

**Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie**

**der Universität Würzburg**

**Direktor: Professor Dr. med. Klaus Toyka**

**Spinale Effekte von TNF- $\alpha$  am Modell des tumor-  
induzierten Knochenschmerzes der Maus**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Michael Graulich**

**aus Ottobeuren**

**Würzburg, Oktober 2010**

**Referentin: Professor Dr. med. Claudia Sommer**

**Koreferentin: Professor Dr. rer. nat. Anna-Leena Sirén**

**Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2011**

**Der Promovend ist Arzt**



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	1
1.1	Einführung	1
1.2	Theoretische Grundlagen	1
1.2.1	Tumorschmerz - Grundlagen und Entstehungsmechanismen	1
1.2.2	Schmerzverhalten und Schmerzqualitäten	2
1.2.3	Das tumorinduzierte Schmerzmodell	3
1.2.4	Neuropathische Schmerzmodelle	3
1.2.5	Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) $\alpha$	4
1.2.6	Die Rolle von TNF- $\alpha$ bei der Entstehung von neuropathischem Schmerz	6
1.2.7	Zentrale Sensibilisierung und Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia	7
1.3	Problemstellung	
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	11
2.1	Versuchstiere und Versuchsgruppen	11
2.2	Zellkultur	13
2.2.1	Auftauen	13
2.2.2	Splitten	13
2.2.3	Einfrieren	13
2.2.4	Gewinnung der Zellen für die Injektion	14
2.3	Tiermodell zur Induktion des Knochentumors	14
2.4	Intraperitoneale Injektion der Medikamente	16
2.4.1	Minocyclin	16
2.4.2	Etanercept	16

<b>2.5 Verhaltenstestungen</b>	17
2.5.1 Gewicht	17
2.5.2 von Frey-Test zur Testung der mechanischen Allodynie	17
2.5.3 Testung von belastungsinduziertem Schmerz	19
2.5.4 Testung des Schmerzverhaltens bei natürlicher Bewegung	19
2.5.5 Testung von nicht provoziertem Schmerzverhalten	20
<b>2.6 Verarbeitung des Gewebes</b>	20
2.6.1 Gewebeentnahme	21
2.6.2 Verarbeitung des Rückenmarks	21
2.6.3 Verarbeitung der Knochen	21
<b>2.7 Färbungen der Gewebe</b>	21
2.7.1 Hämalaun-Eosin-Färbung	22
2.7.2 TRAP-Färbung	22
2.7.3 Immunhistochemie (CD11b-Färbung)	23
2.7.4 Immunfluoreszenzchemie (GFAP)	23
<b>2.8 Auswertung der Histologie</b>	25
<b>2.9 Statistische Auswertung</b>	26
<b>3 Ergebnisse</b>	27
<b>3.1 Auswertung der Verhaltenstestungen</b>	27
3.1.1 Körpergewicht	27
3.1.2 Wildtyp ohne Tumor vs. Wildtyp mit Tumor	27
3.1.3 Wildtyp mit Tumor: Minocyclin vs. NaCl 0,9 %	29
3.1.4 Vergleich der Wildtypen mit den TNFR-defizienten Versuchstieren	29
3.1.5 Wildtyp mit Tumor: Etanercept vs. humanes IgG	31

<b>3.2</b>	<b>Auswertung der Knochenfärbungen</b>	32
3.2.1	Tumorgroße, Hämalaun-Eosin-Färbung	32
3.2.2	Osteoklastenaktivierung, TRAP-Färbung	32
3.2.3	Astrozytenaktivierung, GFAP-Färbung	34
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	35
<b>4.1</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	35
<b>4.2</b>	<b>Interpretation der Verhaltenstestungen</b>	36
4.2.1	Behandlung mit Minocyclin	36
4.2.2	Mechanische Allodynie bei TNFR defizienten Tieren	37
4.2.3	Behandlung mit Etanercept	39
<b>4.3</b>	<b>Interpretation der Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen</b>	40
4.3.1	GFAP-Immunreaktivität	40
4.3.2	Analyse der Knochenmorphologie und Osteoklastenaktivierung	41
<b>4.4</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick</b>	43
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	45
<b>6</b>	<b>Abbildungen und Graphen</b>	46
<b>6.1</b>	<b>Verhaltenstestungen</b>	46
6.1.1	WT ohne Tumor vs. WT mit Tumor	46
6.1.2	WT mit Tumor, Minocyclin vs. NaCl 0,9 %	49
6.1.3	WT mit Tumor vs. TNFR1 -/- vs. TNFR2 -/- vs. TNFR1/2 -/-	52
6.1.4	WT mit Tumor mit Etanercept vs. WT mit Tumor mit IgG	55

<b>6.2</b>	<b>Auswertungen der histologischen Studien</b>	59
6.2.1	Semiquantitative Bestimmung der TumorgroÙe	59
6.2.2	Messungen der TRAP-positiven Flächen (Osteoklasten)	60
6.2.3	Messungen der GFAP-positiven Flächen (Astrozyten)	62
<b>6.3</b>	<b>Bilder morphologischer Untersuchungen</b>	65
6.3.1	Hämalan-Eosin-Färbung des Knochens und Tumorausbreitung	65
6.3.2	Osteoklastenaktivität, TRAP-Färbung	68
6.3.3	Astrozytenaktivierung, GFAP-Immunfluoreszenzfärbung	70
6.3.4	Bildverarbeitung	71
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	72
<b>8</b>	<b>Danksagung</b>	82
<b>9</b>	<b>Lebenslauf</b>	83

# 1 Einleitung

## 1.1 Einführung

Durch Tumorbesiedlung des Skeletts bedingte Schmerzen stellen ein häufiges und schwerwiegendes Problem im klinisch-onkologischen Alltag dar. Primäre Knochentumoren sind sehr viel seltener als Knochenmetastasen (Halvorson et al. 2006). Zwei Drittel aller Patienten mit Knochenmetastasen leiden an starken Schmerzen, ein Viertel von ihnen an unkontrollierbaren Schmerzen (Gralow et al. 2007). Bei Vorliegen von Knochenmetastasen stellen Schmerzen ein Leitsymptom dar. Die Mechanismen der Entstehung und der Aufrechterhaltung dieser Schmerzen sind trotz intensiver Forschung in vielen Punkten noch unklar (Sabino et al. 2005). Das Spektrum der Malignome, der gutartigen Neoplasien und der metastatischen Absiedelungen anderer Primärtumore ist breit gefächert. Der Befall des Skeletts ist dabei eine der häufigsten Ursachen von tumorinduziertem Schmerz, der durch infiltratives Wachstum des Tumors, Veränderungen der Knochenstruktur und Zerstörung der betroffenen Knochen entsteht.

## 1.2 Theoretische Grundlagen

### 1.2.1 Tumorschmerz - Grundlagen und Entstehungsmechanismen

Knöchernen Strukturen verfügen nicht nur über eine ausgeprägte Vaskularisation um ständige Ab- und Umbauprozesse zu unterhalten, sondern auch über eine ebenso ausgeprägte sensible und sympathische Innervierung sowohl des Periosts als auch des Knochenmarks und der mineralisierten Teile, Spongiosa und Compacta. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um langsam leitende, nichtmyelinisierte C-Fasern und schnelle, myelinisierte A $\delta$ -Fasern (Mach et al. 2002). Frühere Studien ließen vermuten, dass eine mechanische Reizung des Periosts die Hauptursache von Knochenschmerzen ist (Mercadante 1997). Heute geht man von einer multikausalen Pathogenese des tumorinduzierten Knochenschmerzes aus.

Tumorinduzierter Knochenschmerz geht mit einer lokalen Aktivierung von Osteoklasten im Knochen einher, welche die Ursache für den osteolytischen Abbau des betroffenen Knochens sind. Gleichzeitig werden afferente Nervenfasern direkt durch Infiltration oder indirekt durch Verdrängung durch den Tumor zerstört oder gestört, was



in der abnormen Stimulation von peripheren Nozizeptoren resultieren kann (Peters et al. 2005). Werden Axone von Tumorzellen infiltriert, kommt es in den Zellkörpern der betreffenden sensiblen Neurone zu einer starken Hochregulierung von „activating transcription factor 3 (ATF 3)“, einem Transskriptionsfaktor der Familie ATF/CREB, der normalerweise nicht in sensiblen Neuronen nachweisbar ist, bei Schädigung ihrer Axone aber stark exprimiert wird (Nakagomi et al. 2003; Peters et al. 2005).

Im Rückenmark kommt es im Rahmen des Schmerzgeschehens zu einer zentralen Sensibilisierung von Neuronen. Pseudounipolare Neurone im Spinalganglion leiten über schnelle, myelinisierte A- $\delta$ -Fasern und über langsame, nichtmyelinisierte C-Fasern den Schmerzreiz zu den nozizeptiven Neuronen im Hinterhorn des Rückenmarks (Millan 1999). In der Umgebung dieser synaptischen Verbindungen werden Mikroglia und Astrozyten aktiviert, indem schmerzfördernde Transmitter, wie Substanz P, calcitonin related peptide (CGRP), Glutamat und ATP ausgeschüttet werden. Diese Aktivierung führt zu einem Einstrom von  $Ca^{2+}$  in Astrozyten, was wiederum zur Freisetzung von ATP führt. Durch das ausgeschüttete ATP wird Mikroglia aktiviert (Hansson 2006), welche proinflammatorische Substanzen, wie Interleukin (IL-) 1, IL-6 und TNF- $\alpha$  sezerniert (Pineau et al. 2007), was zu einer Sensibilisierung von spinalen nozizeptiven Neuronen führt und die Hyperalgesie aufrecht erhält (Watkins et al. 2001)

### 1.2.2 Schmerzqualitäten

Tumorinduzierte Schmerzen werden in drei verschiedene Kategorien eingeteilt, die mit den Entwicklungsstadien der Erkrankung einhergehen. Das erste Symptom bei Knochentumoren ist oft der andauernde, kontinuierliche Schmerz, der von betroffenen Patienten als dumpf, klopfend und konstant beschrieben wird. Bei fortgeschrittener Erkrankung kommen kurze Episoden eines spontanen, starken Schmerzes hinzu, der als scharf und hell charakterisiert wird. Die Intensität und die Häufigkeit dieser Episoden korrelieren mit dem Ausmaß der Zerstörung des Knochens (Adami 1997; Schwei et al. 1999). Die dritte Kategorie ist der durchbrechende, durch Bewegung induzierte, starke, scharfe und helle Schmerz. Diese verschiedenen Schmerzqualitäten können im Tiermodell des tumorinduzierten Schmerzes reproduziert werden und sind durch spezielle Messmethoden quantifizierbar.

### 1.2.3 Das tumorinduzierte Schmerzmodell

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell des tumorinduzierten Schmerzes der Maus wurde 1999 von Schwei und Mantyh erstmals publiziert (Schwei et al. 1999). Bei diesem Modell werden über ein kleines Bohrloch im lateralen Kondylus des rechten Femurs Fibrosarkomzellen der Maus mit einer Injektionsnadel in den proximalen Femur eingebracht. Das Loch wird im Anschluss mit einer Amalgamplombe verschlossen. Die durch osteolytische Prozesse und Nerveninvasion vom Tumor erzeugten Schmerzen (Peters et al. 2005) können mit Verhaltensbeobachtungen und von Frey-Testungen (siehe Kapitel 2.5.2) evaluiert werden.

Es zeigte sich, dass Tiere mit implantierten Fibrosarkomzellen eine Hyperalgesie und Allodynie entwickeln, die mit einer peripheren und zentralen neuronalen Überaktivierung einhergehen (Honore et al. 2000b; Wacnik et al. 2005a). Die Stimulation von Nozizeptoren wird hierbei auch mit der Aktivierung von Osteoklasten und dem dadurch verstärkten Knochenabbau in Zusammenhang gebracht.

### 1.2.4 Neuropathische Schmerzmodelle

Um die Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen zu erforschen und zu verstehen, wurden verschiedene Schmerzmodelle entwickelt, die auf inkompletter Läsion von Nerven basieren. Da es mittlerweile eine Vielzahl solcher Modelle gibt, soll hier nur auf zwei der wichtigsten und am besten etablierten eingegangen werden. Hierzu zählen das Modell der „chronic constriction injury (CCI)“ und das Modell der „spinal nerve ligation (SNL)“.

Bei der CCI, entwickelt 1988 von Bennett, wird neuropathischer Schmerz durch Ligieren des N. ischiadicus erzeugt (Bennett et al. 1988). Hierzu werden vier locker einschnürende Ligaturen auf Höhe der Oberschenkelmitte im Abstand von 1 mm angebracht. Diese Ligaturen sollen den Blutfluss in oberflächlichen, epineuralen Gefäßen vermindern, aber nicht unterbrechen.

Das Modell der SNL, bei dem die Spinalnerven L5 und L6 fest ligiert werden, so dass afferente Anteile des N. ischiadicus zu den dazugehörigen Ganglien geschädigt werden, wurde 1992 beschrieben (Kim et al. 1992). Hierbei bleiben die Ganglien L3 und L4 unbeschädigt. In Folge der Ligation entsteht eine länger dauernde mechanische und thermische Hyperalgesie.

Die meisten Erkenntnisse über neuropathischen Schmerz wurden an diesen oder ähnlichen Modellen gefunden. Verhaltenstestungen an diesen Modellen sind gut etabliert und belegen, dass auf Grund der entsprechenden Läsion mechanische Hyperalgesie und Allodynie entstehen. In dieser Arbeit soll geprüft werden, ob diese Erkenntnisse auch auf das Modell des tumorinduzierten Schmerzes zutreffen.

#### 1.2.5 Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$

Der Name Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) stammt von der ursprünglich beobachteten Anti-Tumor-Aktivität, die *in vitro* und *in vivo* beobachtet wurde. Tumormassen mit bakterieller Superinfektion zerfallen nekrotisch und werden kleiner, wobei man TNF- $\alpha$  als die Ursache erkannte. Genauere Untersuchungen zeigten, dass diese Substanz ein endogen produzierter Stoff ist, der dann vermehrt gebildet wird und zytotoxisch auf Tumorzellen wirkt, wenn gleichzeitig bakterielles Lipopolysaccharid vorhanden ist. TNF- $\alpha$  ist zudem identisch mit dem Protein Cachectin, von dem bereits bekannt war, dass es eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Kachexie und von Fieber bei Krebspatienten spielt.

Heute weiß man, dass TNF- $\alpha$  ein pleiotropes Zytokin ist, das hauptsächlich von Makrophagen und monozytären Zellen synthetisiert wird und in vielen verschiedenen biologischen Prozessen, wie Entzündung, Immunmodulation, Autoimmunität, antivirale Abwehr, Kachexie, Endotoxinschock, Angiogenese und Mitogenese eine wichtige Bedeutung hat. Selinsky und Fukuda zeigten, dass auch verschiedene Tumorzellen, darunter auch die Fibrosarkomzellen, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden, ebenfalls TNF- $\alpha$  produzieren können (Selinsky et al. 2000; Fukuda et al. 2001). TNF- $\alpha$  wird als Vorform aus 233 Aminosäuren synthetisiert. Diese Vorstufe lagert sich an der Zelloberfläche zu stabilen, kegelförmigen Trimeren zusammen, die von einer spezifischen Metalloprotease, dem TNF-converting enzyme (TACE), proteolytisch zu dem ebenfalls trimeren, löslichen TNF- $\alpha$  mit 157 Aminosäuren gespalten wird. Die lösliche, aktive Form bindet kovalent an seine Rezeptoren, die eine Reihe biologischer Wirkungen auslösen und auf vielen kernhaltigen Körperzellen vorhanden sind (Beutler et al. 1985; Baker et al. 1998; Friedman 2000).

Die Wirkung von TNF- $\alpha$  wird über zwei Rezeptoren (TNFR) vermittelt: TNFR 1 (p55), der konstitutiv exprimiert wird und TNFR2 (p75), dessen Bildung induzierbar ist

(George et al. 2005). Sie gehören einer Superfamilie von transmembranären Glykoproteinen an, bestehend aus mindestens 41 Mitgliedern, die durch eine homologe Sequenz ihres extrazellulären Teiles charakterisiert sind. Weitere Vertreter sind außer den TNF-Rezeptoren Fas, der „low-affinity nerve growth factor-receptor“, TRAIL-Rezeptoren, RANK-Rezeptoren und CD40, wobei TNF- $\alpha$  nur an die beiden TNF-Rezeptoren binden kann (MacEwan 2002b).

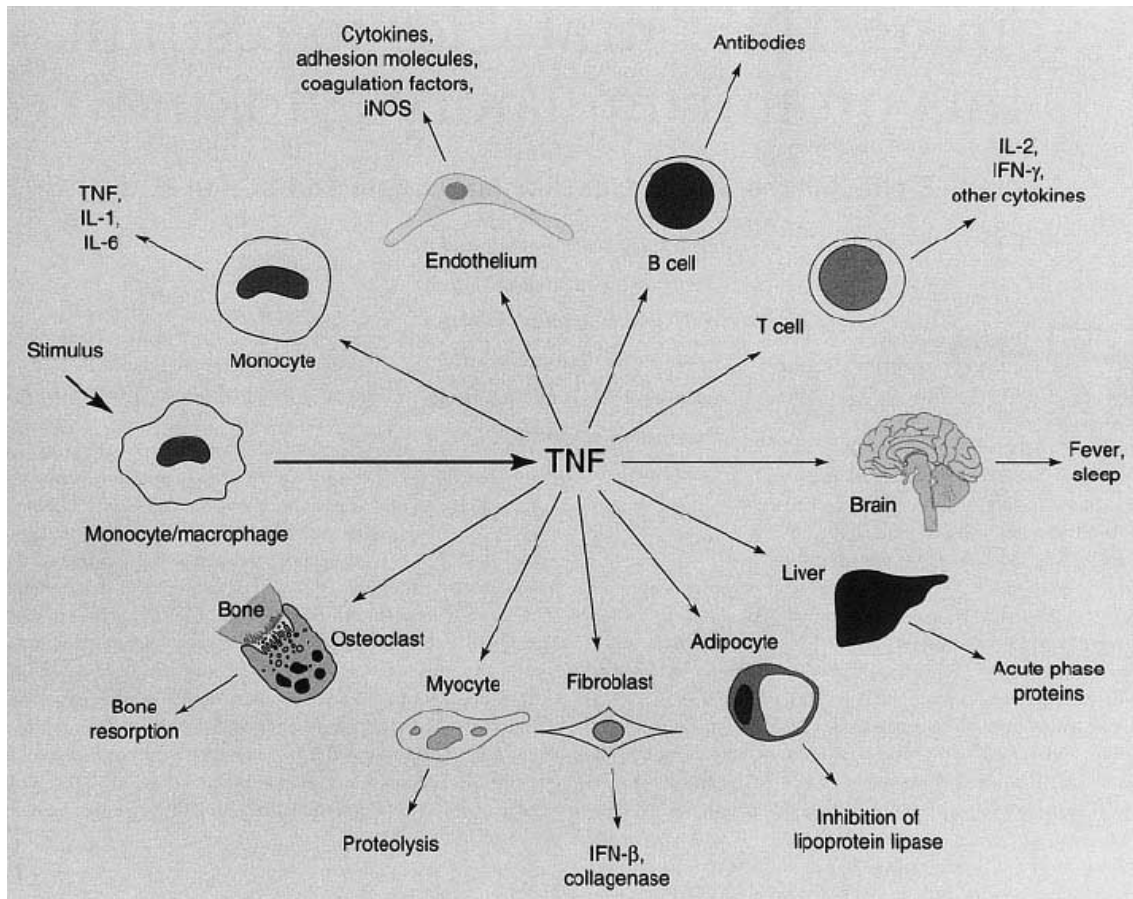


Abbildung 1: Wirkungen von TNF- $\alpha$  (Friedman 2000)

Die Mechanismen, welche die Aktivierung dieser Rezeptoren auslösen, sind sehr komplex reguliert. Diese Rezeptoraktivierung hat in unterschiedlichen Organsystemen und Zellen verschiedene Wirkungen. Endothel kann zur Expression von Adhaesionsmolekülen für Neutrophile angeregt werden und die endotheliale NO-Synthetase aktivieren. NO wiederum kann als proinflammatorisches Zytokin wirken, im ZNS die Glutamat-Ausschüttung verstärken und die Expression von NMDA (n-Methyl-d-Aspartat)-Rezeptoren herunterregulieren, die Neurotransmittersekretion modulieren

oder in hoher Konzentration als Neurotoxin wirken. TNF- $\alpha$  kann aber auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Hyperalgesie nach einer Nervenläsion spielen (Friedman 2000), wobei die Vermittlung der Hyperalgesie vorwiegend durch den TNFR 1 vermittelt wird: Parada et al. stellten fest, dass durch selektive Blockade des TNFR 1 eine durch Carrageenan-Injektion verursachte Hyperalgesie vermindert wird (Parada et al. 2003). Andere Funktionen von TNF- $\alpha$  sind die Stimulation von B-Zellen zur Antikörperproduktion, die Stimulation von T-Zellen zur Produktion von IL-2 und Interferon  $\gamma$ , was im Hypothalamus die Fieberreaktion auslöst. Außerdem regt es die Leber zur Synthese von Akute-Phase-Proteinen an. In Osteoklasten beschleunigt TNF- $\alpha$  den Knochenabbau (Friedman 2000). Eine Besonderheit des TNFR1 stellt seine sogenannte „death-domain“ dar, die zur Induktion der Apoptose und Nekrose der Zellen führt. Andere Signalkaskaden steigern hingegen die Proliferation oder die Differenzierung der Zellen (MacEwan 2002a).

Die verschiedenen Wirkungen von TNF- $\alpha$  spiegeln sich in den vielen unterschiedlichen Erkrankungen wider, in deren Pathogenese es eine wichtige Rolle spielt. Neben rheumatoider Arthritis und chronisch entzündlichen Darmerkrankungen hat es auch eine wichtige Bedeutung bei Enzephalomyelitis disseminata, septischem Schock, zerebraler Malaria, COPD, der Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und vielen anderen Erkrankungen (Sharief et al. 1999; Chung 2001; Gimenez et al. 2003; Hollifield et al. 2003).

#### 1.2.6 Die Rolle von TNF- $\alpha$ bei der Entstehung von neuropathischem Schmerz

Es ist bekannt, dass die Aktivierung von Zytokinen, insbesondere von TNF- $\alpha$ , bei der Entstehung von neuropathischen und inflammatorischen Schmerzen eine große Rolle spielt (Marchand et al. 2005). So konnten bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen und in tierexperimentellen Modellen mit Nervenverletzungen erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen im umgebenden Gewebe und im Plasma festgestellt werden (George et al. 1999; Empl et al. 2001).

Durch Verletzung eines Axons kommt es zur Waller'schen Degeneration. Ein endoneurales Ödem bildet sich, die Gefäßpermeabilität steigt an, Schwann'sche- und Endothelzellen proliferieren und das Axon demyelinisiert. Bei diesen Veränderungen spielt TNF- $\alpha$ , das zur gleichen Zeit vermehrt produziert wird, wahrscheinlich eine große Rolle (Sommer et al. 1998a; George et al. 1999; Taskinen et al. 2000; Shubayev et al.

2002). Wird TNF- $\alpha$  auf den N. ischiadicus oder subkutan appliziert, wird eine ektope Aktivität von A $\delta$ - und C-Fasern induziert und führt zu Allodynie und Hyperalgesie (Wagner et al. 1996; Sorkin et al. 1997; Junger et al. 2000). Genauso setzt auf ein Spinalganglion appliziertes oder intraplantar injiziertes TNF- $\alpha$  die Schmerzschwelle für taktile oder thermische Reize herab und verstärkt das Schmerzempfinden (Cunha et al. 1992; Perkins et al. 1994; Homma et al. 2002; Liu et al. 2002). Die Arbeitsgruppe von Peters und Mantyh konnte nachweisen, dass in Analogie zu Modellen mit inkompletter Nervenverletzung, wie CCI oder SNL, sensorische Nervenfasern durch einen Tumor geschädigt werden und dass „activating transcription factor 3 (ATF3)“ vermehrt gebildet wird (Peters et al. 2005). ATF3 ist ein Transkriptionsfaktor aus der ATF/CREB-Familie (cAMP-responsive-element-binding protein), der bei zellulärem Stress und/oder bei Axondurchtrennung hochreguliert wird und somit als sensitiver Marker einer axonalen Schädigung betrachtet werden kann (Tsujino et al. 2000; Tsuzuki et al. 2001).

Weitere Hinweise, dass die Entstehung von tumorinduziertem Schmerz ähnlich verläuft wie die Entstehung von neuropathischem Schmerz (CCI/SNL) und eng mit TNF- $\alpha$  verknüpft ist, geben die Untersuchungen von Wacnik. Diese zeigen, dass vor allem TNF- $\alpha$ , aber auch IL-1 als proinflammatorische Zytokine sowohl in Tumorhomogenaten als auch in Mikroperfusaten von Mäusen mit Knochentumoren vermehrt nachweisbar sind (Wacnik et al. 2005b).

Ein auf diesen Erkenntnissen basierender Ansatz zur Behandlung von neuropathischen Schmerzen wurde mit Etanercept unternommen. Dieser Wirkstoff ist ein rekombinantes Fusionsprotein aus dem Fc-Fragment von humanem IgG und dem TNFR2 (TNFR:Fc) und kann freies TNF- $\alpha$  kompetitiv binden und somit inaktivieren (Mohler et al. 1993; Sommer et al. 2001). Es zeigte sich, dass sowohl im CCI Modell als auch im SNL Modell unter Therapie mit TNFR:Fc eine signifikante Reduktion der Allodynie und Hyperalgesie erreicht werden kann (Sommer et al. 2001; Schäfers et al. 2003c).

### 1.2.7 Zentrale Sensibilisierung und Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia

In der Vergangenheit wurden Gliazellen als Zellen betrachtet, die im ZNS lediglich Stoffwechselforgänge von Neuronen unterstützen und somit eine angemessene strukturelle Matrix für die informationsverarbeitenden Zellen bilden. Heute weiß man,

dass nicht nur Neurone, sondern auch Gliazellen von Schmerzereignissen beeinflusst werden. So konnte sowohl für neuropathische Schmerzmodelle als auch für Tumorschmerzmodelle eine Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten nachgewiesen werden (Colburn et al. 1997; Schwei et al. 1999). Beim Tumorschmerzmodell kommt es auf der ipsilateralen Seite zur Hypertrophie von Astrozyten. Die Immunoreaktivität von „glial acidic fibrillary protein (GFAP)“, einem astrozytären Marker, ist sowohl in Tieren neuropathischer Schmerzmodelle als auch in Tieren mit Tumorschmerzen gesteigert (Honore et al. 2000b) und zeigt deren Aktivierung an (Abbildung 2).

	Inflammation CFA	Neuropathy spinal nerve ligation	Neuropathy sciatic nerve transection	Cancer sarcoma into the bone
<b>Spinal cord</b>				
SP lam I-II (IF)	↗	↘↘↘	↘↘↘	↔
CGRP lam I-II (IF)	↗	↘↘↘	↘↘↘	↔
IB4 lam I-II (IF)	↔	↘↘↘	↘↘↘	↔
Galanin lam I-II (IF)	↔	↗↗↗↗↗	↗↗↗↗↗	↔
Somatostatin lam I-II (IF)	↔	↔	↔	↔
NPY lam I-II (IF)	↔	↗↗	↗	↔
Dynorphin lam I-II (IF)	↔	↔	↗	↔
SPR lam I-II (IF)	↗	↔	↔	↔
PKC-γ lam III (IF)	↗↗	↗↗	↗	↔
GAP-43 lam I-II (IF)	↔	↗↗↗	↗	↔
NeuN gray matter (IF)	↔	↔	↔	↔
Dynorphin lam III-VI (count)	↗↗	↔	↔	↗↗↗
<b>Glia</b>				
GFAP gray matter (IF)	↔	↗↗↗	↗↗↗	↗↗↗↗↗
Ox42 gray matter (IF)	↔	↗↗↗	↔	↔
<b>Motoneurons</b>				
NeuN motoneurons (count)	↔	↔	↘↘↘	↔
Galanin motoneurons (count)	↔	↗↗	↗↗	↔
NPY motoneurons (count)	↔	↗↗↗	↗↗↗	↔

Abbildung 2: Vergleich der Expression unterschiedlicher morphologischer Marker bei unterschiedlichen Schmerzmodellen (Honore et al. 2000b)

Diese aktivierten Astrozyten setzen eine Vielzahl von Zytokinen und Wachstumsfaktoren frei und verändern somit die neurochemische Balance der Umgebung (Schwei et al. 1999). Die Immunoreaktivität von OX-42, das an den Komplement-Rezeptor Typ 3 bindet und ein Marker für die Aktivierung von Mikroglia ist, bleibt im Gegensatz zu Modellen mit neuropathischem Schmerz bei Tumorschmerzmodellen unverändert (Schwei et al. 1999; Honore et al. 2000b). Aus diesem Grund wird der

Astrozytenaktivierung primär eine größere Rolle beim Tumorschmerz zugesprochen (Abbildung 2).

In früheren Studien konnte sowohl im Modell der CCI als auch im Modell der SNL gezeigt werden, dass die schmerzinduzierte Aktivierung von Mikroglia mit Minocyclin teilweise verhindert werden kann (Owolabi et al. 2006; Mika et al. 2007). Dieses Ergebnis soll auf das Modell des tumorinduzierten Schmerzes übertragen und überprüft werden.

### **1.3 Problemstellung**

Die Wirkungsweise und die pathogenetische Rolle von TNF- $\alpha$  bei der Entstehung von neuropathischem Schmerz wurden bereits an den gut untersuchten Schmerzmodellen wie CCI oder SNL dargestellt. In der vorliegenden Arbeit wird nun die Rolle von TNF- $\alpha$  im Rückenmark der Maus an einem Tiermodell für tumorinduzierten Schmerz untersucht. Hierzu wurde das Modell des tumorinduzierten Knochenschmerzes der Maus mit Implantation von Tumorzellen in den Femur im Labor etabliert, das von Mantyh und Mitarbeitern entwickelt wurde (Schwei et al. 1999). Zur Quantifizierung der schmerzbedingten Verhaltensänderungen wurden zum Teil Testverfahren gewählt, die bereits bei bewährten neuropathischen Schmerzmodellen, wie z.B. dem Modell der CCI oder SNL zum Einsatz kommen und stabile Ergebnisse liefern, zum anderen wurden neue, dem Modell angepasste Testverfahren angewendet.

In Tiermodellen für neuropathischen Schmerz konnte gezeigt werden, dass bei chronischen Schmerzzuständen Mikroglia und Astrozyten im Rückenmark aktiviert werden (Stuesse et al. 2001). Analog hierzu wurden morphologische Veränderungen der Astrozyten im Rückenmark der Versuchstiere mittels Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Bei neuropathischen Schmerzmodellen verhindert die Behandlung der Versuchstiere mit dem Antibiotikum Minocyclin aus der Gruppe der Tetrazykline eine Aktivierung der Mikroglia und führt zu einer Schmerzminderung (Raghavendra et al. 2003), wobei der genaue Mechanismus der Mikrogliahemmung noch nicht verstanden wird (Nutile-McMenemy et al. 2007). In dieser Arbeit der Einsatz von Minocyclin beim Tumorschmerzmodell untersucht.

Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen proinflammatorische Zytokine, wie z.B.



Interleukin (IL) 1, IL-6 und vor allem TNF- $\alpha$  eine wichtige Rolle spielen (Sommer et al. 1998a; Sommer 2001; Uceyler et al. 2007). In dieser Arbeit wird die Rolle von TNF- $\alpha$  bei Tumorschmerz untersucht. Hierzu wurden im Tumorschmerzmodell Verhaltensversuche mit TNF-Rezeptor-defizienten (TNFR $^{-/-}$ ) Tieren durchgeführt. Zur weiteren Klärung der Hypothese, dass TNF- $\alpha$  bei der Entstehung und Aufrechterhaltung des tumorinduzierten Schmerzes beteiligt ist, wurde ein Behandlungsversuch mit Etanercept durchgeführt, einem bereits bei anderen Krankheitsentitäten klinisch eingesetzten TNF- $\alpha$  Fusionsprotein.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere und Versuchsgruppen

Für die durchgeführten Experimente wurden 66 C57BL/6 Mäuse verwendet, die ein Alter von etwa 8 Wochen und ein Gewicht von 20 bis 34 Gramm aufwiesen. Die Versuchstiere wurden in 9 Gruppen aufgeteilt:

Gruppe	Anzahl	Operation	Behandlung	Hintergrund
1	10	A	C	Wildtyp
2	10	B	C	Wildtyp
3	6	B	D	Wildtyp
4	6	B	E	Wildtyp
5	7	B	C	TNFR1 -/-
6	7	B	C	TNFR2 -/-
7	9	B	C	TNFR1/2 -/-
8	6	B	F	Wildtyp
9	5	B	G	Wildtyp

**Operation:** A = Scheinoperation

B = Tumorimplantation  $1 \times 10^6$  MC57G Fibrosarkomzellen

**Behandlung:** C = keine Behandlung

D = 0,25 ml Minocyclin (40mg/kg KG) i.p. täglich

E = 0,25 ml NaCl 0,9% i.p. täglich

F = Etanercept 500 $\mu$ g i.p. jeden 3. Tag

G = humanes IgG 500 $\mu$ g i.p. jeden 3. Tag

Tabelle 1: Versuchsgruppen

Vergleiche	Gruppen
1	1 vs. 2
2	3 vs. 4
3	2 vs. 5 vs. 6 vs. 7
4	8 vs. 9

Tabelle 2: Vergleiche der Versuchsgruppen

WT: Wildtyp Mäuse

TNFR1 -/- : TNF-Rezeptor 1 Knockout Mäuse

TNFR2 -/- : TNF-Rezeptor 2 Knockout Mäuse

TNFR1/2 -/- : TNF-Rezeptor 1+2 Knockout Mäuse

10 Wildtyp-Mäuse: Scheinoperation ohne weitere Behandlung.

10 Wildtyp-Mäuse: Implantation von Tumorzellen ohne weitere Behandlung.

6 Wildtyp-Mäuse: Implantation von Tumorzellen, tägliche Injektion von Minocyclin.

6 Wildtyp-Mäuse: Implantation von Tumorzellen, tägliche Injektion von NaCl 0,9 %.

7 TNFR1 -/- Mäuse: Implantation von Tumorzellen ohne weitere Behandlung.

7 TNFR2-/-Mäuse: Implantation von Tumorzellen ohne weitere Behandlung.

9 TNFR1/2 -/- Mäuse: Implantation von Tumorzellen ohne weitere Behandlung.

6 Wildtyp-Mäuse: Implantation von Tumorzellen, tägliche Injektion von Etanercept.

5 Wildtyp-Mäuse: Implantation von Tumorzellen, tägliche Injektion von humanem IgG.

(vgl. auch Tabelle 1).

Die Tiere wurden einzeln in Plexiglaskäfigen bei einem hell:dunkel-Zyklus von 12:12 Stunden bei Wasser und Nahrung ad libitum gehalten.

Die Tierversuche wurden durch die Regierung von Unterfranken zugelassen (Genehmigung vom 08.08.2005).

## 2.2 Zellkultur

Verwendet wurden Fibrosarkomzellen der Reihe MC57G (ATCC, University Blvd. Manassas).

### 2.2.1 Auftauen

Nach Erhalt der Zellen wurden sie über 3 Passagen kultiviert. Dazu wurde die in flüssigem Stickstoff gelagerte Cryoprotektiv-Zell-Suspension im Wasserbad bei 37°C schnell aufgetaut und anschließend in 3 ml Vollmedium gegeben. Als Zellkulturmedium wurde Minimum Essential Medium (MEM) (1x) liquid verwendet, versetzt mit 2 mmol Glutamin (Fa. Gibco; # 31095-052; 500 ml), 5 ml nicht-essentiellen Aminosäuren (Fa. Gibco; # 11140-035), 5 ml Penicillin/Streptomycin (Fa. Gibco; # 15140122), 2 ml Natriumpyruvat (Fa. Gibco; # 11360-039) und 50 ml FCS (Fa. Gibco; # 10270-106). Nach Zentrifugieren der Zellsuspension über fünf Minuten bei 1000 rpm ohne Bremse wurden der Überstand abgesaugt, 5 ml Vollmedium hinzu gegeben und 5 ml dieser Lösung in 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 20 ml vorgewärmtem Vollmedium pipettiert.

### 2.2.2 Splitten

Bei Bewuchs von mehr als 70% des Flaschenbodens wurden die Zellen gesplittet. Das Medium wurde abgesaugt und 3 ml Trypsin 0,25% - EDTA 0,03% (Fa. Gibco; 2,5 g Trypsin + 0,38 g EDTA; # 25200-056) hinzu gegeben. Nachdem sich die Zellen vom Boden gelöst hatten, wurde das Trypsin mit Hilfe von 7 ml Vollmedium inaktiviert und die Zellen im gewünschten Verhältnis (meist 1:5) auf 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit je 20 ml vorgewärmtem Medium verteilt.

### 2.2.3 Einfrieren

Um Fibrosarkomzellen derselben Charge zu verschiedenen Zeitpunkten in der gleichen Passage verfügbar zu haben, wurden einige Zellaliquots nach dem ersten Passagieren eingefroren. Hierzu wurde zunächst das Medium vollständig abpipettiert. Zum Ablösen der Zellen wurden 4 ml Trypsin-EDTA hinzu gegeben, anschließend die Trypsinierung durch Zugabe von 10 ml Medium gestoppt. Die entstandene Lösung wurde in sterilen Tubes bei 1000 rpm 10 Minuten ungebremst zentrifugiert und der Überstand abgesaugt.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen in 4,5 ml Einfriermittel (5% DMSO (Fa. Roth, # 7029.1) in Vollmedium) gelöst, in 1,5 ml Kryoprotektivröhrchen aliquotiert, eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert.

#### 2.2.4 Gewinnung der Zellen für die Injektion

Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, antrypsinisiert und gestoppt. Anschließend wurden 20 µl Zellsuspension mit 180 µl Trypanblau (Fa. Sigma; # T-8154) angefärbt, um die abgestorbenen Zellen zu identifizieren. Die vitalen Zellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer (Fa. Marienfeld; # 0640130) ausgezählt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte mit nachstehender Formel:

$$\text{Gezählte Zellzahl} * 10^4 * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Nachdem die Zellsuspension bei 1000 rpm fünf Minuten ohne Bremse zentrifugiert worden war, konnte der Überstand abgesaugt werden. Anschließend wurde die entsprechende Menge an Medium hinzu gegeben um eine Konzentration von  $10^6$  Zellen pro 20 µl zu erreichen. Bis zur Implantation wurde die Zellsuspension in einem Eppendorf-Cup mit Aluminiumfolie umwickelt auf einer Wärmeplatte bei 37° C gelagert.

### 2.3 Tiermodell zur Induktion des Knochentumors

Die Versuchstiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von Ketanest<sup>®</sup> 2,5% (WDT, Garbsen, Deutschland) und Rompun<sup>®</sup> 2% (Bayer Healthcare AG, Deutschland) gelöst in 6,25 ml NaCl 0,9 %, in einer Dosis von 10µl/g Körpergewicht in eine tiefe Narkose versetzt. Die Operation zur Implantation der Fibrosarkomzellen wurde modifiziert nach Mantyh durchgeführt (Honore et al. 2000a; Peters et al. 2005). Die rechten Hinterläufe und der Unterbauch der anästhesierten Tiere wurden rasiert und desinfiziert. Über dem rechten Knie wurde ein Hautschnitt von ca. 1 cm Länge gesetzt und die Kniegelenkscapsel scharf mit einem Skalpell eröffnet.



Abbildung 3: Operation und Implantation der Fibrosarkomzellen in den Femur

Um den distalen Femur freizulegen, musste die Patella bei gestrecktem Bein nach medial luxiert werden. Bei gebeugtem Knie wurde der laterale Kondylus dargestellt. Die Eröffnung des Markraums wurde mit Hilfe eines Zahnarztbohrers durchgeführt. Nach Aufsetzen des Bohrers auf den lateralen Kondylus wurde vorsichtig in Richtung Markraum vorgebohrt. Die Sondierung mit einer Kanüle und Spülung mit physiologischer Kochsalzlösung dienten zur Entfernung des Knochenmarks und zur Platzgewinnung für die Zellsuspension. Nach Eröffnung des Markraums wurde die Zellsuspension vorsichtig aufgeschüttelt und in eine 100  $\mu$ l Hamilton-Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz Schweiz) mit einer 25 Gx5/8" Kanüle aufgezogen. Nach Einführen der Kanüle in den Markraum bis zum proximalen Femur wurden unter gleichzeitigem Zurückziehen 20  $\mu$ l Zellsuspension implantiert. Das Loch im lateralen Kondylus wurde mittels eines Amalgampropfs (Fa. Degussa, Düsseldorf, Deutschland) verschlossen. Das OP-Gebiet wurde anschließend nochmals mit steriler Kochsalzlösung gespült. Der Wundverschluss erfolgte in anatomischen Schichten (Kapselnaht: Silkam 6-0; Haut: 3-0 und Klammern, APPOSE ULC, Tyco Healthcare, Norwalk, USA).

Die Tiere der Kontrollgruppe wurden einer Scheinoperation unterzogen, die alle oben genannten Schritte umfasste, außer der Implantation von Fibrosarkomzellen.

## **2.4 Intraperitoneale Injektion der Medikamente**

Die Tiere, die Versuchsgruppen mit medikamentöser Behandlung zugeteilt waren, wurden mit folgenden Substanzen und Injektionsschemata behandelt:

### **2.4.1 Minocyclin**

Minocyclin (Sigma, München, Deutschland) ist ein Antibiotikum aus der Klasse der Tetracycline. Bei anderen neuropathischen Schmerzmodellen wurde eine wirkungsvolle analgetische Wirkung von Minocyclin nur bei vorzeitiger Behandlung vor Induktion des Neuropathieschmerzes beschrieben (Raghavendra et al. 2003; Zhang et al. 2003). Somit wurde die Behandlung mit Minocyclin zwei Tage vor Implantation der Fibrosarkomzellen begonnen. Dabei erfolgte die Injektion stets intraperitoneal, die Dosis betrug 40mg/kg Körpergewicht, gelöst in 250 µl NaCl 0.9%. Den Tieren der Kontrollgruppe wurde stattdessen die gleiche Menge an physiologischer Kochsalzlösung verabreicht.

### **2.4.2 Etanercept**

Etanercept (Enbrel<sup>®</sup> 25mg, Wyeth, Borkshire, GB) ist ein Fusionsprotein aus einem Anteil der TNFR2 und dem Fc-Fragment von humanem IgG. Dieses Protein bindet freies TNF- $\alpha$  im Plasma, welches dadurch inaktiviert wird. Entsprechend den Literaturangaben zur Anwendung bei neuropathischen Schmerzmodellen (Sommer et al. 2001; Schafers et al. 2003c) erfolgten die Injektionen dreitägig, beginnend zwei Tage vor Implantation der Tumorzellen, dann an den postoperativen Tagen 1, 4, 7, 10, 13, 16 und 19. Die Dosis betrug 500 µg Etanercept, gelöst in 250 µl Aqua dest. pro Injektion. Sie wurde intraperitoneal verabreicht. Den Kontrolltieren wurde stattdessen humanes IgG (Sandoglobulin<sup>®</sup>, CSL Behring GmbH, Hattersheim am Main, Deutschland) in einer Konzentration von 2,5mg/ml gelöst in physiologischer NaCl-Lösung injiziert, um sie mit der gleichen Proteinmenge zu behandeln.

## 2.5 Verhaltenstestungen

Die Verhaltenstestungen wurden am Tag vor dem Eingriff sowie am 4., 8., 11., 15. und 18. Tag nach der Implantation der Fibrosarkomzellen durchgeführt. Der erste Testtag diente zur Ermittlung des natürlichen Verhaltens unbehandelter Tiere, Das Resultat wurde als Basiswert herangezogen. Auffällige Änderungen des Verhaltens, des Körpergewichts und der Operationswunden wurden beobachtet und dokumentiert.

### 2.5.1 Gewicht

An jedem Testtag wurde das Körpergewicht der Tiere bestimmt. Eine Gewichtsabnahme von mehr als 20% des Ausgangsgewichts hätte den Ausschluss des Tiers vom weiteren Experiment zur Folge gehabt.

### 2.5.2 von Frey-Test zur Testung der mechanischen Allodynie

Zur Testung der mechanischen Allodynie wurden von Frey-Monofilamente, benannt nach dem Würzburger Physiologen Max von Frey (1852-1932), in logarithmisch absteigenden Stärken von 20 Gramm bis 0,25 Gramm gewählt. Aufgrund der Tatsache, dass diese Reize bis zu einer gewissen Stärke bei gesunden Tieren nicht schmerzhaft sind, werden Antworten hierauf als Allodynie interpretiert (Chaplan et al. 1994). Zur Bestimmung der mechanischen Allodynie wurden die Tiere einzeln in Plastikkäfigen auf einen Gitternetzboden gesetzt. Man wartete dann eine Zeit von 20 Minuten ab, damit die Tiere sich beruhigen, die neue Umgebung erkunden und sich an sie gewöhnen konnten. Der Test wurde nur durchgeführt, wenn die Tiere alle vier Pfoten auf dem Gitter aufgesetzt hatten und ausreichend wach waren. An jedem Tier wurden sowohl das rechte, operierte Hinterbein, als auch das linke, gesunde Hinterbein untersucht. Linkes und rechtes Bein wurden im Wechsel getestet, jeweils beginnend mit dem linken Bein. Dabei wurden von Frey-Monofilamente in einer absteigenden Stärke, beginnend mit der Stärke 3,84 mN von unten senkrecht plantar zwischen den Ballen aufgesetzt und das Filament für 2-3 Sekunden durchgebogen, um eine definierte Kraft auf die Pfote auszuüben. Die Reize wurden in Abständen von mehreren Minuten dargeboten, um eine Beeinflussung des Testergebnisses von dem vorausgegangenen Stimulus zu vermeiden. Ein schnelles Wegziehen wurde als positives Ergebnis gewertet,



ein Hin- und Herbewegen des Tiers mit folgendem Wegziehen der Pfote als nicht eindeutig beurteilt. Im letzten Fall wurde der Reiz wiederholt präsentiert. An jedem Testtag wurden bei allen Versuchstieren 6 Testungen pro Pfote durchgeführt, aus denen anschließend die 50%-Wegzugsschwelle bestimmt wurde, also der Wert, bei dem ein Tier in 50% der Fälle die Pfote wegzieht.

Ausgewertet wurden die von Frey-Testdaten mit Hilfe der up-and-down-Methode nach Dixon (1965, 1980). Diese Methode beruht auf der Alles-oder-Nichts-Regel, die besagt, dass auf einen Stimulus entweder eine Reaktion erfolgt oder nicht. Dixon testete mit diesem Verfahren in logarithmisch aufsteigenden Medikamentenkonzentrationen die LD50. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit an logarithmisch auf- und absteigenden von Frey-Monofilament-Stärken angewandt. Hierbei wurde die 50% Wegzugsschwelle ermittelt. Die Reize wurden mit Hilfe der up-and-down-Methode, entweder auf- oder absteigend, immer in sequentieller Weise dargeboten. Reagierte das Tier auf den Stimulus, wurde die nächst tiefere/schwächere Monofilamentstärke getestet, bei negativem Testergebnis die nächst höhere/stärkere. Die angegebenen Monofilamentstärken entsprechen dabei dem Zehnerlogarithmus der ausgeübten Kraft in mg multipliziert mit dem Faktor 10.

Positive Testergebnisse wurden dabei als X, negative als O tabellarisch dokumentiert (z.B. XXOXOX) und die 50% Wegzugsschwelle mit folgender Formel berechnet:

$$50\% - Schwelle[g] = \frac{(10^{[X_f + \kappa\delta]})}{10000}$$

dabei ist:

$X_f$  = Stärke des letzten benutzen von Frey-Monofilaments.

$\kappa$  = Wert aus der Tabelle nach Dixon (1980) für das jeweilige Muster positiver und negativer Werte.

$\delta$  = mittlere Differenz zwischen den Werten der Monofilamentstärken.

Von den auf diese Weise für jede Maus der entsprechenden Versuchsgruppe ermittelten Schwellenwerten wurden Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler

berechnet. Die Schwellenwerte wurden normalisiert und in Bezug auf den Wert der Vortestung im zeitlichen Verlauf graphisch dargestellt.

### 2.5.3 Testung von belastungsinduziertem Schmerz

Auf einem beschleunigenden Laufrad (accelerating rota-rod Jones & Roberts for mice 7650, UGO BASILE) wurde die Laufleistung der Tiere über die Laufzeit gemessen. Nach Mantyh et al. (Luger et al. 2001; Peters et al. 2005) wurde weiterhin die Laufqualität unter Belastung anhand einer semiquantitativen Skala von 0 – 5 beurteilt:

Wert	Laufqualität
0	normales Laufen
1	leichtes Hinken
2	vermehrtes Hinken
3	Hinken und Schonen des Hinterbeins
4	Hinterbein zeitweise nicht benutzt
5	Hinterbein nicht benutzt

Tabelle 3: Laufqualität rechtes Hinterbein bei belastungsinduziertem Schmerz

Die Laufzeit wurde auf maximal 400 Sekunden begrenzt, die Laufqualität nach 150-200 Sekunden bestimmt und die Werte tabellarisch dokumentiert.

Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler der Versuchsgruppen wurden für die einzelnen Versuchstage ermittelt und chronologisch graphisch aufgetragen.

### 2.5.4 Testung des Schmerzverhaltens bei natürlicher Bewegung

Das Schmerzverhalten bei natürlicher Bewegung ohne besondere Belastung wurde beurteilt, indem der Einsatz des rechten Hinterbeins beim freien Gehen auf einer Ebene anhand einer Skala von 4 – 0 in einem Zeitraum von ca. einer Minute semiquantitativ bewertet wurde (Honore et al. 2000a). Das Augenmerk wurde dabei auf die Benutzung des operierten Beines und auf die Laufqualität gelegt. Die Ergebnisse wurden ebenfalls tabellarisch festgehalten.

Wert	Laufqualität
4	normales Laufen
3	vermehrtes Hinken
2	Hinken und Schonen des Hinterbeins
1	Hinterbein zeitweise nicht benutzt
0	Hinterbein nicht benutzt

Tabelle 4: Laufqualität rechtes Hinterbein bei natürlicher Bewegung

### 2.5.5 Testung von nicht provoziertem Schmerzverhalten

Tiere mit chronischen Schmerzen in den Extremitäten zeigen bestimmte Verhaltensweisen. Einerseits schonen sie das entsprechende Bein, um die Extremität zu entlasten, das heißt, sie heben das Bein von der Unterlage ab und halten es in der Luft. Andererseits schütteln sie das entsprechende Bein öfter, je stärker der Schmerz ist (Honore et al. 2000a; Peters et al. 2005). Die Tiere wurden während eines Zeitraums von 2 Minuten bezüglich ihres Schonungs- und Schüttelverhaltens beobachtet. Das Schonen eines Beins wurde in Sekunden gemessen, das Schütteln als „Anzahl der Schüttelbewegungen/2min“ erfasst. Jeweils das linke und das rechte Hinterbein wurden untersucht, die Ergebnisse tabellarisch dokumentiert und die Mittelwerte sowie die Standardfehler im Zeitverlauf dargestellt.

## 2.6 Verarbeitung des Gewebes

Die Gewebeentnahme erfolgte bei allen Versuchsgruppen am Tag 21 bzw. Tag 22 postoperativ. Hierfür wurden die Tiere mit NaCl 0,9%/Narcoren® (Pentobarbital, Merial, Hallbergmoos, Deutschland) in der Verdünnung 40:1 in tiefe Narkose versetzt und anschließend zur Fixierung perfundiert. Zur Perfusion wurde der Thorax eröffnet und das Herz freigelegt, um den linken Ventrikel zu punktieren und den rechten Vorhof einzuschneiden. Zur Entfernung des Blutes aus dem Gefäßsystem wurde zunächst mit 20 ml Phosphatpuffer (PBS) gespült. Nachdem nur noch klare Flüssigkeit austrat, wurde mit ca. 50 ml PFA 4% für 10 Minuten perfundiert. Entnommen wurden das Rückenmark der Segmente L2, L3 und L4, die Spinalganglien der Segmente L2, L3 und L4 beidseits und der rechte Femur.

### 2.6.1 Gewebeentnahme

Nach Eröffnung der Haut über der Wirbelsäule wurden unter einem Auflichtmikroskop die Wirbelbögen entfernt und das Rückenmark und die Spinalganglien der Segmente L2, L3 und L4 mit einer feinen Schere herausgetrennt. Der rechte Femur wurde freipräpariert und vorsichtig von Muskel- und Bindegewebe gesäubert. Das gesamte Gewebe wurde nach der Entnahme sofort in PFA 4% nachfixiert.

### 2.6.2 Verarbeitung des Rückenmarks

Nachdem die entnommenen Rückenmarkssegmente und Spinalganglien 12 Stunden in PFA 4% nachfixiert worden waren, erfolgte eine dreimalige Spülung des Gewebes mit PBS. Anschließend wurden die Gewebe in Saccharose 30% über Nacht eingelegt. Am nächsten Tag wurde das Gewebe in Cryomold-Schälchen (Cryomold<sup>®</sup>, Miles Inc., Elkhart, USA) in Tissue-Tec<sup>®</sup> O.C.T. Compound (Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) eingebettet und mit flüssigem Stickstoff bei -80° C eingefroren.

### 2.6.3 Verarbeitung der Knochen

Die Knochen wurden ebenfalls 12 Stunden in PFA 4% nachfixiert, dann dreimal mit Phosphatpuffer gespült und drei Tage in Osteosoft<sup>®</sup> (Merck, Darmstadt, Deutschland) entkalkt. Eine ausreichende Entkalkung war erreicht, wenn die Knochen ohne Widerstand gebogen werden konnten. Sie wurden dann dreimal mit PBS gespült, anschließend über Nacht in Saccharose 30% eingelegt, am nächsten Tag in Tissue-Tec<sup>®</sup> O.C.T. Compound eingebettet und analog wie Rückenmark und Spinalganglien eingefroren. Im Cryostaten wurden Längsschnitte der Dicke 10 µm angefertigt.

## 2.7 Färbungen der Gewebe

Für die unterschiedlichen Gewebe wurden verschiedene Färbungen verwendet. Um die Größe des Tumors im Markraum des Knochens zu bestimmen, wurden Längsschnitte der Knochen mit Hämalaun-Eosin (HE) gefärbt. Zur Bestimmung der Osteoklastenaktivität wurde eine spezielle Osteoklastenfärbung verwendet, welche die Tartrat-resistente saure Phosphatase rot anfärbt (tartrate-resistant-acid-phosphatase, kurz TRAP). Die Rückenmarksschnitte wurden immunhistochemisch auf CD11b-Rezeptoren – ein Marker für aktivierte Mikroglia – untersucht. Außerdem wurde eine Immun-

fluoreszenzfärbung spezifisch für saures Gliafaserprotein (GFAP, glial fibrillary acid protein) durchgeführt, um eine Hypertrophie von Astrozyten nachzuweisen.

#### 2.7.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Nachdem die 10 µm dünnen Schnitte an der Luft getrocknet waren, wurden sie 10 Minuten mit Hämalaun gefärbt, mit fließendem Leitungswasser gewässert und anschließend 25 Sekunden mit Eosin gegengefärbt. In einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70-100% wurden die Schnitte entwässert und in Xylol gegeben. Zur Eindeckung wurde Vitro-Clud® (R. Langenbrick GmbH, Emmendingen, # 04-0001) verwendet.

#### 2.7.2 TRAP-Färbung

Zur Herstellung der Färbelösung wurden 80 mg Natriumnitrit (Fa. Sigma; # S-2252) in 2 ml Aqua dest. und 20 mg Naphtol-AS-TR-Phosphat (Fa. Sigma; # N-6000) in 2 ml N,N-Dimethylformamid (Fa. Merck; # 1.03034) gelöst. 1,6 ml der Natriumnitritlösung wurden mit 1,6 ml Pararosanilinlösung (Fa. Sigma; # P-7632), 2 ml Naphtollösung, 10 ml Michaelispuffer und 26 ml Aqua dest. vermischt, die Lösung filtriert und auf einen pH von 4,99-5,01 eingestellt. Zur Herstellung von Pararosanilinlösung 4% wurden 2 g Pararosanilin mit 35,4 ml Aqua dest. und 14,6 ml HCl 25% bei 4°C inkubiert. Zur spezifischen Anfärbung von Tartrat-resistenter alkalischer Phosphatase wurde der Färbelösung zusätzlich noch 1ml Tartrat zugegeben. Um das Gewebe zu färben wurden die Schnitte in der Färbelösung bei 37° C eine Stunde lang inkubiert und anschließend mit destilliertem Wasser gespült. Zur Hintergrundfärbung wurde Methylgrün (Methylgrün Standard Fluka, Fa. Fluka; # 67060) 0,2% benutzt, welches 10 Minuten bei Raumtemperatur auf die Schnitte gegeben wurde. Zur Differenzierung der Schnitte wurde eine aufsteigende Reihe von Alkohollösungen verwendet, beginnend mit Isopropylalkohol 70% (2x2 Minuten), dann Isopropylalkohol 96% (2x2 Minuten) und abschließend Isopropylalkohol 100% (2x2 Minuten). Nach der Differenzierung wurden die Schnitte in Xylol zweimal 10 Minuten eingelegt und mit Vitro-Clud® eingedeckt.

### 2.7.3 Immunhistochemie (CD11b-Färbung)

Nachdem die Schnitte mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet waren, wurden sie 10 Minuten lang in Aceton bei  $-20^{\circ}\text{C}$  nachfixiert. Nach einer ca. fünfminütigen Trocknung auf einer Wärmeplatte bei maximal  $42^{\circ}\text{C}$  wurden sie bei Raumtemperatur 30 Minuten mit BSA/Tris-Puffer 10% geblockt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit dem ersten Antikörper in BSA-Tris-Puffer 1% über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Negativkontrollen mit BSA-Tris-Puffer wurden ebenfalls angelegt.

Am nächsten Tag wurde Rattenserum 1:1 mit dem biotynilierten zweiten Antikörper vermischt, eine Stunde bei  $37^{\circ}\text{C}$  vorinkubiert und dreimal mit Tris-Puffer gewaschen. Anschließend wurden 200 ml Methanol und 3,5 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% hinzu gegeben. Um die endogene Peroxidase zu blockieren ließ man die Lösung 20 Minuten lang bei Raumtemperatur einwirken. Nachfolgend wurde der vorinkubierte, sekundäre Antikörper mit BSA/Tris-Puffer 1% verdünnt und 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit dem Gewebe inkubiert. Die Negativkontrollen wurden ebenfalls mit dem sekundären Antikörper inkubiert, wobei der Erstantikörper weggelassen wurde. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurde wiederum dreimal mit BSA/Tris-Puffer gewaschen und danach ein Streptavidin-Biotin-Komplex 30 Minuten lang bei Raumtemperatur auf die Schnitte aufgetragen. Nachdem die Schnitte nochmals mit BSA/Tris-Puffer gewaschen worden waren, wurden sie mit vorher filtrierter DAB-Lösung 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen wurden die Schnitte anschließend in Aqua dest. gegeben. Zur Entwässerung wurden sie mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (siehe oben) behandelt und abschließend mit Vitro-Clud<sup>®</sup> eingedeckt.

### 2.7.4 Immunfluoreszenzchemie (GFAP)

Nachdem die Gefrierschnitte aufgetaut waren, wurden sie ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend für 10 Minuten in Aceton 100% bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert. Nachfolgend wurden sie auf einer Wärmeplatte bei  $40^{\circ}\text{C}$  5 Minuten lang getrocknet. Die weiteren Färbeschritte erfolgten in einer feuchten Kammer.

Die Präparate wurden mit einer Lösung von BSA 10% (Rinderserumalbumin) in PBS (Phosphate-buffered saline, pH 7,4, 0,1 M) 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt, um eine Adsorption des Primärantikörpers an stark geladene Bindegewebsstrukturen zu

verhindern, was eine unspezifische Hintergrundfärbung nach sich ziehen würde. Falsch positive Anfärbungen durch Bindung der markierten Sekundärantikörper an die Primärantikörper werden dadurch vermieden. Alle verwendeten Antikörper wurden zuvor in den in Tabelle 5 genannten Konzentrationen verdünnt, wobei BSA 1% in PBS als Puffer diente.

Das BSA wurde vorsichtig abgeklopft, die Schnitte dann über Nacht (ca. 18 Stunden) mit dem Primärantikörper bei +4° C inkubiert. Anschließend wurden sie dreimal mit PBS gewaschen, der Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung aufgetragen und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der abschließenden Eindeckung der Präparate mit DABCO (25 ml PBS, 75 ml Glycerol ~87%, 2,5 g DABCO = 1,4 Diazabizyclo[2.2.2.]octan) wurden sie noch dreimal mit PBS gewaschen.

<b>Prim. AK</b>	<b>Host</b>	<b>Konzentration prim. AK</b>	<b>Sek. AK</b>	<b>Konzentration sek. AK</b>	<b>Farbe</b>
CD11b	rat	1:10	anti-rat, biotyniliert	1:200	braun
GFAP	rabbit	1:1000	goat anti-rabbit	1:100	rot

Tabelle 5: Antikörper zu Immunfluoreszenzfärbungen

CD11b monoklonal: Serotec Ltd.; Oxford UK; # MCA711

GFAP, polyklonal: Chemicon international Inc., Ca, USA; NB5804

Sekundärer Fluoreszenzantikörper: Dianova GmbH, Hamburg; Cy3-konjugiert; # 111-165-003

## 2.8 Auswertung der Histologie

Die Auswertung der Histologie wurde vom Untersucher unter verblindeten Bedingungen durchgeführt.

Die Größe des Tumors im intramedullären Raum der Knochen wurde semiquantitativ in den Hämalaun-Eosin-Färbungen bestimmt. Vier Schnitte jedes Versuchstiers wurden analysiert. Hierzu wurde eine Skala von 0-3 verwendet.

0 : kein Tumorwachstum

1 : Tumorgröße von 0 bis 1/3 des Markraums

2 : Tumorgröße von 1/3 bis 2/3 des Markraums

3 : Tumorgröße von 2/3 bis 3/3 des Markraums

Die Ergebnisse wurden tabellarisch protokolliert.

Um den Grad der Aktivierung der Osteoklasten zu ermitteln wurde im Knochen die Tartrat-resistente alkalische Phosphatase (TRAP) angefärbt und drei metaphysäre Ausschnitte pro Tier unter Durchlichtmikroskopie in 20facher Vergrößerung fotografiert. Die Bilder wurden mit Hilfe des Analyseprogramms Image Pro Plus (Version 4.0; Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA) ausgewertet, die Anzahl der Osteoklasten in einem Blickfeld automatisch ausgezählt und gleichzeitig die Fläche der Zellen bestimmt (Abbildung 52). Die ermittelten Werte wurden in Microsoft Excel tabellarisch aufgetragen, die Gesamtfläche aller Osteoklasten errechnet. Außerdem wurden Mittelwert, Standardabweichung sowie Standardfehler bestimmt.

Zur Bestimmung der Astrozytenhypertrophie wurden GFAP-Immunfluoreszenzfärbungen (glial fibrillary acidic protein) des Rückenmarks der Segmente L2-L4 angefertigt und mit Hilfe des Immunfluoreszenzmikroskops Axiophot 2 (Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) bei 100facher Vergrößerung mit 2048x2048 Pixel aufgenommen. Pro Tier wurden drei Schnitte ausgewertet. Die Bilder wurden mit dem Programm Image Pro Plus Version 4 ausgewertet. Hierzu wurde jeweils rechts und links ein 250 µm x 250 µm großes Quadrat in den Laminae I-III des Hinterhorns des Rückenmarks als „area of interest“ (AOI) definiert, die markierten Astrozyten innerhalb des Quadrates gezählt und ihre Fläche gemessen (Abbildung 53). Die automatisch ermittelten Werte wurden in Microsoft Excel tabellarisch aufgetragen und die Gesamtfläche der markierten Astrozyten bestimmt. Aus den drei Schnitten pro Tier wurden Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler ermittelt.



## 2.9 Statistische Auswertung

Die Messwerte der Gruppen 1, 2, 5, 6 und 7 wurden mit one-way-ANOVA und nachgeschaltetem Bonferoni post hoc Test verglichen. Die Messwerte der Gruppen 2 und 3 und der Gruppen 8 und 9 wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen. Unterschiede wurden ab einem p-Wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

Anschließend wurden alle Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler in Diagrammen und Tabellen dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Auswertung der Verhaltenstestungen

#### 3.1.1 Körpergewicht

Die Tiere wurden an jedem Versuchstag gewogen um ihren Allgemeinzustand abzuschätzen und eine mögliche übermäßige Belastung zu erkennen. Im Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht.

#### 3.1.2 Wildtyp ohne Tumor vs. Wildtyp mit Tumor

##### 3.1.2.1 Schmerzverhalten bei natürlicher Bewegung

Bei beiden Versuchsgruppen zeigt sich an Tag 4 ein deutlicher Abfall der Werte für die Laufqualität von 4,0 auf 3,2  $\pm$  0,17 bzw. 2,4  $\pm$  0,16, was als postoperativer Schmerz zu bewerten ist. Unabhängig von der Art der Operation oder der Behandlung zeigt sich dieses postoperative Schmerzverhalten bei sämtlichen Verhaltenstestungen aller Versuchsgruppen. Bei den Tieren mit Scheinoperation zeigte sich im Verlauf ein Rückgang der Werte auf das Ausgangsniveau, während bei Tieren mit Tumor bis zum Versuchsende eine signifikante Reduktion des Scores für das Schmerzverhalten bei natürlicher Bewegung besteht (Abbildung 5).

##### 3.1.2.2 Testung von nicht provoziertem Schmerzverhalten

Das spontane Schmerzverhalten wurde bei zwei verschiedenen Verhaltensweisen der Tiere analysiert: das Schonungsverhalten und das Schütteln der Hinterpfote.

Es lässt sich bei allen Versuchsgruppen ein Anstieg des spontanen Schonungsverhaltens an den Versuchstagen 4 und 8 erkennen, was wiederum als postoperativer Schmerz zu bewerten ist. Die Wildtypiere mit implantiertem Tumor (Gruppe 2) zeigen im Vergleich mit den Kontrolltieren der Gruppe 1 an den Versuchstagen 11, 15 und 18 einen signifikanten Anstieg des schmerzbedingten Schonungsverhaltens (Abbildung 6).

Bei der Auswertung des Schüttelverhaltens zeigt sich ein deutlich gesteigertes spontanes Schmerzverhaltens der Tumorgruppe ab Tag 8 (Abbildung 7).

### 3.1.2.3 Testung von belastungsinduziertem Schmerz am Rota-Rod

Bei dem Vergleich der Laufzeiten auf dem Rota-Rod lassen sich keine signifikanten Unterschiede der Gruppen ausmachen, ebenso kein deutlicher postoperativer Einbruch (Abbildung 8). Die reine, in Sekunden messbare Laufleistung der Tiere scheint somit trotz deutlicher schmerzbedingter Veränderung der Laufqualität weder durch die Operation selbst noch durch das Tumorwachstum oder eine eventuelle Knochendestruktion beeinträchtigt zu sein.

Die semiquantitative Bewertung der Laufqualität auf dem Rota-Rod ergibt auch in diesem Versuch deutliche Veränderungen für den Versuchstag 4 und belegt hiermit die operativ bedingte Einschränkung der motorischen Leistung der Tiere. Während sich die Werte der Kontrollgruppe im weiteren Verlauf wieder den Ergebnissen der Vortestung annähern, entwickelt sich bei der Tumorgruppe ab Tag 8 ein tumorinduziertes erhöhtes Schmerzniveau bei Belastung, das für die Tage 8, 11, 15 und 18 signifikant ist (Abbildung 9).

Die in den übrigen Verhaltenstests gefundenen Ergebnisse lassen sich folglich auf das Schmerzverhalten und nicht auf motorische Beeinträchtigungen durch das Tumorwachstum selbst zurückführen. Ein geringfügiger Anstieg der Laufzeit zu späteren Zeitpunkten lässt sich auf einen „Trainingseffekt“ nach mehrmaliger Exposition erklären.

### 3.1.2.4 Testung der mechanischen Allodynie mittels von Frey-Testungen

Die mechanische Allodynie wurde, wie oben beschrieben, mit von-Frey-Tests untersucht. Es wird angenommen, dass es bei dem Tumormodell im Rahmen der oben genannten zentralen Sensibilisierung im Rückenmark nicht nur zu lokalen Schmerzen im Bereich des Femurs kommt, sondern auch zu einem Absenken der Schmerzschwelle für das betroffene Bein.

Diese Hypothese wird gestützt durch eine im Vergleich zum linken Bein signifikante Herabsetzung der Pfotenrückzugsschwelle im rechten, tumortragenden Bein bei den Tieren der Gruppe 2 (WT mit Tumor) für die Versuchstage 8, 11, 15 und 18 (Abbildung 10).

Auch hier zeigt sich für beide Tiergruppen der oben beschriebene postoperative Effekt. Bei der Kontrollgruppe kommt es im Verlauf zu einem Rückgang auf das Niveau der

Vortestung. Die Tumorgruppe weist kongruent mit den übrigen Verhaltenstestungen eine signifikant erhöhte mechanische Allodynie ab Tag 8 auf (vgl. Abbildung 11).

### 3.1.3 Wildtyp mit Tumor: Minocyclin vs. NaCl 0,9 %

Unter der Vorstellung, dass Tumorschmerz mit einer Mikroglia-Aktivierung einhergeht, wurde zur Mikrogliahemmung das Antibiotikum Minocyclin verwendet. Für die Versuchsgruppen Wildtyp mit Tumor mit täglicher Minocyclin-Behandlung vs. Wildtyp mit Tumor mit täglichen NaCl-Injektionen ergeben sich bei den Verhaltenstestungen für das spontane und provozierte Schmerzverhalten sowie für das Schmerzverhalten bei natürlicher Bewegung ähnliche Verläufe wie bei der Versuchsgruppe 2 (Wildtyp mit Tumor ohne Behandlung; Abbildungen 5, 6, 7, 8 und 9). Es zeigen sich sowohl das erhöhte postoperative Schmerzverhalten als auch deutliche schmerzinduzierte Veränderungen zu späteren Zeitpunkten in den oben erwähnten Verhaltenstests. Signifikante Unterschiede zwischen der mit Minocyclin behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe lassen sich allerdings nicht ausmachen (Abbildungen 12-16).

Auch bei der Testung der taktilen Rückzugsschwellen mit von-Frey-Filamenten zeigt sich bei beiden Gruppen eine ausgeprägte mechanische Allodynie ab Tag 4 ohne Gruppenunterschiede (Abbildung 17). Somit war Minocyclin in dieser experimentellen Konstellation in Bezug auf Reduktion des Schmerzverhaltens nicht wirksam.

### 3.1.4 Vergleich der Wildtyp-Mäuse mit TNFR-defizienten Mäusen

Aufgrund der Hypothese, dass TNF- $\alpha$  mitursächlich für den Tumorschmerz sein könnte, wurden Mäuse mit Defizient für einen oder beide TNFR untersucht.

#### 3.1.4.1 Schmerzverhalten bei natürlicher Bewegung

Weder im Vergleich mit den tumortragenden Wildtyp-Tieren noch innerhalb der TNFR-defizienten Gruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied bei der Bewertung des Schmerzverhaltens beim Laufen auf ebener Fläche (vgl. Abbildung 18). Es liegen jedoch eine deutliche postoperative Beeinträchtigung sowie ein tumorinduziertes Schmerzverhalten vor. Für TNFR-2-KO und TNFR1/2-KO-Mäuse stellt sich eine geringgradige Verminderung dieses Effekts im Versuchsverlauf dar, die allerdings zu keinem Zeitpunkt signifikant wird.

#### 3.1.4.2 Testung von nicht provoziertem Schmerzverhalten

Das Schonungsverhalten war bei der Gruppe der TNFR1/2-KO-Mäuse an den Versuchstagen 4 und 8 signifikant gesteigert (Abbildung 20).

Dieser Effekt fällt in das Zeitfenster des postoperativen Schmerzes. Ab Versuchstag 11, zur Zeit des sicher tumorinduzierten Schmerzverhaltens, zeigt sich ein nahezu identisches Bild aller vier Gruppen.

Bei der Analyse des spontanen Schüttelverhaltens ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Abbildung 20).

#### 3.1.4.3 Testung von belastungsinduziertem Schmerzverhalten am Rota-Rod

Die Laufdauer ist postoperativ verkürzt, jedoch bilden sich im weiteren Verlauf keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen heraus (Abbildung 21)

Nach einer vergleichbaren postoperativen Verschlechterung des Laufverhaltens aller Gruppen zeigt sich im späteren Versuchsverlauf eine deutliche Verbesserung der Laufqualität der TNFR1/2-KO-Gruppe, was an Tag 15 statistisch signifikant wird (Abbildung 22). Die Laufqualität der übrigen Gruppen bleibt ab dem 8. Versuchstag auf stabilem, im Vergleich zur TNFR1/2-KO-Gruppe geringerem Niveau (Bewertungen zwischen 1,7 – 2,4 +/- 0,25 – 0,17 gegenüber 0,9 – 1,1 +/- 0,20 – 0,22).

#### 3.1.4.4 Testung der mechanischen Allodynie mittels von Frey-Testungen

Die taktilen Rückzugsschwellen waren unmittelbar postoperativ an den Versuchstagen 4 und 8 reduziert. Während sich bei der Wildtyp-, der TNFR1-KO- und der TNFR2-KO-Gruppe gleich bleibende oder sogar zunehmend reduzierte Rückzugsschwellen finden, erholt sich die TNFR1/2-KO-Gruppe rasch und hat an an den Versuchstagen 15 und 18, wieder Ausgangswert erreicht (Abbildung 23). Weiterhin ist zu beobachten, dass auch die unmittelbare postoperative Allodynie bei der TNFR1/2-KO-Gruppe geringer ausgeprägt ist, was allerdings ohne Signifikanz bleibt (0,16 +/- 0,05 SEM vs. 0,29 +/- 0,07 SEM vs. 0,07 vs. 0,02 SEM vs. 0,60 +/- 0,08 SEM). Somit ist für die Reduktion der mechanischen Allodynie im verwendeten Schmerzmodell die Blockade nur eines der beiden TNF-Rezeptoren allein nicht ausreichend. Nur durch Ausschaltung beider Rezeptoren kann ein entsprechender Effekt erzielt werden.

### 3.1.5 Wildtyp mit Tumor: Etanercept vs. humanes IgG

Als zweite Methode, um einen eventuellen Einfluss von TNF- $\alpha$  auf den Tumorschmerz zu testen, wurde der TNF-Inhibitor Etanercept verwendet.

#### 3.1.5.1 Schmerzverhalten bei natürlicher Bewegung

Die Laufqualität auf freier Ebene als Maß für spontanes Schmerzverhalten zeigte einen Verlauf wie oben beschrieben (3.1.4.1). Es zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Abbildung 24).

#### 3.1.5.2 Testung von nicht provoziertem Schmerzverhalten

Das Schonverhalten war an den Versuchstagen 11 bei den Etanercept-behandelten Tieren signifikant reduziert. Auch an den anderen Versuchstagen ergab sich ein ähnlicher Trend (Abbildung 25).

Das Schüttelverhaltens war ebenfalls am Versuchstag 11 bei Etanercept-behandelten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren reduziert. (Abbildung 26).

#### 3.1.5.3 Testung von belastungsinduziertem Schmerz am Rota-Rod

Die Behandlung mit Etanercept nimmt auf die Laufdauer nur an Tag 18 einen signifikanten Einfluss (Abbildung 27).

Postoperativ kommt es in beiden Gruppen zunächst zu einem durch den OP-Schmerz bedingten Abfall der Laufqualität. Die Etanercept-behandelten Versuchstiere entwickeln im weiteren Verlauf eine relativ bessere Laufqualität (Abbildung 28). Es wird allerdings nur für den Versuchstag 11 eine Signifikanz erreicht (IgG: 2,9 +/- 0,21 SEM, Etanercept: 2,25 +/- 0,24 SEM).

#### 3.1.5.4 Testung der mechanischen Allodynie mittels von Frey-Haaren

Bei den mit Etanercept behandelten Tieren ergaben sich gegenüber den IgG-behandelten Tieren an den Versuchstagen 15 und 18 eine signifikante Reduktion der Allodynie, wobei der absolute Unterschied gering war (Tag 15: Etanercept 0,13 +/- 0,06 SEM, IgG 0,02 +/- 0,001 SEM; Tag 18: Etanercept 0,15 +/- 0,06 SEM, IgG 0,02 +/- 0,001 SEM, Abbildung 29).

Somit war die Behandlung mit Etanercept in der verwendeten Versuchsanordnung signifikant, aber absolut geringer wirksam in Bezug auf die Reduktion der mechanischen Allodynie im Vergleich zu den TNFR<sup>-/-</sup> Tieren.

## 3.2 Auswertung der Knochenfärbungen

### 3.2.1 Tumorgröße, Hämalaun-Eosin-Färbung

Um die Größe des Tumors im intramedullären Raum des rechten Femurs zu bestimmen, wurden diese in histologischen Schnitten der Knochen aller Tiere im Durchlichtmikroskop semiquantitativ mit einer Skala von 0-3 bewertet (Abbildungen 30 und 40). Außerdem konnten osteolytische Prozessen dargestellt werden (Abbildung 45). Für alle Tiere der Versuchsgruppen mit Implantation von Fibrosarkomzellen kann ein ausreichendes Tumorwachstum nachgewiesen werden, das mindestens die Hälfte des intramedullären Raumes ausfüllt. Die Tiere der Kontrollgruppe sind frei von Tumor. Innerhalb der Tiergruppen mit Tumorimplantation sind die relativen Tumorgrößen vergleichbar; der größte Befall kann bei der TNFR1/2-KO-Gruppe mit  $2,78 \pm 0,16$  SEM beobachtet werden, der geringste bei der TNFR2-KO-Gruppe mit  $1,57 \pm 0,32$  SEM. Die Daten der übrigen Gruppen liegen zwischen diesen Werten (vgl. Abbildung 30). Ein signifikanter Unterschied zeigt sich im Vergleich der Gruppen 2 und 7 (WT mit Tumor ohne Behandlung vs. TNFR1/2<sup>-/-</sup>).

### 3.2.2 Osteoklastenaktivierung, TRAP-Färbung

Die Färbungen der „tartrat-resistent acid phosphatase“ (TRAP) dienen zur Bestimmung des Grades der Aktivierung der Osteoklasten im Knochen. Ausgewertet wurde, wie oben beschrieben, die Fläche aktivierter Osteoklasten in einem definierten Teil der Metaphyse (siehe Tabelle 6).

#### 3.2.2.1 Osteoklastenaktivierung, WT ohne Tumor vs. WT mit Tumor

Erwartungsgemäß kann gezeigt werden, dass die Fläche der aktivierten Osteoklasten bei Versuchsgruppe 2 (Wildtyp mit Tumor ohne Behandlung) ca. 5-fach größer ist als bei Versuchsgruppe 1 (Wildtyp ohne Tumor ohne Behandlung) (Abbildung 31).

### 3.2.2.2 Osteoklastenaktivierung, Minocyclin vs. NaCl 0,9%

Die tägliche i.p.-Injektion von Minocyclin wirkt sich nicht signifikant auf die Aktivität der Osteoklasten aus, was sich im Vergleich der Gruppen 3 und 4 zeigt (Abbildung 32).

### 3.2.2.3 Osteoklastenaktivierung, KO-Gruppen

Im Vergleich der Versuchsgruppen 5 und 6 (TNFR1<sup>-/-</sup> und TNFR2<sup>-/-</sup>) mit der Versuchsgruppe 2 (Wildtyp mit Tumor ohne Behandlung) sind die Flächen der Osteoklasten in den TNFR-KO-Tieren tendenziell größer als in der Kontrollgruppe, wobei im Mehrfachvergleich nur für die Gruppe der TNFR2-defizienten Tiere eine Signifikanz erreicht wird. Im Vergleich der Gruppen 7 und 2 (TNFR1/2<sup>-/-</sup> vs. WT + Tumor) ist kein signifikanter Unterschied festzustellen (vgl. Abbildung 33).

### 3.2.2.4 Osteoklastenaktivierung, Etanercept vs. IgG

Aus der Behandlung mit dem TNF- $\alpha$ -Blocker Etanercept, der alle drei Tage i.p. verabreicht wurde, resultiert eine signifikant vermehrte Osteoklastenaktivität im Vergleich der Gruppen 8 und 9 (Abbildung 34).

<b>Gruppe</b>	<b>Fläche Mittelwert (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	<b>Standard- abweichung</b>	<b>Standardfehler</b>
WT – Tumor	2541	3203	1067
WT + Tumor ohne Behandlung	12537	7007	2477
WT + Tumor + Minocyclin	12733	4703	2103
WT + Tumor + NaCl 0,9%	14110	10467	4681
TNFR 1 <sup>-/-</sup>	24505	14754	6023
TNFR 2 <sup>-/-</sup>	32014	11082	4524
TNFR 1/2 <sup>-/-</sup>	17554	7705	2724
WT + Tumor + Etanercept	38875	8261	3694
WT + Tumor + IgG	28964	5570	2785

Tabelle 6: TRAP-Färbung



### 3.2.3 Astrozytenaktivierung, GFAP-Färbung

Das glial-fibrillary-acidic-protein (GFAP), ein Marker für Astrozyten, wurde mit Immunfluoreszenzfärbungen untersucht, um eine astrozytäre Aktivierung zu prüfen. Die Schnitte wurden hergestellt und ausgewertet, wie oben beschrieben.

#### 3.2.3.1 Astrozytenaktivierung, WT ohne Tumor vs. WT mit Tumor

Bei den Tieren mit implantiertem Tumor kann eine deutliche Aktivierung und Hypertrophie der Astrozyten im untersuchten Bereich gezeigt werden, was sich im Vergleich der Gruppe 1 mit Gruppe 2 darstellt. Die Fläche der aktivierten Astrozyten im Hinterhorn des Rückenmarks der Tiere der Gruppe 2 ist nahezu doppelt so groß wie bei den Kontrolltieren der Gruppe 1 (Abbildung 35). Die Abbildungen 50 und 51 zeigen die vermehrte Astrozytenaktivierung und die erhöhte Immunfluoreszenz für GFAP.

#### 3.2.3.2 Astrozytenaktivierung, Minocyclin vs. NaCl 0,9%

Der Vergleich der Versuchsgruppen 3 und 4 zeigt keinen signifikanten Unterschied im Ausmaß der Aktivierung der Astrozyten im Hinterhorn. Die Werte bleiben unter beiden Behandlungen gleich (Abbildung 36).

#### 3.2.3.3 Astrozytenaktivierung, KO-Gruppen vs. WT mit Tumor

Es kann kein signifikanter Unterschied im Ausmaß der astrozytären Aktivierung im Hinterhorn zwischen den Tieren der Gruppen 5 (TNFR1<sup>-/-</sup>), 6 (TNFR2<sup>-/-</sup>), 7 (TNFR1/2<sup>-/-</sup>) und 2 (WT mit Tumor) festgestellt werden (Abbildung 37).

#### 3.2.3.4 Astrozytenaktivierung, Etanercept vs. IgG

Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied bei der Analyse der GFAP Immunreaktivität im Hinterhorn von tumortragenden Mäusen nach intraperitonealer Gabe von Etanercept in Dosen von 500µg alle drei Tage (Vergleich zwischen Gruppe 8 und 9, Abbildung 38).

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die intramedullär injizierten Tumorzellen proliferierten und zeigten im rechten Femur aller Versuchstiere ein ähnliches Tumorwachstum. Die Knochen entwickelten in dem Versuchszeitraum osteolytische Veränderungen. Auffallend war ein signifikant größeres Tumorwachstum bei TNFR1/2 defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (Gruppe 2 und 7). In Verhaltenstests konnte zuverlässig quantifiziert werden, dass das Schmerzverhalten bei Tumorwachstum, verglichen mit den scheinoperierten Tieren, deutlich ausgeprägter war.

Die Behandlung mit dem Mikroglia-Hemmer Minocyclin von Wildtyp-Mäusen mit Knochentumor ergab weder in den Verhaltenstestungen noch in den histologischen Studien des Rückenmarks einen relevanten signifikanten Effekt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen an TNFR-defizienten Tieren zeigten für die TNFR1/2-KO-Tiere im späteren Verlauf eine signifikant verminderte taktile Allodynie in den von Frey-Testungen (Versuchstage 11, 15 und 18, Abbildung 23). Bei den übrigen Verhaltenstestungen zeigten sich bei TNFR1/2-KO-Tieren ein verstärktes Schonverhalten und eine schlechtere Laufqualität. Der auf Grund dieser Ergebnisse durchgeführte Behandlungsversuch mit Etanercept erbrachte in den Testungen des nicht provozierten Schmerzverhaltens zu späteren Zeitpunkten (Versuchstage 11-18) signifikante Unterschiede mit reduziertem Schonverhalten nach der Behandlung (Gruppen 8 und 9) und reduzierter mechanischer Allodynie an späteren Testtagen (Versuchstage 15 und 18). In den anderen Testungen konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

Die TRAP-Färbungen ergaben, dass die Aktivität der Osteoklasten in tumortragenden Tieren signifikant zunahm. Bei TNFR2-KO-Tieren zeigte sich eine signifikante Zunahme TRAP positiver Osteoklasten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Abbildung 33). Die Immunfluoreszenzfärbungen ließen eine Vermehrung der Immunreaktivität für GFAP im Hinterhorn des Rückenmarks bei Tieren mit implantiertem Tumor im Vergleich zu Tieren ohne Tumor erkennen (Abbildung 35). Für die anderen Gruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied.

## 4.2 Interpretation der Verhaltenstestungen

### 4.2.1 Behandlung mit Minocyclin

Im tumorinduzierten Schmerzmodell der Maus mit Implantation von Sarkomzellen in den Femur kommt es nach einzelnen Literaturberichten zu keiner wesentlichen Steigerung der Immunreaktivität von OX-42, einem Marker für Mikroglia (Schwei et al. 1999; Honore et al. 2000b). Im Gegensatz hierzu zeigten Zhang et al. an einem Modell mit Implantation von Karzinomzellen der Prostata in die Tibia der Ratte, dass es in diesem Falle zu einer deutlichen Steigerung der Immunreaktivität für OX-42 im Rückenmark kam (Zhang et al. 2005). In dieser Arbeit wurde nun versucht, einer Aktivierung von Mikroglia durch Behandlung mit Minocyclin entgegenzuwirken, was bei neuropathischen Schmerzmodellen eine Reduktion von mechanischer Allodynie und Hyperalgesie bewirkt (Raghavendra et al. 2003; Zhang et al. 2003; Ledebor et al. 2005). Die Behandlung mit Minocyclin hatte in der vorliegenden Arbeit keinen relevanten Effekt auf das Schmerzverhalten der Versuchstiere. Es wurden mehrere Versuche durchgeführt Mikroglia mithilfe von Antikörpern gegen OX-42 darzustellen, jedoch zeigten sich bei den Färbungen keine spezifische Immunreaktivität, was an der Verarbeitung des Gewebes (Perfusion und Fixierung mit Paraformaldehyd) gelegen haben kann. Aufgrund der negativen Verhaltensdaten wurde schließlich die morphologische Analyse der Mikrogliaaktivierung beim Tumorschmerzmodell der Maus nicht weiter verfolgt. In weiteren histochemischen Studien mit anderen Fixierungs- und Färbeprotokollen sollte geklärt werden, ob beim Tumorschmerzmodell ähnliche Effekte der Mikrogliaaktivierung beobachtet werden können. Weiterhin sollte geprüft werden, ob die Applikationsform und -dosis von Minocyclin eine Rolle spielen. In dieser Arbeit wurde die bei anderen Schmerzmodellen erfolgreich verwendete Dosierung und Applikationsart gewählt (Raghavendra et al. 2003; Mika et al. 2007). Es wäre denkbar, dass die intrathekale Gabe des Medikaments eine bessere Wirkung erzielen könnte als die intraperitoneale Applikation. Vergleichende Studien fehlen bislang. Weiterhin zeigt die vorliegende Arbeit erwartungsgemäß, dass die Behandlung mit Minocyclin keinerlei Auswirkungen auf das Tumorwachstum und die Tumorgroße hat. Die genaue Wirkungsweise von Minocyclin auf die Aktivierung von Mikroglia ist noch nicht vollständig geklärt. Es beeinflusst einerseits zelluläre Funktionen auf

posttranslationaler Ebene, z.B. durch eine verminderte Ausschüttung von NO (Amin et al. 1996), andererseits bewirkt es eine verminderte Expression von TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, iNOS und Caspase 1/3 (Zhang et al. 2003; Zanjani et al. 2006) und moduliert somit die biochemische Balance, welche sich in den verschiedenen Schmerzmodellen deutlich unterschiedlich auswirkt (Honore et al. 2000a).

#### 4.2.2 Mechanische Allodynie bei TNFR defizienten Tieren

TNFR1/2 KO Mäuse, jedoch nicht TNFR1- und TNFR2KO-Mäuse zeigen im Gegensatz zu Wildtypen deutlich geringeres Schmerzverhalten zu späteren Versuchszeitpunkten (Versuchstag 11-18), bei denen alleine der Tumorschmerz zum Tragen kommt. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass zur Unterdrückung von tumorinduzierter mechanischer Allodynie die Inaktivierung beider TNF-Rezeptoren notwendig ist.

Die intrazellulären Signalkaskaden beider TNF-Rezeptoren sind an vielen Stellen miteinander verknüpft, z.B. können beide dieselben Kinasen aktivieren (phosphorylieren). Beide Kaskaden können in denselben Endstrecken münden. Es ist möglich, dass die Funktion eines deaktivierten Rezeptors jeweils von dem anderen kompensiert wird.

Sommer und Kollegen zeigten am Modell der CCI, dass eine selektive Blockade von TNFR1 eine Reduktion von thermaler Hyperalgesie und mechanischer Allodynie nach sich zieht. Die Behandlung mit einem selektiven TNFR2-Antagonisten erbrachte in dieser Hinsicht keinerlei Effekt (Sommer et al. 1998b). An einem Schmerzmodell, das mit Injektionen von „Carrageenan“ arbeitet und ein inflammatorisches Modell chronischer Schmerzen darstellt, konnten Parada und Kollegen zeigen, dass die Entwicklung von entzündlich bedingter chronischer Hyperalgesie ebenfalls durch TNFR1 vermittelt wird (Parada et al. 2003). Dagegen fanden Schäfers und Sommer, dass im Modell der SNL nach der Nervenverletzung beide TNF-Rezeptoren innerhalb von Stunden hochreguliert werden (Schäfers et al. 2003b).

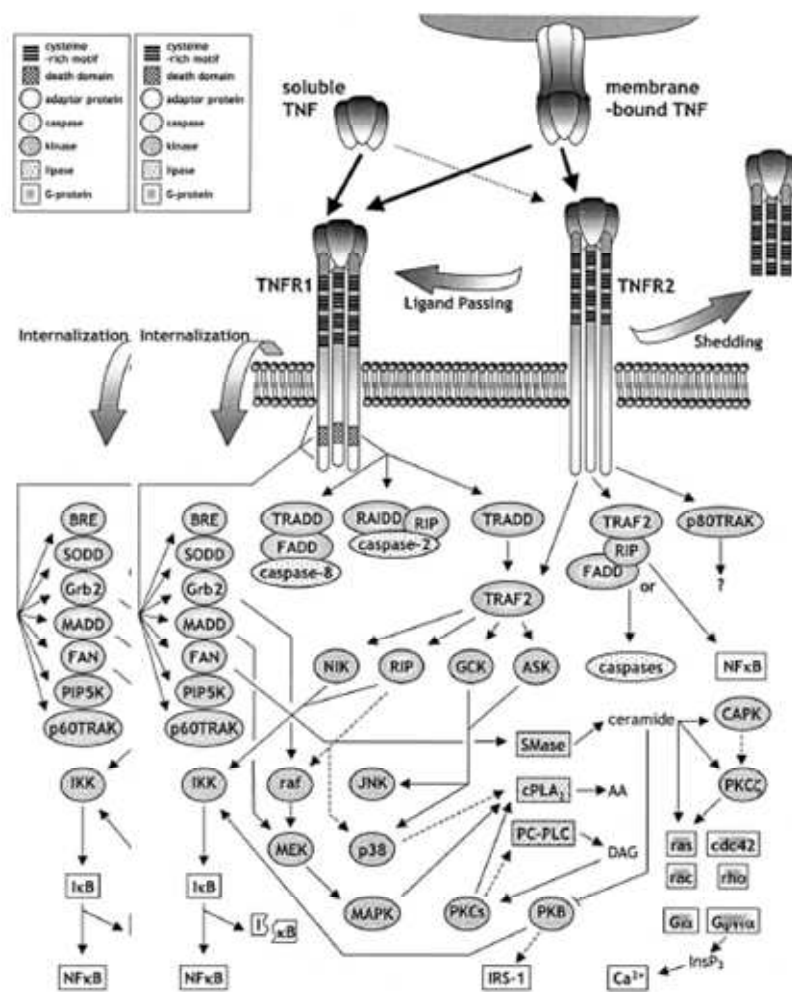


Abbildung 4: TNF-Signalkaskade (MacEwan 2002b)

Die durch einen Knochentumor induzierte mechanische Allodynie kann nicht allein durch Ausschaltung des TNFR1 verhindert oder reduziert werden, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Vielmehr ist die Blockade beider TNF-Rezeptoren notwendig, um einen analgetischen Effekt zu erzielen. Interessanterweise zeigte sich im Gegensatz hierzu ein vermehrtes Schonverhalten der TNFR1/2-KO-Mäuse bei frühen Versuchszeitpunkten. Dies könnte im Zusammenhang mit dem vermehrten Tumorwachstum bei diesen Tieren stehen.

#### 4.2.3 Behandlung mit Etanercept

Da in den Untersuchungen an TNFR1/2-defizienten Mäusen eine Reduktion der tumorinduzierten mechanischen Allodynie gefunden werden konnte, wurde ein Behandlungsversuch mit dem TNF-Inhibitor Etanercept durchgeführt. Hier ergaben sich

quantitativ geringer ausgeprägte Unterschiede zwischen den mit Etanercept behandelten Tieren und der mit IgG behandelten Kontrollgruppe. So zeigten sich signifikante Unterschiede im Schonverhalten zu späteren Versuchszeitpunkten und in den von Frey-Testungen für mechanische Allodynie.

In vielen Studien mit neuropathischen Schmerzmodellen konnte ein Effekt der Behandlung mit Etanercept im Sinne einer Reduktion von Hyperalgesie und Allodynie belegt werden (Sommer et al. 2001; Schäfers et al. 2003c). Wacnik und Kollegen zeigten in ihrer Arbeit von 2005, dass die Behandlung mit Etanercept die Entwicklung von Hyperalgesie und Allodynie bei einem anderen Tumorschmerzmodell verhindern kann (Wacnik et al. 2005b). Ausschlaggebend hierfür waren aber die Applikationsform und -dosis von Etanercept. Es wurde eine Reduktion der mechanischen Hyperalgesie bei Dosen von 500µg i.p. gefunden.

Die von Wacnik demonstrierte Reduktion der mechanischen Hyperalgesie in relativ frühen Stadien des Versuchs konnte in der vorliegenden Arbeit nicht in diesem Ausmaß bestätigt werden. Obwohl die gleiche Applikationsmethode und -dosis gewählt wurden, zeigten sich im untersuchten Tumorschmerzmodell der Maus zwar signifikante, aber keine hochgradigen Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. In weiteren Untersuchungen bleibt zu klären, ob sich ein reproduzierbarer Effekt durch Etanercept-Behandlung bei tumorinduziertem Schmerz herstellen lässt, und in wie weit Applikations- und Behandlungsmethode auf die Wirksamkeit der Behandlung Einfluss nehmen. Andere Studien, die jedoch mit dem Modell der „spinal cord injury“ (einseitige Durchtrennung des Myelons) arbeiteten, zeigen, dass die intrathekale Gabe von Etanercept eine positive Wirkung auf die Hyperalgesie und Allodynie hat (Marchand et al. 2009). Dies könnte unter anderem durch die Umgehung der Blut-Hirn-Schranke durch direkte intrathekale Applikation bedingt sein. Auch die intraganglionäre Applikation von Etanercept im Rahmen des Modells des SNL („sciatic nerve ligation“) erbrachte in bisherigen Untersuchungen eine Verminderung der Hyperalgesie und Allodynie (Schäfers et al. 2003a), was ebenfalls auf eine entscheidende Rolle der Applikationsform dieses Medikaments hinweist.

### 4.3 Interpretation der Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen

#### 4.3.1 GFAP-Immunreaktivität

Die Auswertung der GFAP-Immunreaktivität im Hinterhorn bei Wildtyp-Tieren mit und ohne Tumor zeigt, dass es durch Implantation von Tumorzellen und die dadurch ausgelösten Knochenschmerzen zu einer Steigerung der Immunoreaktivität für GFAP kommt, was einer deutlichen Hypertrophie der Astrozyten entspricht. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Erkenntnissen von Honore und Zhang (Honore et al. 2000b; Zhang et al. 2005). Bei anderen neuropathischen Schmerzmodellen steht diese ausgeprägte Astrozytenaktivierung nicht im Vordergrund. Dies spricht dafür, dass bei neuropathischen Schmerzmodellen eher die Aktivierung von Mikroglia als von Astrozyten für die Schmerzentwicklung überwiegt. Im Gegensatz hierzu scheint bei inflammatorischen Schmerzmodellen, die mit Injektionen von Carrageenan oder CFA (complete Freund's adjuvant) arbeiten, und beim Tumormodell der Maus die Mikrogliaaktivierung keine wesentliche Rolle zu spielen.

Der Vergleich der Versuchsgruppen 2, 5, 6 und 7 (WT mit Tumor vs. TNFR1<sup>-/-</sup> vs. TNFR2<sup>-/-</sup> vs. TNFR1/2<sup>-/-</sup>) zeigt bei allen eine astrozytäre Aktivierung im Hinterhorn nach Tumorinduktion, aber keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Auch die Behandlung mit Minocyclin oder mit Etanercept erbrachte keine Veränderung der astrozytären Aktivierung. Hieraus ist zu schließen, dass die astrozytäre Aktivierung im Hinterhorn nicht in Zusammenhang mit der beobachteten Reduktion der taktilen Allodynie bei TNFR1/2-defizienten Mäusen steht. Eine über das Hinterhorn hinausgehende Beeinflussung der Astrozytenaktivierung im Rückenmark wurde allerdings nicht untersucht, was einschränkend bemerkt werden muss. Auch bezüglich der Astrozytenhypertrophie ist es möglich, dass die intrathekale, intraganglionäre oder topische Gabe von Etanercept einen deutlicheren Effekt haben könnte. Da Minocyclin vorwiegend die Aktivierung von Mikroglia unterdrückt (Ledeboer et al. 2005) ist ein mangelnder Effekt auch hier im Tumorschmerzmodell nicht ungewöhnlich und steht im Einklang mit den Ergebnissen der Verhaltenstestung.

### 4.3.2 Analyse der Knochenmorphologie und Osteoklastenaktivierung

#### 4.3.2.1 Hämalaun-Eosin-Färbung

Die HE-gefärbten histologischen Schnitte zeigten, dass sich die implantierten Fibrosarkomzellen im Femur der Mäuse erwartungsgemäß vermehrten und sich in dem Untersuchungszeitraum ausgeprägte osteolytische Veränderungen der Knochenkortikalis entwickelten. Signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen waren bei dem Vergleich zwischen tumortragendem Wildtyp und TNFR1/2-defizienten Mäusen (Gruppe 2 und 7) auszumachen, wobei das Tumorwachstum in den Femores der TNFR1/2 KO-Tiere am ausgeprägtesten war. Dieses Ergebnis legt nahe, dass das Wachstum der Tumorzellen durch TNF- $\alpha$  moduliert und beeinflusst wird. Die Stimulation des Tumorwachstums erfolgt über die Aktivierung des TNFR1 und die sich anschließende Transduktionskaskade via p42/p44, JNK und NF- $\kappa$ B, wie Rivas et al. anhand einer Brustkrebszelllinie aufzeigten. Ähnliche Schlussfolgerungen zogen Selinsky und Kollegen, die in vivo zeigen konnten, dass löslicher TNFR1 (sTNFR1) die Entwicklung und das Wachstum von Fibrosarkomzellen der Maus fördert (Selinsky et al. 2000). TNFR2 dagegen kann durch Unterdrückung der Angiogenese des Tumors via NO das Tumorwachstum verzögern oder stoppen (Zhao et al. 2007). Andererseits ist bekannt, dass TNF- $\alpha$  auch zytotoxische Eigenschaften auf Tumorzellen hat, was bereits an unterschiedlichsten Modellen gezeigt wurde (Baglioni et al. 1987; Nobuhara et al. 1987; Budd et al. 1991; Kopreski et al. 1996). Aus diesem Grund werden bei bestimmten fortgeschrittenen Tumorleiden auch therapeutisch Applikationen von TNF- $\alpha$  in die Tumormasse durchgeführt (LeBlanc et al. 2002).

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse unterstützen die Hypothese eines Überwiegens der Tumorsupressorfunktion von TNF- $\alpha$  im hier verwendeten Knochentumormodell der Maus, da ein Anstieg der Tumorgröße bei Fehlen beider TNF-Rezeptoren gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend wiesen TNFR1/2-defiziente Mäuse zwar ein erhöhtes Tumorwachstum auf und hatten zu frühen Zeitpunkten ein signifikant höheres Schonverhalten des betroffenen Hinterlaufs. Sie zeigten allerdings eine verminderte taktile Allodynie. Hieraus kann gefolgert werden, dass das Tumorwachstum per se die verschiedenen Schmerzqualitäten unterschiedlich beeinflusst.



#### 4.3.2.2 TRAP-Färbung

Die tartratresistente saure Phosphatase gehört zu der ubiquitär exprimierten Familie der sauren Phosphatasen und ist in der Hämatonkologie als Markerenzym der Haarzell-Leukämie bekannt. Primär ist TRAP („tartrat resistent acid phosphatase“) ein zytochemischer Marker für Makrophagen, dendritische Zellen und Osteoklasten und ist intrazellulär im lysosomalen Kompartiment lokalisiert.

Die spezifische Färbung aktivierter Osteoklasten (TRAP Färbung) ergab, dass im Vergleich der Wildtyp-Mäuse mit und ohne Tumor eine signifikante Steigerung der Osteoklastenaktivität im Femur nach Tumorinokulation zu verzeichnen ist. Dies steht in guter Übereinstimmung mit publizierten Berichten über eine Steigerung der Osteoklastenaktivität durch intramedullär injizierte Sarkomzellen (Clohisy et al. 1996).

Im Behandlungsversuch mit Minocyclin konnten keine signifikanten Unterschiede in der Osteoklastenaktivität beobachtet werden. Die von Saikali und Kollegen aufgestellte Hypothese, dass Tetracycline einen negativen Effekt auf die Differenzierung von Osteoklasten und deren Überleben haben, konnte im Knochentumormodell der Maus nicht bestätigt werden (Saikali et al. 2003). Bei dem Vergleich der TNFR defizienten Tiere mit den Wildtyp-Tieren nach Tumorimplantation konnte gezeigt werden, dass die Osteoklastenaktivität bei TNFR defizienten Tieren tendenziell erhöht ist, wobei sich bei TNFR2  $-/-$  Tieren ein signifikanter Unterschied ergab.

TNF- $\alpha$  sowie andere Zytokine, wie IL-1 oder RANKL, sind in der Lage, die Osteoklastenaktivität sowie die Differenzierung der Zellen zu beeinflussen. Nach Bindung von löslichem TNF- $\alpha$  an den TNF-Rezeptor wird eine Signalkaskade ausgelöst, die durch das Adapterprotein TRAF6 NF $\kappa$ -B aktiviert wird und die Aktivität und die Ausdifferenzierung von Osteoklasten fördert (Gravallese et al. 2001). In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass allein die Aktivierung von TNFR1 zu einer Aktivitätssteigerung der Osteoklasten führt (Zhang et al. 2001). Allerdings sprechen die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit beim Knochentumormodell der Maus für eine vermehrte Osteoklastenaktivität als Folge der Defizienz einer oder beider TNF-Rezeptoren. Dies könnte in dem oben diskutierten, vermehrten Tumorwachstum bei TNFR-defizienten Mäusen ursächlich begründet sein. Kongruent hierzu ergab der Behandlungsversuch mit Etanercept ebenfalls signifikant höhere Werte verglichen mit der mit humanem IgG behandelten Kontrollgruppe.

#### 4.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Im Gegensatz zu neuropathischen Schmerzmodellen (Raghavendra et al. 2003; Zhang et al. 2003; Ledebøer et al. 2005) konnten im Tumorschmerzmodell durch Behandlung mit Minocyclin keine Hinweise auf die Wirksamkeit des Tetracyclins in Bezug auf das spontane oder provozierte Schmerzverhalten und auf das Schmerzverhalten bei natürlicher Bewegung gefunden werden. Es zeigten sich auch weiterhin keine relevanten Veränderungen der Astrozytenaktivierung im Rückenmark und der Osteoklastenaktivierung im Knochen.

Durch die Untersuchungen bei TNFR-defizienten Tieren konnte belegt werden, dass im Tumorschmerzmodell der Maus das Schmerzverhalten, insbesondere die mechanische Allodynie, über die Aktivierung beider TNF-Rezeptoren beeinflusst wird. Bei Defizienz nur eines Rezeptors zeigten sich keine Unterschiede zur Kontrollgruppe, im Gegensatz zu neuropathischen Schmerzmodellen (CCI), bei denen die hauptsächlich algetische Wirkung durch den TNFR1 vermittelt wird (Sommer et al. 1998b). Interessanterweise war die Reduktion der mechanischen Allodynie bei den TNFR1/2-defizienten Tieren von der Größe des Tumors unabhängig. Das Tumorstadium in diesen Tieren war sogar größer bei tendenziell erhöhter Osteoklastenaktivierung, was an der Ausschaltung des tumorhemmenden Effektes von TNF- $\alpha$  liegen könnte. Daher ist es auch möglich, dass die systemische Applikation von Etanercept Einfluss auf die Tumorstadium nimmt und somit die durchschnittliche Tumorstadium zunimmt. Die hier gezeigten gegensätzlichen Effekte von TNF- $\alpha$  auf Tumorstadium, Osteoklastenaktivierung und Modulation des Schmerzverhaltens zeigen, dass die aufgehobene mechanische Allodynie bei TNFR1/2-KO-Mäusen zu späteren Stadien des Tumorschmerzes im Modell unabhängig von der Tumorstadium ist und impliziert somit eine entscheidende Rolle für TNF- $\alpha$  bei der Schmerzverarbeitung im Tumormodell. Durch Behandlung mit Etanercept, einem TNF- $\alpha$ -neutralisierendem Fusionsprotein, konnte die bei den TNFR defizienten Tieren gefundene Analgesie nur teilweise reproduziert werden, was an der systemischen Applikationsweise mit mangelnder spinaler Anreicherung gelegen haben könnte.

Ausgehend von diesen Ergebnissen sollten weitere präklinische Studien durchgeführt werden, um den potentiellen Nutzen einer pharmakologischen TNF- $\alpha$  Blockade bei

Patienten mit Tumorschmerzen zu prüfen und die Gefahren bezüglich eines evtl. gesteigerten Tumorwachstum unter dieser Therapie genauer zu eruieren.

## 5 Zusammenfassung

Am Modell des tumorinduzierten Schmerzes der Maus wurden sowohl das Schmerzverhalten der Tiere als auch spezifische morphologische Veränderungen im Hinterhorn des Rückenmarks (Aktivierung von Astrozyten) und im tumorbefallenen Knochen analysiert. Durch Analyse von Mäusen mit Defizienz für TNF-Rezeptor 1, TNF-Rezeptor 2 oder für beide Rezeptoren konnte die Rolle von TNF- $\alpha$  seiner Rezeptoren bei der Entstehung von tumorinduziertem Schmerz untersucht werden. Im Unterschied zu neuropathischen Schmerzmodellen konnte gezeigt werden, dass beide TNF-Rezeptoren ausgeschaltet werden müssen, um eine signifikante Schmerzreduktion zu erzielen. Die systemische Behandlung mit dem TNF-neutralisierenden Fusionsprotein Etanercept konnte die im genetischen Modell gezeigte Reduktion der mechanischen Allodynie teilweise, aber nicht vollständig reproduzieren.

Eine Hemmung der Mikrogliaaktivierung mittels Minocyclin erbrachte im Tumorschmerzmodell keinen Effekt auf das Schmerzverhalten der Tiere.

Die histologische Analyse der tumoraffizierten Knochen zeigte eine signifikante Zunahme der Osteoklastenaktivität in tumortragenden Tieren. Die Behandlung mit Minocyclin war ohne erkennbaren Effekt auf die Differenzierung und die Aktivität der Osteoklasten. Es ergaben sich jedoch Hinweise, dass TNF- $\alpha$  einen hemmenden Einfluss auf die Osteoklastenaktivität im Knochentumormodell hat, da sowohl in den TNFR-KO-Tieren als auch unter Gabe von Etanercept eine Steigerung der Osteoklastenaktivität nachgewiesen werden konnte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass TNF- $\alpha$  eine wichtige Rolle, sowohl in der Entstehung, als auch in der Aufrechterhaltung von tumorinduziertem Schmerz spielt. Hier liegt der Ansatzpunkt für weitere Studien mit dem Ziel, eine spezifische Pharmakotherapie zu entwickeln mit wirksamer TNF- $\alpha$  Blockade auch bei Patienten mit Tumorschmerzen. Nach den Erkenntnissen dieser Arbeit mit Etanercept sollte ein spezielles Augenmerk auf die ZNS-Gängigkeit dieser Substanzen gelegt werden und die Gefahr der Möglichkeit eines vermehrten Tumorwachstum bedacht werden.

## 6 Abbildungen und Graphen

### 6.1 Verhaltenstestungen

#### 6.1.1 WT ohne Tumor vs. WT mit Tumor

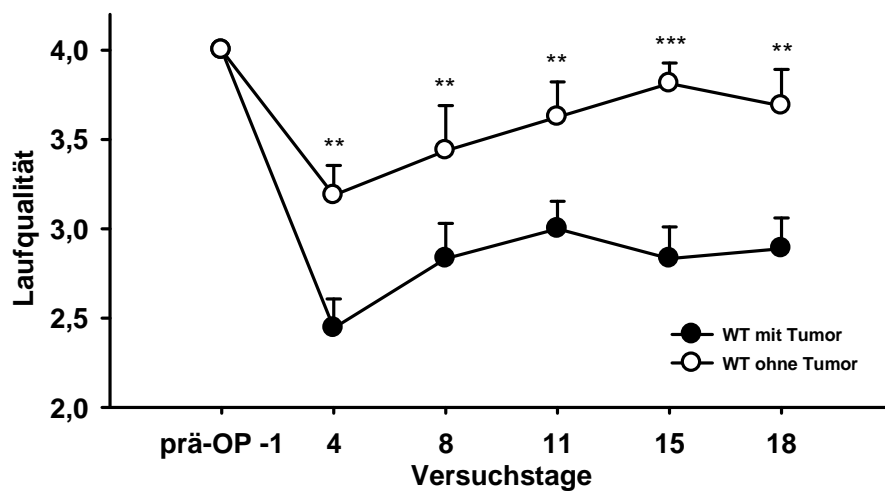


Abbildung 5: Freies Laufen

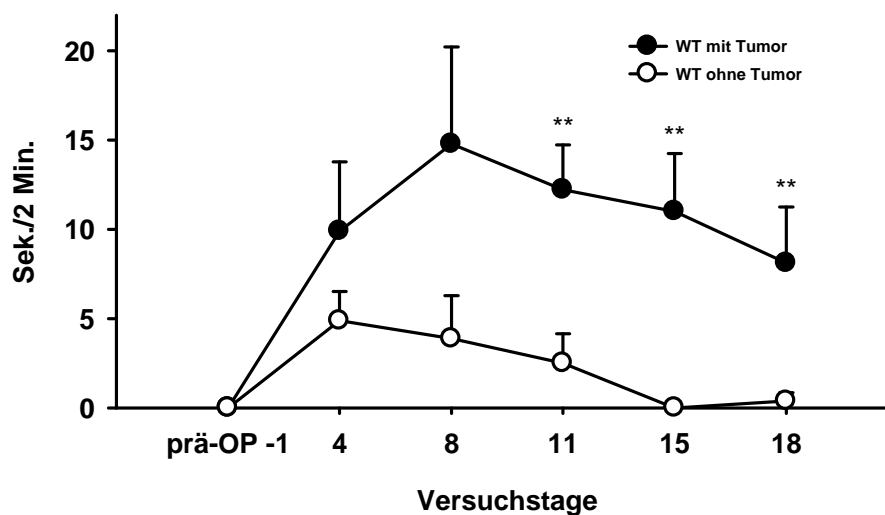


Abbildung 6: Schonen/2 min

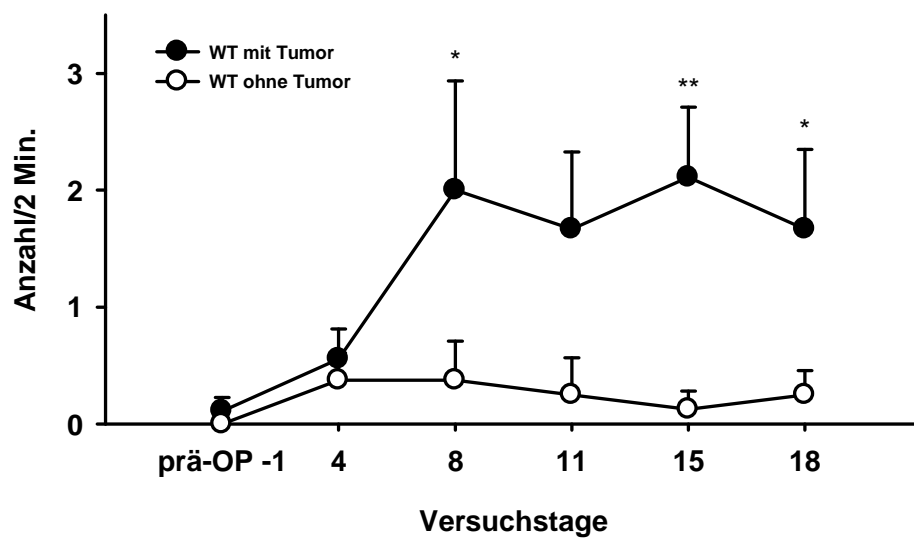


Abbildung 7: Schütteln/2 min

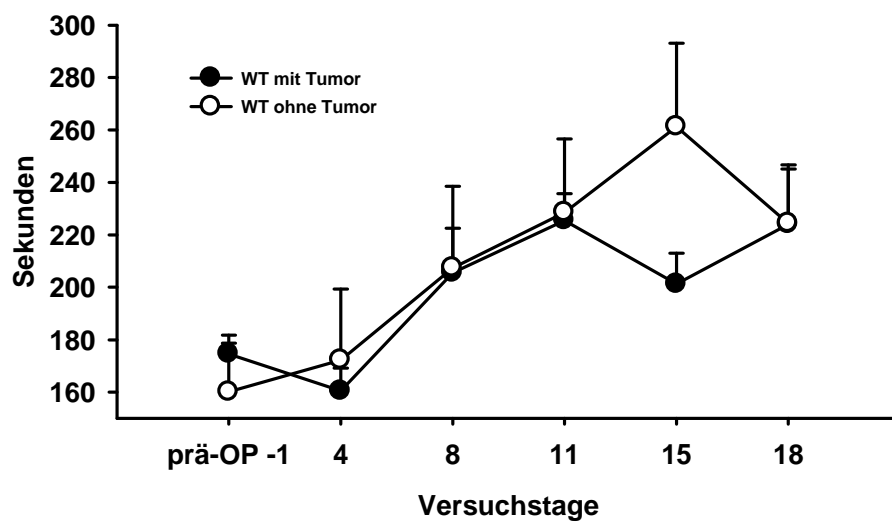


Abbildung 8: Rota-Rod (Laufdauer in Sekunden)

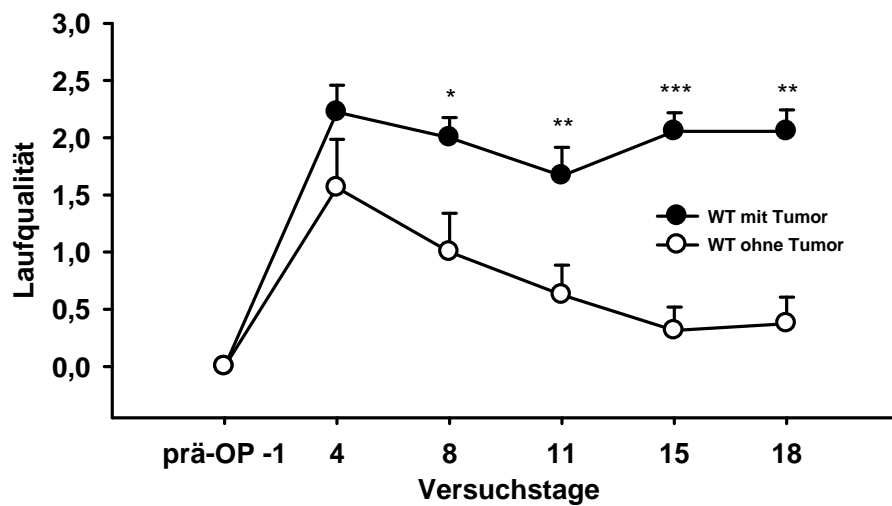


Abbildung 9: Rota-Rod (Laufqualität)

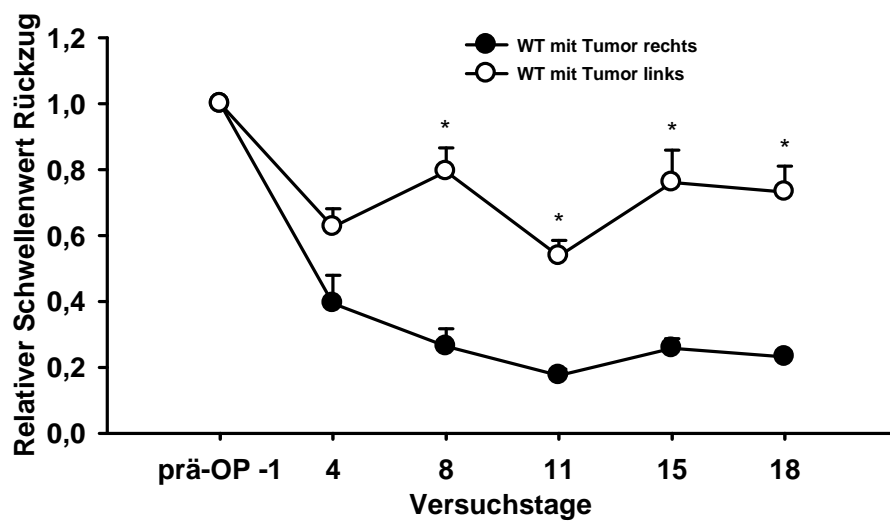


Abbildung 10: Mechanische Allodynie, WT mit Tumor Vergleich rechts gegen links

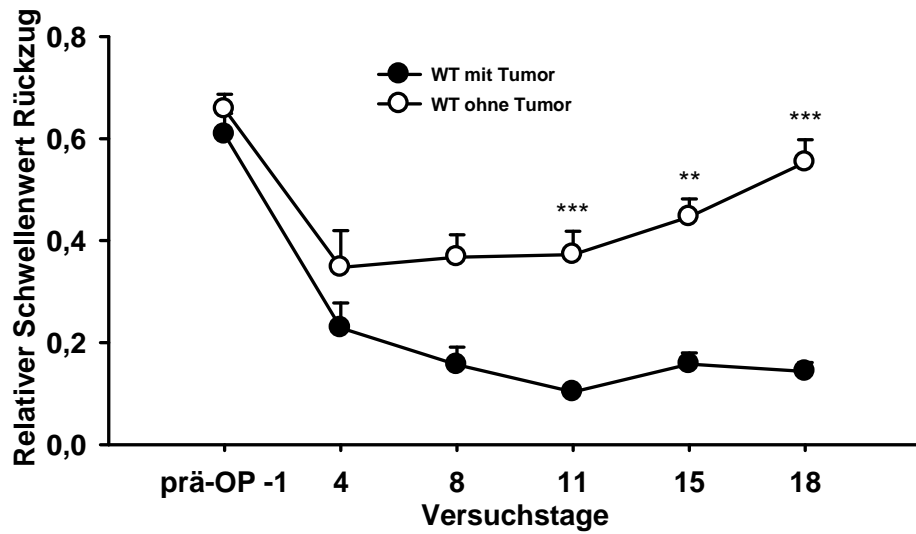


Abbildung 11: Mechanische Allodynie, WT ohne Tumor vs. WT mit Tumor

#### 6.2.2 WT mit Tumor, Minocyclin vs. NaCl 0,9 %

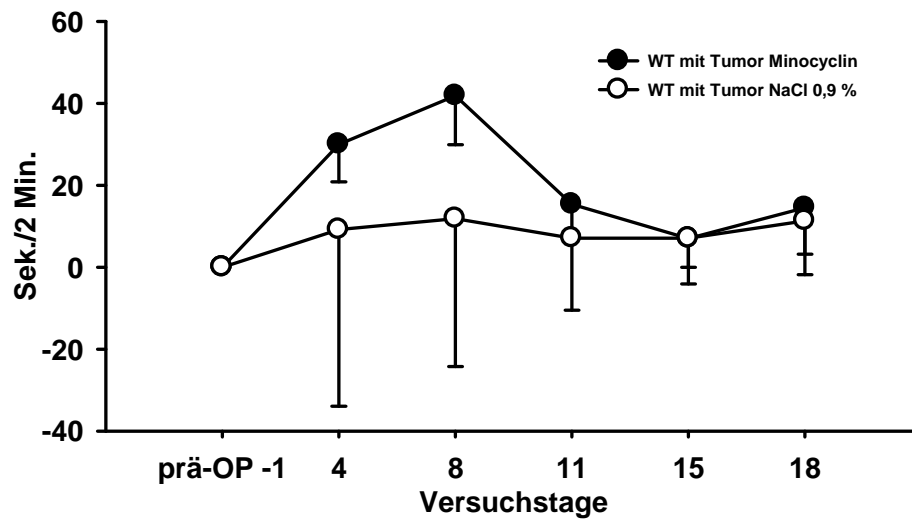


Abbildung 12: Schonzeit/2 min



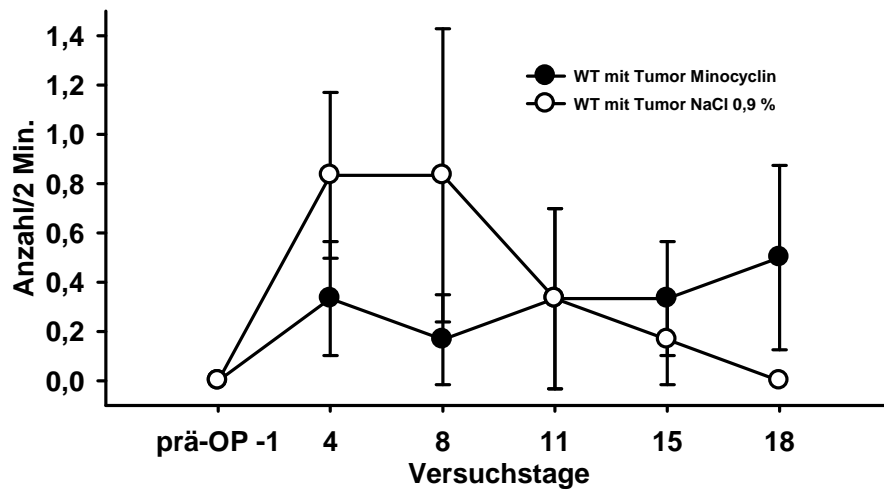


Abbildung 13: Schütteln Anzahl/2 min

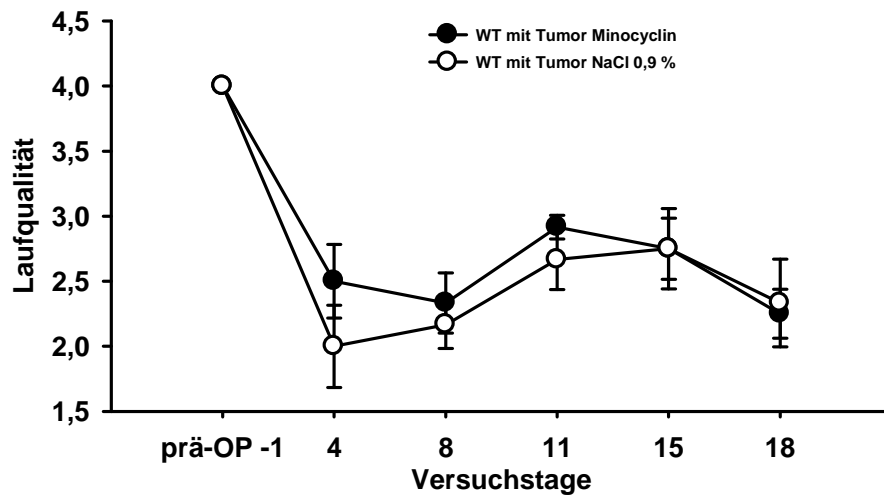


Abbildung 14: Freies Laufen

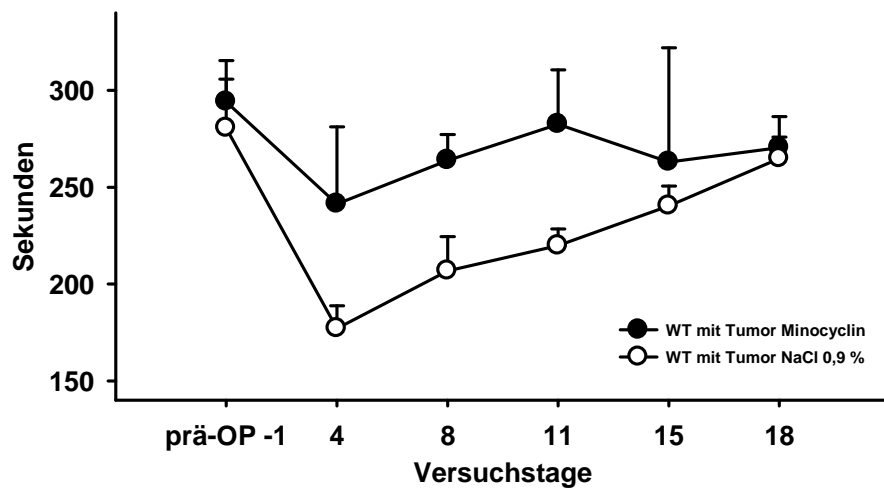


Abbildung 15: Rota-Rod (Laufdauer in Sekunden)

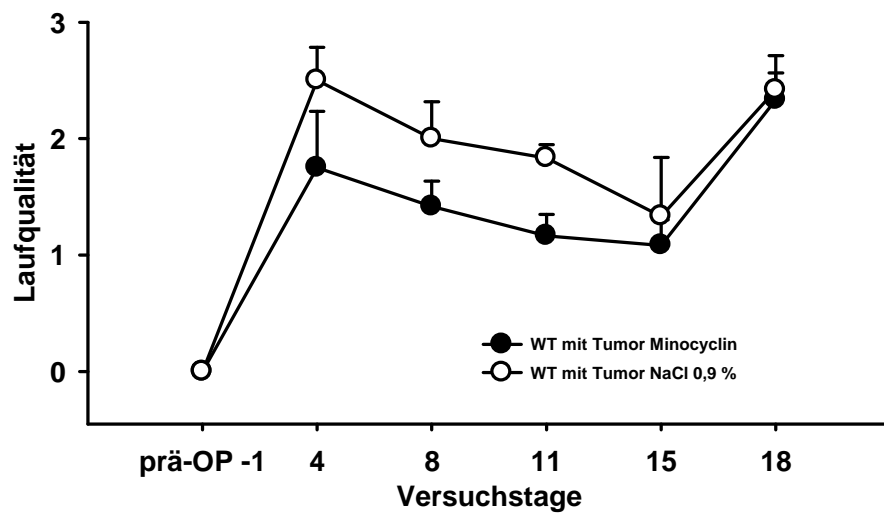


Abbildung 16: Rota-Rod (Laufqualität)

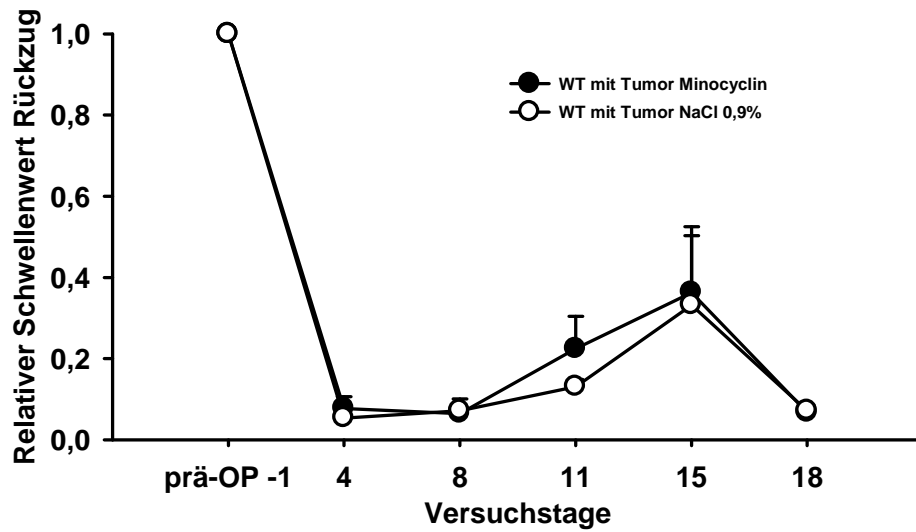


Abbildung 17: Mechanische Allodynie, Tumortiere mit/ohne Minocyclininjektion

### 6.1.3 WT mit Tumor vs. TNFR1 $-/-$ vs. TNFR2 $-/-$ vs. TNFR1/2 $-/-$

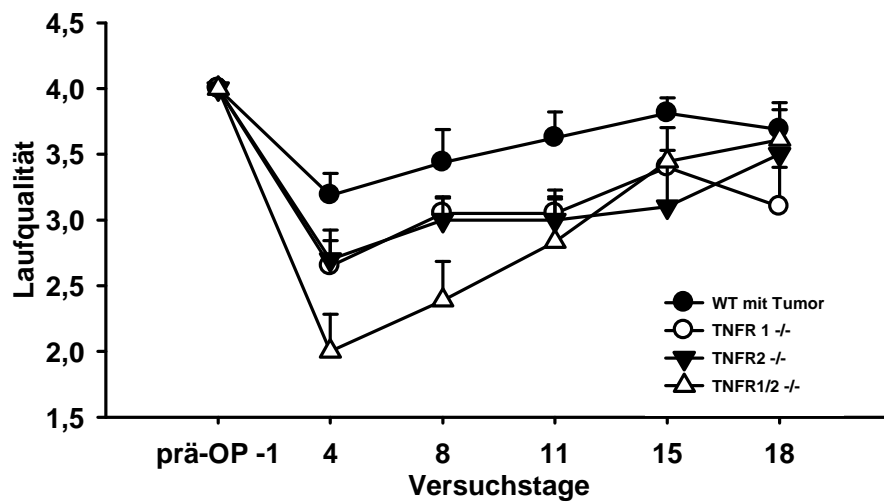


Abbildung 18: Freies Laufen Laufqualität

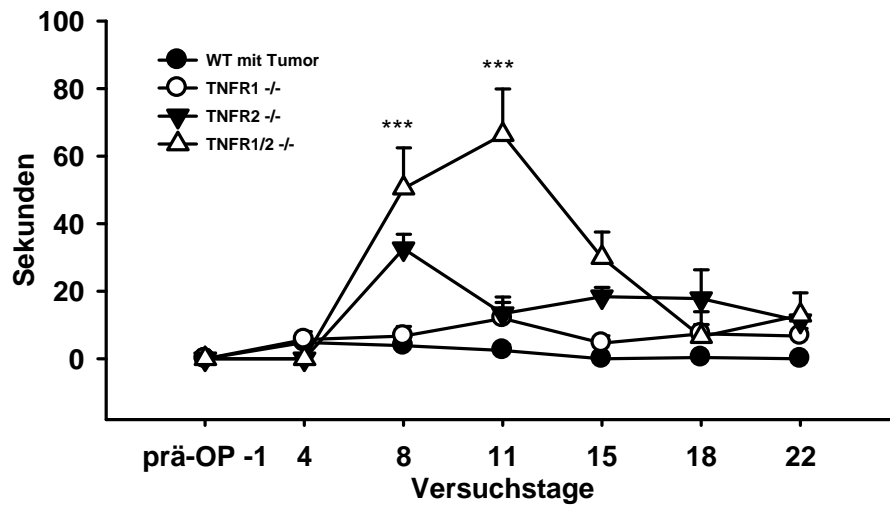


Abbildung 19: Schonen sek/2min

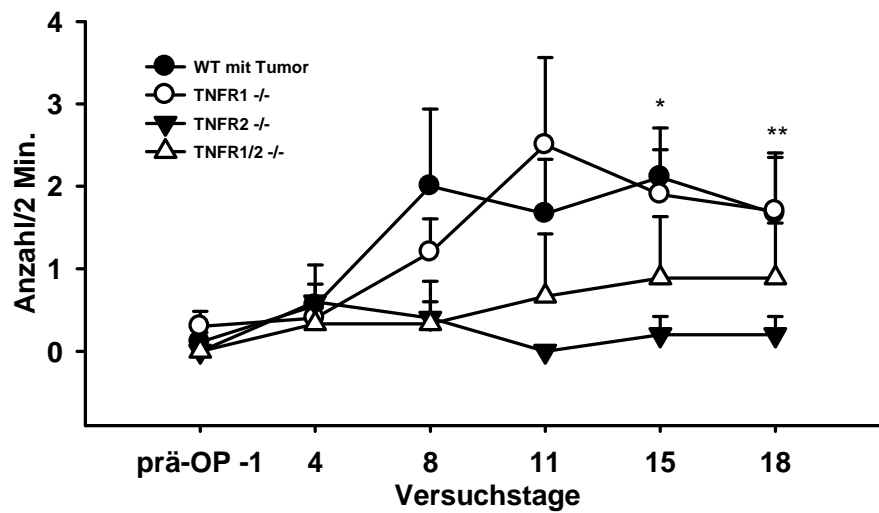


Abbildung 20: Schütteln Anzahl/2min

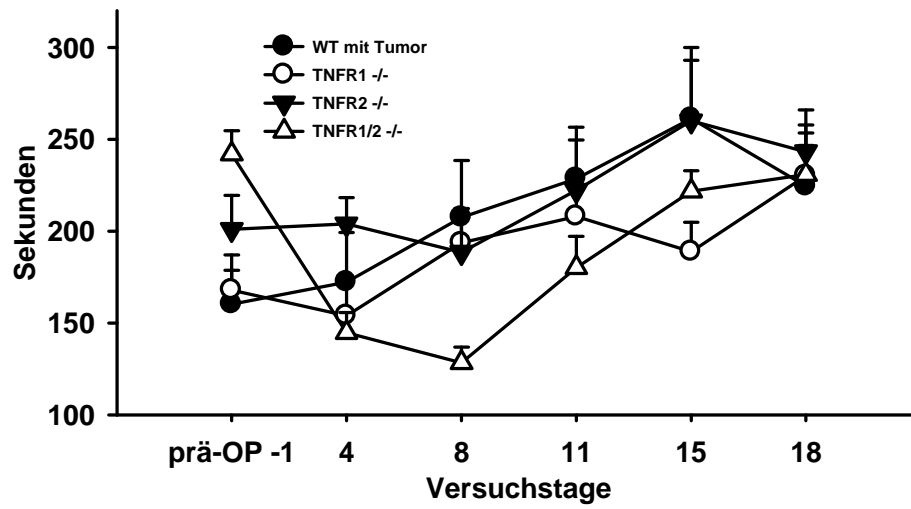


Abbildung 21: Rota-Rod Laufdauer in Sekunden

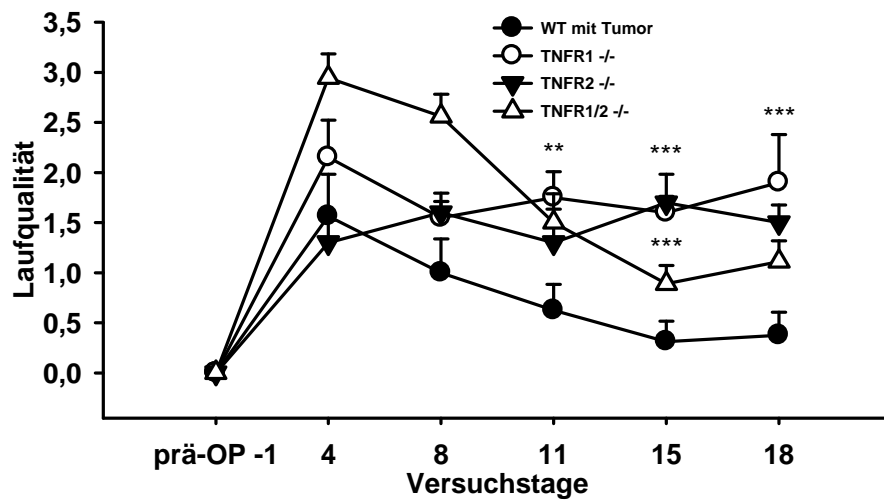


Abbildung 22: Rota-Rod Laufqualität

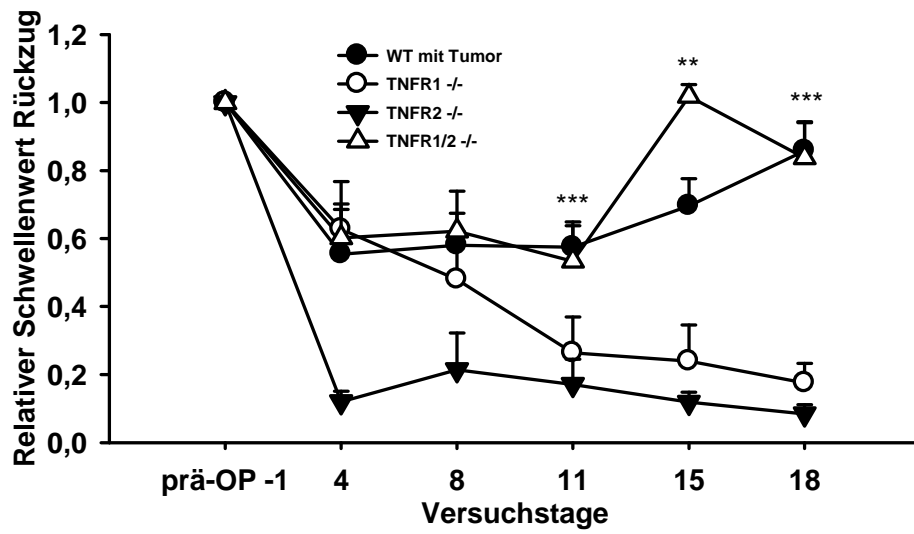


Abbildung 23: Mechanische Allodynie, Vergleich der TNFR-KO-Tiere

#### 6.1.4 WT mit Tumor mit Etanercept vs. WT mit Tumor mit IgG

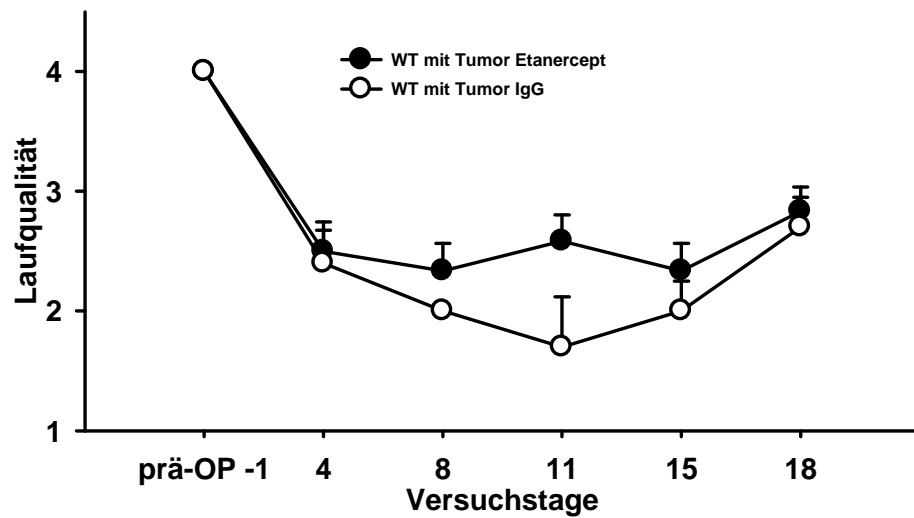


Abbildung 24: Freies Laufen Laufqualität

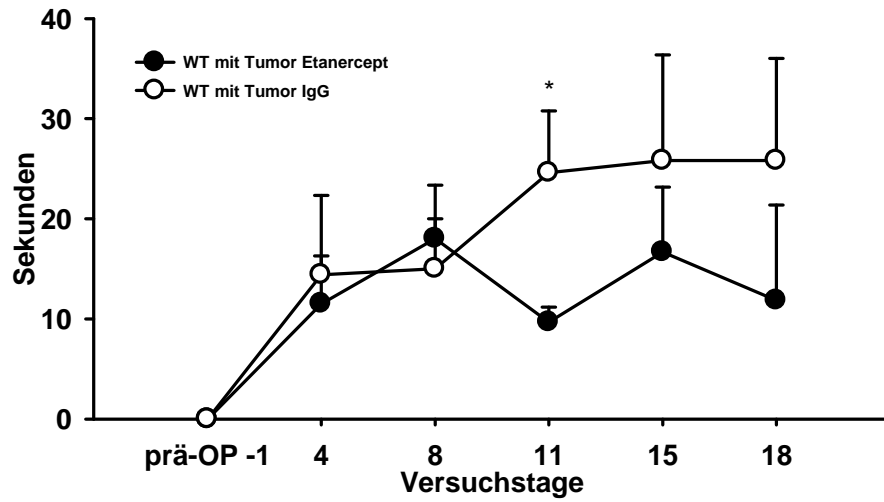


Abbildung 25: Schonen sek/2 min

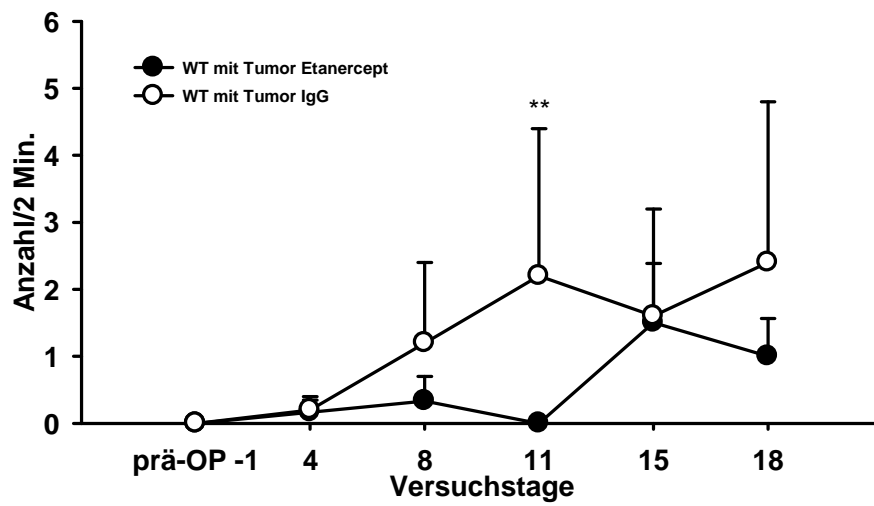


Abbildung 26: Schütteln Anzahl/2min

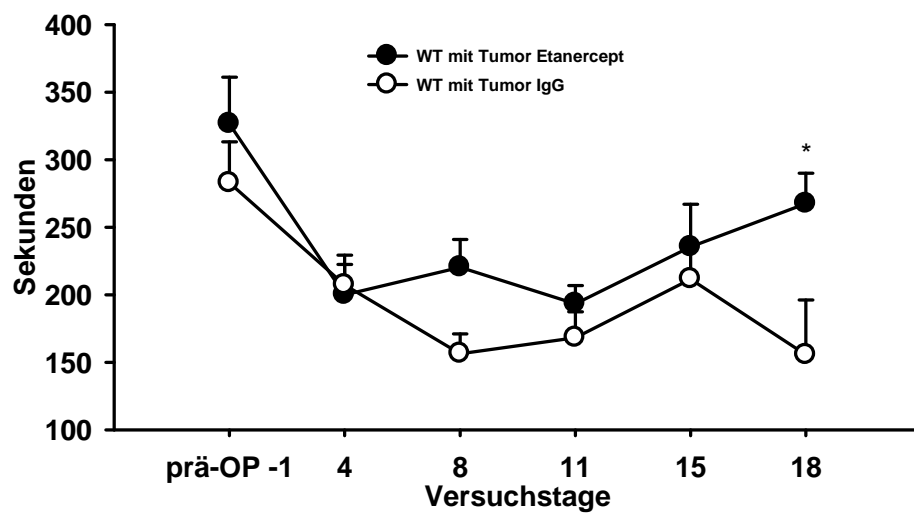


Abbildung 27: Rota-Rod Laufdauer in Sekunden

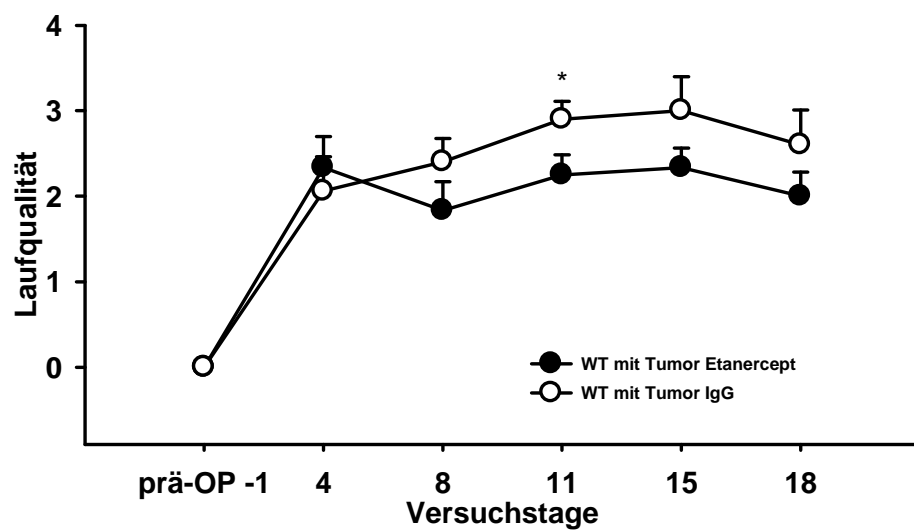


Abbildung 28: Rota-Rod Laufqualität



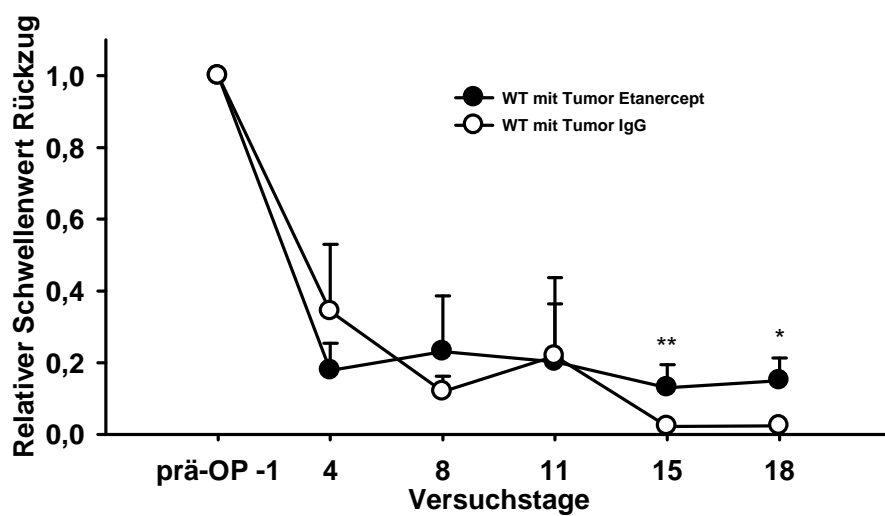


Abbildung 29: Mechanische Allodynie, Vergleich Tumortiere mit und ohne Etanerceptinjektion

## 6.2 Auswertungen der histologischen Studien

### 6.2.1 Semiquantitative Bestimmung der Tumorgroße

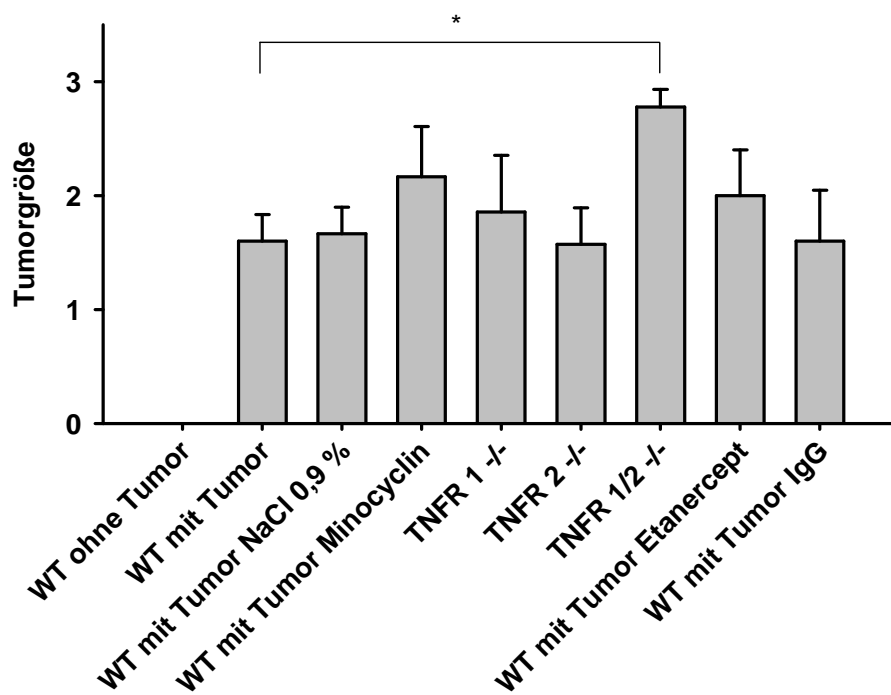


Abbildung 30: Tumorgroße, semiquantitativ

## 6.2.2 Messungen der TRAP-positiven Flächen (Osteoklasten)

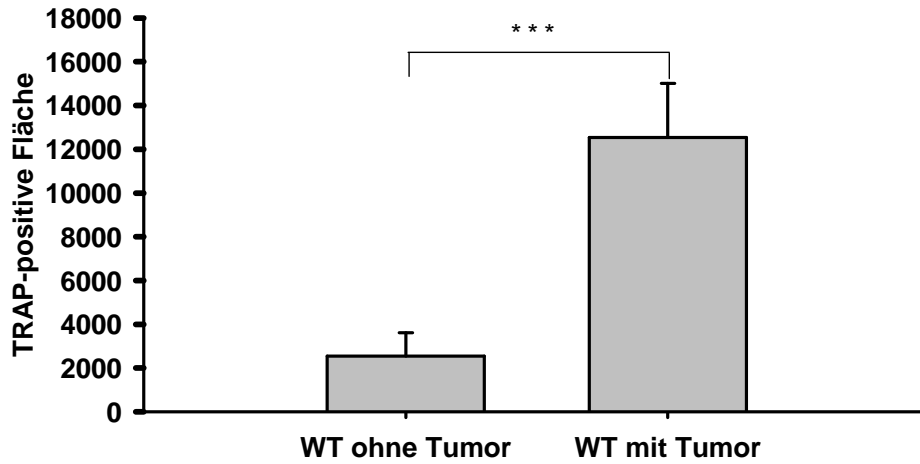


Abbildung 31: TRAP-positive Flächen, Vergleich WT mit Tumor vs. WT ohne Tumor

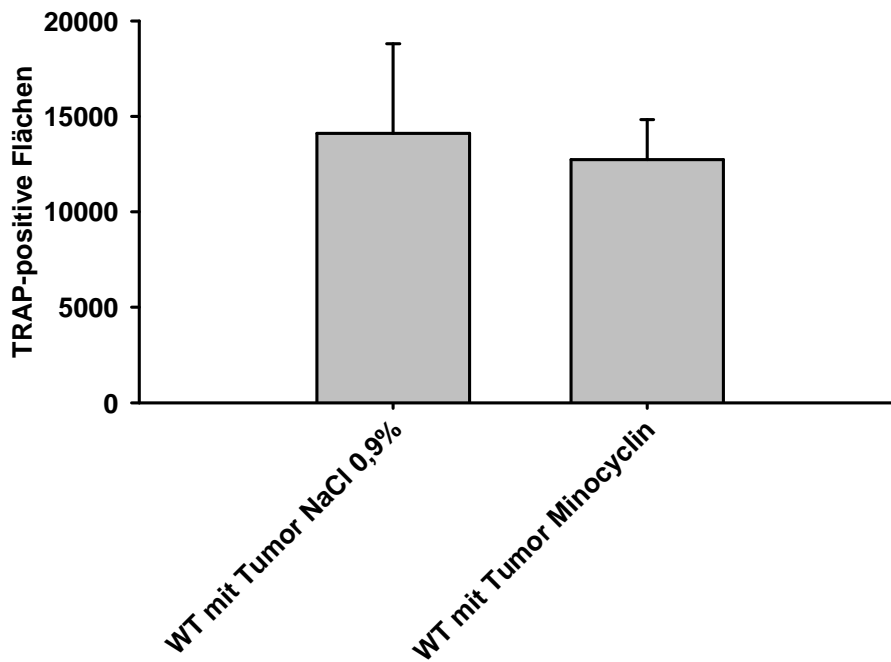


Abbildung 32: Messung der TRAP-positiven Flächen, Vergleich Tumortiere mit und ohne Minocyclininjektion

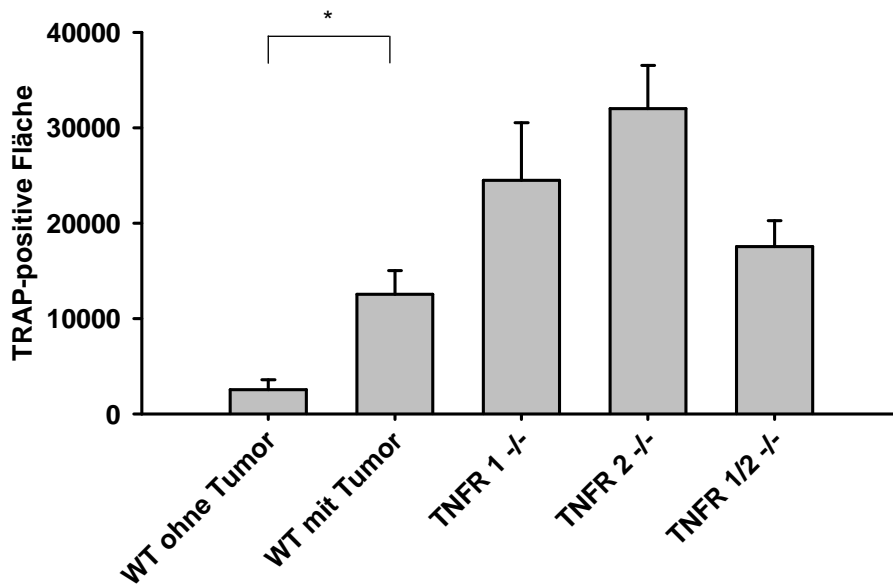


Abbildung 33: TRAP-positive Flächen, Vergleich TNFR-KO-Tiere

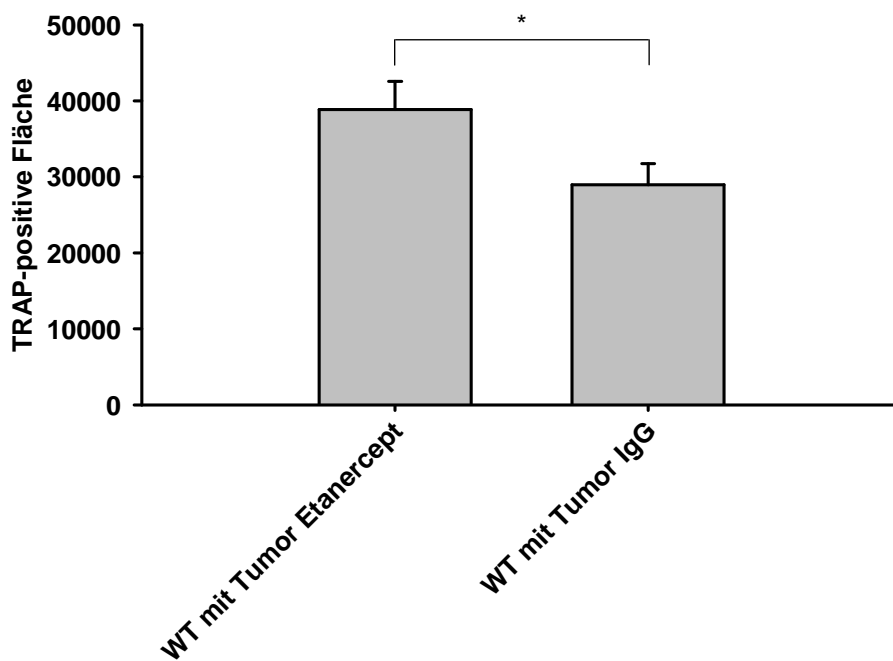


Abbildung 34: TRAP-positive Flächen, Vergleich Tumortiere mit und ohne Etanerceptinjektion

## 6.2.3 Messungen der GFAP-positiven Flächen (Astrozyten)

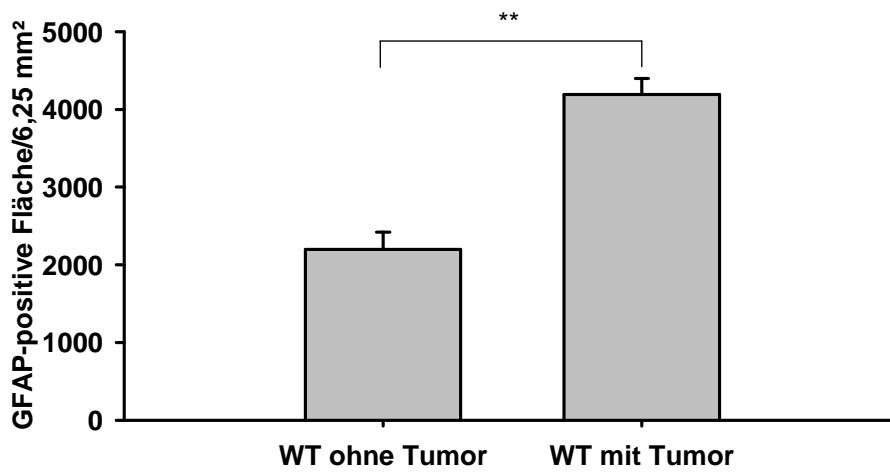


Abbildung 35: Gemessene Fläche der GFAP-positiven Zellen im Hinterhorn, WT ohne Tumor vs. WT mit Tumor

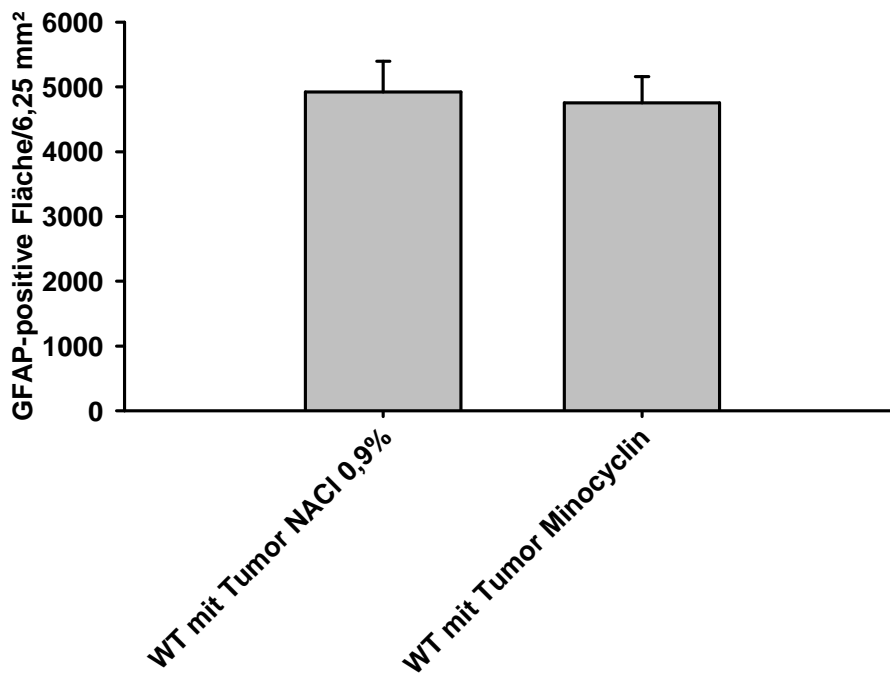


Abbildung 36: Gemessene Fläche der GFAP-positiven Zellen im Hinterhorn, Vergleich Tumortiere mit und ohne Minocyclininjektion

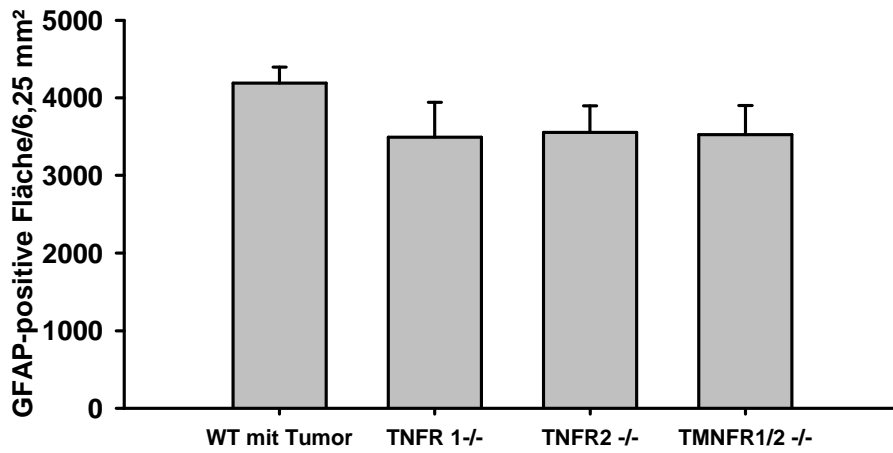


Abbildung 37: Gemessene Fläche der GFAP-positiven Zellen im Hinterhorn, Vergleich TNFR-KO-Tiere

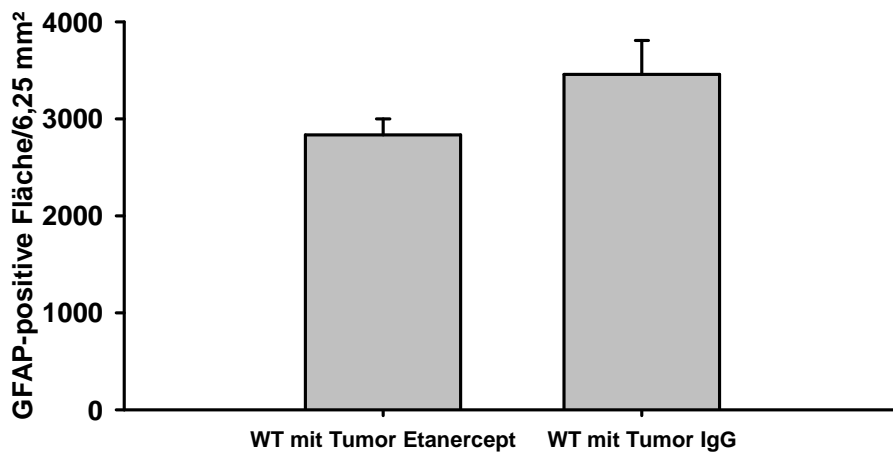


Abbildung 38: Gemessene Fläche der GFAP-positiven Zellen im Hinterhorn, Vergleich Tumortiere mit und ohne Etanerceptinjektion

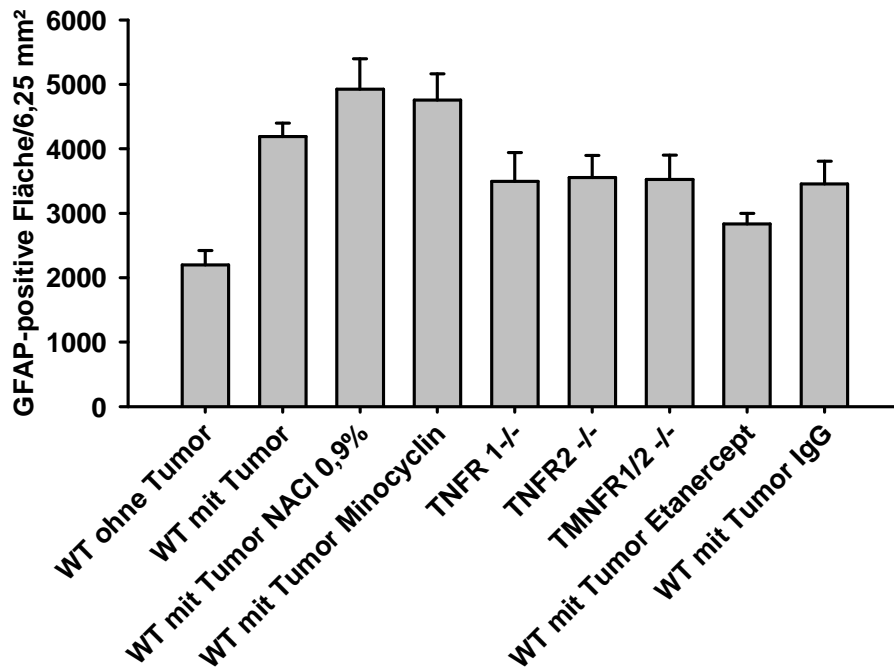


Abbildung 39: Gemessene Fläche der GFAP-positiven Zellen im Hinterhorn

## 6.3 Bilder morphologischer Untersuchungen

### 6.3.1 Hämalaun-Eosin-Färbung des Knochens und Tumorausbreitung

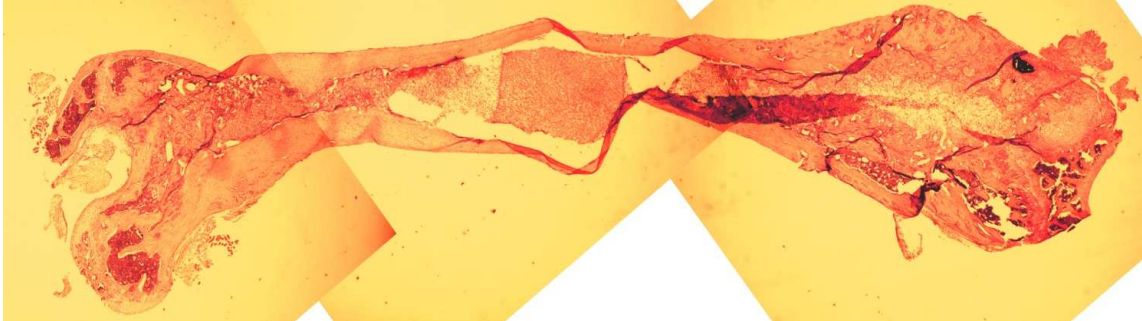


Abbildung 40: Tumor im gesamten Markraum

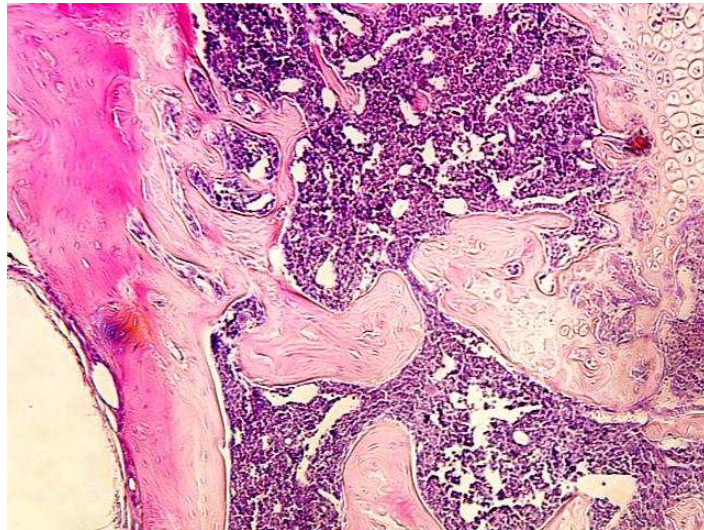


Abbildung 41: Gesunde Knochen trabekel mit Knorpelanteilen und Knochenmark



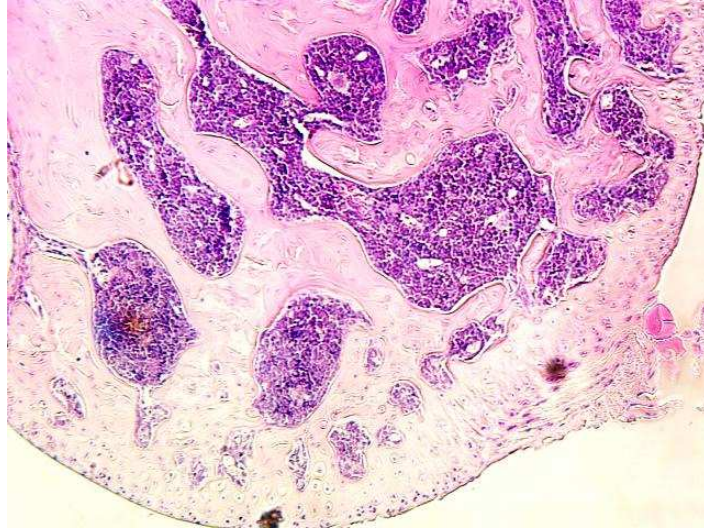


Abbildung 42: Gesunde Knochenbälkchen und Knorpel im Bereich der Metaphyse

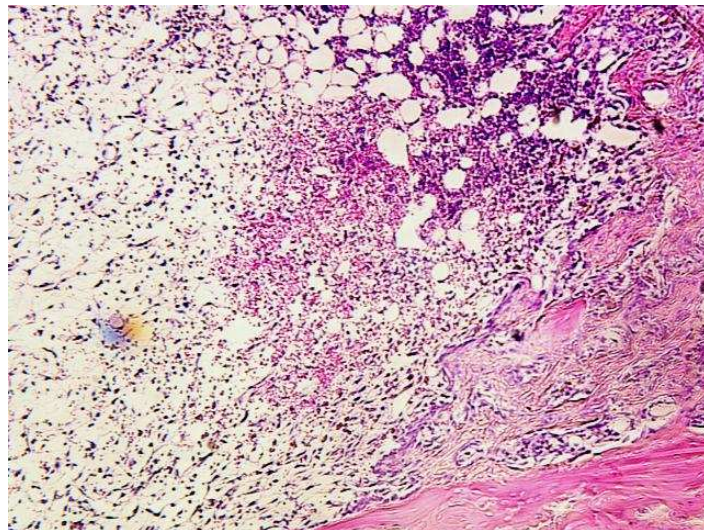


Abbildung 43: Tumorgewebe intramedullär

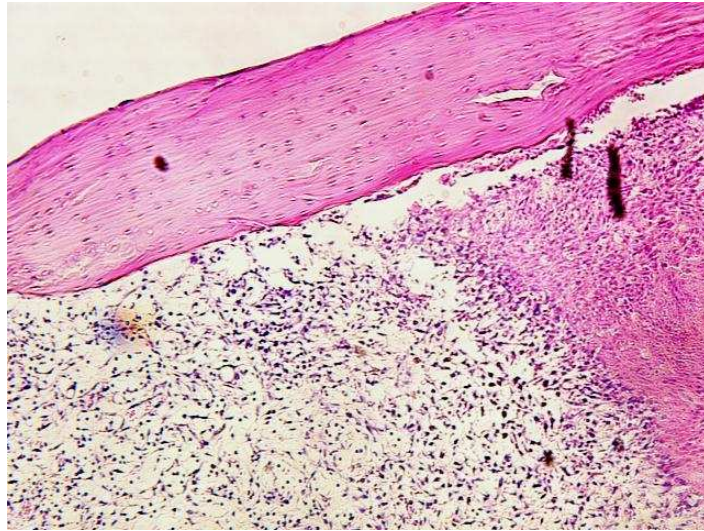


Abbildung 44: Fibröse und solide Tumoranteile

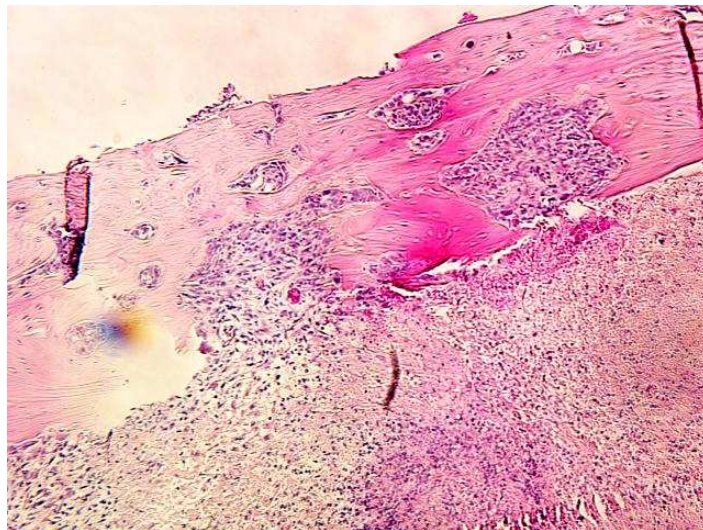


Abbildung 45: Osteolytische Invasion des Tumors in die Kortikalis

### 6.3.2 Osteoklastenaktivität, TRAP-Färbung

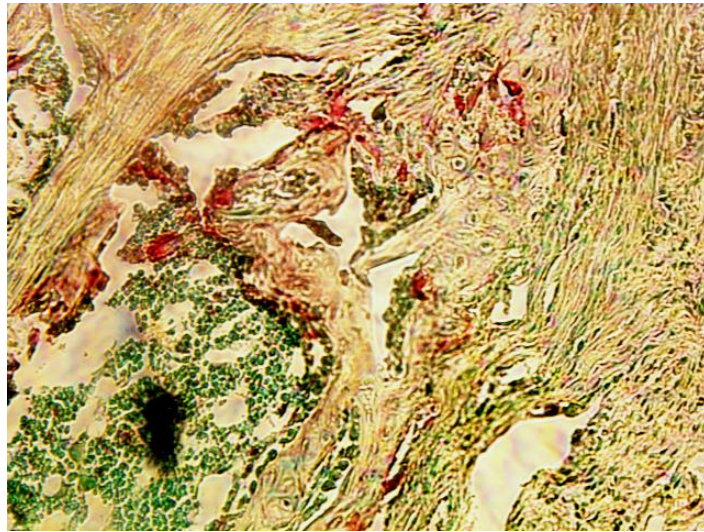


Abbildung 46: Osteoklasten und Tumor

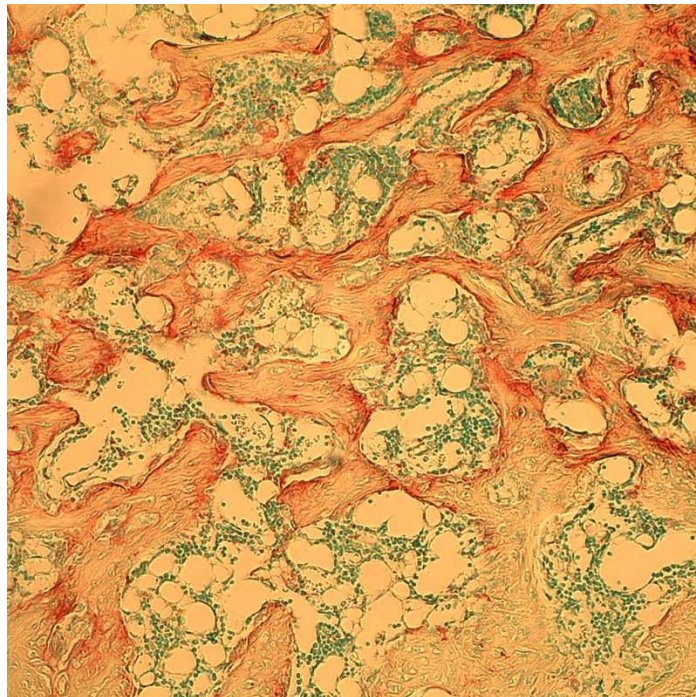


Abbildung 47: Gesteigerte Osteoklastenaktivität in der Metaphyse

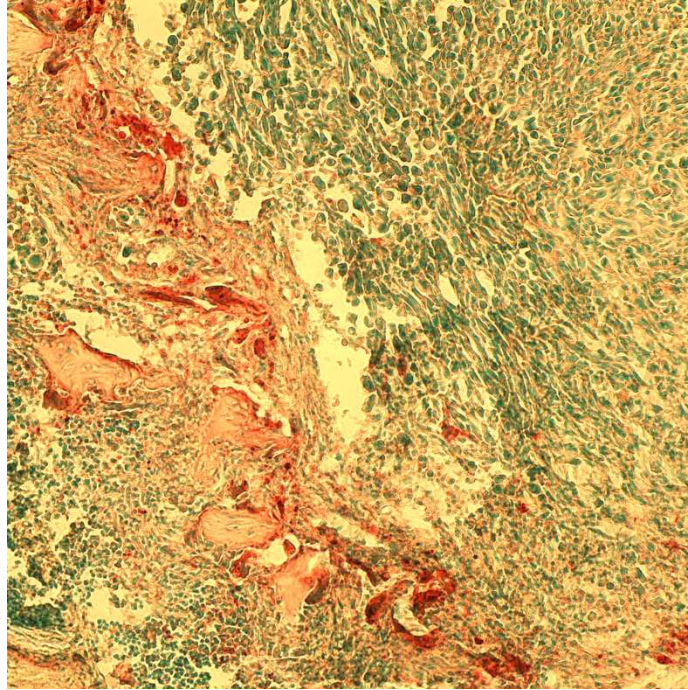


Abbildung 48: Osteoklasten normales Knochenmark und Tumor

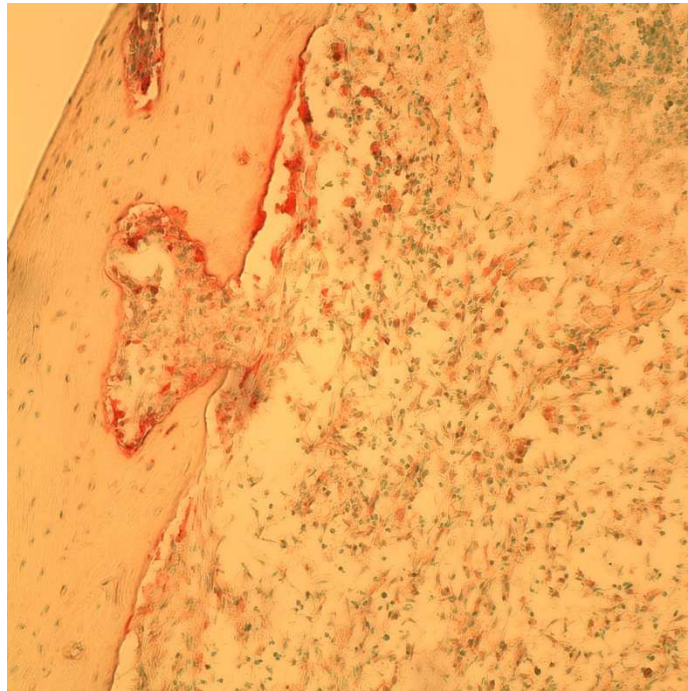


Abbildung 49: Osteolyse und Tumor

## 6.3.3 Astrozytenaktivierung, GFAP-Immunfluoreszenzfärbung

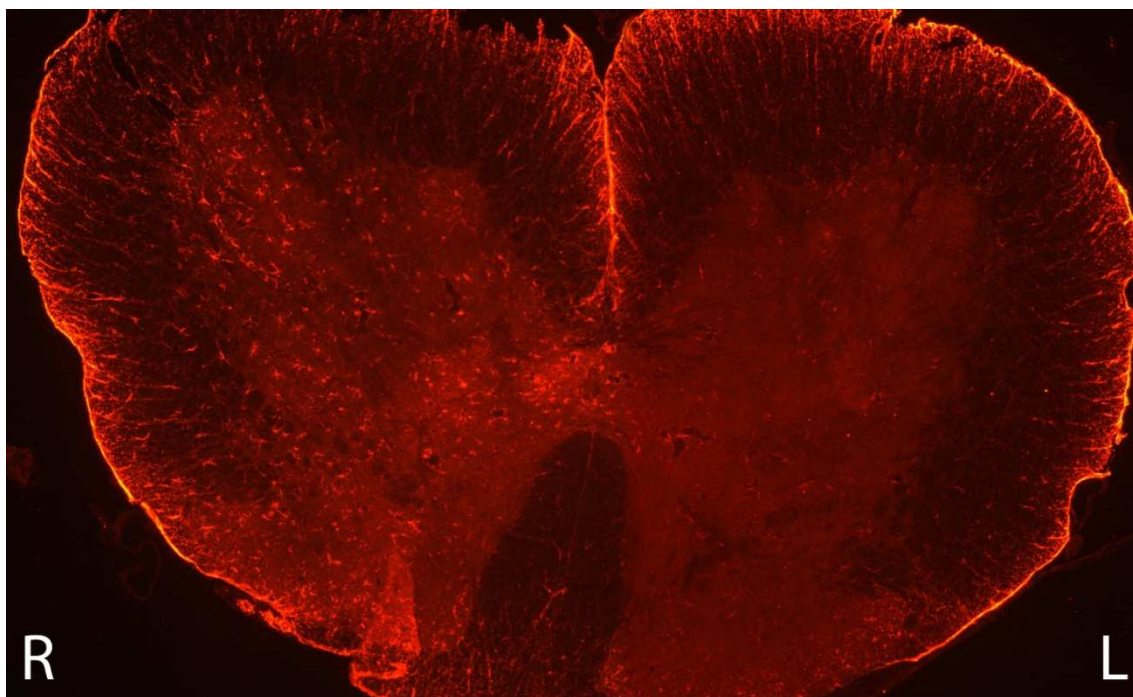


Abbildung 50: WT mit Tumor

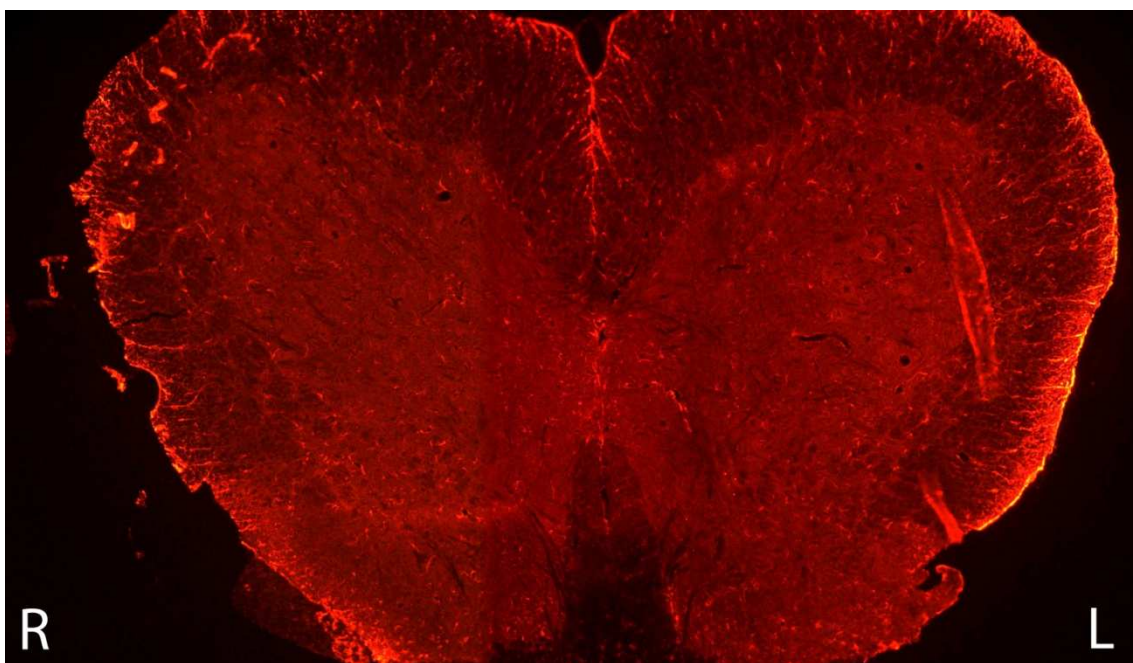


Abbildung 51: WT ohne Tumor

## 6.3.4 Bildverarbeitung

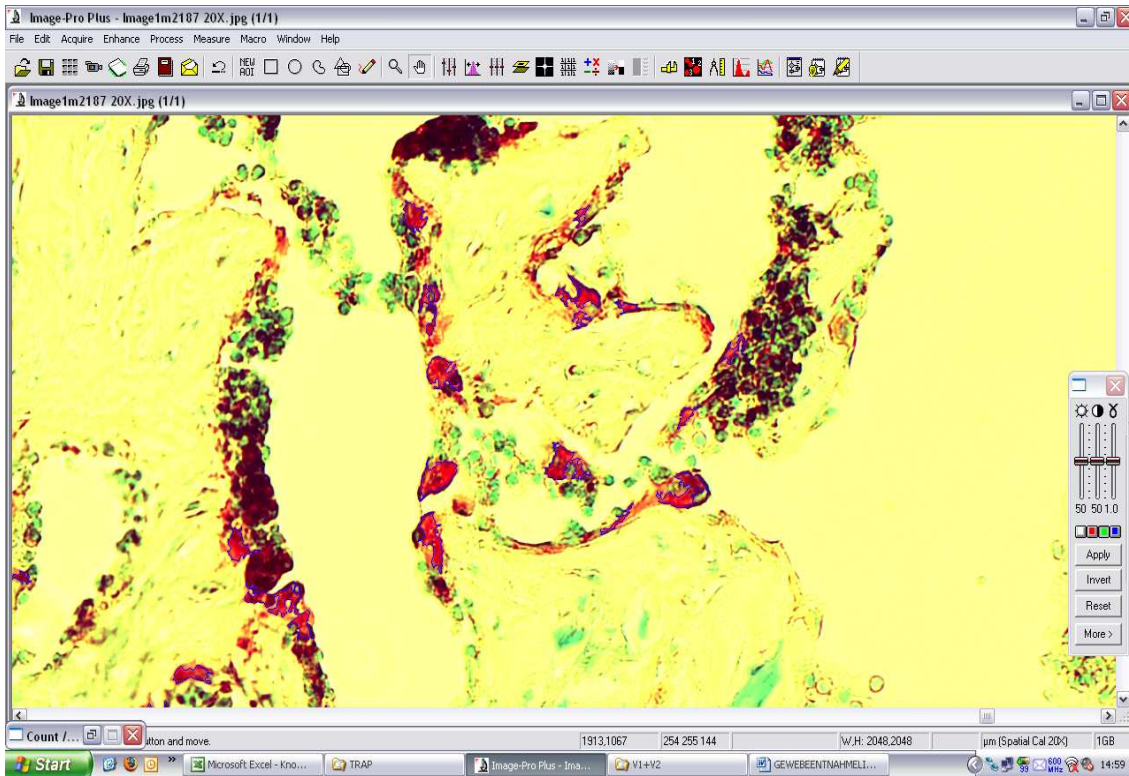


Abbildung 52: Messung der Osteoklastenaktivität in der TRAP-Färbung

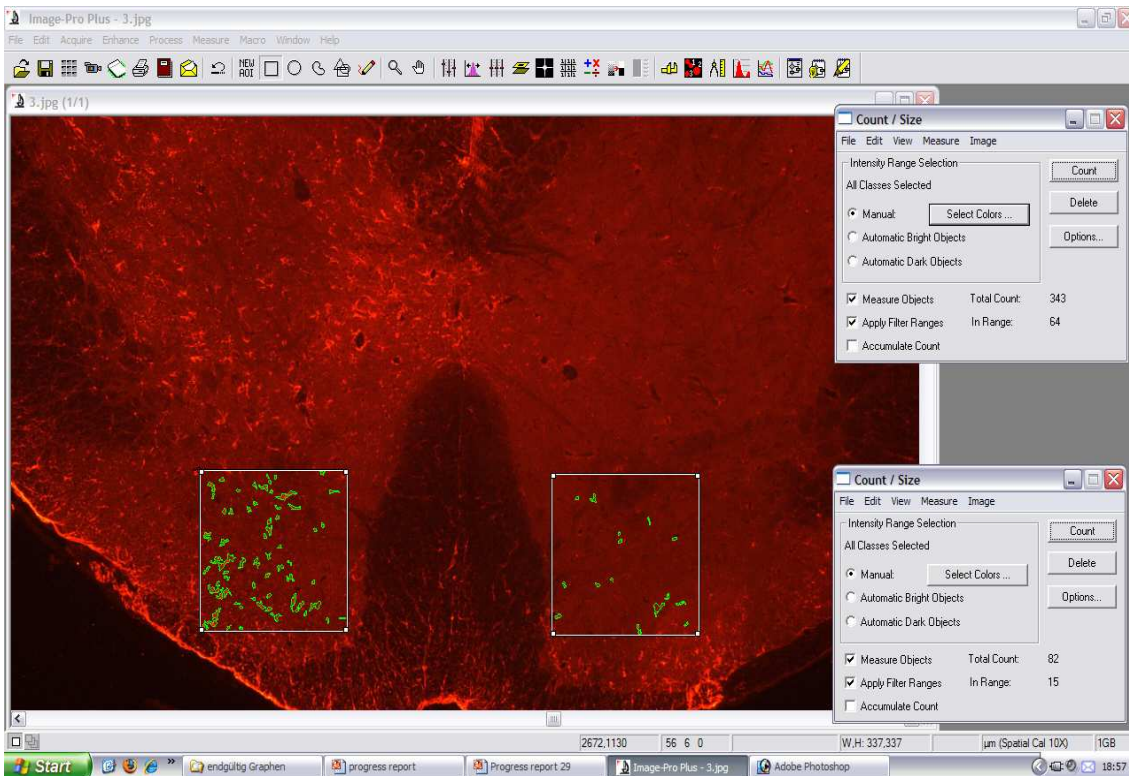


Abbildung 53: Messung der GFAP-Immunoreaktivität

## 7 Literaturverzeichnis

Adami S (1997). "Bisphosphonates in prostate carcinoma." *Cancer* 80(8 Suppl): 1674-9.

Amin AR, Attur MG, Thakker GD, Patel PD, Vyas PR, Patel RN, Patel IR, Abramson SB (1996). "A novel mechanism of action of tetracyclines: effects on nitric oxide synthases." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 14014-9.

Baglioni C, Ruggiero V, Latham K, Johnson SE (1987). "Cytocidal activity of tumour necrosis factor: protection by protease inhibitors." *Ciba Found Symp* 131: 52-63.

Baker SJ, Reddy EP (1998). "Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily." *Oncogene* 17(25): 3261-70.

Bennett GJ, Xie YK (1988). "A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man." *Pain* 33(1): 87-107.

Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala PC, Cerami A (1985). "Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells." *J Exp Med* 161(5): 984-95.

Budd GT, Green S, Baker LH, Hersh EP, Weick JK, Osborne CK (1991). "A Southwest Oncology Group phase II Trial of recombinant tumor necrosis factor in metastatic breast cancer." *Cancer* 68(8): 1694-5.

Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994). "Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw." *J Neurosci Methods* 53(1): 55-63.

Chung KF (2001). "Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease." *Eur Respir J Suppl* 34: 50s-59s.

Clohisy DR, Ogilvie CM, Carpenter RJ, Ramnaraine ML (1996). "Localized, tumor-associated osteolysis involves the recruitment and activation of osteoclasts." *J Orthop Res* 14(1): 2-6.

Colburn RW, DeLeo JA, Rickman AJ, Yeager MP, Kwon PH, Hickey WF (1997). "Dissociation of microglial activation and neuropathic pain behaviors following peripheral nerve injury in the rat." *J Neuroimmunol* 79(2): 163-75.

Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH (1992). "The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia." *Br J Pharmacol* 107(3): 660-4.

Empl M, Renaud S, Erne B, Fuhr P, Straube A, Schaeren-Wiemers N, Steck AJ (2001). "TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies." *Neurology* 56(10): 1371-7.

Friedman R (2000). "Pain at the cellular level: the role of the cytokine tumor necrosis factor-alpha." *Reg Anesth Pain Med* 25(2): 110-2.

Fukuda T, Yamaguchi T, Yamaki T, Suzuki T (2001). "Ovarian fibrosarcoma producing multiple cytokines." *Pathol Int* 51(9): 739-43.

George A, Buehl A, Sommer C (2005). "Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve." *Exp Neurol* 192(1): 163-6.

George A, Schmidt C, Weishaupt A, Toyka KV, Sommer C (1999). "Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury." *Exp Neurol* 160(1): 124-32.



Jimenez F, Barraud de Lagerie S, Fernandez C, Pino PMazier D (2003). "Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of cerebral malaria." *Cell Mol Life Sci* 60(8): 1623-35.

Gralow JTripathy D (2007). "Managing metastatic bone pain: the role of bisphosphonates." *J Pain Symptom Manage* 33(4): 462-72.

Gravallese EM, Galson DL, Goldring SRAuron PE (2001). "The role of TNF-receptor family members and other TRAF-dependent receptors in bone resorption." *Arthritis Res* 3(1): 6-12.

Halvorson KG, Sevcik MA, Ghilardi JR, Rosol TJMantyh PW (2006). "Similarities and differences in tumor growth, skeletal remodeling and pain in an osteolytic and osteoblastic model of bone cancer." *Clin J Pain* 22(7): 587-600.

Hansson E (2006). "Could chronic pain and spread of pain sensation be induced and maintained by glial activation?" *Acta Physiol (Oxf)* 187(1-2): 321-7.

Hollifield RD, Harbige LS, Pham-Dinh DSharief MK (2003). "Evidence for cytokine dysregulation in multiple sclerosis: peripheral blood mononuclear cell production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during relapse and remission." *Autoimmunity* 36(3): 133-41.

Homma Y, Brull SJZhang JM (2002). "A comparison of chronic pain behavior following local application of tumor necrosis factor alpha to the normal and mechanically compressed lumbar ganglia in the rat." *Pain* 95(3): 239-46.

Honore P, Luger NM, Sabino MA, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB, O'Keefe P F, Ramnaraine ML, Clohisy DRMantyh PW (2000a). "Osteoprotegerin blocks bone cancer-induced skeletal destruction, skeletal pain and pain-related neurochemical reorganization of the spinal cord." *Nat Med* 6(5): 521-8.

Honore P, Rogers SD, Schwei MJ, Salak-Johnson JL, Luger NM, Sabino MC, Clohisy DR, Mantyh PW (2000b). "Murine models of inflammatory, neuropathic and cancer pain each generates a unique set of neurochemical changes in the spinal cord and sensory neurons." *Neuroscience* 98(3): 585-98.

Junger HS, Sorokin LS (2000). "Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNF $\alpha$ ." *Pain* 85(1-2): 145-51.

Kim SH, Chung JM (1992). "An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat." *Pain* 50(3): 355-63.

Kopreski MS, Lipton A, Harvey HA, Kumar R (1996). "Growth inhibition of breast cancer cell lines by combinations of anti-P185HER2 monoclonal antibody and cytokines." *Anticancer Res* 16(1): 433-6.

LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Schow P, Fong S, Schwall R, Sinicropi D, Ashkenazi A (2002). "Tumor-cell resistance to death receptor--induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax." *Nat Med* 8(3): 274-81.

Ledeboer A, Sloane EM, Milligan ED, Frank MG, Mahony JH, Maier SF, Watkins LR (2005). "Minocycline attenuates mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in rat models of pain facilitation." *Pain* 115(1-2): 71-83.

Liu B, Li H, Brull SJ, Zhang JM (2002). "Increased sensitivity of sensory neurons to tumor necrosis factor  $\alpha$  in rats with chronic compression of the lumbar ganglia." *J Neurophysiol* 88(3): 1393-9.

Luger NM, Honore P, Sabino MA, Schwei MJ, Rogers SD, Mach DB, Clohisy DR, Mantyh PW (2001). "Osteoprotegerin diminishes advanced bone cancer pain." *Cancer Res* 61(10): 4038-47.

MacEwan DJ (2002a). "TNF ligands and receptors--a matter of life and death." *Br J Pharmacol* 135(4): 855-75.

MacEwan DJ (2002b). "TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences." *Cell Signal* 14(6): 477-92.

Mach DB, Rogers SD, Sabino MC, Luger NM, Schwei MJ, Pomonis JD, Keyser CP, Clohisy DR, Adams DJ, O'Leary PM, Mantyh PW (2002). "Origins of skeletal pain: sensory and sympathetic innervation of the mouse femur." *Neuroscience* 113(1): 155-66.

Marchand F, Perretti M, McMahon SB (2005). "Role of the immune system in chronic pain." *Nat Rev Neurosci* 6(7): 521-32.

Marchand F, Tsantoulas C, Singh D, Grist J, Clark AK, Bradbury EJ, McMahon SB (2009). "Effects of Etanercept and Minocycline in a rat model of spinal cord injury." *Eur J Pain* 13(7): 673-81.

Mercadante S (1997). "Malignant bone pain: pathophysiology and treatment." *Pain* 69(1-2): 1-18.

Mika J, Osikowicz M, Makuch W, Przewlocka B (2007). "Minocycline and pentoxifylline attenuate allodynia and hyperalgesia and potentiate the effects of morphine in rat and mouse models of neuropathic pain." *Eur J Pharmacol* 560(2-3): 142-9.

Millan MJ (1999). "The induction of pain: an integrative review." *Prog Neurobiol* 57(1): 1-164.

Mohler KM, Torrance DS, Smith CA, Goodwin RG, Stremmler KE, Fung VP, Madani H, Widmer MB (1993). "Soluble tumor necrosis factor (TNF) receptors are effective

therapeutic agents in lethal endotoxemia and function simultaneously as both TNF carriers and TNF antagonists." *J Immunol* 151(3): 1548-61.

Nakagomi S, Suzuki Y, Namikawa K, Kiryu-Seo SKiyama H (2003). "Expression of the activating transcription factor 3 prevents c-Jun N-terminal kinase-induced neuronal death by promoting heat shock protein 27 expression and Akt activation." *J Neurosci* 23(12): 5187-96.

Nobuhara M, Kanamori T, Ashida Y, Ogino H, Horisawa Y, Nakayama K, Asami T, Iketani M, Noda K, Andoh Set al. (1987). "The inhibition of neoplastic cell proliferation with human natural tumor necrosis factor." *Jpn J Cancer Res* 78(2): 193-201.

Nutile-McMenemy N, Elfenbein ADeleo JA (2007). "Minocycline decreases in vitro microglial motility, beta1-integrin, and Kv1.3 channel expression." *J Neurochem* 103(5): 2035-46.

Owolabi SASaab CY (2006). "Fractalkine and minocycline alter neuronal activity in the spinal cord dorsal horn." *FEBS Lett* 580(18): 4306-10.

Parada CA, Yeh JJ, Joseph EKLevine JD (2003). "Tumor necrosis factor receptor type-1 in sensory neurons contributes to induction of chronic enhancement of inflammatory hyperalgesia in rat." *Eur J Neurosci* 17(9): 1847-52.

Perkins MNKelly D (1994). "Interleukin-1 beta induced-desArg9bradykinin-mediated thermal hyperalgesia in the rat." *Neuropharmacology* 33(5): 657-60.

Peters CM, Ghilardi JR, Keyser CP, Kubota K, Lindsay TH, Luger NM, Mach DB, Schwei MJ, Sevcik MAMantyh PW (2005). "Tumor-induced injury of primary afferent sensory nerve fibers in bone cancer pain." *Exp Neurol* 193(1): 85-100.

Pineau ILacroix S (2007). "Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved." *J Comp Neurol* 500(2): 267-85.

Raghavendra V, Tanga FDeLeo JA (2003). "Inhibition of microglial activation attenuates the development but not existing hypersensitivity in a rat model of neuropathy." *J Pharmacol Exp Ther* 306(2): 624-30.

Sabino MAMantyh PW (2005). "Pathophysiology of bone cancer pain." *J Support Oncol* 3(1): 15-24.

Saikali ZSingh G (2003). "Doxycycline and other tetracyclines in the treatment of bone metastasis." *Anticancer Drugs* 14(10): 773-8.

Schafers M, Lee DH, Brors D, Yaksh TLSorkin LS (2003a). "Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation." *J Neurosci* 23(7): 3028-38.

Schafers M, Sorkin LS, Geis CShubayev VI (2003b). "Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat." *Neurosci Lett* 347(3): 179-82.

Schafers M, Svensson CI, Sommer CSorkin LS (2003c). "Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons." *J Neurosci* 23(7): 2517-21.

Schwei MJ, Honore P, Rogers SD, Salak-Johnson JL, Finke MP, Ramnaraine ML, Clohisy DRMantyh PW (1999). "Neurochemical and cellular reorganization of the spinal cord in a murine model of bone cancer pain." *J Neurosci* 19(24): 10886-97.

Selinsky CLHowell MD (2000). "Soluble tumor necrosis factor receptor type I enhances tumor development and persistence in vivo." *Cell Immunol* 200(2): 81-7.

Sharief MK, Green A, Dick JP, Gawler JThompson EJ (1999). "Heightened intrathecal release of proinflammatory cytokines in Creutzfeldt-Jakob disease." *Neurology* 52(6): 1289-91.

Shubayev VIMyers RR (2002). "Endoneurial remodeling by TNF $\alpha$ - and TNF $\alpha$ -releasing proteases. A spatial and temporal co-localization study in painful neuropathy." *J Peripher Nerv Syst* 7(1): 28-36.

Sommer C (2001). "[Cytokines in neuropathic pain]." *Anaesthesist* 50(6): 416-26.

Sommer CSchafers M (1998a). "Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity." *Brain Res* 784(1-2): 154-62.

Sommer C, Schafers M, Marziniak MToyka KV (2001). "Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy." *J Peripher Nerv Syst* 6(2): 67-72.

Sommer C, Schmidt CGeorge A (1998b). "Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1." *Exp Neurol* 151(1): 138-42.

Sorkin LS, Xiao WH, Wagner RMyers RR (1997). "Tumour necrosis factor- $\alpha$  induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres." *Neuroscience* 81(1): 255-62.

Stuesse SL, Crisp T, McBurney DL, Schechter JB, Lovell JACruce WL (2001). "Neuropathic pain in aged rats: behavioral responses and astrocytic activation." *Exp Brain Res* 137(2): 219-27.

Taskinen HS, Olsson T, Bucht A, Khademi M, Svelander LRoytta M (2000). "Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN- $\gamma$ , IL-10 and TNF- $\alpha$  mRNA." *J Neuroimmunol* 102(1): 17-25.

Tsujino H, Kondo E, Fukuoka T, Dai Y, Tokunaga A, Miki K, Yonenobu K, Ochi T, Noguchi K (2000). "Activating transcription factor 3 (ATF3) induction by axotomy in sensory and motoneurons: A novel neuronal marker of nerve injury." *Mol Cell Neurosci* 15(2): 170-82.

Tsuzuki K, Kondo E, Fukuoka T, Yi D, Tsujino H, Sakagami M, Noguchi K (2001). "Differential regulation of P2X(3) mRNA expression by peripheral nerve injury in intact and injured neurons in the rat sensory ganglia." *Pain* 91(3): 351-60.

Uceyler N, Tschärke A, Sommer C (2007). "Early cytokine expression in mouse sciatic nerve after chronic constriction nerve injury depends on calpain." *Brain Behav Immun* 21(5): 553-60.

Wacnik PW, Baker CM, Herron MJ, Kren BT, Blazar BR, Wilcox GL, Hordinsky MK, Beitz AJ, Ericson ME (2005a). "Tumor-induced mechanical hyperalgesia involves CGRP receptors and altered innervation and vascularization of DsRed2 fluorescent hindpaw tumors." *Pain* 115(1-2): 95-106.

Wacnik PW, Eikmeier LJ, Simone DA, Wilcox GL, Beitz AJ (2005b). "Nociceptive characteristics of tumor necrosis factor-alpha in naive and tumor-bearing mice." *Neuroscience* 132(2): 479-91.

Wagner RM, Myers RR (1996). "Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors." *Neuroreport* 7(18): 2897-901.

Watkins LR, Milligan ED, Maier SF (2001). "Spinal cord glia: new players in pain." *Pain* 93(3): 201-5.

Zanjani TM, Sabetkasaei M, Mosaffa N, Manaheji H, Labibi F, Farokhi B (2006). "Suppression of interleukin-6 by minocycline in a rat model of neuropathic pain." *Eur J Pharmacol* 538(1-3): 66-72.

Zhang RX, Liu B, Wang L, Ren K, Qiao JT, Berman BMLao L (2005). "Spinal glial activation in a new rat model of bone cancer pain produced by prostate cancer cell inoculation of the tibia." *Pain* 118(1-2): 125-36.

Zhang SC, Goetz BDDuncan ID (2003). "Suppression of activated microglia promotes survival and function of transplanted oligodendroglial progenitors." *Glia* 41(2): 191-8.

Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee AAbu-Amer Y (2001). "Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways." *J Biol Chem* 276(1): 563-8.

Zhao X, Mohaupt M, Jiang J, Liu S, Li BQin Z (2007). "Tumor necrosis factor receptor 2-mediated tumor suppression is nitric oxide dependent and involves angiostasis." *Cancer Res* 67(9): 4443-50.



## **8 Danksagung**

Ganz besonders danke ich der Initiatorin dieser Arbeit, Frau Prof. Dr. med. Claudia Sommer für die interessante Aufgaben- und Themenstellung, sowie für ihre stetige, freundliche und hilfsbereite Unterstützung bei der Bearbeitung.

Ebenso gilt mein großer Dank Herrn Dr. med. Christian Geis für die sehr intensive Mitbetreuung, für die vielen Ideen und Anregungen und für die engagierte Förderung und Hilfestellung.

Des Weiteren danke ich herzlich Frau Lydia Biko für die Hilfestellung im Umgang mit den Versuchstieren und bei der Gewebeentnahme. Frau Barbara Dekant bin ich zu Dank verpflichtet für die aufwendige Unterstützung bei der Anfertigung der histologischen Präparate.

## **9 Lebenslauf**

### **PERSÖNLICHE DATEN**

Name	Michael Graulich
Adresse	Klosterwaldstraße 29 87724 Ottobeuren
Geburtsdatum	19.02.1979
Geburtsort	Ellwangen

### **SCHULBILDUNG**

1985-1989	Grundschule Ottobeuren
1989-1990	Hauptschule Ottobeuren
1990-1995	Ruppert-Neß-Gymnasium, Ottobeuren
1995-2000	Vöhlin Gymnasium, Memmingen
2000	Allgemeine Hochschulreife

### **WEHRDIENST**

2000-2001	JaBoG 34 Memmingerberg
-----------	------------------------

### **HOCHSCHULBILDUNG**

2001-2007	Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität Würzburg
09/2003	Ärztliche Vorprüfung
11/2007	Ärztliche Prüfung

## **KLINISCHE AUSBILDUNG**

Medizinisch-praktisches Jahr

August-Dezember 2006      Chirurgische Klinik, Leopoldina-Krankenhaus  
Schweinfurt

Dezember '06-April '07      Medizinische Klinik, Leopoldina-Krankenhaus  
Schweinfurt

April-Juli 2007              Anästhesiologische Klinik,  
Universitätsklinikum Würzburg

Facharztausbildung

seit April 2008              Assistenzarzt, Kreisklinik Ottobeuren,  
Abteilung für Innere Medizin

## **WISSENSCHAFTLICHE AUSBILDUNG**

Seit 01/2005                Promotionsarbeit in der Neurologischen Klinik  
und Poliklinik der Universität Würzburg







