2007. **120**(1): p. 10-27.

(AG Anker)

Um die Anzahl der Versuchstiere möglichst gering zu halten wurden aus Gründen des Tierschutzes die für die Sham Gruppen, die mit Placebo behandelte Tumorgruppe und die Bisoprolol Gruppe ermittelten Daten von der Arbeitsgruppe Anker (Kai Hartmann, Katja Schmidt, Valerie Flach und Tanja Hamm) gemeinsam erhoben und auch in allen Arbeiten

als gemeinsame Daten veröffentlicht. Daten, die in dieser Arbeit veröffentlicht werden und als gemeinsame Daten der Arbeitsgruppe Anker ^(AG Anker) gekennzeichnet sind, werden auch in folgenden Arbeiten verwendet:

Hartmann, Kai, *Der Einfluss der Xanthinoxidasehemmer Allopurinol und Oxypurinol auf Gewichtsverlauf, Körperzusammensetzung und spontane Aktivität in einem Rattenmodell der Tumorkachexie*, Dissertation, FU Berlin, 2010

Schmidt, Katja, *Der Einfluss von Bisoprolol und IGF-1 als alleinige Medikation und in Kombination auf Gewichtsverlauf, Körperzusammensetzung, spontane Aktivität und Herzfunktion in einem Rattenmodell der Tumor-Kachexie*, Dissertation, FU Berlin, 2011

Flach, Valerie, Dissertation in Vorbereitung

Danksagung

Allen, die zur Realisierung dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich an dieser Stelle danken, auch wenn sie hier nicht namentlich erwähnt sein sollten.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Anker für die Betreuung und Begutachtung meiner Dissertation.

Auch Herrn Prof. Dr. Gruber möchte ich für die Begutachtung meiner Dissertation danken.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Jochen Springer für die gute Betreuung und die Unterstützung während der langen Versuchsphase.

Desweiteren danke ich Frau Sandra Palus, Herrn Arne Hillmann, Frau Dr. Nadine Möller und Herrn Prof. Yoshihiro Akashi für ihre Mithilfe.

Meinen Kollegen Dr. Kai Hartmann, Dr. Katja Schmidt, Valerie Flach und Bettina Fritze möchte ich für die gute Zusammenarbeit danken. Besonders Katja und Kai, die mir gute Freunde geworden sind, danke ich ganz herzlich für die Unterstützung in allen Lebenslagen.

Mein herzlicher Dank gilt auch meinem Bruder Markus Kesenheimer und meiner Schwägerin Martina Kesenheimer sowie meiner Tante Heidi Braun-Denzinger und meinem Onkel Anton Denzinger für ihren Zuspruch und ihre Unterstützung.

Meiner lieben Freundin Sarah Wessinger danke ich für die stets offene Tür und den Familienanschluss im fernen Berlin.

Kai Richter möchte ich für die stetige Ermutigung danken.

Nicole Streuli, Anja Heidemann, Dr. Aenne Gäch, Dr. Barbara Nieberle, Dr. Cornelia Schulz und im besonderen Dr. Manuela Käser danke ich ganz herzlich für die Unterstützung und Aufmunterung nicht nur während dieser Dissertation.

Tausend Dank meinem Mann Mirko Hamm für den Beistand auf der langen Zielgeraden.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Wolfgang und Rosemarie Braun, für alles.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Der Einfluss von Erythropoetin und Tissue Protective Molecule auf Gewichtsverlauf, Körperzusammensetzung und spontane Aktivität in einem Rattenmodell der Tumorkachexie“ selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe.

Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen in Anspruch genommen habe.

Aach-Linz,, den 13.09.2012

Tanja Hamm