

Aus dem Institut für Physiologie
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Charakteristika regenerierender
Muskelafferenzen nach Nervendurchtrennung
des Nervus gastrocnemius-soleus und
Kreuzanastomose an den Nervus suralis

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Jan Tode
geboren in Preetz

Kiel im Jahr 2011

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Wilfrid Jänig

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Gunnar Wasner

Tag der mündlichen Prüfung:

21.12.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

21.12.2013

gez.

Any effort to lessen our ignorance on this subject should be indulgently received, and I have, therefore, felt justified in setting forth the following observations, incomplete though they be.

(Silas Weir Mitchell, M.D., Philadelphia 1872)

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung..... | 7 |
| 1.1 Definition Schmerz..... | 7 |
| 1.2 Neuropathische Schmerzen können entstehen, wenn das somatosensorische System erkrankt..... | 8 |
| 1.3 Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen nach peripherer Nervenschädigung | 9 |
| 1.4 Vorgehensweise und Ziele der Studie | 11 |
| 1.4.1 Vorgehensweise | 11 |
| 1.4.2 Ziele | 12 |
| 2. Material und Methoden..... | 13 |
| 2.1 Kreuzanastomose..... | 14 |
| 2.2 Basispräparation am Versuchstag..... | 15 |
| 2.3 Elektrophysiologische Ableitung..... | 16 |
| 2.4 Versuchsablauf | 17 |
| 2.4.1 Messung der Leitungsgeschwindigkeiten und Identifikation einzelner Nervenfasern | 18 |
| 2.4.2 Bestimmung der funktionellen Eigenschaften afferenter A- und C-Fasern | 19 |
| a) Mechanosensibilität..... | 19 |
| b) Thermische Sensibilität (Kälte-/Hitzesensibilität)..... | 20 |
| c) Spontanaktivität..... | 21 |
| 2.4.3 Regeneration | 21 |
| 2.5 Datenanalyse | 22 |
| 3. Ergebnisse | 22 |
| 3.1 Ektope Aktivität von A- und C-Fasern..... | 31 |
| 3.1.1 Mechanosensibilität..... | 31 |
| 3.1.2 Kältesensibilität..... | 35 |
| 3.1.3 Hitzesensibilität..... | 39 |
| 3.1.4 Spontanaktivität | 43 |

| | |
|---|----|
| 3.2 Vergleich funktioneller Eigenschaften von A- und C-Fasern..... | 44 |
| 3.3 Regeneration..... | 48 |
| 3.4 Vergleich der funktionellen Eigenschaften von A- oder C-Fasern aus Filamenten der Hinterwurzeln L4/L5 und aus Filamenten des N. ischiadicus. | 53 |
| 3.5 Vergleich der funktionellen Eigenschaften von A- und C-Fasern 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose | 55 |
| | |
| 4. Diskussion..... | 57 |
| 4.1 Ektope Aktivität von A- und C-Fasern..... | 57 |
| 4.1.1 Mechanosensibilität..... | 57 |
| 4.1.2 Thermische Sensibilität (Kälte-/Hitzesensibilität) | 60 |
| 4.1.3 Spontanaktivität | 62 |
| 4.2 Vergleich der funktionellen Eigenschaften und Leitungsgeschwindigkeiten geschädigter A- und C-Afferenzen | 63 |
| 4.3 Regeneration..... | 65 |
| 4.4 Vergleich der funktionellen Eigenschaften von Muskelafferenzen aus N. ischiadicus- und Hinterwurzel-Ableitungen 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose | 67 |
| 4.5 Molekulare Mechanismen der getesteten Sensibilitäten und der Spontanaktivität | 68 |
| | |
| 5. Zusammenfassung und Ausblick..... | 70 |
| | |
| 6. Literaturverzeichnis..... | 73 |
| | |
| 7. Danksagung..... | 79 |
| | |
| 8. Anhang..... | 80 |

1. Einleitung

Die vorliegende Studie beschreibt experimentelle Untersuchungen zur Entstehung neuropathischer Schmerzen nach peripherer Nervenschädigung in tiefem somatischem Gewebe. Zu diesem Zweck wurden die funktionellen Eigenschaften geschädigter A- und C-Fasern des Nervus gastrocnemius-soleus lateralis nach Kreuzanastomose an den Nervus suralis in festgelegten Zeitabständen nach der Läsion mit neurophysiologischen Mitteln an Ratten untersucht.

1.1 Definition Schmerz

Schmerz ist nach der „International Association for the Study of Pain“ (IASP) ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder drohender Gewebeschädigung einhergeht oder von betroffenen Personen so beschrieben wird (Merskey, 1994). Schmerz ist ein integraler Bestandteil des protektiven Verhaltens des Organismus. Noxische Reize mit Verletzungen oder drohenden Verletzungen von Körpergewebe lösen Schmerzen aus, die in die betroffenen Körpergewebe hineinprojiziert und protektiv motorisch beantwortet werden.

Zum Einen wird Schmerz anatomisch nach seiner Herkunft eingeteilt. Der Oberflächenschmerz ist im Wesentlichen mit der Haut assoziiert. Der tiefe somatische Schmerz ist mit der Skelettmuskulatur, den Knochen, Gelenken, Sehnen und Faszien assoziiert. Der viszerale Schmerz ist mit den inneren Organen assoziiert.

Zum Anderen unterscheidet man den akuten physiologischen Schmerz vom chronischen pathologischen Schmerz. Der akute physiologische Schmerz ist von vorübergehendem Charakter. Er entsteht durch die Reizung peripherer nozizeptiver Neurone, die tatsächliche oder potentiell gewebeschädigende, mechanische, thermische, metabolische oder entzündliche Zustände in ihrer Aktivität kodieren. Periphere nozizeptive Neurone haben unmyelinisierte und dünn myelinisierte Axone, die fast alle Körpergewebe innervieren.

Chronische pathologische Schmerzen können wie folgt eingeteilt werden (Jänig & Baron, 2011):

- Chronischer Entzündungsschmerz: Dieser Schmerz entsteht meist nach Gewebetraumata mit anhaltender Entzündungsreaktion.
- Neuropathische Schmerzen: Diese Schmerzen können die Folge von peripheren oder zentralen mechanischen, metabolischen, viralen oder anderen Schädigungen des somatosensorischen Systems sein.
- Generalisierende Schmerzsyndrome: Nach heutigem Wissensstand liegen bei diesen Schmerzsyndromen keine sichtbaren oder messbaren Veränderungen der peripheren Nozizeptoren zu Grunde. Eine zentrale Fehlregulation im nozizeptiven System wird hierbei vermutet. Das Fibromyalgiesyndrom und das Reizdarmsyndrom gehören in diese Schmerzkategorie.

Im Folgenden werden die unmyelinisierten Axone primär afferenter Neurone C-Fasern (Gruppe IV) und die myelinisierten A-Fasern genannt. Letztere lassen sich anhand ihrer Leitungsgeschwindigkeiten in A α - (Gruppe I), A β - (Gruppe II) und A δ - Fasern (Gruppe III) unterteilen. Ein Teil der A δ -Fasern ist dem nozizeptiven System zuzuordnen.

1.2 Neuropathische Schmerzen können entstehen, wenn das somatosensorische System erkrankt

Die „Neuropathic Pain Special Interest Group of the International Association for the Study of Pain“ (NeuPSIG) definiert neuropathische Schmerzen als solche, die als direkte Konsequenz aus einer Läsion oder Krankheit, die das somatosensorische System beeinflusst, hervorgehen (Treede *et al.*, 2008). Mitchell beschrieb schon 1872 Schmerzen von meist brennendem Charakter, Hyperästhesien der tiefen Gewebe und Veränderungen der Haut bei Soldaten mit Nervenläsionen nach Geschoss-Verletzungen (Mitchell, 1872).

Mechanische, metabolische oder entzündliche Schäden peripherer Neurone (z.B. nach Traumata oder bei Erkrankungen wie Diabetes mellitus, Herpes Zoster und AIDS oder iatrogen nach Chemotherapie oder Operationen) können eine Ursache neuropathischer Schmerzen sein.

1.3 Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen nach peripherer Nervenschädigung

Als Folge einer Nervenschädigung verändern sich primär afferente Neurone und die nachgeschalteten zentralen Neuronennetzwerke, welche noxische Reize kodieren und an der Entstehung von Schmerzen beteiligt sind, morphologisch, biochemisch und physiologisch. Diese Veränderungen lassen sich auf vier Ebenen beschreiben (siehe Abb.1):

1. Am primär afferenten Neuron mit seinem Axon (I in Abb.1)
2. Im Spinalganglion (II in Abb.1)
3. Im Hinterhorn des Rückenmarks (III in Abb. 1)
4. An den somatosensorischen Repräsentationen in Thalamus und Kortex (IV in Abb.1)

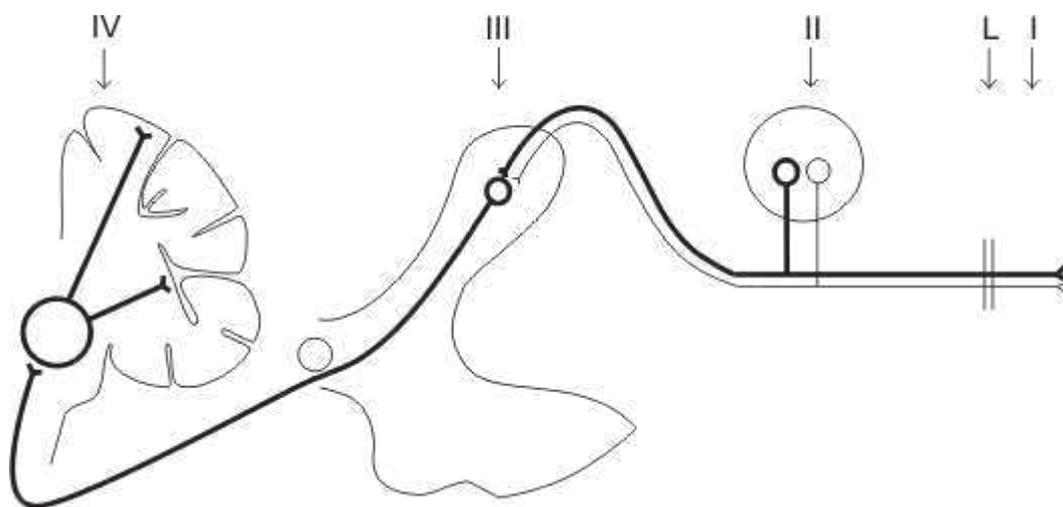


Abb.1

Modell zur Entstehung neuropathischer Schmerzen in Folge einer Nervenläsion.

I = primär afferentes Neuron; L = Läsion; II = Spinalganglion; III = Hinterhorn des Rückenmarks; IV = Thalamus und Kortex. Primär afferente Neurone (I) (myelinisierte Axone, dick; unmyelinisierte Axone, dünn) sind durch eine Nervenläsion (L) geschädigt. Ihre Zellkörper befinden sich im Spinalganglion (II). Im Hinterhorn des Rückenmarks (III) werden Signale dieser primär afferenten Neurone verarbeitet und in der Aktivität von Traktneuronen (zwischen III und IV) nach supraspinal gemeldet. Thalamische Neurone projizieren zum Inselkortex, zu den somatosensorischen Kortexarealen und zu anderen Kortexarealen (IV).

1. Primär afferente Neurone sind an ihren rezeptiven Feldern durch mechanische, thermische, metabolische oder noxische Reize oder durch mehrere dieser Reize erregbar. Werden sie geschädigt, sind viele dieser Neurone ektop aktiv. Ektoper Aktivität heißt, dass diese Neurone nicht am ursprünglichen rezeptiven Feld, sondern an der Stelle der Schädigung oder entlang ihres Axons durch physiologische Reize erregbar sind und zusätzlich oder auch ausschließlich Spontanaktivität zeigen können, das heißt Aktivität ohne physikalische Reizung (Blumberg & Jänig, 1984; Burchiel *et al.*, 1985; Gorodetskaya *et al.*, 2003; Gorodetskaya *et al.*, 2009; Jänig *et al.*, 2009; Serra, 2010). Neben der ektopen Aktivität können Nervenschädigungen zu einer erhöhten peripheren Sensibilität der afferenten Neurone mit Erniedrigung der Reizschwellen führen (Baron, 2009). Erhöhte periphere Sensibilität und ektoper Aktivität in nozizeptiven und nicht-nozizeptiven Afferenzen, die im zentralen Nervensystem verarbeitet wird, stellen vermutlich den ersten Schritt zur Entstehung neuropathischer Schmerzen nach peripherer Nervenläsion dar.

2. Das Spinalganglion verändert sich ebenfalls in Folge einer Nervenläsion (McLachlan *et al.*, 1993). Es kann, wie das Axon geschädigter primär afferenter Neurone (Papir-Kricheli & Devor, 1988; Serra, 2010), die Quelle von Spontanaktivität sein (Wall & Devor, 1983; Michaelis *et al.*, 2000b).

3. Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks bilden die erste Schaltstelle zwischen primär afferenten Neuronen und dem zentralen Nervensystem. Neurone des nozizeptiven Systems im Hinterhorn kodieren Aktivität in nozizeptiven C- und A δ -Fasern und senden diese nach supraspinal. In Folge einer peripheren Nervenläsion kommt es hier zu charakteristischen Veränderungen. Zu diesen Veränderungen gehört unter anderem, dass einige Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks eine gesteigerte Erregbarkeit entwickeln (Dickenson & Sullivan, 1987; D'Mello & Dickenson, 2008) und sich ihre rezeptiven Felder vergrößern. Mechanosensible A β -Fasern, die nicht dem nozizeptiven System angehören, können diese Neurone erregen (Woolf & Salter, 2000; Latremoliere & Woolf, 2009). Weiterhin geht ein Teil der hemmenden GABA-ergen Neurone zu Grunde (Moore *et al.*, 2002). Mikroglia und Astrozyten werden aktiviert (Wieseler-Frank *et al.*, 2005) und aktivieren ihrerseits die Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks. Diese plastischen Veränderungen sind

die Grundlage für die Entwicklung zentraler Übererregbarkeit und können zu einer zentralen Sensibilisierung führen. Die Ursache hierfür ist vermutlich eine gesteigerte Aktivität in C-Fasern (unter anderem nach Nervenschädigung) und die damit verbundene gesteigerte Ausschüttung von Neurotransmittern (Glutamat und Neuropeptide, wie Substanz P) im Hinterhorn des Rückenmarks. Die zentrale Sensibilisierung spielt wahrscheinlich eine große Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen (Baron, 2009).

4. Die Verarbeitung der Impulsaktivität nozizeptiver und nicht-nozizeptiver Neurone im somatosensorischen Kortex und in anderen Kortexarealen ist die entscheidende Voraussetzung für das Gefühlserlebnis „Schmerz“. In Folge einer peripheren Nervenläsion kommt es unter anderem zu plastischen Veränderungen der somatosensorischen Repräsentationen im Gehirn (Napadow *et al.*, 2006). Dieser Prozess ist möglicherweise einer der wichtigsten bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen.

1.4 Vorgehensweise und Ziele der Studie

In der vorliegenden experimentellen Studie an erwachsenen Ratten wurden die funktionellen Eigenschaften von geschädigten primär afferenten A- und C-Fasern eines Muskelnerfs, des Nervus gastrocnemius-soleus lateralis, und die Regeneration dieser in den Nervus suralis mit neurophysiologischen Methoden untersucht.

1.4.1 Vorgehensweise

Primär afferente A- und C-Fasern eines intakten Muskelnerfs sind ein integraler Bestandteil der Regulation des Bewegungsapparats, der Anpassung des kardiovaskulären und respiratorischen Systems des Körpers an Arbeit („exercise pressor reflex“), der Regulation von Metabolismus und Körpertemperatur sowie der Nozizeption der Skelettmuskulatur. Entsprechend dieser Funktionen zeigen diese Afferenzen charakteristische Antworten auf mechanische, thermische, metabolische

und noxische Reizung des Muskels. Anhand dieser charakteristischen Antworten können ihnen funktionelle Eigenschaften zugewiesen werden.

In einer früheren Studie wurden die funktionellen Eigenschaften myelinisierter und unmyelinisierter Muskelafferenzen 4 bis 7 Tage nach Quetschläsion des Nervus gastrocnemius-soleus lateralis quantitativ untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass nahezu alle afferenten A- und C-Fasern ektop aktiv sind, also am Läsionsort mechanisch oder thermisch erregbar und zusätzlich oder ausschließlich spontanaktiv sind (Kirillova *et al.*, 2011a).

Um den Regenerationsprozess zu beobachten, wurde der Untersuchungszeitraum in der vorliegenden Studie ausgedehnt. Verändern sich quantitativ die funktionellen Eigenschaften chronisch geschädigter Afferenzen zu einem Zeitpunkt der vermutlich unvollständigen Regeneration (ca. 20 Tage) und zu einem Zeitpunkt der vermutlich abgeschlossenen Regeneration (ca. 80 Tage)? Bleibt die Spontanaktivität konstant? Findet der regenerative Prozess bei A- und C-Fasern gleichmäßig statt?

Bei Durchtrennung und anschließender Reanastomose des Nervus gastrocnemius-soleus lateralis wäre aufgrund der anatomischen Verhältnisse eine Untersuchung der Regeneration sowie der funktionellen Eigenschaften unmöglich. Aus diesem Grund wurde eine Kreuzanastomose des durchtrennten Nervus gastrocnemius-soleus lateralis an den peripheren Stumpf des durchtrennten Nervus suralis, der sich durch seine gut zugängliche Lage anbietet, gewählt. Zwanzig und 80 Tage nach der Kreuzanastomose wurden die funktionellen Eigenschaften der geschädigten Muskelafferenzen, die vom Nervus ischiadicus oder von den Hinterwurzeln L4 oder L5 isoliert worden waren, mit neurophysiologischen Methoden bei der Ratte *in vivo* untersucht. Die geschädigten Afferenzen wurden auf ihre Spontanaktivität und Erregbarkeit durch mechanische oder thermische Reizung untersucht. Die Reize wurden auf den Nerven am Ort der Läsion (Kreuzanastomose), distal der Läsion am N. suralis sowie an der Haut im Innervationsgebiet des N. suralis (im Folgenden Haut genannt) appliziert.

1.4.2 Ziele

Die Studie hat folgende Ziele:

- (1) Untersuchung der funktionellen Eigenschaften (Spontanaktivität, mechanische und thermische Sensibilität) der A- und C-Afferenzen 20 Tage nach Kreuzanastomose der Nerven. Zu diesem Zeitpunkt kann die Regeneration zur Haut bei Regenerationsgeschwindigkeiten von 1-4 mm/Tag (Sunderland, 1978) noch nicht stattgefunden haben.
- (2) Untersuchung der funktionellen Eigenschaften (Spontanaktivität, mechanische und thermische Sensibilität) der A- und C-Afferenzen 80 Tage nach Kreuzanastomose der Nerven. Zu diesem Zeitpunkt kann die Regeneration zur Haut bei Regenerationsgeschwindigkeiten von 1-4 mm/Tag stattgefunden haben.
- (3) Vergleich der funktionellen Eigenschaften (Spontanaktivität, mechanische und thermische Sensibilität) und Leitungsgeschwindigkeiten geschädigter A- und C-Afferenzen.
- (4) Untersuchung der Regeneration geschädigter A- und C-Fasern durch Testung der mechanischen und/oder thermischen Sensibilitäten an der Kreuzanastomose, am N. suralis und an der Haut.
- (5) Vergleich der funktionellen Eigenschaften insbesondere der Spontanaktivität geschädigter Afferenzen, die vom Nervus ischiadicus oder von den Hinterwurzeln L4 oder L5 isoliert worden sind, um zu testen, ob die Zellen im Spinalganglion zur Spontanaktivität beitragen.
- (6) Vergleich der funktionellen Eigenschaften (Spontanaktivität, mechanische und thermische Sensibilität) von A- und C-Afferenzen 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose.

2. Material und Methoden

An 34 männlichen narkotisierten Wistar Ratten, mit Kreuzanastomose des proximalen Stumpfes des durchtrennten Nervus gastrocnemius-soleus lateralis an den distalen Stumpf des durchtrennten Nervus suralis, wurden elektrophysiologische Experimente durchgeführt. Es wurden 4 experimentelle Gruppen gebildet, um sowohl 2 Zeiträume nach der Kreuzanastomose, als auch zwei Orte der elektrophysiologischen Ableitung miteinander zu vergleichen. 17 bis 21 (20 Tage) und 76 bis 95 Tage (80 Tage) nach der Kreuzanastomose wurden A- und C-

Afferenzen, die aus dem Nervus ischiadicus oder aus den Hinterwurzeln L4 bzw. L5 isoliert worden waren, mit elektrophysiologischen Mitteln untersucht. Hierbei wurden die Leitungsgeschwindigkeiten, die funktionellen Eigenschaften, Spontanaktivität und die Bereitschaft zur Regeneration der einzelnen Afferenzen gemessen.

Alle Experimente wurden vom lokalen Tierschutz-Komitee der staatlichen Verwaltung genehmigt und wurden nach den Vorgaben bundesdeutscher Gesetze durchgeführt.

2.1 Kreuzanastomose

Die Kreuzanastomose wurde unter nahezu sterilen Bedingungen durchgeführt. Das Versuchstier wurde mit Pentobarbital (Narcoren 60mg/kg intraperitoneal) anästhesiert. Eine ausreichende Narkosetiefe lag bei fehlenden Flexor-, Ohr- und ggf. Korneal-Reflexen vor. Anschließend wurde der Nervus ischiadicus (SCI) mit seinen Ästen freigelegt. Zu diesem Zwecke wurde die Fascia lata von lateral gespalten und sowohl der Musculus gluteus maximus als auch die ischiocrurale Muskulatur lateral gelöst und nach medial abgeklappt. Der nun sichtbare SCI mit seinen Abgängen Nervus peroneus communis (PE), Nervus tibialis (TIB), Nervus suralis (SU), und den vom TIB abgehenden Muskelästen zum Musculus gastrocnemius-soleus, Nervus gastrocnemius-soleus lateralis (LGS) und medialis (MGS), wurde ausschließlich an der Stelle der Verzweigung freipräpariert, um eine Schädigung des proximalen SCI zu vermeiden.

Nun wurde der SU vom SCI abgetrennt und der LGS weit distal kurz vor dem Eintritt in den Musculus gastrocnemius-soleus durchtrennt. Anschließend wurde der proximale Teil des LGS mit dem distalen Teil des SU kreuzanastomosiert. Hierbei wurde Prolene 10-0 Nahtmaterial verwendet und 3 epineurale Einzelknopfnähte in mikrochirurgischer Technik durchgeführt. Danach wurde die Wunde in Schichtnahttechnik verschlossen.

Die Wundheilung erfolgte stets per primam. Bei den regelmäßigen Kontrollen zeigten sich reizlose Wundverhältnisse. Die Tiere nahmen stetig an Gewicht zu und zeigten keine Hinweise auf Autotomie, so dass nach 20 Tagen lediglich eine Narbe sichtbar war und in der 80 Tage Gruppe äußerlich überhaupt keine Anzeichen auf den Eingriff zu finden waren.

Temperatur wurde kontinuierlich gemessen und über eine Thermomatte konstant bei ca. 37 °C gehalten.

Bei stabilen Vitalparametern des Versuchstiers wurde der SCI mit seinen Abzweigungen freigelegt und die CU freipräpariert. Die Haut wurde in einen quadratischen Kupferring (4 x 5 cm) eingespannt, um einen mit Paraffin-Öl gefüllten Pool zu erzeugen, in dem die Nerven elektrisch isoliert und warm (28 °C - 32 °C) gehalten wurden. Der PE, der MGS und der TIB wurden durchtrennt, um Signale von diesen Nerven auszuschließen.

Für Ischiadicusableitungen wurde der SCI nach proximal bis zu seinem Eintritt in das Foramen infrapiriforme freigelegt und auf eine in den Pool reichende fest installierte 8 x 3 mm Plexiglasplatte gelegt, so dass er knapp unter der Öloberfläche zu liegen kam.

Für Hinterwurzelableitungen wurde die Cauda equina mittels Laminektomie der Segmente L1 bis L6 von dorsal freigelegt. Auch hier wurde - analog zum Pool für Ableitungen vom SCI - ein Paraffin-Öl Pool (30 °C - 36 °C) erzeugt. Anschließend wurde die Dura mater eröffnet, so dass die Hinterwurzeln von dem Öl umspült werden konnten. Die ipsilaterale Hinterwurzel L4 oder L5 wurde auf eine in den Pool reichende fest installierte Plexiglasplatte gelegt, so dass sie gut zugänglich knapp unterhalb der Öloberfläche lag.

2.3 Elektrophysiologische Ableitung

Je nach Versuchsgruppe wurde vom SCI oder von den Hinterwurzeln L4/L5 elektrophysiologisch abgeleitet. Für Ableitungen von Filamenten aus dem SCI wurde das Epineurium eröffnet. Möglichst dünne Filamente wurden unter dem Auflichtmikroskop mit feinsten Uhrmacherpinzetten von dem SCI isoliert. Für Ableitungen von Filamenten aus den Hinterwurzeln L4/L5 wurden nach Laminektomie und Eröffnung der Dura mater ebenfalls dünne Filamente mit Pinzetten von den Hinterwurzeln isoliert. Es wurde von Filamenten der Hinterwurzeln L4 und L5 abgeleitet, weil hier die meisten Fasern des LGS liegen (Baron *et al.*, 1988; Swett *et al.*, 1991).

Die elektrische Aktivität der so gewonnenen von ihrem zentral gelegenen Teil getrennten Axone wurde unipolar über eine Platindrahtelektrode abgeleitet. Die

Referenzelektrode wurde mit dem Gewebe am Rand des Paraffin-Öl-Pools verbunden. Die abgeleiteten Aktionspotentiale in afferenten Nervenfasern wurden zunächst verstärkt (Verstärker, Zwischenverstärker, jeweils Faktor 100; 10 M Ω) und anschließend gefiltert (120 Hz bis 1,2 kHz für C-Fasern und 120 Hz bis 12 kHz für A-Fasern; 50 Hz-Filter „Hum Bug“ (Quest Scientific Noise Eliminator) für beide Faser-Typen). Sie wurden auf einem Speicheroszilloskop (Tektronix, Oregon, USA) sichtbar und über Lautsprecher hörbar gemacht.

Gleichzeitig wurden sämtliche Signale, also zusätzlich zu den Aktionspotentialen der untersuchten Nervenfasern auch die Signale des Monitorings (EKG; Blutdruck; Temperatur des Versuchstiers; endotrachealer Druck), in das Aufnahmesystem „Spike2“ (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, UK) eingespeist und in Echtzeit auf einem Bildschirm angezeigt. Die digitale Auflösung der gemessenen Aktionspotentiale betrug 10.000 Hz. Die digitale Auflösung für alle weiteren Signale (Beatmungskurve, EKG, Temperaturkurve, etc.) wurde geringer gewählt (50 Hz - 1000 Hz). Die spätere offline Analyse der neurophysiologisch gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe desselben Systems.

Zum Versuchsaufbau siehe Abb.5

2.4 Versuchsablauf

Der Versuchsablauf folgte stets einem feststehenden Protokoll. Nach der Präparation wurden die aus dem Nerven oder den Hinterwurzeln isolierten Filamente auf die Platinelektrode gelegt. Waren Aktionspotentiale von spontanaktiven Fasern zu sehen, so wurde zunächst eine 5 Minuten andauernde Aufnahme vorgenommen. Danach wurden die einzelnen Nervenfasern elektrisch identifiziert. Im weiteren Verlauf wurden mechanische und thermische Stimuli appliziert. Daraus folgte die Bestimmung der funktionellen Eigenschaften der Fasern und ihrer Reizschwellen. Zum Ende der Testung wurde, wenn vorhanden, erneut die Spontanaktivität aufgenommen.

2.4.1 Messung der Leitungsgeschwindigkeiten und Identifikation einzelner Nervenfasern

Die Identifikation der einzelnen Nervenfasern und die Differenzierung zwischen A- und C-Fasern geschahen anhand zweier Kriterien. Erstens wurde die Nervenleitgeschwindigkeit gemessen (s. Abb. 3), um festzulegen, ob es sich um A- (>2 m/s) oder C- Fasern (≤ 2 m/s) handelte. Dieses Kriterium war das aussagekräftigste. Zweitens wurden die Fasern anhand der Form ihrer Aktionspotentiale differenziert. Hierbei spielte neben der Amplitude auch der typische biphasische (A-Fasern) oder triphasische (C-Fasern) Kurvenverlauf der Aktionspotentiale eine Rolle (s. Abb. 4). Dieses Verfahren ist gut validiert, aber eher ein weiches Kriterium zur Unterscheidung von A- und C-Fasern. Zur Messung der Nervenleitgeschwindigkeit wurde der LGS mit Rechteckimpulsen der Länge 0,1 ms (A-Fasern) oder 0,5 ms (C-Fasern), einer Frequenz von 3 Hz bzw. 0,3 Hz und zunehmender Intensität bis 25 V elektrisch stimuliert. Die Strecke (in Millimetern) zwischen Stimulations- und Ableitelektrode (je nach Versuchsgruppe zwischen 55 mm und 90 mm, Median 76 mm, für Ableitungen von Filamenten der Hinterwurzeln L4/L5, und zwischen 8 mm und 21 mm, Median 15 mm, für Ableitungen von Filamenten des Nervus ischiadicus) wurde durch die Zeitspanne (Latenz in Sekunden) zwischen elektrischem Stimulationsartefakt und Aktionspotential dividiert, um so die Leitungsgeschwindigkeit in Metern pro Sekunde zu errechnen.

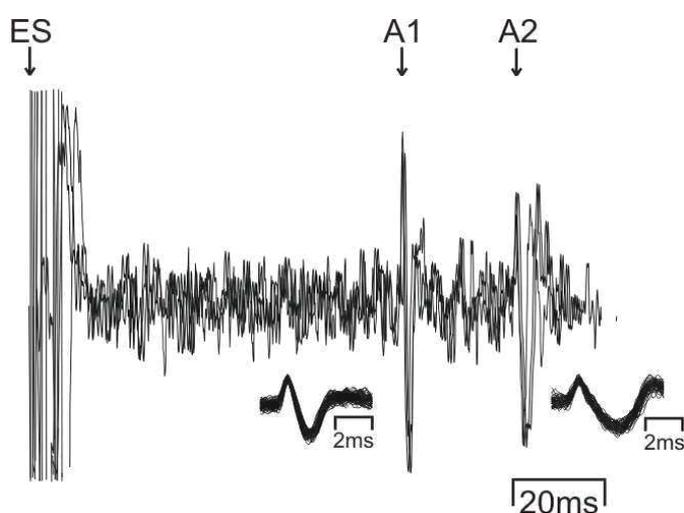


Abb. 3

Messung der Leitungsgeschwindigkeiten zweier C-Fasern aus einer Hinterwurzel-Ableitung. Die Ableitung ist 3x überlagert. Die Insets zeigen überlagerte Aktionspotenziale der jeweiligen C-Faser. ES = elektr. Stimulationsartefakt, A1 = Aktionspotential 1 (Latenz zwischen ES und A1 = 82 ms), A2 = Aktionspotential 2 (Latenz zwischen ES und A2 = 108 ms). Die Strecke zwischen Stimulations- und Ableitelektrode (75 mm) dividiert durch die Zeit zwischen Stimulusartefakt und Aktionspotential ergibt die Leitungsgeschwindigkeit (0,9 und 0,7 m/s).

Bei Ableitungen unter den oben erwähnten Filterbedingungen (Punkt 2.3) zeigten die Aktionspotentiale je nach Fasertyp einen biphasischen (A-Fasern) oder triphasischen Kurvenverlauf, der optisch am Oszilloskop bestimmt wurde (s. Abb. 4).



Abb. 4

Form von Aktionspotentialen einer A-Faser (links) und einer C-Faser (rechts) unter den in Punkt 2.3 beschriebenen Filterbedingungen. Man beachte den typischen biphasischen Kurvenverlauf der A- und den ebenfalls typischen triphasischen Kurvenverlauf der C-Faser.

2.4.2 Bestimmung der funktionellen Eigenschaften afferenter A- und C-Fasern

Die Aktivierung einer Nervenfasern durch mechanische oder thermische Stimuli wurde anhand ihrer Reizantwort (mindestens 3 Spikes bei Fasern ohne Spontanaktivität), oder anhand einer Steigerung ihrer Aktivität (>50 % bei Fasern mit Spontanaktivität von >0,5 Imp/s) festgelegt. Die rezeptiven Felder einzelner Neurone wurden anhand der mechanischen oder thermischen Erregbarkeit ihrer Axone entlang des Nervs sowie an der Haut festgelegt.

a) Mechanosensibilität

Die Mechanosensibilität wurde getestet, indem der Nerv an und distal der CU sowie an der Haut mit einem stumpfen Glasstab rhythmisch mechanisch stimuliert wurde. An der Haut wurden zudem die Sensibilität auf Quetschreize, die mit einer Uhrmacherpinzette erzeugt wurden, und die Erregbarkeit der Nervenfasern durch Stimulation der Haarfollikel der behaarten Haut durch Bewegung einzelner Haare

getestet. Bei Nervenfasern, die auf Druck reagierten, wurden die Reizschwellen bestimmt. Hierzu wurden kalibrierte von Frey Glasfaserfilamente mit abgerundeten kugelförmigen Enden (0,5 mm) und einer Stärke von 0,3 mN bis 100 mN (Marstock Nervetest, Fruhstorfer, Marburg) verwendet.

Die Druckapplikation erfolgte gegen ein Plastikwiderlager an der Kreuzanastomose und gegen den Musculus gastrocnemius-soleus am SU mit einer Frequenz von ca. 1 Hz.

Bei Nervenfasern, die außer auf Druck zusätzlich auf Haarfollikelstimulation und/oder Quetschreize reagierten, wurde nur die Reizschwellenbestimmung auf Druckapplikation berücksichtigt.

Die Reizschwellen der Nervenfasern, die ausschließlich auf Haarfollikelstimulation reagierten, wurden auf von Frey 1, die der Nervenfasern, die ausschließlich auf Quetschreize reagierten auf von Frey 12 festgelegt.

| | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-----|------|-----|---|---|-----|----|----|----|----|----|-----|
| von Frey Filament | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| mN | 0,3 | 0,45 | 0,7 | 1 | 2 | 7,5 | 10 | 20 | 30 | 45 | 70 | 100 |

Tabelle 1

Umrechnungstabelle der einzelnen vF Filamente in mN.

Die Reizantwort mechanosensibler Fasern wurde über Zeiträume von 10 - 15 s gemessen. Die Reizschwelle wurde anhand des niedrigsten Stimulus, der eine Antwort von mindestens 3 Spikes (bei Fasern ohne Spontanaktivität) oder eine Steigerung der Aktivität um 50 % (bei Fasern mit Spontanaktivität >0,5 Imp/s) erzeugte, festgelegt.

b) Thermische Sensibilität (Kälte-/Hitzesensibilität)

Kälte- und/oder Hitzesensibilität einzelner Fasern wurde durch Applikation eines kalten (0 °C bis 4 °C) und eines heißen (48 °C bis 52 °C) abgerundeten Kupferstabes direkt an die Stelle der CU und distal hiervon entlang des N. suralis sowie an die Haut festgestellt. Lag thermische Sensibilität vor, so wurde mit einer Thermode die Reizschwelle bestimmt. Kältesensible Fasern wurden mit Temperaturen von 5 °C bis

25 °C aufsteigend in 5 °C Schritten, hitzesensible mit Temperaturen von 48 °C und 45 °C bis 35 °C absteigend in 5 °C Schritten gereizt. Das Stimulationsareal direkt am Nerven war ca. 2 mm² groß. Die erzeugten Temperaturen lagen in einem Toleranzbereich von maximal ± 2 °C. So spiegelte die angegebene Test-Temperatur von 5 °C einen Bereich von 3 °C - 7 °C wider. Für die Messung der Temperaturschwellen der Haut wurde eine Peltier Thermode mit gleichen Temperaturschritten benutzt.

Die Applikationsdauer am Nerven betrug 20 Sekunden bei einer Ausgangstemperatur des Nervs zwischen 28 °C und 32 °C. An der Haut betrug sie 30 Sekunden bei den extremen Temperaturen (5 °C bzw. 48 °C) und 1 Minute bei allen anderen Testtemperaturen bei einer Ausgangstemperatur von 30°C.

Die Reizantwort der Neurone auf thermische Stimuli wurde über den gesamten Stimulationszeitraum gemessen und gemittelt in Hz angegeben. Lag Spontanaktivität vor, wurde ihre Höhe von der Höhe der Reizantwort subtrahiert. Zur Unterscheidung des Antworttyps (phasisch bzw. statisch) wurden die ersten 5 Sekunden der Antwort mit dem Gesamtzeitraum der Stimulation verglichen.

c) Spontanaktivität

Die Spontanaktivität wurde 5 Minuten lang vor der Applikation jeglicher Reize, einschließlich der elektrischen Stimulation, an den Nerven abgeleitet. Nach Applikation sämtlicher Stimuli wurde ebenfalls eine Aufnahme von einigen Minuten angeschlossen. Die gemessene Spontanaktivität wurde über 5 Minuten gemittelt und in Impulsen/s angegeben.

2.4.3 Regeneration

Die Regenerationsbereitschaft der einzelnen Neurone wurde anhand der physikalischen Erregbarkeit ihrer Axone entlang des SU getestet. Waren diese distal der Kreuzanastomose mechanisch oder thermisch erregbar, so wurde eine erfolgreiche Regeneration angenommen.

2.5 Datenanalyse

Die Datenanalyse wurde mit Hilfe des Monitoring- und Aufnahmesystems „Spike2“ (Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge, UK) vorgenommen. Die digitale Auflösung der elektrophysiologischen Daten von 10.000 Hz ermöglichte eine exakte offline Differenzierung einzelner Aktionspotentiale mit einer maximalen Amplitudenabweichung und Kurvenpunktdifferenz von 5 %.

Die statistische Auswertung der Daten dieser explorativen Studie erfolgte mithilfe des exakten Fisher-Tests, des χ^2 -Tests, des t-Tests und des Mann-Whitney-U-Tests. Die Frage nach Normalverteilung wurde mittels des Shapiro-Wilk Tests beantwortet.

Die Verteilungen von Entladungsfrequenzen wurden als Boxplot nach J. W. Tukey mit Median, 1. und 3. Quartil, oberem und unterem Whisker (1,5 x Inter Quartil Range), und Ausreißern dargestellt.

3. Ergebnisse

Die Ergebnisse der Studie wurden an 167 Filamenten aus 34 Versuchen erhoben, aus denen 260 A- und 180 C-Fasern elektrisch isoliert wurden. Von diesen waren insgesamt 139 A- und 89 C-Fasern ektop aktiv. Es gab 4 experimentelle Gruppen, 2 Zeiträume nach Kreuzanastomose (20 und 80 Tage) und 2 Orte der elektrophysiologischen Ableitung (an den Hinterwurzeln L5/L4 oder am N. ischiadicus).

77 % der elektrisch identifizierten Fasern und 67 % der Fasern mit ektoper Aktivität gingen aus Experimenten mit elektrophysiologischer Ableitung von Filamenten aus dem N. ischiadicus hervor (s. A2 Abb.5). 23 % der elektrisch identifizierten Fasern und 33 % der Fasern mit ektoper Aktivität entstammten Experimenten mit elektrophysiologischer Ableitung von Filamenten aus den Hinterwurzeln L4 oder L5. (s. A1 Abb. 5)

Versuchsaufbau

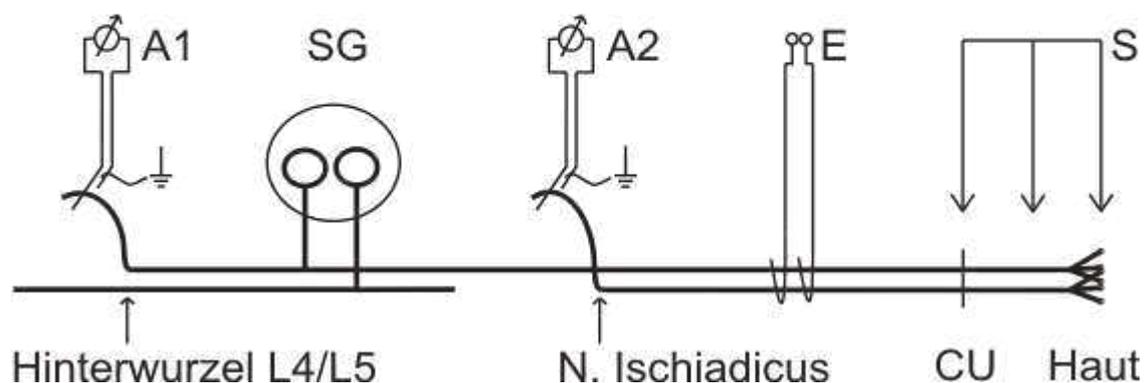


Abb.5

Versuchsaufbau zur Ableitung von Aktionspotentialen einzelner Neurone aus Filamenten der Hinterwurzeln L4/L5 oder aus Filamenten des N. ischiadicus.

A1 = elektrophysiologische Ableitung an Filamenten der Hinterwurzeln L4/L5, A2 = elektrophysiologische Ableitung an Filamenten des N. ischiadicus, SG = Spinalganglion, E = elektrische Stimulation, CU = Kreuzanastomose, S = thermische/mechanische Stimuli, Haut = Haut im Innervationsgebiet des N. suralis.

Die Distanz zwischen der Stimulationselektrode und der Ableitelektrode variierte je nach Ort der elektrophysiologischen Ableitung (s. Abb.5). Dementsprechend waren die Latenzen zwischen Stimulus-Artefakt und Aktionspotential der Faser unterschiedlich groß (s. Abb.6). A- und C-Fasern konnten eindeutig anhand ihrer errechneten Leitungsgeschwindigkeiten unterschieden werden.

Identifikation von A- und C-Fasern

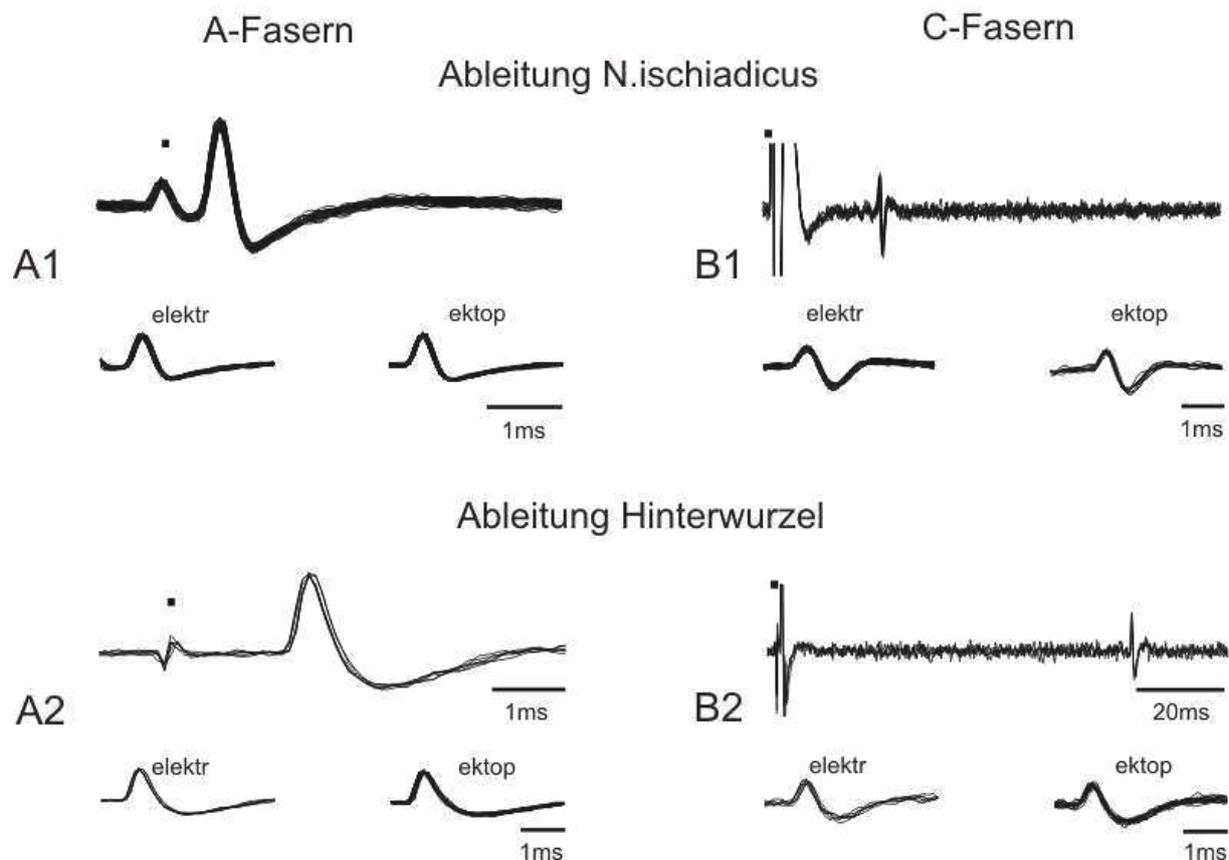


Abb.6

Elektrische Identifikation von geschädigten A- und C-Fasern aus Filamenten des N. ischiadicus (A1, B1) oder der Hinterwurzeln L4 bzw. L5 (A2, B2).

Obere Ableitungen: Aktivierung der afferenten Fasern durch elektrische Reizung des Nervus gastrocnemius-soleus lateralis. Das Reizartefakt ist durch einen Punkt gekennzeichnet.

Untere Ableitungen: Vergleich der Form der Aktionspotentiale hervorgerufen durch elektrische Reizung der Axone (links „elektr“) oder durch mechanische oder thermische Reizung oder spontan generiert (rechts „ektop“). Der Vergleich von Form und Amplitude der Aktionspotentiale zeigt, dass es sich um Ableitungen derselben Aferenzen handeln muss. Alle Ableitungen sind mehrere Male überlagert.

A1: A-Faser: 12,5 m/s; A2: A-Faser 31,8 m/s; B1: C-Faser 0,52 m/s; B2: C-Faser 0,72 m/s

Man beachte die deutlich längeren Latenzen von C-Fasern im Vergleich zu denen der A-Fasern.

Von der üblichen Einteilung der Muskelaferenzen in Gruppe I bis IV wurde abgesehen. Es konnten keine klaren Kriterien aufgezeigt werden, weder bei den Leitungsgeschwindigkeiten, noch bei den funktionellen Eigenschaften, die eine Unterscheidung der myelinisierten Aferenzen in Gruppe I/II (A α /A β) oder III (A δ) ermöglicht hätten. Alle Fasern mit Leitungsgeschwindigkeiten >2 m/s wurden als A-

Fasern oder myelinisierte Fasern definiert, alle Fasern mit Leitungsgeschwindigkeiten <2 m/s als C-Fasern oder unmyelinisierte Fasern. Diese Gruppe der unmyelinisierten Fasern (Gruppe IV oder C-Fasern) konnte eindeutig anhand der Leitungsgeschwindigkeiten (s.Abb.7) und anhand der funktionellen Eigenschaften (s.Abb.8) von der Gruppe der A-Fasern unterschieden werden.

Die gemessenen Leitungsgeschwindigkeiten von Fasern aus Filamenten des N. ischiadicus erlaubten eine eindeutige Unterteilung in A- und C-Fasern. Die A-Fasern ließen sich nicht in Untergruppen einteilen (s. Abb.7 oben).

In den Messungen der Leitungsgeschwindigkeiten von Fasern, die aus Filamenten der Hinterwurzeln L4/L5 isoliert wurden, zeigten sich drei Gruppen (s. Abb.7 unten). Eine Gruppe ließ sich eindeutig den A-Fasern zuordnen, eine andere den C-Fasern. Die schnell leitenden C-Fasern und langsam leitenden A-Fasern bildeten die dritte (mittlere) Gruppe.

Mense und Meyer zeigten, dass afferente Fasern mit einer niedrigen bis mittleren Leitungsgeschwindigkeit teilweise einen unmyelinisierten, proximal des Spinalganglions gelegenen und einen myelinisierten, distal des Spinalganglion gelegenen Anteil haben (Mense & Meyer, 1985).

Die Fasern der dritten Gruppe (die schnell leitenden C- und langsam leitenden A-Fasern) hatten vermutlich einen myelinisierten (schnell leitenden), distal des Spinalganglions gelegenen Teil, und einen unmyelinisierten (langsam leitenden), proximal des Spinalganglions gelegenen Teil. Die elektrische Stimulation erfolgte stets distal des Spinalganglions. Bei Hinterwurzel-Ableitungen wurde proximal des Spinalganglions abgeleitet. Somit addierten sich die Leitungsgeschwindigkeiten der schnell-leitenden und langsam-leitenden Anteile der Axone dieser Gruppe zu einer mittleren Leitungsgeschwindigkeit. Die funktionellen Eigenschaften und die Form des Aktionspotentials der langsam leitenden A-Fasern unterschieden sich nicht von denen der schnell leitenden A-Fasern. Die funktionellen Eigenschaften und die Form des Aktionspotentials der schnell leitenden C-Fasern unterschieden sich ebenfalls nicht von denen der langsam leitenden C-Fasern. Aus diesem Grund, und aufgrund der geringen Zahl der Fasern der dritten Gruppe, wurden diese entweder den C- oder den A-Fasern zugeteilt. Die Teilung erfolgte, analog zu der Teilung bei N. ischiadicus-Aufnahmen, bei 2 m/s.

Leitungsgeschwindigkeiten und Charakteristika

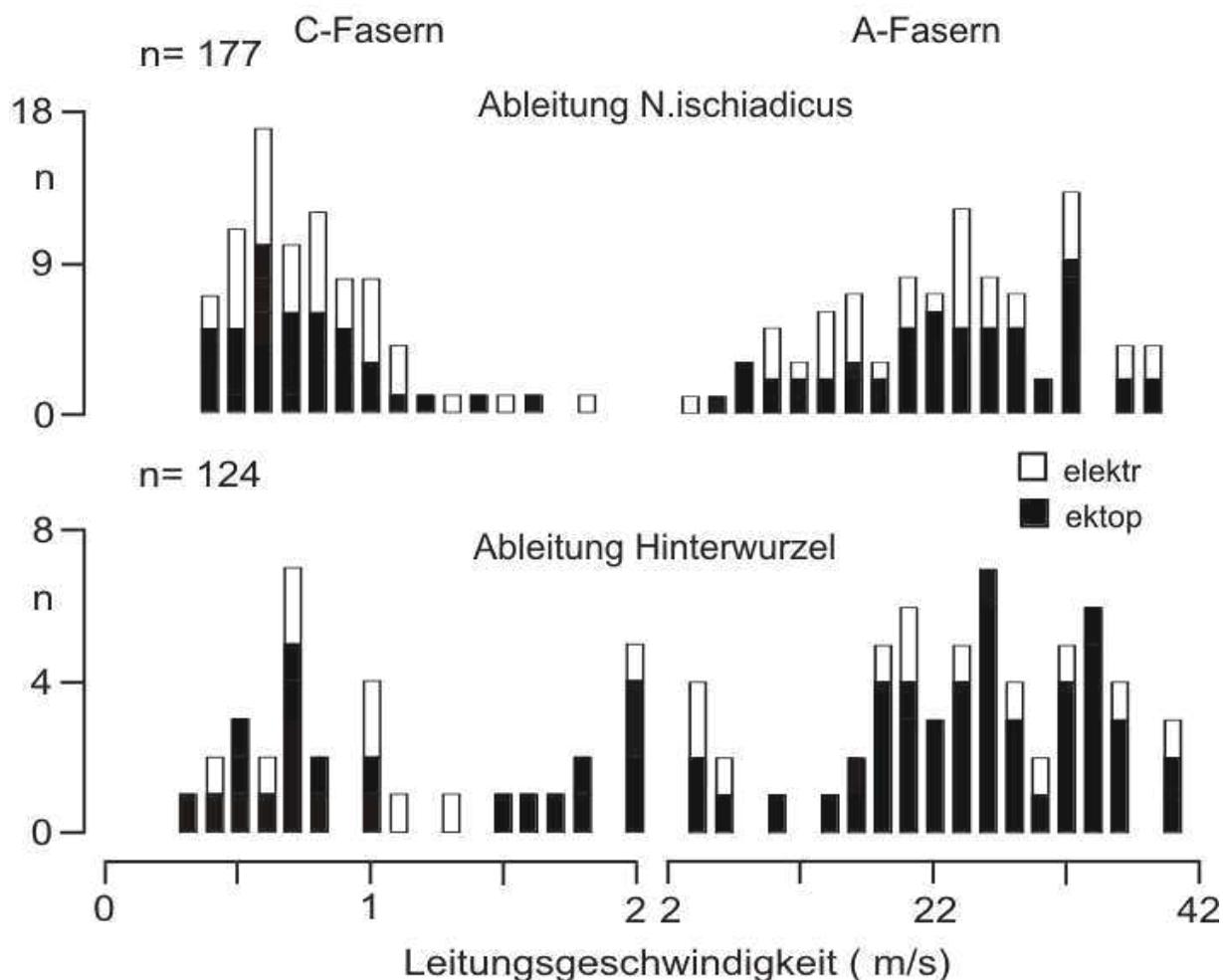


Abb.7

Leitungsgeschwindigkeiten von A- und C-Fasern mit und ohne ektope Aktivität aus Filamenten des N. ischiadicus (oben) und der Hinterwurzeln L4 bzw. L5 (unten).

Gesamtsäulen = elektrisch identifizierte Fasern, schwarz (ektop) = Fasern mit ektope Aktivität, weiß (elektr)= Fasern ohne ektope Aktivität

Oben: Die Fasern aus Filamenten des N. ischiadicus zeigen eine deutliche Teilung in 2 Gruppen, nämlich die Gruppe der A- (rechts) und die Gruppe der C-Fasern (links). Etwa die Hälfte der elektrisch identifizierten Fasern (Gesamtsäule) sind Fasern mit ektope Aktivität (schwarz).

Unten: Die Fasern aus Filamenten der Hinterwurzeln L4/L5 sind in 3 Gruppen aufgeteilt, nämlich in die Gruppe der A-Fasern (rechts), die Gruppe der C-Fasern (links) und eine Misch-Gruppe (Mitte). Die meisten Fasern haben ektope Aktivität (schwarz).

Circa 50 % der myelinisierten Fasern im Nervus gastrocnemius-soleus lateralis sind somatomotorisch (Mitchell, 1983; Peyronnard *et al.*, 1986; Sittiracha & McLachlan, 1986) und etwa 45 % der unmyelinisierten Fasern sind sympathisch postganglionär

(Baron *et al.*, 1988). Es ist anzunehmen, dass die geschädigten somatomotorischen und postganglionären Fasern zwar elektrisch, aber nicht mechanisch oder thermisch erregbar sind und keine Spontanaktivität mit peripherem Ursprung zeigen (Schmidt *et al.*, 1995; Schmelz *et al.*, 1998; Teliban *et al.*, unveröffentlicht). Daraus ist zu schließen, dass die meisten elektrisch erregbaren Fasern ohne ektope Aktivität efferente Fasern sind, und dass Fasern mit ektope Aktivität den afferenten (hier untersuchten) Fasern zuzuordnen sind. 20 Tage nach Kreuzanastomose zeigten etwa die Hälfte der A- und C-Fasern aus N. ischiadicus-Ableitungen ektope Aktivität. Bei den Hinterwurzel-Ableitungen - hier sind keine efferenten Fasern zu erwarten - war die Zahl erwartungsgemäß deutlich höher, nämlich nahezu 90 %. 80 Tage nach Kreuzanastomose war der Anteil der A-Fasern mit ektope Aktivität an den elektrisch identifizierten Fasern aus Hinterwurzel-Ableitungen (28/40) ebenfalls signifikant höher als der Anteil derer aus N. ischiadicus-Ableitungen (52/135). Auch bei den C-Fasern war dieser Trend zu sehen (40/87 zu 12/20), allerdings - bei kleiner Stichprobe - nicht signifikant (s. Tabelle 2).

Prozent der elektrisch identifizierten Fasern mit ektope Aktivität

| | 20 Tage N. ischiadicus | χ^2 -Test | Hinterwurzel | 80 Tage N. ischiadicus | χ^2 -Test | Hinterwurzel |
|----------|---------------------------|----------------|-----------------|---------------------------|----------------|-----------------|
| A-Fasern | 35/58 (60 %) | p<0,008 | 24/27 (89 %) | 52/135 (39 %) | p<0,001 | 28/40 (70 %) |
| C-Fasern | 23/57 (40 %) | p<0,001 | 14/16 (88 %) | 40/87 (46 %) | p= 0,26 | 12/20 (60 %) |

Tabelle 2

Prozentanteil der A- und C-Fasern mit ektope Aktivität an den elektrisch identifizierten Fasern.

Die Fasern aus Filamenten des N. ischiadicus wurden in 16 Experimenten untersucht. Die Fasern aus Filamenten der Hinterwurzeln L4 oder L5 wurden in 18 Experimenten untersucht.

A-Fasern: 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose war der Anteil von A-Fasern mit ektope Aktivität aus N. ischiadicus-Ableitungen erwartungsgemäß signifikant kleiner als aus Hinterwurzel-Ableitungen.

C-Fasern: 20 Tage nach Kreuzanastomose war der Anteil von C-Fasern mit ektope Aktivität aus N. ischiadicus-Ableitungen erwartungsgemäß signifikant kleiner als aus Hinterwurzel-Ableitungen. 80 Tage nach Kreuzanastomose war der Unterschied nicht signifikant.

Hinsichtlich ihrer funktionellen Eigenschaften (Mechano-, Kälte- und Hitzesensibilität sowie Spontanaktivität), zeigten sich innerhalb der Gruppe der A-Fasern sowie innerhalb der Gruppe der C-Fasern keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Fasern, die 20 und Fasern, die 80 Tage nach Kreuzanastomose untersucht wurden. Beim Vergleich der funktionellen Eigenschaften von A- und C-Fasern aus N. ischiadicus-Ableitungen und A- und C-Fasern aus Hinterwurzel-Ableitungen gab es ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede (s. Tabelle 3). Aus diesem Grund wurden die A-Fasern der vier experimentellen Gruppen (2 Zeiträume nach Kreuzanastomose und 2 Orte der elektrophysiologischen Ableitung) gemeinsam betrachtet.

Funktionelle Eigenschaften von A-Fasern, 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose aus Filamenten des Nervus ischiadicus sowie der Hinterwurzeln L4 oder L5

| Anzahl der Fasern mit ektopter Aktivität | 20 Tage | | | 80 Tage | | |
|--|----------------|--------------|--------|----------------|--------------|--------|
| | N. ischiadicus | Hinterwurzel | gesamt | N. ischiadicus | Hinterwurzel | gesamt |
| | 35 | 24 | 59 | 52 | 28 | 80 |

Individuelle funktionelle Eigenschaften

| | | | | | | |
|---------------------|-----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|
| Spontanaktivität | 2 (6%) | 6 (25%) | 8 (14%) | 9 (17%) | 7 (25%) | 16 (20%) |
| Mechanosensibilität | 35 (100%) | 23 (96%) | 58 (98%) | 52 (100%) | 28 (100%) | 80 (100%) |
| Thermische Sens. | 10 (29%) | 3 (13%) | 13 (22%) | 15 (29%) | 4 (14%) | 19 (24%) |
| Kältesensibilität | 8 (23%) | 3 (13%) | 11 (19%) | 12 (23%) | 2 (7%) | 14 (18%) |
| Hitzesensibilität | 3 (9%) | 1 (4%) | 4 (7%) | 10 (19%) | 2 (7%) | 12 (15%) |

Kombinationen der funktionellen Eigenschaften

| | | | | | | |
|-------------------|------|------|------------|------|------|------------|
| MS ausschl/SA | 25/0 | 21/4 | 46/4 (78%) | 37/1 | 24/5 | 61/6 (76%) |
| Kälte ausschl/SA | 0/0 | 1/1 | 1/1 (2%) | 0/0 | 0/0 | 0% |
| Hitze ausschl/SA | 0/0 | 0/0 | 0% | 0/0 | 0/0 | 0% |
| Kälte&Hitze/SA | 0/0 | 0/0 | 0% | 0/0 | 0/0 | 0% |
| MS&Kälte/SA | 7/2 | 1/1 | 8/3 (14%) | 4/0 | 2/2 | 6/2 (8%) |
| MS&Hitze/SA | 2/0 | 0/0 | 2/0 (3%) | 2/1 | 2/0 | 4/1 (5%) |
| MS&Hitze&Kälte/SA | 1/0 | 1/0 | 2/0 (3%) | 9/7 | 0/0 | 9/7 (11%) |
| SA ausschl | 0 | 0 | 0% | 0 | 0 | 0% |

Tabelle 3

Individuelle und gruppierte funktionelle Eigenschaften von 139 A-Fasern mit ektopter Aktivität aus 34 Experimenten.

SA = Spontanaktivität, MS = Mechanosensibilität, Hitze = Hitzesensibilität, Kälte = Kältesensibilität. Die Prozentzahl in Klammern gibt den Anteil der Fasern mit einer Eigenschaft (Mechano-, Hitze-, Kältesensibilität, Spontanaktivität) an der Gesamtzahl der Fasern mit ektopter Aktivität der dargestellten experimentellen Gruppe an. Die Zahl hinter dem Schrägstrich gibt die Zahl der Fasern mit Spontanaktivität an. Sie ist in der Zahl vor dem Schrägstrich enthalten.

Es werden 4 experimentelle Gruppen dargestellt:

- A-Fasern aus N. ischiadicus-Ableitungen 20 Tage nach Kreuzanastomose
- A-Fasern aus Hinterwurzel-Ableitungen 20 Tage nach Kreuzanastomose
- A-Fasern aus N. ischiadicus-Ableitungen 80 Tage nach Kreuzanastomose
- A-Fasern aus Hinterwurzel-Ableitungen 80 Tage nach Kreuzanastomose

Die Gesamtzahl fasst die Fasern aus N.ischiadicus- und Hinterwurzel-Ableitungen zusammen.

Funktionelle Eigenschaften von C-Fasern, 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose aus Filamenten des Nervus ischiadicus sowie der Hinterwurzeln L4 oder L5

| Anzahl der Fasern mit ektopter Aktivität | 20 Tage | | | 80 Tage | | |
|--|----------------|--------------|--------|----------------|--------------|--------|
| | N. ischiadicus | Hinterwurzel | gesamt | N. ischiadicus | Hinterwurzel | gesamt |
| | 23 | 14 | 37 | 40 | 12 | 52 |

Individuelle Entladungseigenschaften

| | | | | | | |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Spontanaktivität | 6 (26%) | 9 (64%) | 15 (41%) | 20 (50%) | 6 (50%) | 26 (50%) |
| Mechanosensibilität | 20 (87%) | 12 (86%) | 32 (86%) | 33 (85%) | 11 (92%) | 44 (85%) |
| Thermische Sens. | 13 (57%) | 12 (86%) | 25 (68%) | 30 (75%) | 10 (83%) | 40 (77%) |
| Kältesensibilität | 12 (52%) | 9 (64%) | 21 (57%) | 13 (33%) | 7 (58%) | 20 (38%) |
| Hitzesensibilität | 6 (26%) | 7 (50%) | 13 (35%) | 26 (65%) | 3 (25%) | 29 (56%) |

Kombinationen der Entladungseigenschaften

| | | | | | | |
|-------------------|------|-----|------------|------|-----|------------|
| MS ausschl/SA | 10/1 | 2/1 | 12/2 (32%) | 10/3 | 1/0 | 11/3 (21%) |
| Kälte ausschl/SA | 1/1 | 1/1 | 2/2 (5%) | 1/1 | 0/0 | 1/1 (2%) |
| Hitze ausschl/SA | 1/0 | 1/1 | 2/1 (5%) | 5/2 | 0/0 | 5/2 (10%) |
| Kälte&Hitze/SA | 1/1 | 0/0 | 1/1 (3%) | 1/0 | 0/0 | 1/0 (2%) |
| MS&Kälte/SA | 6/2 | 4/1 | 10/3 (27%) | 3/1 | 7/3 | 10/4 (19%) |
| MS&Hitze/SA | 0/0 | 2/1 | 2/1 (5%) | 12/8 | 3/2 | 15/10(29%) |
| MS&Hitze&Kälte/SA | 4/1 | 4/4 | 8/5 (22%) | 8/5 | 0/0 | 8/5 (15%) |
| SA ausschl | 0 | 0 | 0% | 0 | 1 | 1 (2%) |

Tabelle 4

Individuelle und gruppierte funktionelle Eigenschaften von 89 C-Fasern aus 34 Experimenten.

Die Legende dieser Tabelle entspricht der Legende der Tabelle 3.

3.1 Ektope Aktivität von A- und C-Fasern

3.1.1 Mechanosensibilität

A-FASERN

Nahezu 100 % (138/139) der A-Fasern mit ektope Aktivität, sowohl 20 als auch 80 Tage nach Kreuzanastomose, waren mechanosensibel. Die A-Fasern regenerierten erwartungsgemäß in den N. suralis und die Haut. 20 Tage nach Kreuzanastomose waren 66 % (39/59) der A-Fasern mit ektope Aktivität vom N. suralis, 3 % (2/59) von der Haut und 29 % (17/59) von der Kreuzanastomose mechanisch erregbar. 80 Tage nach Kreuzanastomose waren 9 % (7/80) der A-Fasern mit ektope Aktivität vom N. suralis, 70 % (56/80) von der Haut und 21 % (17/80) von der Kreuzanastomose mechanisch erregbar. Ein Teil der regenerierten A-Fasern hatte mehrere rezeptive Felder. So waren 25 % (26/105) der regenerierten A-Fasern nicht nur vom N. suralis oder der Haut, sondern zusätzlich auch von der Stelle der Kreuzanastomose mechanisch erregbar. 20 % (11/56) der in die Haut regenerierten A-Fasern waren zusätzlich vom N. suralis (s. Abb. 9A2) mechanisch erregbar.

Die A-Fasern reagierten unabhängig vom Ort der Stimulation phasisch auf mechanische Stimulation. Das heißt, dass jede kurze Stimulation der afferenten Nervenfasern einige Aktionspotentiale hervorrief, eine andauernde statische Stimulation mit gleichbleibender Intensität aber keine andauernde Erregung der Nervenfasern zur Folge hatte. Darin begründete sich auch die repetitive Stimulation mit circa 1 Hz zur Testung der mechanischen Sensibilität (s. Abb. 9A1).

Der Median der Reizschwellen betrug an der Stelle der Kreuzanastomose 0,7 mN (Bereich 0,3 mN – 45 mN), am N. suralis 2 mN (Bereich 0,3 mN – 100 mN) und an der Haut 7,5 mN (Bereich 0,3 mN – 100 mN) (s. Abb. 10A). Die Reizschwellen am N. suralis oder an der Haut waren in der Regel höher als an der Stelle der Kreuzanastomose. Die Variabilität der Reizschwellen an der Haut war allerdings groß. 54 % der von der Haut mechanisch erregbaren A-Fasern reagierten auf repetitive mechanische Stimulation; hier erfolgte die Testung mit Glasstäben und von Frey Filamenten mittlerer Stärke. 25 % reagierten zusätzlich oder ausschließlich auf Haarfollikelstimulation; ihre Reizschwellen waren extrem niedrig. Diese Fasern

neigten zu hoch frequenten Reizantworten. 23 % der mechanosensiblen A-Fasern mit rezeptiven Feldern an der Haut konnten zusätzlich oder ausschließlich durch Hautquetschung mit der Pinzette erregt werden; ihre Reizschwellen waren sehr hoch.

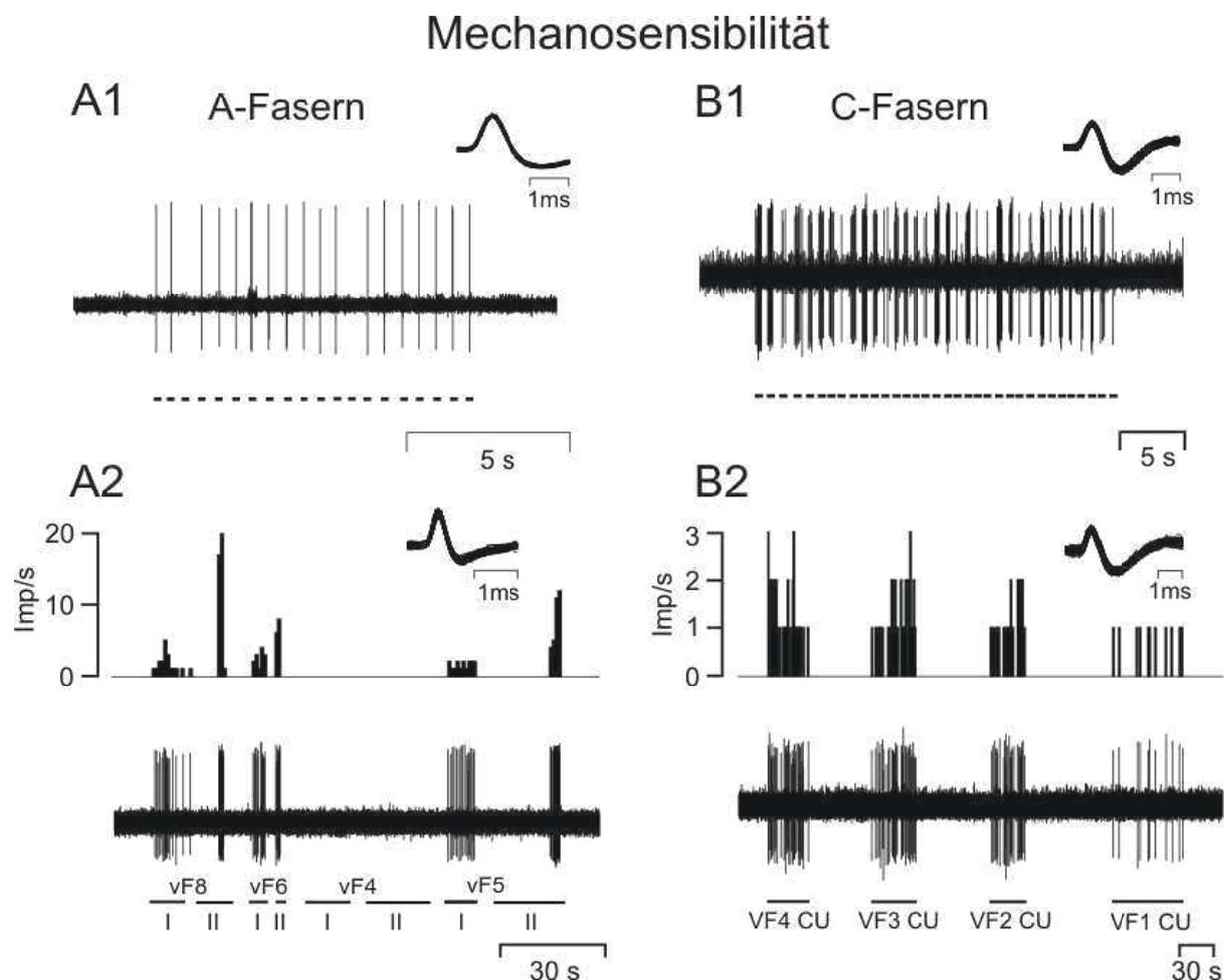


Abb.9

Mechanosensibilität der A-Fasern (links) und C-Fasern (rechts).

A1: Originalaufnahme einer mechanosensiblen A-Faser bei Stimulation der Kreuzanastomose mit einem feinen Glas-Stab mit etwa 1 Hz. Die phasische Antwort auf mechanische Stimuli ist typisch.

A2: Bestimmung der mechanischen Reizschwelle einer A-Faser mit von Frey Filamenten am Nervus suralis und der Haut. I = erstes rezeptives Feld am Nervus suralis, 24 mm distal der Kreuzanastomose; II = zweites rezeptives Feld, Haut. Die mechanische Reizschwelle liegt jeweils bei 2 mN.

B1: Originalaufnahme einer mechanosensiblen C-Faser bei Stimulation der Kreuzanastomose mit einem feinen Glas-Stab mit etwa 1 Hz. Die phasische Antwort auf mechanische Stimuli ist typisch.

B2: Bestimmung der mechanischen Reizschwelle einer C-Faser mit von Frey Filamenten an der Stelle der Kreuzanastomose. Die Reizschwelle liegt bei 0,3 mN.

C-FASERN

85 % (76/89) der C-Fasern mit ektooper Aktivität waren mechanisch erregbar. Die Anzahl mechanosensibler C-Fasern war statistisch signifikant niedriger als die Anzahl mechanosensibler A-Fasern (138/139 vs. 76/89 $p < 0,000$ χ^2 -Test). Der überwiegende Teil der mechanosensiblen C-Fasern (88 %) war ausschließlich von der Kreuzanastomose oder leicht proximal (1-2 mm) hiervon zu erregen. Distal der Kreuzanastomose vom N. suralis oder von der Haut waren nur wenige C-Fasern (12 %) mechanisch erregbar.

Die Reizantwort mechanosensibler C-Fasern auf mechanische Stimuli war, wie bei den mechanosensiblen A-Fasern, von phasischem Charakter (s. Abb. 9B1). Die mechanischen Reizschwellen wurden mit von Frey Filamenten in absteigender Stärke mit repetitiven Impulsen (etwa 1 Hz) bestimmt (s. Abb. 9B2). Der Median der Reizschwellen betrug an der Stelle der Kreuzanastomose 0,7 mN (Bereich 0,3 mN – 100 mN) und am N. suralis 7,5 mN (Bereich 0,45 mN – 20 mN) (s. Abb. 10B). Die Reizschwellen der 4 zur Haut regenerierten C-Fasern konnten aufgrund der anatomischen Lage der rezeptiven Felder nicht bestimmt werden.

Dehnungssensibilität mechanosensibler A- und C-Fasern wurde nicht systematisch und quantitativ untersucht. Sie wurde aber häufig anhand der starken Reizantworten mechanosensibler Fasern auf die Positionierung der Thermode zur Bestimmung der thermischen Sensibilitäten festgestellt.

Mechanosensibilität

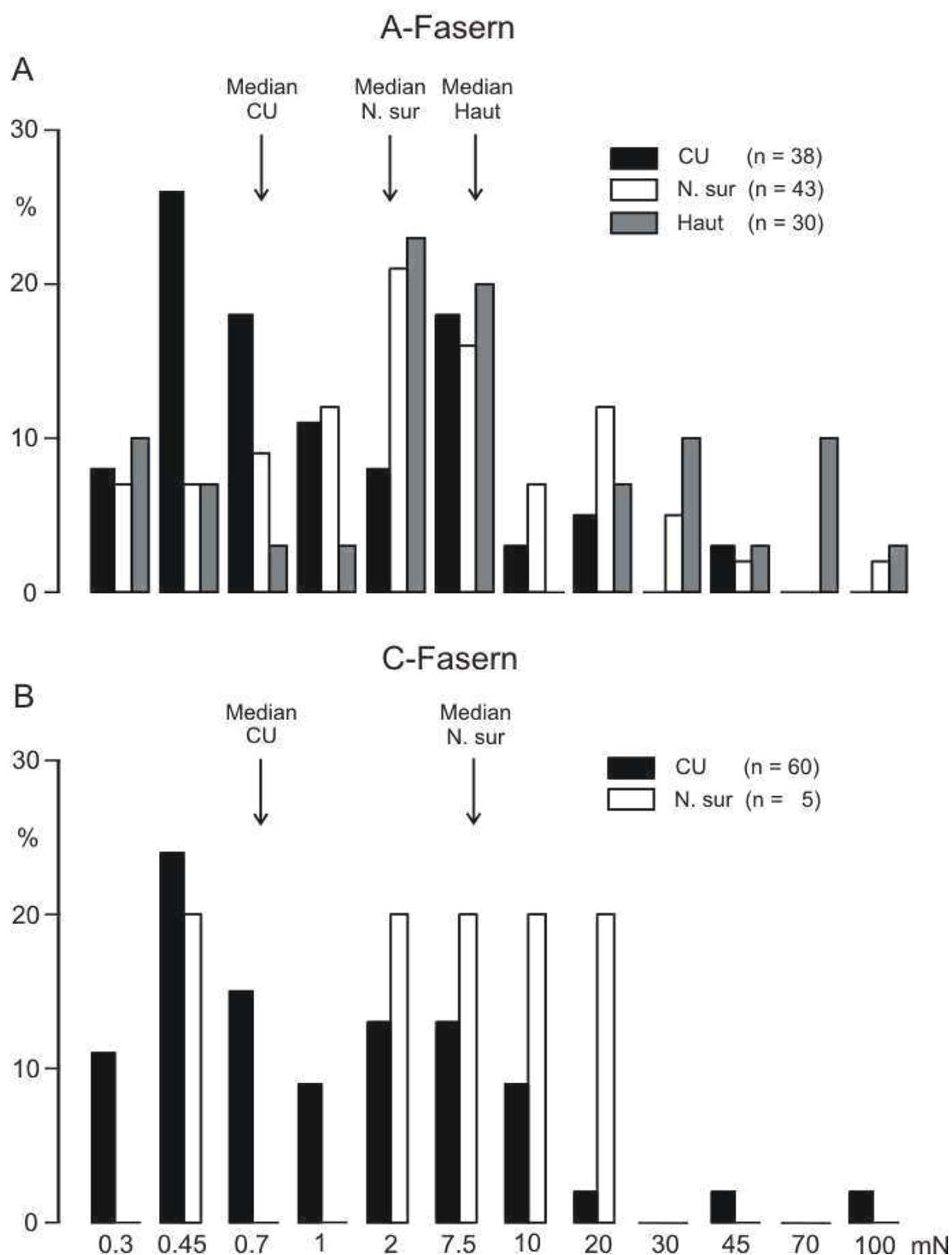


Abb. 10

Verteilung der Reizschwellen mechanosensibler A- und C-Fasern.

Mediane sind mit Pfeilen markiert. CU = Kreuzanastomose, N. sur = N. suralis distal der Kreuzanastomose, Haut = Haut im Innervationsgebiet des N. suralis.

A: Verteilung der Reizschwellen in mN von A-Fasern, die von der Stelle der Kreuzanastomose (schwarz), vom N. suralis (weiß) oder von der Haut (grau) mechanisch erregbar waren. Bei A-Fasern mit rezeptiven Feldern an der Haut, sind 3 Häufungen der mechanischen Reizschwellen angedeutet. Dies entspricht der Feststellung, dass ein Teil der mechanosensiblen A-Fasern durch Stimulation der Haarfollikel (niedrige Schwellen), ein Teil durch Druckapplikation an die Haut (mittlere Schwellen) und ein Teil durch Quetschung der Haut (hohe Schwellen) mechanisch erregbar war.

B: Verteilung der Reizschwellen in mN von C-Fasern, die von der Stelle der Kreuzanastomose (schwarz) oder vom N. suralis (weiß) mechanisch erregbar waren.

3.1.2 Kältesensibilität

A-FASERN

18 % (25/139) der A-Fasern mit ektopter Aktivität waren kältesensibel. Mit Ausnahme von einer waren alle kältesensiblen A-Fasern auch mechanosensibel, 52 % (13/25) waren auch spontanaktiv. Die rezeptiven Felder der kältesensiblen A-Fasern lagen an der Stelle der Kreuzanastomose (100 %) oder zusätzlich am N. suralis und/oder an der Haut (32 %). 68 % (17/25) waren ausschließlich von der Stelle der Kreuzanastomose durch Kältereize erregbar.

20 Tage nach Kreuzanastomose waren 27 % (3/11) der kältesensiblen A-Fasern durch Applikation von Kälte-Stimuli an den N. suralis erregbar. Von den 8 kältesensiblen A-Fasern, die 20 Tage nach Kreuzanastomose nicht vom N. suralis durch Kälte-Stimuli erregbar waren, waren 63 % (5/8) auch nicht durch mechanische Stimulation des N. suralis erregbar. 80 Tage nach Kreuzanastomose waren 29 % (4/14) der kältesensiblen A-Fasern von der Haut und 7 % (1/14) vom N. suralis durch Applikation von Kälte-Stimuli erregbar. Von den 10 kältesensiblen A-Fasern, die 80 Tage nach Kreuzanastomose nicht von der Haut durch Kälte-Stimuli erregbar waren, waren 60 % (6/10) auch nicht durch mechanische Stimulation der Haut erregbar (Abb. 11 zeigt 2 Beispiele: A&B Haut, C&D Kreuzanastomose).

Kältesensibilität von A-Fasern

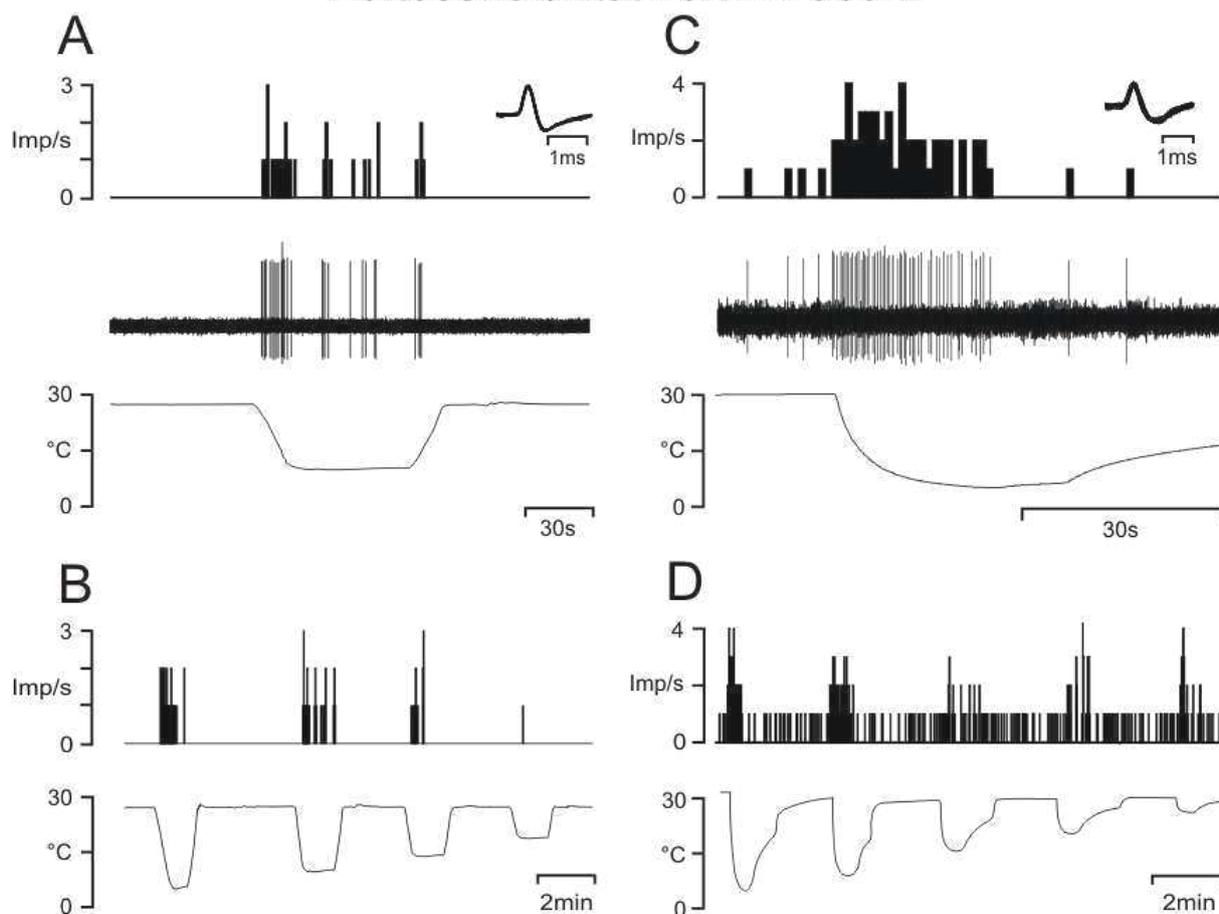


Abb.11

A, B: Aktivierung einer A-Faser durch Kältereizung des rezeptiven Feldes in der Haut mit einer Peltier-Thermode. A mit 10 °C. B mit graduierten Kältereizen. 80 Tage nach Kreuzanastomose.

C, D: Aktivierung einer A-Faser mit Spontanaktivität durch Kältereizung des rezeptiven Feldes an der Kreuzanastomose mit einer Thermode. C mit 5 °C. D mit graduierten Kältereizen. 20 Tage nach Kreuzanastomose.

Die Reizantworten der kältesensiblen A-Fasern waren graduiert (s. Abb. 12). Sie waren überwiegend von phasischem Charakter (s. Abb 11C), das heißt, dass die größte Aktivität in den erregten A-Fasern zu Beginn der Stimulation, also während der Temperaturabnahme zu sehen war.

Bezüglich der Höhe der Entladungsfrequenz und dem Charakter der Reizantworten gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den kältesensiblen A-Fasern mit rezeptiven Feldern an der Kreuzanastomose und solchen mit rezeptiven Feldern in der Haut.

Spontanaktive A-Fasern zeigten höhere Reizantworten als solche ohne Spontanaktivität ($p < 0,03$ Mann-Whitney-U-Test, 5 °C). Die größte Reizantwort wurde

vom niedrigsten getesteten Kälte-Stimulus (5 °C) hervorgerufen (A-Fasern mit Spontanaktivität: Median 2,7 Imp/s, Bereich 1,7 Imp/s – 12,8 Imp/s [n=8]; A-Fasern ohne Spontanaktivität: Median 1,5 Imp/s, Bereich 0,15 Imp/s – 4,5 Imp/s [n=10]). Die Reizschwellen der kältesensiblen A-Fasern lagen zwischen 5 °C und 25 °C (Median 10 °C) (s. Abb. 12C).

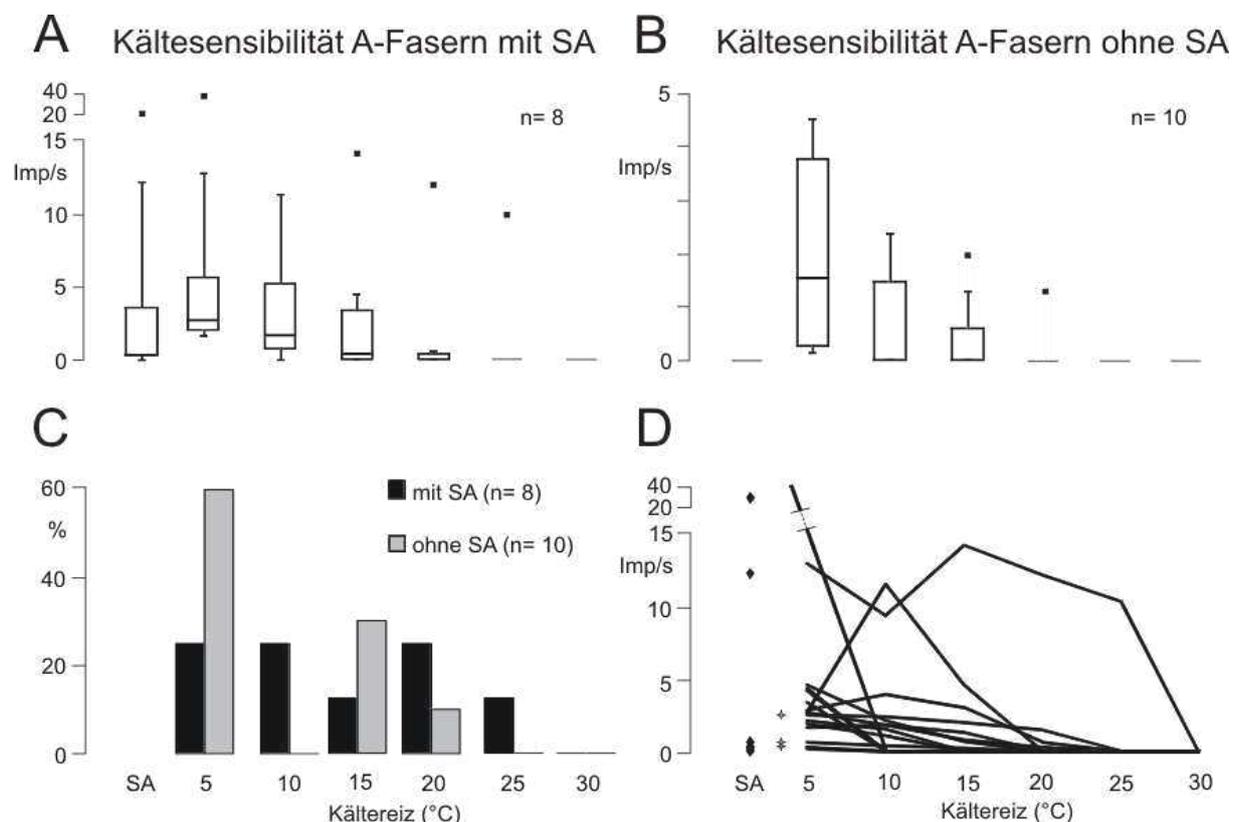


Abb.12

A, B: Reizantwort von A-Fasern mit (A) und ohne Spontanaktivität (B) in Impulsen/s auf graduierte Kälte-Stimuli (5 °C – 30 °C) appliziert an die Kreuzanastomose. Darstellungsform Boxplot. Die Spontanaktivität wurde von der Reizantwort abgezogen.

C: Reizschwellen in °C der kältesensiblen A-Fasern mit (schwarz) und ohne Spontanaktivität (grau). D: Reizantwort auf Kälte-Stimuli (5 °C – 30 °C) der einzelnen A-Fasern mit und ohne SA. Die Spontanaktivität wurde von der Reizantwort abgezogen. Die Sterne markieren 3 A-Fasern mit rezeptiven Feldern in der Haut.

Die Kälte-Stimuli sind in °C Kategorien angegeben. Diese geben einen Bereich von der jeweils angegebenen Temperatur ± 2 °C wieder.

C-FASERN

46 % (41/89) der C-Fasern mit ektooper Aktivität waren kältesensibel. Die Anzahl der kältesensiblen C-Fasern war signifikant höher als die der kältesensiblen A-Fasern (41/89 vs. 25/139 $p < 0,000$ χ^2 -Test). Alle kältesensiblen C-Fasern waren nur an der Stelle der Kreuzanastomose durch Applikation von Kälte-Stimuli erregbar (s. Abb. 13A/B). Keine C-Faser war durch Kälte-Stimulation des N. suralis oder der Haut erregbar.

93 % (38/41) der kältesensiblen C-Fasern waren zusätzlich hitze- und/oder mechanosensibel, 7 % (3/41) waren ausschließlich kältesensibel. 51 % (21/41) der kältesensiblen C-Fasern waren zusätzlich spontanaktiv.

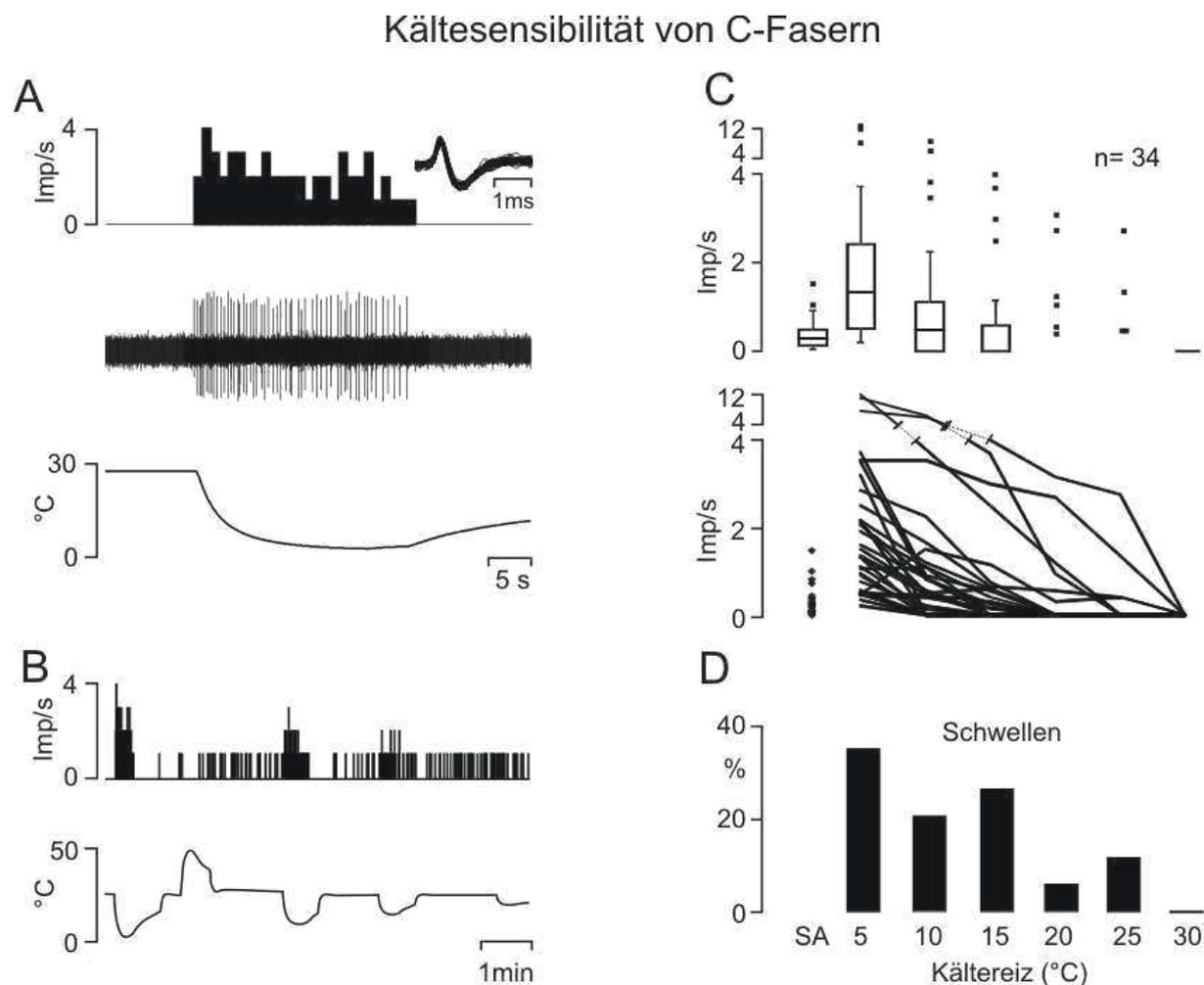


Abb.13

A, B: Aktivierung einer C-Faser durch einen Kälte-Stimulus an der Kreuzanastomose mit einer Thermode. A mit 5 °C. B mit graduierten Kälte-Stimuli, 20 Tage nach Kreuzanastomose.

C: Reizantwort von C-Fasern auf Kälte-Stimuli (5 °C – 30 °C) als Boxplot und individuelle Kurven in Impulsen/s. Die Spontanaktivität (SA) wurde von der Reizantwort abgezogen.

D: Reizschwellen der kältesensiblen C-Fasern.

Die Kälte-Stimuli sind in °C Kategorien angegeben. Diese geben einen Bereich von der jeweils angegebenen Temperatur ± 2 °C wieder.

Die Reizantworten der C-Fasern waren graduiert (s. Abb. 13C). Sie waren von statischem Charakter, das heißt, dass die Aktivität in den erregten C-Fasern über den gesamten Stimulus-Zeitraum gleich hoch war (s. Abb. 13A).

Die größte Reizantwort wurde vom niedrigsten getesteten Kälte-Stimulus (5 °C) hervorgerufen (Median 1,3 Imp/s, Bereich 0,2 Imp/s – 12,4 Imp/s [n=34]). Es gab keinen Unterschied zwischen der Höhe der Reizantworten auf Kälte-Stimuli von spontanaktiven C-Fasern und der Höhe der Reizantworten von C-Fasern ohne Spontanaktivität. Die Reizschwellen lagen zwischen 5 °C und 25 °C (Median 10 °C) (s. Abb. 13D).

3.1.3 Hitzesensibilität

A-FASERN

12 % (16/139) der ektopt aktiven A-Fasern waren hitzesensibel. Alle hitzesensiblen A-Fasern waren auch mechanosensibel, 50 % (8/16) waren auch spontanaktiv. Die rezeptiven Felder der hitzesensiblen A-Fasern lagen an der Stelle der Kreuzanastomose (100 %) oder zusätzlich am N. suralis und/oder an der Haut (31 %). 69 % (11/16) waren ausschließlich an der Stelle der Kreuzanastomose erregbar.

20 Tage nach Kreuzanastomose war eine (1/4) der hitzesensiblen A-Fasern durch Applikation von Hitze-Stimuli an den N. suralis erregbar. Von den 3 hitzesensiblen A-Fasern, die 20 Tage nach Kreuzanastomose nicht vom N. suralis durch Hitze-Stimuli erregbar waren, waren 2 auch nicht durch mechanische Stimulation des N. suralis erregbar. 80 Tage nach Kreuzanastomose waren 33 % (4/12) der hitzesensiblen A-Fasern von der Haut und 8 % (1/12) zusätzlich vom N. suralis durch Applikation von Hitze-Stimuli erregbar. Von den 8 hitzesensiblen A-Fasern, die 80 Tage nach Kreuzanastomose nicht von der Haut durch Hitze-Stimuli erregbar waren, waren

50 % (4/8) auch nicht durch mechanische Stimulation der Haut erregbar (Abb. 14 zeigt 2 Beispiele: A&B Haut, C Kreuzanastomose).

Hitzesensibilität A-Fasern

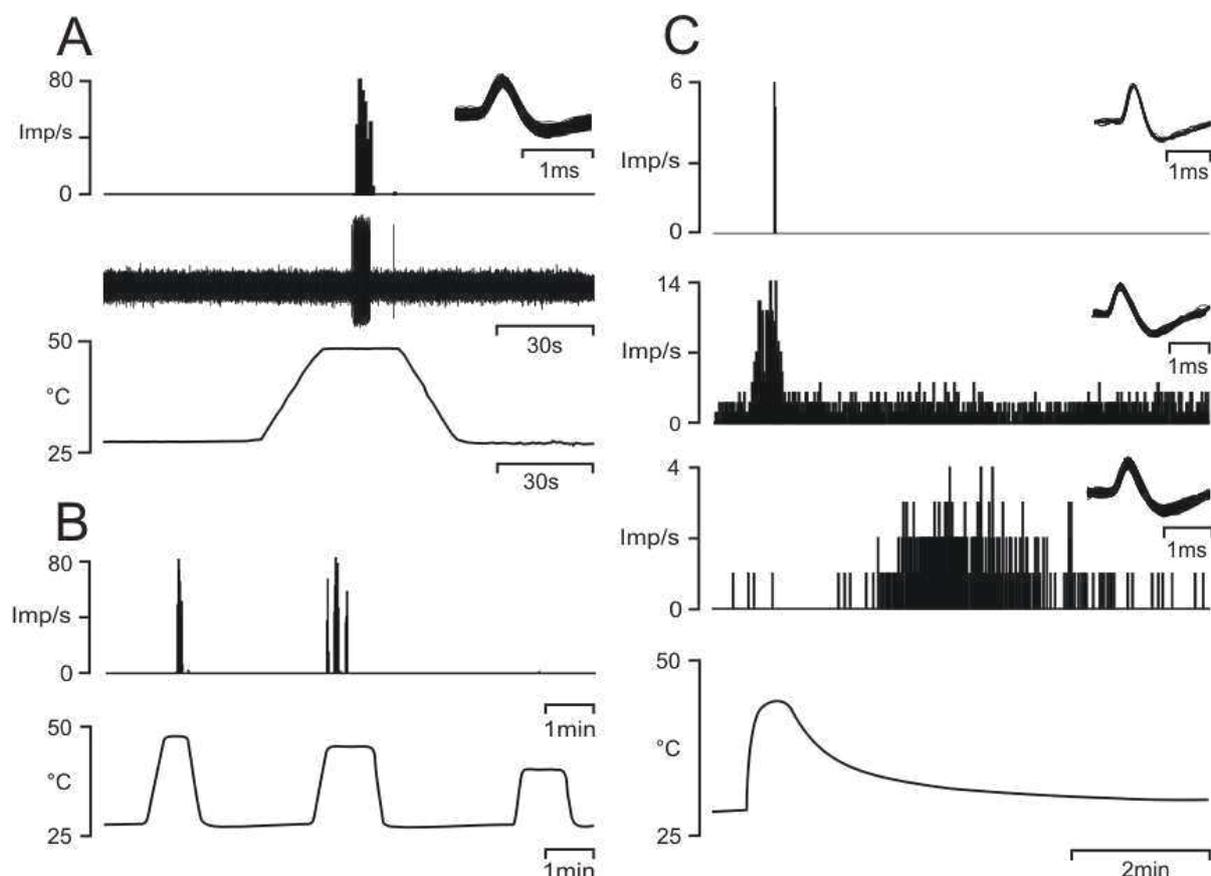


Abb.14

A, B: Aktivierung einer A-Faser durch Hitzereizung des rezeptiven Feldes in der Haut mit einer Peltier-Thermode. A mit 48 °C. B mit graduierten Hitzereizen. 80 Tage nach Kreuzanastomose.

C: Aktivierung mehrerer A-Fasern mit und ohne Spontanaktivität durch Hitzereizung des rezeptiven Feldes an der Kreuzanastomose mit einer Thermode mit 48 °C, 20 oder 80 Tage nach Kreuzanastomose der Nerven. Die Reizantworten waren sehr variabel. Sie waren von phasischem, statischem oder verzögertem Charakter. Sie stehen exemplarisch für die am häufigsten beobachteten Reizantworten hitzesensibler A-Fasern auf Hitze-Stimuli.

Die Reizantworten der hitzesensiblen A-Fasern waren graduiert (s. Abb. 15A). Sie waren sehr variabel (s. Abb. 14C). Zumeist waren sie von kurzem impulsartigem Charakter, einige Fasern zeigten statische Reizantworten auf Hitze-Stimuli. Eine A-Faser zeigte eine anhaltende hochfrequente Reizantwort bis 4 Minuten nach

Applikation des Stimulus (s. Abb. 14C), wie sie von Kirillova et al. beobachtet worden war (Kirillova *et al.*, 2011a).

Bezüglich der Höhe der Entladungsfrequenz und dem Charakter der Reizantworten gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den hitzesensiblen A-Fasern mit rezeptiven Feldern an der Kreuzanastomose und solchen mit rezeptiven Feldern in der Haut. Aufgrund der geringen Anzahl hitzesensibler A-Fasern wurde nicht zwischen Fasern mit und ohne Spontanaktivität unterschieden, sie wurden gemeinsam betrachtet. Der größte getestete Hitze-Stimulus (48 °C) rief die größten Reizantworten hervor (Median 1,45 Imp/s, Bereich 0,25 Imp/s – 12,2 Imp/s [n=10]). Die Reizschwellen lagen zwischen 35 °C und 48 °C (Median 45 °C) (s. Abb. 15B).

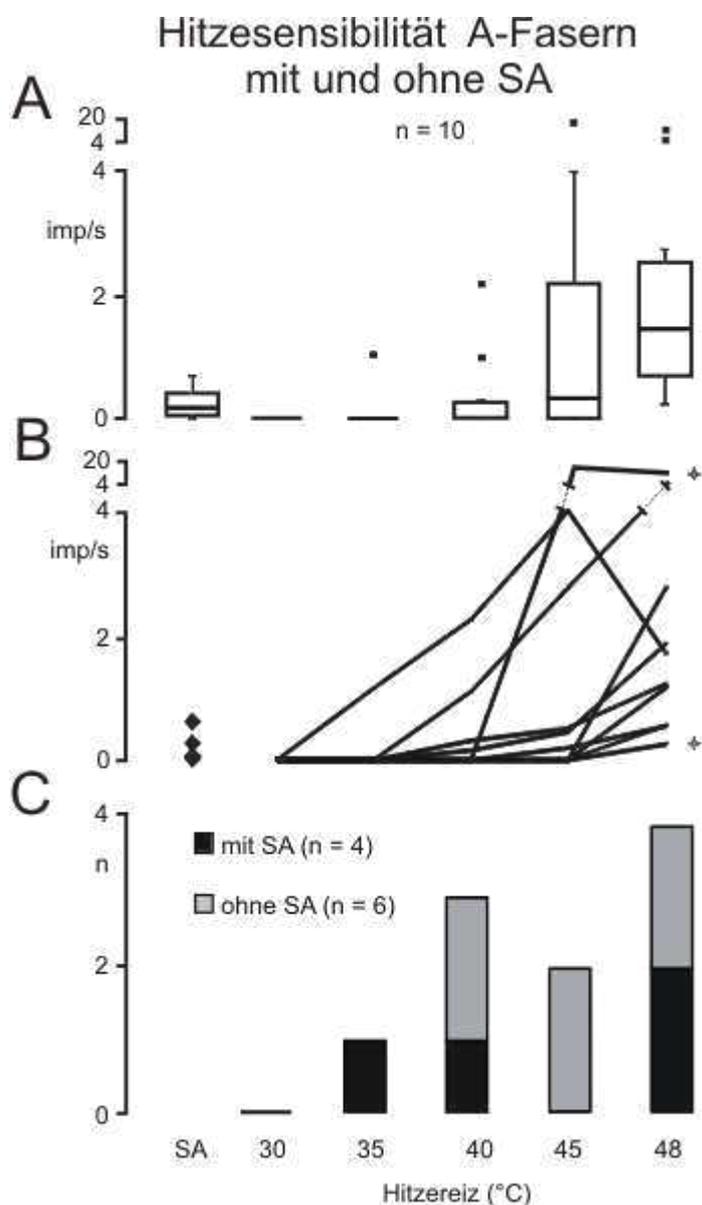


Abb.15

A, C: Graduierte Reizantworten von A-Fasern mit und ohne Spontanaktivität auf Hitze-Stimuli (30 °C – 48 °C) in Impulsen/s. Die Spontanaktivität wurde von der Reizantwort abgezogen. A: Darstellungsform Boxplot.

B: Individuelle Reizantwortkurven. Die Sterne markieren 2 A-Fasern mit rezeptiven Feldern in der Haut.

C: Reizschwellen in °C der hitzesensiblen A-Fasern mit (schwarz) und ohne Spontanaktivität (grau).

Die Hitze-Stimuli sind in °C Kategorien angegeben. Diese geben einen Bereich von der jeweils angegebenen Temperatur ± 2 °C wieder.

C-FASERN

47 % (42/89) der C-Fasern mit ektooper Aktivität waren hitzesensibel. Die Anzahl der hitzesensiblen C-Fasern war signifikant höher als die der hitzesensiblen A-Fasern (42/89 vs. 16/139 $p < 0,000$ χ^2 -Test). Die rezeptiven Felder der hitzesensiblen C-Fasern lagen an der Stelle der Kreuzanastomose (100 %) oder zusätzlich am N. suralis (7 %). 93 % (39/42) waren ausschließlich von der Stelle der Kreuzanastomose erregbar. Keine C-Faser war durch die Applikation von Hitze-Stimuli an die Haut erregbar.

83 % (35/42) der hitzesensiblen C-Fasern waren zusätzlich kälte- und/oder mechanosensibel, 16 % (7/42) waren ausschließlich hitzesensibel. 60 % (25/42) der hitzesensiblen C-Fasern waren zusätzlich spontanaktiv.

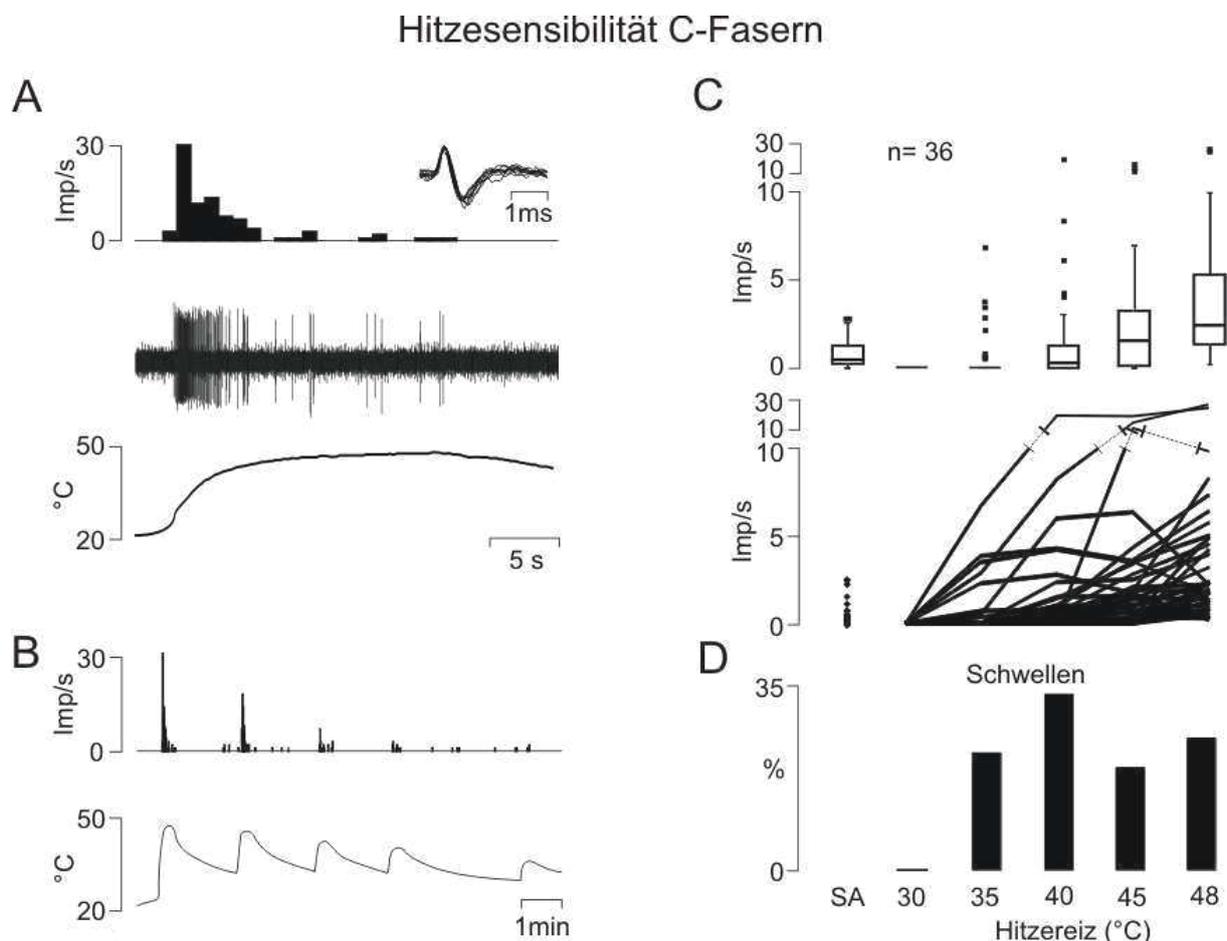


Abb. 16

A, B: Aktivierung einer C-Faser durch einen Hitze-Stimulus an der Kreuzanastomose mit einer Thermode. A mit 48 °C. B mit graduierten Hitze-Stimuli, 20 Tage nach Kreuzanastomose.

C: Reizantwort von C-Fasern auf Hitze-Stimuli (30 °C – 48 °C) als Boxplot und individuelle Kurven in Impulsen/s. Die Spontanaktivität (SA) wurde von der Reizantwort abgezogen.

D: Reizschwellen der hitzesensiblen C-Fasern.

Die Hitze-Stimuli sind in °C Kategorien angegeben. Diese geben einen Bereich von der jeweils angegebenen Temperatur ± 2 °C wieder.

Die Reizantworten der hitzesensiblen C-Fasern waren graduiert (s. Abb. 16C). Sie waren von phasischem Charakter, das heißt, dass die größte Aktivität in den erregten C-Fasern zu Beginn der Stimulation, also während der Temperaturzunahme zu sehen war (s. Abb. 16A). Der höchste getestete Hitze-Stimulus (48 °C) rief die größte Reizantwort hervor (Median 2,2 Imp/s, Bereich 0,2 Imp/s – 24,5 Imp/s [n=36]). Es gab keinen Unterschied zwischen der Höhe der Reizantworten auf Hitze-Stimuli von C-Fasern mit Spontanaktivität und der Höhe der Reizantworten von C-Fasern ohne Spontanaktivität. Die Reizschwellen lagen zwischen 35 °C und 48 °C (Median 40 °C) (s. Abb. 16D).

3.1.4 Spontanaktivität

A-FASERN

17 % (24/139) der A-Fasern mit ektopter Aktivität waren spontanaktiv. Die Höhe der Entladungsfrequenz spontanaktiver A-Fasern lag zwischen 0,01 Imp/s und 27,7 Imp/s (Median: 0,38 Imp/s). 35 % der A-Fasern zeigten eine Entladungsfrequenz von >1 Imp/s, 23 % feuerten mit mehr als 10 Imp/s. Die Entladungsmuster der spontanaktiven A-Fasern waren regulär (33 %), salvenartig (17 %) oder irregulär (50 %). Anhand von Intervallhistogrammen war eine eindeutige Einteilung in die jeweiligen Entladungsmuster möglich. Die Interspikeintervalle der Fasern mit regulärem Entladungsmuster waren normalverteilt. Die Interspikeintervalle der Fasern mit irregulärem Entladungsmuster waren nicht normalverteilt (Beta-Verteilung). Die Interspikeintervalle der Fasern mit salvenartigem Entladungsmuster waren zweigipfelig verteilt (bimodale Verteilung, kurze Intra-burstintervalle, lange Interburstintervalle) (s. Abb. 17B).

Die Höhe der Entladungsfrequenz regulär spontanaktiver A-Fasern (Median 16,2 Imp/s, Bereich 0,7 Imp/s – 27,7 Imp/s [n=8]) war deutlich größer ($p=0,008$ Mann-

Whitney-U-Test) als die der irregulär spontanaktiven A-Fasern (Median 0,1 Imp/s, Bereich 0,01 Imp/s – 0,4 Imp/s [n=12]). Die Höhe der Entladungsfrequenz salvenartig spontanaktiver A-Fasern (Median 3 Imp/s, Bereich 0,3 Imp/s – 15,8 Imp/s [n=4]) lag ebenfalls über der der irregulär spontanaktiven, allerdings bei kleiner Stichprobengröße (s. Abb. 17A).

Zur Haut regenerierte spontanaktive A-Fasern (n= 10) zeigten eine deutlich höhere Entladungsfrequenz als nicht zur Haut regenerierte (p=0,05 Mann-Whitney-U-Test [s. Abb. 22]). 70 % der regenerierten spontanaktiven A-Fasern entluden regelmäßig.

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Höhe der Entladungsfrequenz spontanaktiver A-Fasern aus Filamenten des N. ischiadicus und der spontanaktiver A-Fasern aus Filamenten der Hinterwurzeln L4/L5. Die Höhe der Entladungsfrequenzen spontanaktiver A-Fasern, die 20 Tage nach Kreuzanastomose untersucht wurden, unterschied sich ebenfalls nicht von der der spontanaktiven A-Fasern, die 80 Tage nach Kreuzanastomose untersucht wurden.

Die Höhe der Entladungsfrequenzen der spontanaktiven A-Fasern mit Leitungsgeschwindigkeiten ≥ 20 m/s (Median 12,2 Imp/s, Bereich 0,1 Imp/s – 27,7 Imp/s [n=9]) unterschied sich statistisch nicht signifikant von der der A-Fasern mit Leitungsgeschwindigkeiten < 20 m/s (Median 0,3 Imp/s, Bereich 0,03 Imp/s – 22,3 Imp/s [n=9]). Hiervon ist vermutlich der größte Teil den A δ -Fasern zuzuordnen.

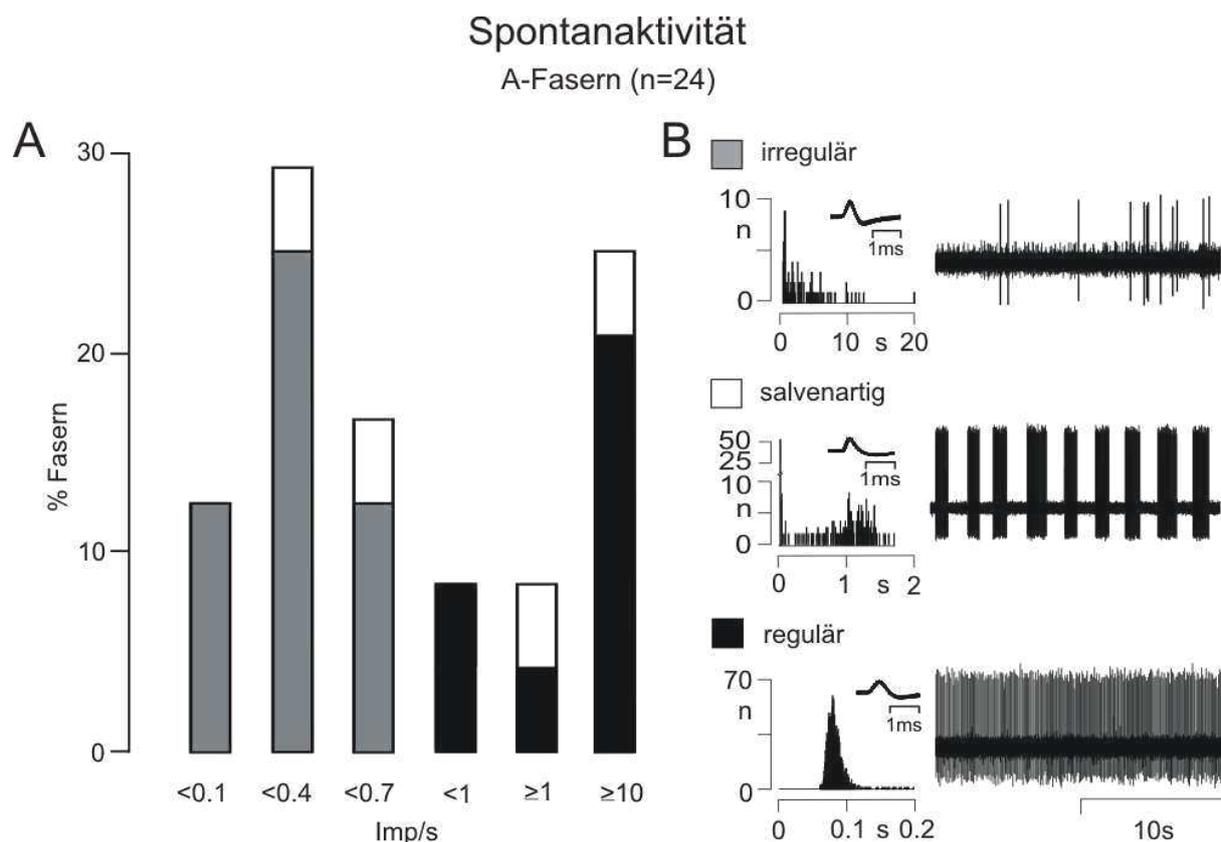


Abb. 17

A: Verteilung von Entladungsfrequenzen spontanaktiver A-Fasern. Die Ordinate zeigt die Anzahl der spontanaktiven Fasern in Prozent. Die Abszisse zeigt die Höhe der Entladungsfrequenz in Impulsen/s. B: Entladungsmuster spontanaktiver A-Fasern. (regulär [normal verteilt], salvenartig [bimodal] und irregulär [beta]). Die Intervallhistogramme dienen der Klassifikation der Entladungsmuster. Die Intervall-Balkenweite des Intervallhistogramms „irregulär“ ist 0,1 s, die des Histogramms „salvenartig“ 0,01 s und die des Histogramms „regulär“ 0,005 s.

C-FASERN

46 % (41/89) der C-Fasern mit ektopter Aktivität waren spontanaktiv. Ihre Anzahl war signifikant größer als die der spontanaktiven A-Fasern (41/89 vs. 24/139 $p < 0,000$ χ^2 -Test). Die Höhe der Entladungsfrequenz spontanaktiver C-Fasern lag zwischen 0,02 Imp/s und 2,64 Imp/s (Median 0,38 Imp/s). Sie unterschied sich, bei eingeschränkter Vergleichbarkeit der Stichprobengröße (24 A-Fasern, 41 C-Fasern), nicht signifikant von der der spontanaktiven A-Fasern. 22 % (9) der spontanaktiven C-Fasern zeigten eine Entladungsfrequenz $\leq 0,1$ Imp/s.

Die Entladungsmuster waren regulär (59 %) oder irregulär/salvenartig (41 %). Die Intervallhistogramme der Fasern mit irregulären und salvenartigen Entladungsmustern unterschieden sich nicht eindeutig. Aus diesem Grund wurde keine Trennung der beiden Typen vorgenommen (s. Abb. 18B). Die Höhe der Entladungsfrequenz regulär spontanaktiver C-Fasern (Median 0,46 Imp/s, Bereich 0,14 Imp/s – 2,64 Imp/s [n=24]) war statistisch signifikant höher ($p=0,009$ Mann-Whitney-U-Test) als die der salvenartig/irregulär spontanaktiven (Median 0,1 Imp/s, Bereich 0,02 Imp/s – 0,94 Imp/s [n=17]) (s. Abb. 18A).

Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen der Höhe der Entladungsfrequenzen spontanaktiver C-Fasern aus N. ischiadicus- und aus Hinterwurzel-Ableitungen. Die Höhe der Entladungsfrequenzen spontanaktiver C-Fasern, die 20 Tage nach Kreuzanastomose untersucht wurden, unterschied sich ebenfalls nicht von der Höhe der Entladungsfrequenzen spontanaktiver C-Fasern, die 80 Tage nach Kreuzanastomose untersucht wurden.

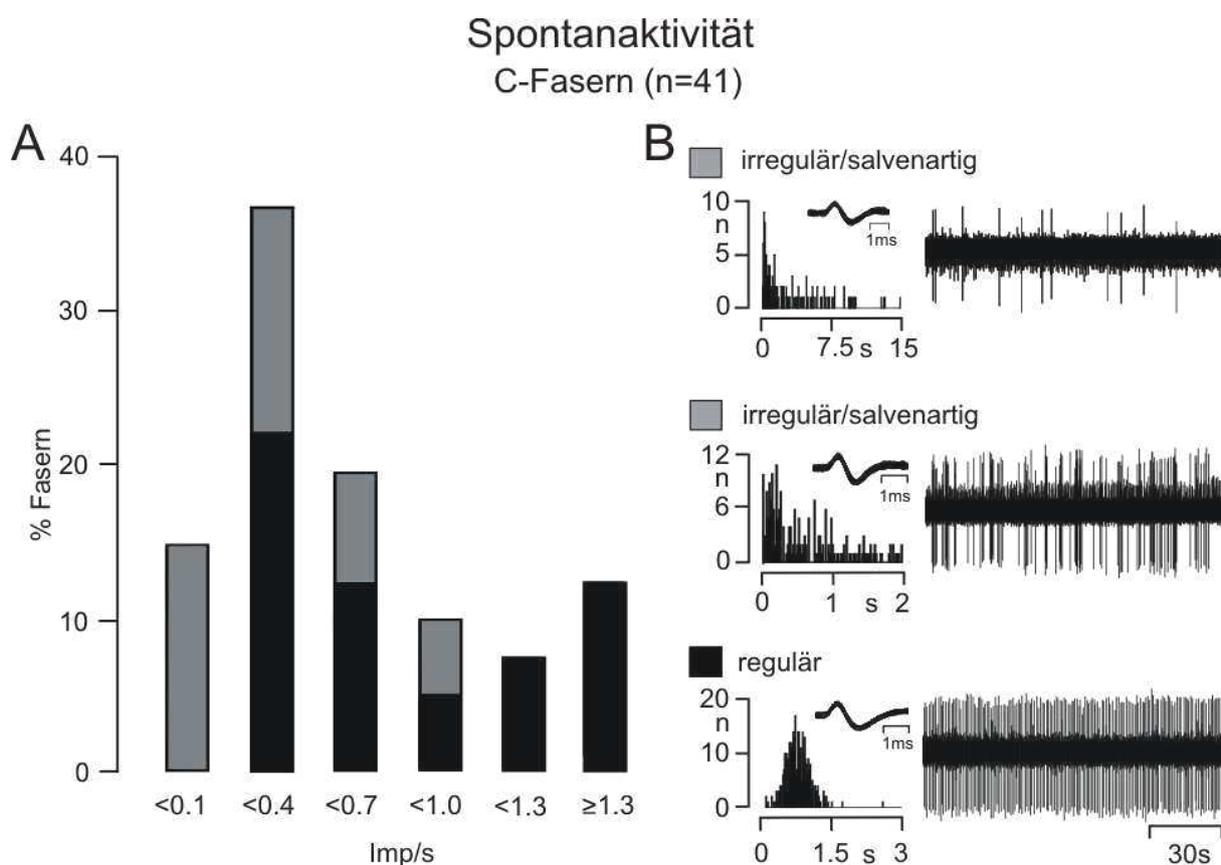


Abb. 18

A: Verteilung von Entladungsfrequenzen spontanaktiver C-Fasern. Die Ordinate zeigt die Anzahl der spontanaktiven Fasern in Prozent. Die Abszisse zeigt die Höhe der Entladungsfrequenz in Impulsen/s.

B: Entladungsmuster spontanaktiver C-Fasern. (regulär [normal verteilt], irregulär/salvenartig [beta]). Die Intervallhistogramme dienen der Klassifikation der Entladungsmuster. Die Intervall-Balkenweite des 1. Intervallhistogramms „irregulär/salvenartig“ ist 0,05 s, die des 2. Histogramms „irregulär/salvenartig“ 0,01 s und die des Histogramms „regulär“ 0,02 s.

3.2 Vergleich funktioneller Eigenschaften von A- und C-Fasern

Der Vergleich der Häufigkeit funktioneller Eigenschaften von A- und C-Fasern zeigte, dass sie sich hoch signifikant für alle getesteten Sensibilitäten und die Spontanaktivität unterschieden (s. Abb.19). Innerhalb der Gruppe der A-Fasern gab es hinsichtlich der Häufigkeit funktioneller Eigenschaften keine signifikanten Unterschiede zwischen schnell leitenden (>20 m/s) vermutlich A α / β -Fasern und langsam leitenden (<20 m/s) vermutlich A δ -Fasern.

Vergleich der funktionellen Eigenschaften von A- und C-Fasern

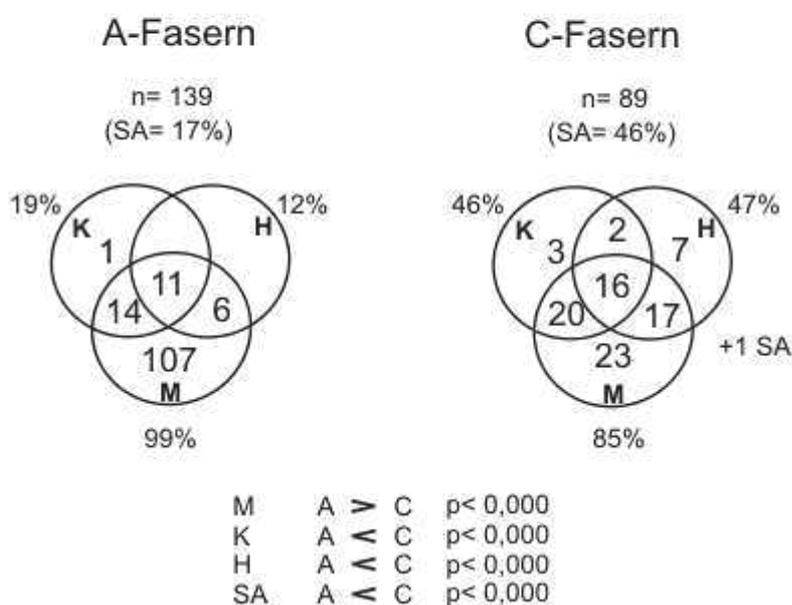


Abb.19

Funktionelle Eigenschaften von A- und C-Fasern mit ektooper Aktivität.

M = Mechanosensibilität, H = Hitzesensibilität, K = Kältesensibilität, SA = Spontanaktivität, A>C = Häufigkeit der getesteten Sensibilität bei A- größer als bei C-Fasern, A<C = Häufigkeit geringer bei A-Fasern, χ^2 -Test

Die Gruppe der A-Fasern unterscheidet sich in der Häufigkeit aller getesteten Sensibilitäten und der Spontanaktivität hoch signifikant von der Gruppe der C-Fasern.

3.3 Regeneration

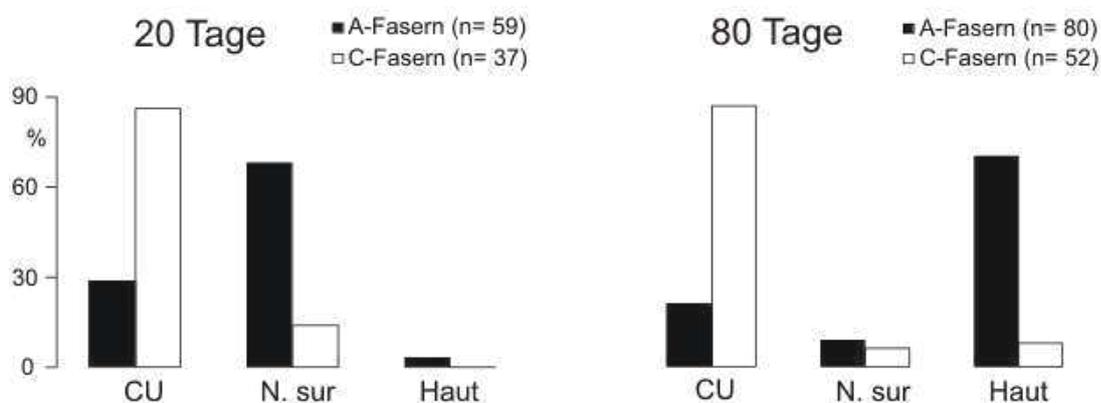
A-FASERN

20 Tage nach Kreuzanastomose waren 68 % (40/59) der A-Fasern mit ektopter Aktivität durch mechanische oder thermische Stimulation des N. suralis erregbar, 45 % (18/40) hiervon zusätzlich durch Stimulation der Kreuzanastomose. 29 % (17/59) der A-Fasern mit ektopter Aktivität waren ausschließlich von der Stelle der Kreuzanastomose mechanisch oder thermisch erregbar, 3 % (2/59) durch mechanische Stimulation der Haut.

80 Tage nach Kreuzanastomose waren 70 % (56/80) der A-Fasern mit ektopter Aktivität durch mechanische oder thermische Stimulation der Haut erregbar, 14 % (8/56) hiervon zusätzlich durch Stimulation der Kreuzanastomose. 21 % (17/80) der A-Fasern mit ektopter Aktivität waren ausschließlich von der Stelle der Kreuzanastomose mechanisch oder thermisch erregbar, 9 % (7/80) waren nur durch mechanische oder thermische Stimulation des N. suralis erregbar (s. Abb. 20A).

Regeneration

A Erregbarkeit durch physikalische Stimuli entlang des Nervs und an der Haut



B Erregbarkeit durch elektrische Stimuli proximal und distal der Kreuzanastomose C-Fasern

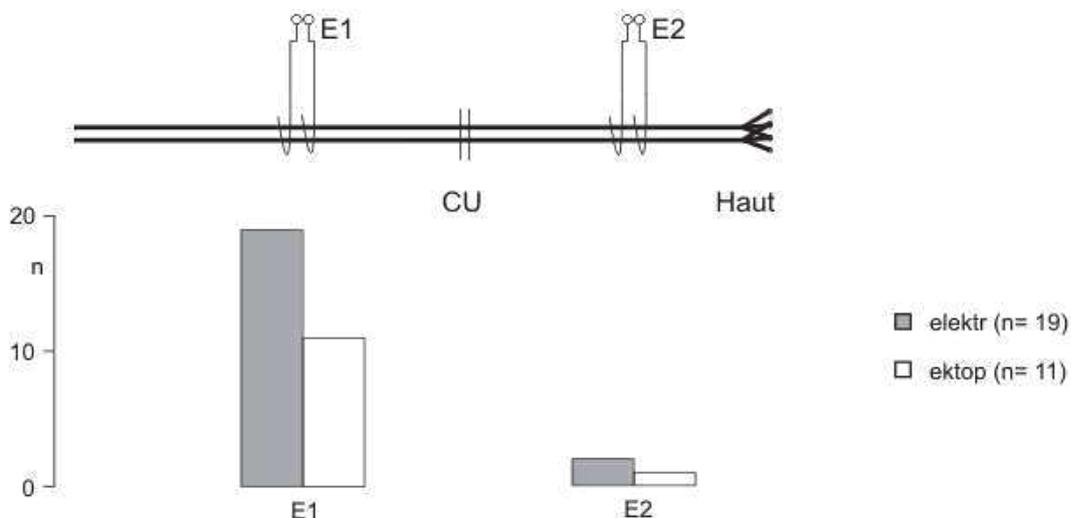


Abb.20

A: Anteil der A- und C-Afferenzen mit ektopter Aktivität, die 20 Tage oder 80 Tage nach Kreuzanastomose durch mechanische und/oder thermische Reizung der Kreuzanastomose, des N. suralis oder der Haut erregbar waren.

CU = Kreuzanastomose, N. sur = N. suralis distal der CU, Haut = Haut im Innervationsgebiet des N. suralis

B: Die grauen Säulen zeigen die Anzahl der C-Fasern aus 3 Versuchen, die durch elektrische Stimulation proximal (E1), und die Anzahl derer, die zusätzlich durch elektrische Stimulation distal (E2) der Kreuzanastomose erregbar waren. Die weißen Säulen zeigen die Anzahl dieser elektrisch identifizierten Fasern, die durch mechanische oder thermische Stimulation der Kreuzanastomose (CU) oder distal hiervon erregbar waren. Die gemessenen C-Fasern stammen aus 2 Versuchen mit

Ableitung von Filamenten aus den Hinterwurzeln L4/L5 und aus 1 Versuch mit Ableitung von Filamenten aus dem N. ischiadicus, jeweils 80 Tage nach Kreuzanastomose.

Die funktionellen Eigenschaften (Mechano-, Kälte-, Hitzesensibilität) der regenerierten A-Fasern unterschieden sich nicht signifikant von denen der nicht-regenerierten Fasern (s. Abb. 21A). Die Leitungsgeschwindigkeiten der in den N. suralis (Median 26 m/s, Bereich 14 m/s – 39 m/s [n= 34]) oder in die Haut (Median 28 m/s, Bereich 6 m/s – 45 m/s [n= 36]) regenerierten A-Fasern waren signifikant höher als die Leitungsgeschwindigkeiten der nicht-regenerierten A-Fasern, die nur von der Kreuzanastomose aktiviert werden konnten (Median 18 m/s, Bereich 3 m/s – 30 m/s [n= 27]) ($p < 0,000$ Mann-Whitney-U-Test) (s. Abb.21B).

Die Höhe der Entladungsfrequenzen spontanaktiver in die Haut regenerierter A-Fasern (Median 8,9 Imp/s, Bereich 0,1 Imp/s – 27,7 Imp/s [n= 10]) war signifikant höher, als die der nicht-regenerierten (Median 0,24 Imp/s, Bereich 0,01 Imp/s – 0,7 Imp/s [n= 8]) ($p = 0,05$ Mann-Whitney-U-Test) und die der in den N. suralis regenerierten A-Fasern (Median 0,25 Imp/s, Bereich 0,04 Imp/s – 22,3 Imp/s [n=6]) (s. Abb. 22).

C-FASERN

87 % (77/89) der C-Fasern mit ektopter Aktivität waren ausschließlich von der Stelle der Kreuzanastomose erregbar. 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose gab es nur wenige C-Fasern, die durch mechanische oder thermische Stimulation des N. suralis oder der Haut erregbar waren. 9 % (8/89) der C-Fasern mit ektopter Aktivität konnten vom N. suralis, 4 % (4/89) konnten von der Haut mechanisch und/oder thermisch erregt werden (s. Abb. 20A). Es konnten signifikant mehr A-Fasern (105/139) als C-Fasern (12/89) distal der Kreuzanastomose mechanisch oder thermisch erregt werden ($p < 0,000$ χ^2 -Test).

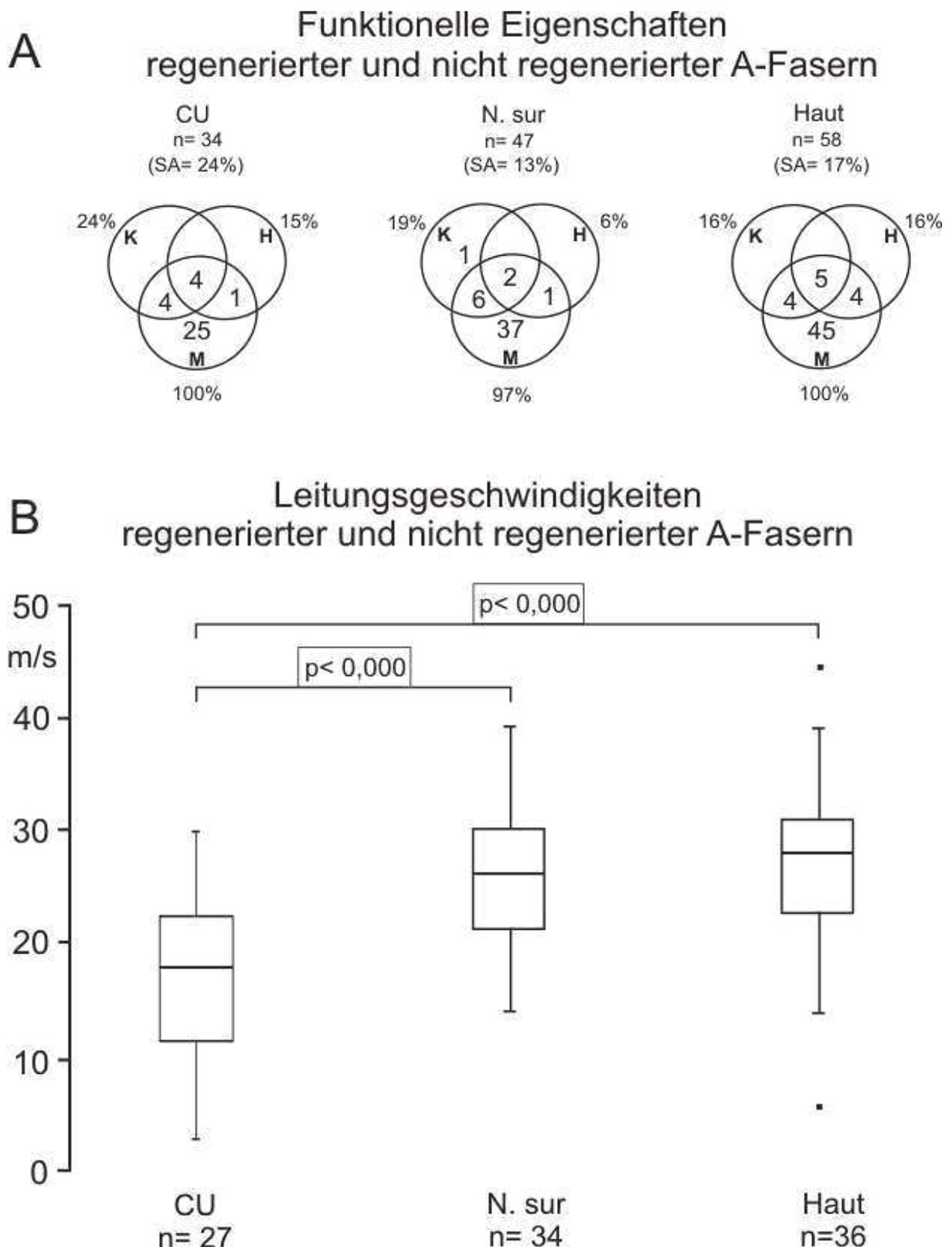


Abb.21

A: Funktionelle Eigenschaften von nicht-regenerierten und in den N. suralis oder die Haut regenerierten A-Fasern, beide Zeitperioden zusammengelegt. M = Mechanosensibilität, K = Kältesensibilität, H = Hitzesensibilität, SA = Spontanaktivität, CU = Kreuzanastomose, N. sur = N. suralis distal der CU, Haut = Haut im Innervationsgebiet des N. suralis.

B: Vergleich der Leitungsgeschwindigkeiten in m/s von in den N. suralis oder in die Haut regenerierten und nicht-regenerierten A-Fasern. Mann-Whitney-U-Test.

80 Tage nach Kreuzanastomose wurde in 3 Versuchen (2 Versuche mit Hinterwurzel- und 1 Versuch mit N. ischiadicus-Ableitungen) die elektrische Erregbarkeit von C-Fasern distal der Kreuzanastomose getestet. Lediglich 10 % (2/19) der elektrisch identifizierten C-Fasern konnten distal der Kreuzanastomose elektrisch erregt werden. Von den 19 elektrisch identifizierten Fasern waren 11 C-Fasern von der Stelle der Kreuzanastomose mechanisch oder thermisch erregbar. Eine dieser Fasern konnten durch Stimulation des N. suralis erregt werden (s. Abb. 20B).

Entladungsfrequenz spontanaktiver regenerierter und nicht-regenerierter A-Fasern

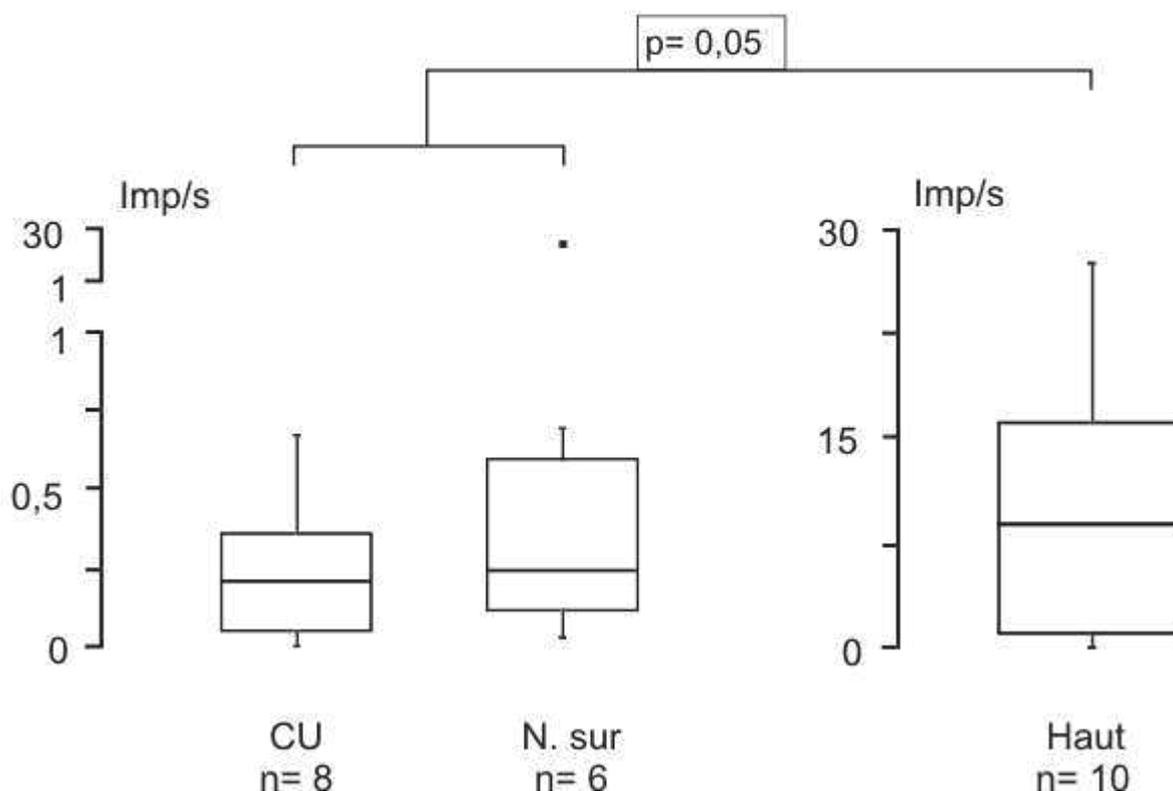


Abb.22

Vergleich der Höhe der Entladungsfrequenzen spontanaktiver nicht-regenerierter und in den N. suralis regenerierter oder in die Haut regenerierter A-Fasern, beide Zeitperioden zusammengelegt.

CU = Kreuzanastomose, N. sur = Nervus suralis distal der Kreuzanastomose, Haut = Haut im Innervationsgebiet des N. suralis. Mann-Whitney-U-Test.

3.4 Vergleich der funktionellen Eigenschaften von A- oder C-Fasern aus Filamenten der Hinterwurzeln L4/L5 und aus Filamenten des N. ischiadicus.

A-FASERN

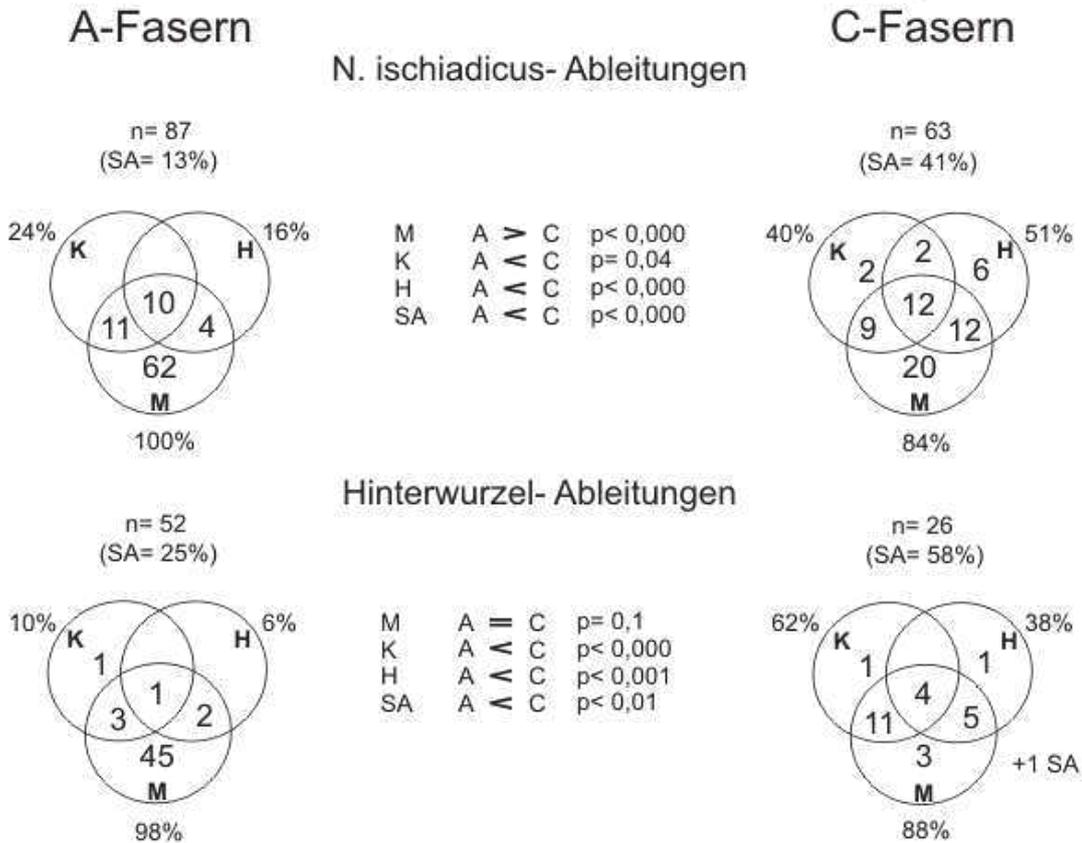
Es gab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl mechano- und/oder thermosensibler A-Fasern aus Filamenten des N. ischiadicus und solchen aus Filamenten der Hinterwurzeln L4/L5 (s. Abb. 23A). Bezogen auf die Anzahl spontanaktiver A-Fasern und die Höhe der Entladungsfrequenzen gab es ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen A-Fasern aus Filamenten des N. ischiadicus und der Hinterwurzeln L4/L5 (s. Abb. 23B).

C-FASERN

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen der Anzahl mechano- und/oder thermosensibler C-Fasern aus Filamenten des N. ischiadicus und solchen aus Filamenten der Hinterwurzeln L4/L5 (s. Abb. 23A). Anzahl und Entladungsfrequenz spontanaktiver C-Fasern aus den jeweiligen experimentellen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant (s. Abb. 23B).

Es gab hoch signifikante Unterschiede hinsichtlich der funktionellen Eigenschaften (Mechano-, Kälte-, Hitzesensibilität) (s. Abb. 19) und der Spontanaktivität zwischen A- und C-Fasern (s. Abb. 23A/B).

A Funktionelle Eigenschaften von Fasern aus N.ischiadicus- oder Hinterwurzel-Ableitungen



B Spontanaktivität von Fasern aus N. ischiadicus- oder Hinterwurzel-Ableitungen

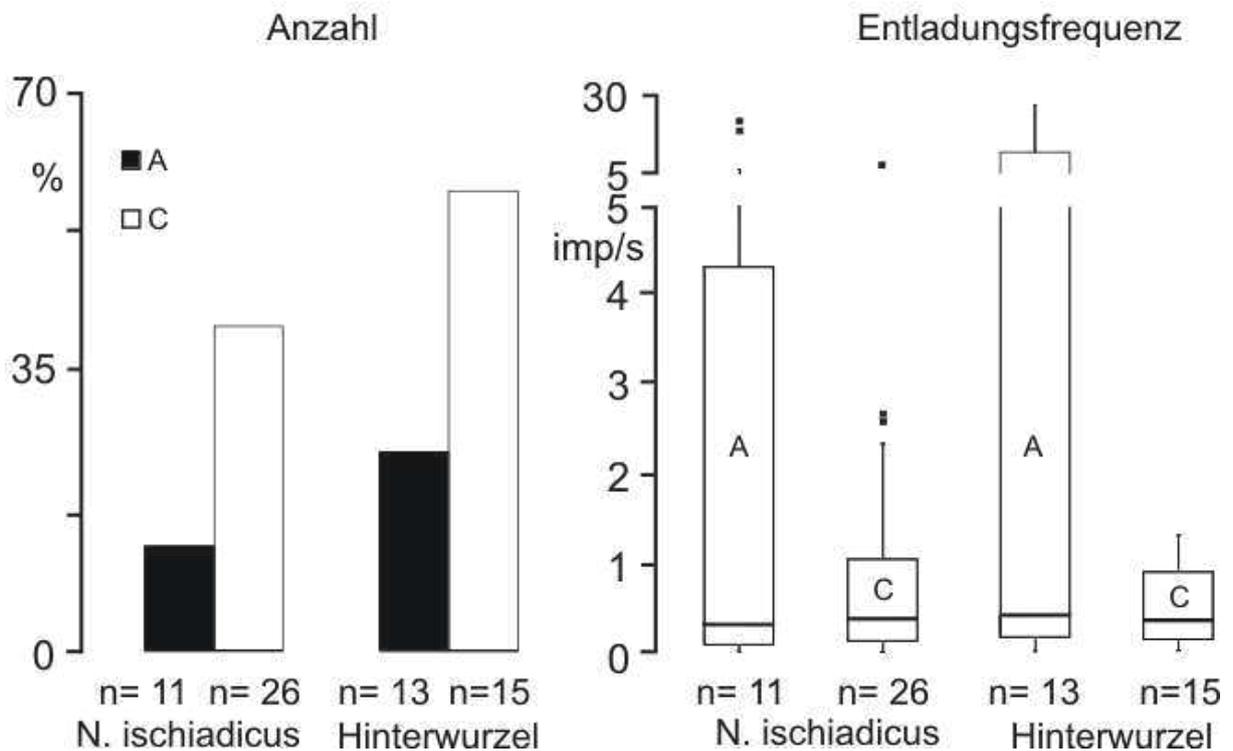


Abb.23

A: Vergleich funktioneller Eigenschaften von A- und C-Fasern aus N. ischiadicus- und Hinterwurzel-Ableitungen. Zwischen N. ischiadicus- und Hinterwurzel-Ableitungen gab es bei der Gruppe der A-Fasern sowie bei der Gruppe der C-Fasern keinen signifikanten Unterschied ihrer funktionellen Eigenschaften.

Die Gruppe der A-Fasern unterschied sich hoch signifikant von der Gruppe der C-Fasern.

M = Mechanosensibilität, K = Kältesensibilität, H = Hitzesensibilität, SA = Spontanaktivität, A>C = Ausprägung der getesteten Sensibilität bei A- häufiger als bei C-Fasern, A<C = Ausprägung geringer bei A-Fasern, A=C = Kein signifikanter Unterschied. exakter Fisher-Test, χ^2 -Test

B: Vergleich der Anzahl (links) und Entladungsfrequenz (rechts) spontanaktiver A- und C-Fasern aus N. ischiadicus- und Hinterwurzel-Ableitungen. Es gab keinen signifikanten Unterschied, weder bei der Anzahl spontanaktiver Fasern noch bei der Entladungsfrequenz dieser Fasern. A = A-Fasern, C = C-Fasern

3.5 Vergleich der funktionellen Eigenschaften von A- und C-Fasern 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose

A-FASERN

Es gab keinen signifikanten Unterschied der funktionellen Eigenschaften (Mechano-, Kälte- und Hitzesensibilität) und der Spontanaktivität von A-Fasern, die 20 Tage und A-Fasern, die 80 Tage nach Kreuzanastomose untersucht wurden (s. Abb. 24).

C-FASERN

Die funktionellen Eigenschaften (Mechano-, Kälte- und Hitzesensibilität) und die Spontanaktivität von C- Fasern, die 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose untersucht wurden, unterschieden sich nicht signifikant (s. Abb. 24).

Die Gruppe der A-Fasern unterschied sich in allen getesteten Sensibilitäten sowie der Spontanaktivität hoch signifikant von der Gruppe der C-Fasern.

Funktionelle Eigenschaften von A- und C-Fasern 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose

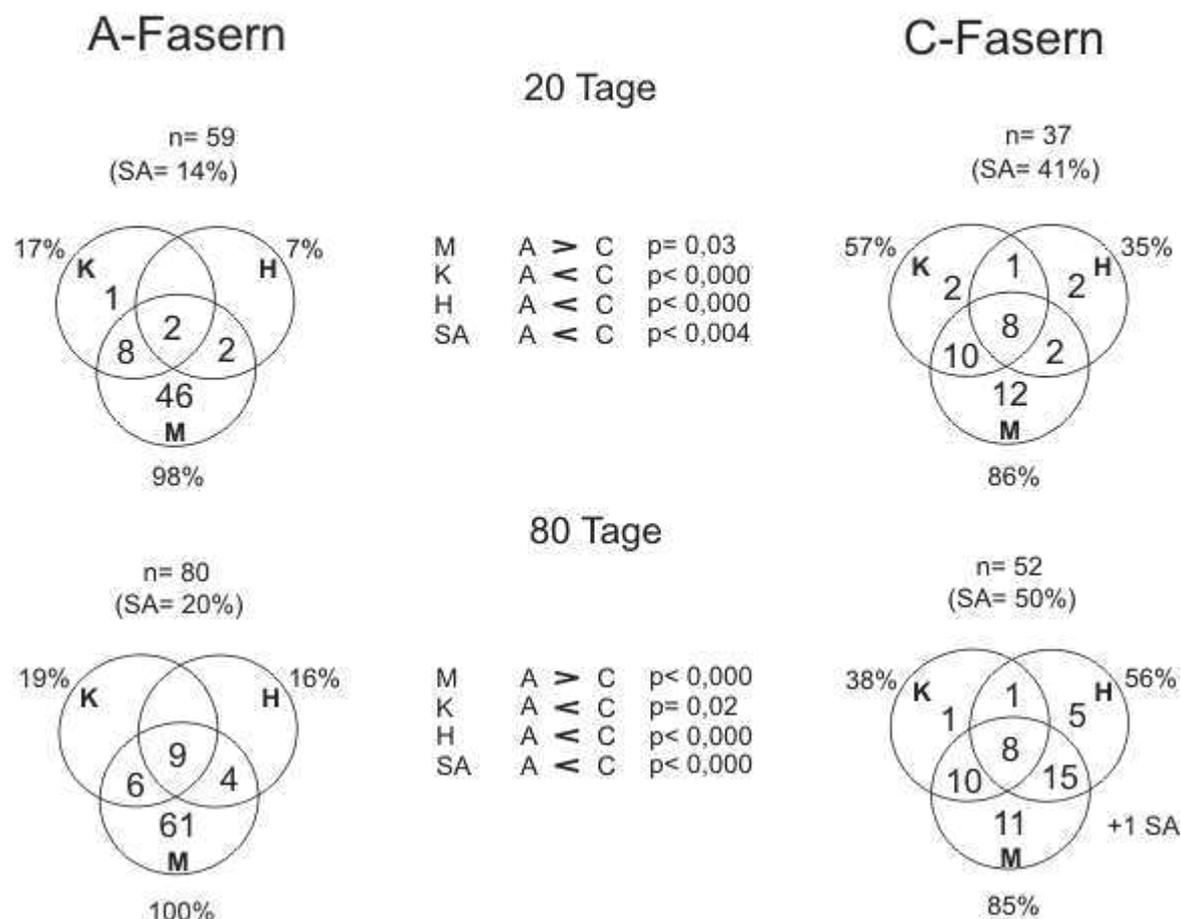


Abb. 24

Vergleich der funktionellen Eigenschaften von A- und C-Fasern 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose. Zwischen Ableitungen 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose gab es bei der Gruppe der A-Fasern sowie bei der Gruppe der C-Fasern keinen signifikanten Unterschied ihrer funktionellen Eigenschaften. Die Gruppe der A-Fasern unterschied sich hoch signifikant von der Gruppe der C-Fasern.

M = Mechanosensibilität, K = Kältesensibilität, H = Hitzesensibilität, SA = Spontanaktivität, A>C = Ausprägung der getesteten Sensibilität bei A- häufiger als bei C-Fasern, A<C = Ausprägung geringer bei A-Fasern. exakter Fisher-Test, χ^2 -Test

4. Diskussion

Die elektrophysiologischen Untersuchungen dieser Studie wurden an 34 erwachsenen Ratten durchgeführt. Aus 167 Filamenten wurden 260 A- und 180 C-Fasern elektrisch isoliert. 139 A- und 89 C-Fasern zeigten ektope Aktivität.

4.1 Ektope Aktivität von A- und C-Fasern

Circa 50 % der myelinisierten Fasern im N. gastrocnemius-soleus lateralis sind somatomotorische Fasern (Mitchell, 1983; Peyronnard *et al.*, 1986; Sittiracha & McLachlan, 1986); etwa 45 % der unmyelinisierten sind sympathisch postganglionär (Baron *et al.*, 1988). Folglich sind etwa die Hälfte der A- und C-Fasern afferent.

Geschädigte efferente Fasern zeigen keine ektope Aktivität ((Kirillova *et al.*, 2011a) Teliban *et al.* unveröffentlicht). In der vorliegenden Studie sind etwa 50 % der elektrisch identifizierten Fasern aus N. ischiadicus-Ableitungen entweder mechano- und/oder thermosensibel und/oder zeigen Spontanaktivität. Diese ektope Aktivität entwickelt sich kurz nach einer Nervenschädigung und ist 4-7 Tage nach Quetschläsion (Kirillova *et al.*, 2011a) bzw. 20 Tage nach Kreuzanastomose in fast allen Muskelafferenzen nachweisbar. Achtzig Tage nach Kreuzanastomose nimmt die Zahl der Muskelafferenzen mit ektoper Aktivität leicht ab. Eine Ursache könnte in der Kreuzanastomose liegen, bei der Muskelafferenzen in die Haut regenerieren. Sie exprimieren möglicherweise keine kutanen Rezeptoren, die auf thermische oder mechanische Stimulation der Haut reagieren. Ein Verlust rezeptiver Eigenschaften von Muskelafferenzen im Verlauf des Heilungsprozesses könnte eine weitere mögliche Ursache darstellen. Beides bedarf weiterer Untersuchungen.

4.1.1 Mechanosensibilität

In der vorliegenden Studie sind fast alle A- (99 %) und der größte Teil der C-Fasern (85 %) mit ektoper Aktivität mechanosensibel. Ihre Anzahl ist, vor dem Hintergrund der Zahlen intakter mechanosensibler Muskelafferenzen (Paintal, 1960; Iggo, 1961;

Franz & Mense, 1975; Mense & Stahnke, 1983; Mense, 1993), erwartungsgemäß hoch. Zwanzig und 80 Tage nach Kreuzanastomose sind ebenso viele A-Fasern mechanosensibel wie 4-7 Tage nach Quetschläsion. Versuche an Hautnerven zeigen ähnliche Ergebnisse. Die Anzahl mechanosensibler C-Fasern, 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose, ist höher als 4-7 Tage nach Quetschläsion (51 %) und ebenfalls höher als in geschädigten Hautnerven (etwa 50 %) (Gorodetskaya *et al.*, 2003; Gorodetskaya *et al.*, 2009; Jänig *et al.*, 2009; Kirillova *et al.*, 2011a).

Viele Autoren trennen intakte mechanosensible A- und C-Fasern je nach Höhe der Reizschwelle in hoch- und niederschwellige Fasern. Die niederschwelligen werden den nicht-nozizeptiven, wahrscheinlich zu einem Teil ergozeptiven (Adreani *et al.*, 1997; Kaufman & Hayes, 2002), die hochschwelligen den nozizeptiven Fasern zugeschrieben. Die meisten A-Fasern sind dehnungssensibel und im niederschwelligen, nicht-noxischen Bereich drucksensibel (Paintal, 1960; Hayes *et al.*, 2005). Circa 1 Drittel der dünn myelinisierten A-Fasern reagieren auf noxische Stimulation des Muskels (Mense & Meyer, 1985).

40 % der mechanosensiblen C-Fasern eines Muskelnervs zeigen eine Reizschwelle, die im nicht-noxischen, niederschwelligen Bereich liegt (Hoheisel *et al.*, 2005). Bis zu 60 % der C-Fasern sind durch noxische Stimuli, wie starker Druck auf den Muskel, Muskelquetschung oder starke Muskeldehnung bzw. tetanische Kontraktion, erregbar (Franz & Mense, 1975; Hoheisel *et al.*, 2005).

Für die Unterscheidung zwischen hoch- und niederschwelligen A- und C-Fasern bei direkter Stimulation eines Muskelnervs, gibt es zur Zeit keine Untersuchung. Bei Stimulation des Muskels durch Quetschung mit einer abgerundeten Pinzette legen Hoheisel *et al.* die Trennung bei 100 mN fest, mit etwa 40 % der mechanosensiblen C-Fasern im niederschwelligen Bereich (Hoheisel *et al.*, 2005). Bei Stimulation der Haut nach Kreuzanastomose des N. gastrocnemius-soleus an den N. suralis legen Lewin und McMahon die Trennung bei 10 mN fest, mit etwa 80 % der mechanosensiblen A-Fasern im niederschwelligen Bereich (Lewin & McMahon, 1991). Bei Stimulation des geschädigten N. suralis legen Grossmann *et al.* die Trennung bei ≤ 10 und ≥ 20 mN fest, mit ca. 60 % der mechanosensiblen A-Fasern im niederschwelligen Bereich und ca. 50 % der mechanosensiblen C-Fasern im niederschwelligen Bereich (Gorodetskaya *et al.*, 2009; Grossmann *et al.*, 2009a; Jänig *et al.*, 2009).

Nicht regenerierte mechanosensible A- und C-Fasern der vorliegenden Studie zeigen eine zweigipfelige Reizschwellenverteilung auf mechanische Reizung der Kreuzanastomose (s. Abb. 10). Dies könnte der oben beschriebenen Einteilung in hoch- und niederschwellige mechanosensible Fasern entsprechen. Mechanosensible Fasern mit rezeptiven Feldern am Nervus suralis zeigen höhere Reizschwellen ohne zweigipfelige Reizschwellenverteilung. Möglicherweise ist das ein Artefakt, da der Nervus suralis trotz chirurgischer Freilegung von mehr Perineurium und Faszie umgeben ist, als die freiliegende Kreuzanastomose. Mechanosensible Fasern bedürfen somit wahrscheinlich einer stärkeren Stimulation als solche die von der Kreuzanastomose stimuliert werden können. Die zur Haut regenerierten Fasern (fast ausschließlich A-Fasern) weisen ebenfalls keine klare zweigipfelige Reizschwellenverteilung auf. Das liegt unter anderem an der Mechanosensibilität auf Haarfollikelstimulation und Quetschung der Haut.

Die Reizschwellen von 94 % der hier untersuchten mechanosensiblen C-Fasern liegen bei ≤ 10 mN, die von 80 % der A-Fasern – vergleichbar mit den Ergebnissen von Lewin und McMahon (Lewin & McMahon, 1991) – bei ≤ 10 mN. Man könnte daraus folgern, dass die mechanischen Reizschwellen in geschädigten Muskelafferenzen als Folge der Schädigung sinken, und niedriger sind als die in intakten Muskelafferenzen oder in geschädigten Hautafferenzen, allerdings bei fraglich vergleichbaren Testbedingungen.

Eine Erklärung könnte in einer läsionsbedingten Erhöhung der peripheren Mechanosensibilität in geschädigten Muskelafferenzen liegen (s. Abb. 1 I und Absatz 1.3 1.) und eventuell im Zusammenhang mit dem Phänomen der Hyperalgesie stehen.

Eine Dehnung des Nervs durch die mechanische Testung mit von Frey Filamenten, die die meist dehnungssensiblen Muskelafferenzen erregen könnte, erklärt nur bedingt die niedrigen Reizschwellen, da die meisten Fasern schon auf kleinste mechanische Stimuli reagieren. Von Frey Filamente mit geringer Stärke sind zu schwach, den Nerven zu dehnen.

4.1.2 Thermische Sensibilität (Kälte-/Hitzesensibilität)

Vor allem C-Fasern zeigen thermische Sensibilität. Drei Viertel der C- aber nur 1 Viertel der A-Fasern in der vorliegenden Studie sind thermosensibel. Ihre Reizschwellen liegen zumeist im noxischen Bereich. A-Fasern mit Kälte- und/oder Hitzesensibilität sind zusätzlich mechanosensibel (99 %). Der überwiegende Teil der C-Fasern mit Kälte- und/oder Hitzesensibilität ist ebenfalls zusätzlich mechanosensibel, einige dieser Fasern (18 %) sind ausschließlich kälte- und/oder hitzesensibel.

Thermische Sensibilität in intakten A-Fasern, die die Muskulatur innervieren, ist kaum untersucht worden. Bis dato wurden nur 3 hitzesensible und 3 kältesensible A-Fasern (bei insgesamt 10 untersuchten A-Fasern) beschrieben, die auf Erwärmung bzw. Abkühlung des Muskels im physiologischen Bereich reagierten (Hertel *et al.*, 1976). Vermutlich als Folge der Nervenschädigung sind etwa 3 Viertel der A-Fasern, 4-7 Tage nach Quetschläsion eines Muskelnerfs, hitze- und/oder kältesensibel (Kirillova *et al.*, 2011a). 20 Tage nach Kreuzanastomose sind es deutlich weniger. Daraus lässt sich ableiten, dass sich die thermische Sensibilität von A-Fasern eines Muskelnerfs in einem gewissen Zeitraum nach Nervenschädigung entwickelt und auch wieder zurückbildet. Inwiefern diese vorübergehend hohe thermische Sensibilität geschädigter A-Fasern eines Muskelnerfs mit Phänomenen neuropathischer Schmerzen zusammenhängt, bedarf weiterer Untersuchungen.

Thermische Sensibilität intakter C-Fasern eines Muskelnerfs ist gut untersucht worden. 19 % der C-Fasern sind durch thermische Reize im physiologischen Bereich von 20 °C bis 40 °C erregbar (Mense & Meyer, 1985). Bis zu 60 % der C-Fasern sind durch Reize im potentiell schädlichen Bereich von >40 °C und <20 °C erregbar (Kumazawa & Mizumura, 1977).

4-7 Tage nach Nervenläsion sind über 80 % der geschädigten C-Fasern hitze- und/oder kältesensibel (Kirillova *et al.*, 2011a), 20 oder 80 Tage nach Kreuzanastomose sind es etwa 3 Viertel. Ihre Reizschwellen liegen meist im noxischen Bereich. Daraus lässt sich ersehen, dass sich in Folge einer Nervenläsion sowohl die Anzahl, als auch die Reizschwellen der thermosensiblen C-Fasern im Gegensatz zu denen der A-Fasern nicht verändern.

Die meist hohen Reizschwellen der hier untersuchten thermisch erregbaren C-Fasern liegen im Bereich von $>40\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $<20\text{ }^{\circ}\text{C}$ und geben Hinweise darauf, dass der Großteil dieser C-Fasern nozizeptiv ist. Die meisten dieser Fasern sind gleichzeitig mechanisch erregbar und – zieht man Studien zur chemischen Sensibilität von C-Fasern hinzu (Kumazawa & Mizumura, 1977; Hanna & Kaufman, 2003; Hoheisel *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2008) – wahrscheinlich auch chemisch erregbar. Nozizeptive C-Fasern sind folglich polymodal erregbar. Ob die vermeintlich nozizeptiven geschädigten C-Fasern, mit ihren hohen thermischen Reizschwellen und meist extrem niedrigen mechanischen Reizschwellen, in Zusammenhang mit Allodynie und Hyperalgesie stehen, ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die kältesensiblen C-Fasern eines Muskelnervs zeigen viele Analogien zu kutanen kältesensiblen C-Fasern vom Typ 2 (Grossmann *et al.*, 2009b), die vermutlich nozizeptiv sind. Der Median der Reizantwort kältesensibler C-Fasern der vorliegenden Studie liegt, bei einem Kälte-Stimulus von $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, bei 1,3 Hz. Er ist vergleichbar mit der Reizantwort kutaner kältesensibler C-Fasern vom Typ 2. Die untersuchten kältesensiblen C-Fasern haben hohe Reizschwellen. Gleichzeitig sind die meisten dieser Fasern mechanosensibel. Dies ähnelt ebenfalls den Charakteristika kutaner kältesensibler C-Fasern vom Typ 2 (Grossmann *et al.*, 2009b; Jänig *et al.*, 2009). Temperaturen von $<20\text{ }^{\circ}\text{C}$ kommen unter physiologischen Bedingungen im Muskel, im Gegensatz zur Haut, praktisch nicht vor. Möglicherweise ist hochschwellige Kältesensibilität in Muskelafferenzen ein Charakteristikum nozizeptiver Afferenzen. Kutane kältesensible C-Fasern vom Typ 2 sind nicht durch Menthol erregbar (Teliban *et al.* unveröffentlicht). Ob die vermeintlich nozizeptiven kältesensiblen C-Fasern des Muskelnervs auf Menthol reagieren, bleibt zu untersuchen.

Die Entladungsmuster der thermosensiblen C-Fasern der vorliegenden Studie sind jeweils einem gewissen Typ zuzuordnen. Hitzesensible C-Fasern reagieren phasisch auf den Hitzereiz. Die höchste Aktivität ist innerhalb der ersten 5 Sekunden, während des Temperaturanstiegs, zu sehen. Kältesensible C-Fasern antworten statisch auf den Kältereiz. Sie zeigen lediglich eine sehr kleine phasische Komponente zu Beginn des Stimulus. Diese Entladungsmuster werden von allen thermosensiblen C-Fasern gezeigt. Sogar Fasern, die sowohl kälte- als auch hitzesensibel sind, zeigen die entsprechenden Entladungsmuster. Ob eine besondere Kombination von Rezeptoren hinter dieser Beobachtung steckt, bleibt unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.1.3 Spontanaktivität

In in vivo Experimenten an intakten Muskel-Afferenzen wird häufig Spontanaktivität beobachtet. Etwa die Hälfte (je nach Studie zwischen 33 % und 90 %) der intakten C- und viele der intakten A-Fasern zeigen Spontanaktivität von ≤ 1 Imp/s (Franz & Mense, 1975; Kumazawa & Mizumura, 1977; Berberich *et al.*, 1988). Einige Stunden nach Nervenläsion eines Muskelnervs sind circa 50 % der C-Fasern mit ektopter Aktivität, aber fast keine A-Fasern, spontanaktiv. 4-7 Tage nach Nervenläsion sind etwa die Hälfte der A- und C-Fasern mit ektopter Aktivität spontanaktiv (Kirillova *et al.*, 2011a). 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose zeigen 46 % der C-Fasern und 17 % der A-Fasern Spontanaktivität.

Der Median der Entladungsfrequenz geschädigter spontanaktiver A-Fasern 4-7 Tage nach Quetschläsion liegt mit 9,5 Imp/s (Kirillova *et al.*, 2011a) deutlich über der Entladungsfrequenz intakter spontanaktiver A-Fasern (≤ 1 Imp/s). 20 oder 80 Tage nach Kreuzanastomose liegt der Median der Entladungsfrequenz der meisten spontanaktiven A-Fasern bei ≤ 1 Imp/s (65 %), also im Bereich der intakten spontanaktiven A-Fasern. Etwa ein Viertel zeigen Spontanaktivität mit Entladungsfrequenzen ≥ 10 Imp/s (23 %), also im Bereich der geschädigten spontanaktiven A-Fasern 4-7 Tage nach Quetschläsion. Diese spontanaktiven Muskelafferenzen mit hoher Entladungsfrequenz sind, mit einer Ausnahme, alle in die Haut regeneriert. Ob und inwiefern die Haut eine Rolle bei der Höhe der Entladungsfrequenz spontanaktiver A-Fasern spielt, bleibt an dieser Stelle unklar.

In Folge einer Nervenläsion scheinen Anzahl und Entladungsfrequenz spontanaktiver A-Fasern eines Muskelnervs zuzunehmen und während der regenerativen Phase wieder abzunehmen. 80 Tage nach Kreuzanastomose feuern dennoch etwa 1 Viertel der spontanaktiven A-Fasern hoch frequent. Inwiefern die Spontanaktivität geschädigter A-Fasern zur Entstehung neuropathischer Schmerzen beiträgt ist nicht klar. Devor stellt in einem Review die Hypothese auf, dass die ektopte Aktivität spontanaktiver A-Fasern möglicherweise eine größere Rolle bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen spielt, als bisher angenommen worden ist (Devor, 2009).

Der Median der Entladungsfrequenzen spontanaktiver C-Fasern eines Muskelnervs liegt einige Stunden nach Nervenläsion bei 0,5 Imp/s und 4-7 Tage nach Nervenläsion bei 0,2 Imp/s (Kirillova *et al.*, 2011a). 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose liegt der Median der Entladungsfrequenz spontanaktiver C-Fasern bei 0,38 Imp/s. Etwa 20 % entladen mit $\geq 1,0$ Imp/s. Anzahl und Entladungsfrequenz spontanaktiver C-Fasern variieren einige Stunden, 4-7, 20 oder 80 Tage nach Nervenschädigung eines Muskelnervs insgesamt nur geringfügig und sind in etwa vergleichbar mit den Ergebnissen bei Untersuchungen an intakten C-Fasern. In Folge der Nervenschädigung eines Muskelnervs kommt es möglicherweise zu keiner oder nur zu einer geringen Veränderung der Spontanaktivität in C-Fasern. Es bleibt offen, ob Spontanaktivität in geschädigten C-Fasern wirklich eine so große Rolle bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen spielt, wie bisher angenommen (s. 1.3). Michaelis und Liu zeigten 6 bis 12 Tage nach peripherer Nervenläsion mit oder ohne Beteiligung eines Muskelnervs, dass ein kleiner Teil (etwa 20 %, wobei die Höhe der Entladungsfrequenz durch die Größe der Läsion beeinflusst wird) der Muskelafferenzen mit myelinisierten Axonen (A-Fasern) Spontanaktivität mit Ursprung im Spinalganglion hat. Bei kutanen Afferenzen und in unmyelinisierten Muskelafferenzen (C-Fasern) konnte dies nicht nachgewiesen werden (Michaelis *et al.*, 2000a). Sowohl 4-7 (Kirillova *et al.*, 2011a), als auch 20 oder 80 Tage nach Nervenläsion kann bezüglich der Anzahl und Entladungsfrequenz spontanaktiver A- und C-Fasern kein signifikanter Unterschied zwischen Hinterwurzel-Ableitungen und N. ischiadicus-Ableitungen gefunden werden (s. Abb. 20B). Diese Feststellung gibt einen indirekten Hinweis darauf, dass das Spinalganglion, entgegen der Beschreibung in Punkt 1.3.2, keinen oder, wie von Michaelis *et al.* beschrieben, nur einen geringen Einfluss auf die Spontanaktivität in geschädigten A- und C-Fasern eines Muskelnervs hat. Spontanaktivität in geschädigten Muskelafferenzen scheint ihren Ursprung überwiegend in der Peripherie distal des Spinalganglions zu haben.

4.2 Vergleich der funktionellen Eigenschaften und Leitungsgeschwindigkeiten geschädigter A- und C-Afferenzen

Afferente Fasern eines Muskelnervs werden in schnell leitende, dick myelinisierte A α -/A β -Fasern (Afferenzen von Muskelspindeln und Golgi-Sehnenorganen), in leicht

myelinisierte A δ -Fasern mit mittlerer Leitungsgeschwindigkeit, und unmyelinisierte, langsam leitende C-Fasern unterteilt (Speckmann, 2005). A δ - und C-Fasern eines Muskelnervs sind über ihre polymodalen rezeptiven Eigenschaften (mechanische, thermische, chemische Sensibilität) in diverse Funktionen des Muskels integriert (Kumazawa & Mizumura, 1977; Mense & Stahnke, 1983; Kaufman & Hayes, 2002; Mense, 2003; Reinohl *et al.*, 2003; Hoheisel *et al.*, 2005; Proske & Gandevia, 2009). Es ist zu erwarten, dass sich langsam leitende A-Fasern (A δ) und C-Fasern funktionell ähneln und deutlich von schnell leitenden A-Fasern (A α /A β) unterscheiden.

Die vorliegende Studie kann keinen Unterschied, in Bezug auf Mechano-, Kälte- oder Hitzesensibilität sowie Spontanaktivität, zwischen A-Fasern mit Leitungsgeschwindigkeiten <20 m/s und solchen mit ≥ 20 m/s aufzeigen. Folglich wird ausschließlich zwischen A- und C- Muskelafferenzen unterschieden.

Die geschädigten A-Fasern unterscheiden sich in Anzahl und Muster aller getesteten Sensibilitäten (Mechano-, Kälte-, Hitzesensibilität) und der Spontanaktivität hoch signifikant von den geschädigten C-Fasern. Mechanosensibilität ist häufiger in A-Fasern, Kälte- und Hitzesensibilität sowie Spontanaktivität häufiger in C-Fasern zu beobachten.

Die Verteilung der Leitungsgeschwindigkeiten von Fasern, die aus Filamenten des N. ischiadicus isoliert worden sind, zeigt eine Unterteilung in A- oder C-Fasern (s. Abb. 7 oben). Bei Fasern aus Filamenten der Hinterwurzeln L4/L5 sind drei Gruppen zu erkennen (s. Abb. 7 unten). Die erste Gruppe ist eindeutig den C-Fasern zuzuordnen, die dritte eindeutig den A-Fasern. Die mittlere Gruppe mit Leitungsgeschwindigkeiten $>1,5$ m/s und <12 m/s hat wahrscheinlich einen unmyelinisierten, langsam leitenden, proximal des Spinalganglions gelegenen und einen myelinisierten, schnell leitenden, distal des Spinalganglions gelegenen Anteil (Mense & Meyer, 1985; Lawson & Waddell, 1991). Bei distaler Stimulation und Ableitung an der Hinterwurzel, addieren sich die Leitungsgeschwindigkeiten zu einer mittleren Leitungsgeschwindigkeit. Bei N. ischiadicus-Ableitungen wird distal des Spinalganglions sowohl stimuliert als auch, mehrere Millimeter proximal hiervon, abgeleitet. Auf Grund dessen ist eine Vermischung von Leitungsgeschwindigkeiten unwahrscheinlich und die mittlere Gruppe entfällt (s. Abb. 7 oben).

Waddell & Lawson teilten afferente Fasern anhand ihrer Leitungsgeschwindigkeiten in A- (>2 m/s) und C- Fasern (<2 m/s) ein. Sie konnten nur bei Ableitungen von

Neuronen im Spinalganglion L6 und nicht bei Ableitungen von Neuronen in den Spinalganglien L4/L5 eine natürliche Unterteilung von A-Fasern in $A\alpha$ -/ $A\beta$ - (>12 m/s) und $A\delta$ - (>2 m/s <12 m/s) aufzeigen (Waddell *et al.*, 1989; Lawson & Waddell, 1991). Analog zu Waddell & Lawson und Kirillova *et al.* (Waddell *et al.*, 1989; Kirillova *et al.*, 2011a) und aufgrund der Verteilung der Leitungsgeschwindigkeiten sowie anhand der funktionellen Eigenschaften werden die Fasern der vorliegenden Studie in A- (>2 m/s) oder C-Fasern (<2 m/s) eingeteilt.

4.3 Regeneration

Die funktionellen Eigenschaften von geschädigten A- und C-Fasern eines Muskelnerfs, insbesondere in Hinblick auf die Regeneration, sind bis dato nicht quantitativ elektrophysiologisch untersucht worden.

In der vorliegenden Studie beträgt die Distanz zwischen Kreuzanastomose und Haut im Mittel 42 mm. Bei einer normalen Regenerationsgeschwindigkeit von 1-4 mm/d (Sunderland, 1978) ist 20 Tage nach Kreuzanastomose mit einer fortgeschrittenen, aber nicht abgeschlossenen, 80 Tage nach Kreuzanastomose mit einer abgeschlossenen Regeneration zu rechnen.

Erwartungsgemäß sind die meisten A-Fasern 20 Tage nach Kreuzanastomose durch mechanische und/oder thermische Stimulation des N. suralis erregbar. Wie schon von Lewin und McMahon beschrieben (Lewin & McMahon, 1991) sind 80 Tage nach Kreuzanastomose die meisten A-Fasern durch mechanische und/oder thermische Stimulation der Haut erregbar.

Erstaunlicher Weise ist die Mehrheit der C-Fasern (88 %), sowohl 20 als auch 80 Tage nach Kreuzanastomose, ausschließlich von der Stelle der Kreuzanastomose mechanisch oder thermisch erregbar (s. Abb. 17A). Distal der Kreuzanastomose sind fast keine C-Fasern, weder durch mechanische noch durch thermische oder elektrische Stimulation, (s. Abb. 17B) erregbar.

Die Regenerationsbereitschaft scheint vom Grad der Myelinisierung abhängig zu sein. Die meisten A-Fasern regenerieren, C-Fasern nicht. Auch innerhalb der Gruppe der A-Fasern scheint die Regenerationsbereitschaft vom Grad der Myelinisierung abzuhängen; die Leitungsgeschwindigkeiten von nicht-regenerierten A-Fasern sind signifikant niedriger als die der regenerierten (s. Abb. 18B).

Die fehlende Regenerationsbereitschaft geschädigter C-Fasern ist unerwartet. Ob und in welchem Umfang sie mit neuropathischen Schmerzen in Zusammenhang steht, ist unklar.

Zwischen regenerierten und nicht-regenerierten A-Fasern findet sich kein statistisch signifikanter Unterschied der funktionellen Eigenschaften wie Mechano-, Kälte- und Hitzesensibilität. Die Regeneration scheint also keinen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften zu haben (s. Abb. 18A).

Die Entladungsfrequenz in zur Haut regenerierten spontanaktiven A-Fasern ist deutlich höher als in nicht-regenerierten. Die regenerierten A-Fasern sind regulär spontanaktiv und haben überwiegend Entladungsfrequenzen von $\geq 10\text{Hz}$ (s. Abb. 19). Aufgrund der Kreuzanastomose kommt es zu einer anatomisch unphysiologischen Innervation der Haut. Experimentell bedingt wird die Haut in einen Metallring eingespannt und somit gedehnt. Dies könnte zu einer tonischen Aktivierung der extrem mechanosensiblen A-Fasern führen. Die rezeptiven Felder der regenerierten spontanaktiven A-Fasern lagen aber alle im Bereich der Ferse des Versuchstiers und somit mehrere Millimeter vom Metallring entfernt. Ein experimentelles Artefakt lässt sich dennoch nicht vollständig ausschließen.

Ob die hier beobachteten hohen Entladungsfrequenzen von regenerierten A-Fasern auf Versuchsmodelle ohne Kreuzanastomose übertragbar sind, bleibt ungeklärt und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen vermuten, dass A-Muskelafferenzen mit hoher Wahrscheinlichkeit einige Zeit nach Nervenschädigung ihr Zielgewebe reinnervieren. Einige dieser Fasern sind hoch spontanaktiv. Sie könnten eine Schlüsselfunktion bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen einnehmen.

Die polymodalen, häufig auch spontanaktiven C-Fasern erreichen ihre ursprünglichen rezeptiven Felder nicht. Diese C-Fasern mit ektopter Aktivität sind ohne physiologischen Reiz aktiv. Sie aktivieren ihrerseits Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks (s. Abb. 1). Sie könnten an der Entstehung neuropathischer Schmerzen beteiligt sein.

Es stellt sich die Frage, ob diese Beobachtungen auch auf andere experimentelle Modelle ohne definierte mechanische Nervenschädigung übertragbar sind, zum Beispiel auf Experimente mit metabolisch oder ischämisch geschädigten Nerven (zum Bsp. in Folge einer systemischen Erkrankung wie Diabetes mellitus).

4.4 Vergleich der funktionellen Eigenschaften von Muskelafferenzen aus N. ischiadicus- und Hinterwurzel-Ableitungen 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose

Die getesteten Sensibilitäten (Mechanosensibilität, Kältesensibilität, Hitzesensibilität) und die Spontanaktivität von Fasern aus N. ischiadicus- und Fasern aus Hinterwurzel-Ableitungen, sowie von Fasern, die 20 oder 80 Tage nach Kreuzanastomose untersucht wurden, unterscheiden sich nicht. Weder der Ort der elektrophysiologischen Ableitung, noch der Zeitpunkt nach Kreuzanastomose scheinen demnach einen Einfluss auf Mechano-, Kälte- oder Hitzesensibilität sowie auf Spontanaktivität zu haben.

Die funktionellen Eigenschaften und die Spontanaktivität von Muskelafferenzen, die akut oder vor wenigen Tagen geschädigt worden sind, unterscheiden sich von denen der Muskelafferenzen 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose (siehe Punkt 4.1.1, 4.1.2, 4.1.3). Im hier beobachteten chronischen Läsionsmodell bleiben die funktionellen Eigenschaften und die Spontanaktivität von Muskelafferenzen im zeitlichen Verlauf konstant.

Es stellt sich nun die Frage, ob

- a) die Aktivität in akut geschädigten Afferenzen bereits entscheidend in der Kette der Ereignisse zur Entstehung neuropathischer Schmerzen ist, oder
- b) im chronischen Modell die über Wochen und Monate konstante Funktion der geschädigten Afferenzen mit teilweise gesteigerter peripherer Sensibilität und/oder erhöhter Spontanaktivität nach wie vor eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen spielt, oder
- c) neuropathische Schmerzen im chronischen Modell ohne periphere Aktivität bestehen.

Diese Frage wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Devor, 2006b; Devor, 2006a, 2009). Das Spinalganglion scheint, betrachtet man die Ergebnisse der vorliegenden Studie, keinen oder nur einen geringen Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften und die Spontanaktivität geschädigter Muskelafferenzen zu haben.

4.5 Molekulare Mechanismen der getesteten Sensibilitäten und der Spontanaktivität

Mechanosensibilität

Der molekulare Apparat der Mechanosensibilität ist größtenteils bisher nicht verstanden. Er ist Bestandteil vieler neuerer Studien, die zu einem Großteil am Nematoden (Wurm) *Caenorhabditis elegans* durchgeführt werden (Bounoutas & Chalfie, 2007). Mechanosensible Fasern eines Muskelnervs haben viele Funktionen (Druck-, Dehnungssensibilität, Ergozeption, Nozizeption). Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass es zahlreiche unterschiedliche mechanorezeptive Proteine in der Membran der Axone mechanosensibler Neurone gibt.

Kältesensibilität

Kältesensibilität entsteht unter anderem durch die Aktivierung von Ionenkanälen vom „Transient Receptor Potential“ Typ mit Menthol-Sensibilität, TRPM8, im noxischen Bereich durch eine Aktivierung von TRP-Ionenkanälen vom Typ Ankyrin 1, TRPA1, mit Zimtaldehyd- und Senfölsensibilität (Belmonte & Viana, 2008). In Untersuchungen an geschädigten Hautnerven sind 2 Typen kältesensibler kutaner Fasern beschrieben (Grossmann *et al.*, 2009b). Typ 1 Fasern sind fast ausschließlich kältesensibel und reagieren auf Applikation von Menthol (Teliban *et al.* unveröffentlicht). Typ 2 Fasern sind wahrscheinlich nozizeptiv. Sie sind zusätzlich zu ihrer Kältesensibilität meist mechano- und/oder hitzesensibel und nicht durch Menthol erregbar (Teliban *et al.* unveröffentlicht). Die meisten kältesensiblen Fasern eines Muskelnervs haben funktionell viel Ähnlichkeit mit kutanen kältesensiblen Fasern vom Typ 2. Es gilt zu prüfen, ob muskuläre kältesensible Fasern durch Applikation von Menthol, ähnlich der kutanen kältesensiblen Fasern vom Typ 1, erregbar sind, oder, ähnlich der Typ 2 Fasern nicht auf Menthol reagieren. Neuere unveröffentlichte Daten zeigen, dass spontanaktive kältesensible A-Fasern eines Muskelnervs durch Menthol gehemmt, spontanaktive kältesensible C-Fasern durch Menthol aktiviert werden (Kirillova & Jänig, unveröffentlicht). Die Sensibilität auf

Zimtaldehyd und Senföl könnte ein Hinweis auf Beteiligung anderer Ionenkanäle, wie TRPA1, sein.

Hitzesensibilität

Hitzesensibilität entsteht unter anderem durch die Aktivierung von Capsaicin-sensiblen TRP Ionenkanälen vom Vanilloid Typ, TRPV1 (Belmonte & Viana, 2008). Etwa die Hälfte der intakten Muskel C-Afferenzen können durch Applikation von Capsaicin erregt werden (Hoheisel *et al.*, 2004). Diese Zahl entspricht der Anzahl geschädigter hitzesensibler C-Fasern der vorliegenden Studie. Es gilt zu prüfen, ob geschädigte A- und C-Fasern eines Muskelnervs durch Applikation von Capsaicin oder anderer Agonisten erregbar sind. Neuere unveröffentlichte Daten zeigen, dass Capsaicin fast alle C-Fasern und einige A-Fasern eines geschädigten Muskelnervs aktiviert und ihre Hitzesensibilität hemmt (Kirillova & Jänig, unveröffentlicht).

Spontanaktivität

In Folge einer Schädigung im Nervensystem kommt es zu Veränderungen der Ionenkanalexpression in einzelnen Neuronen (Sleeper *et al.*, 2000; Hains *et al.*, 2005). Eine Veränderung der Zusammenstellung von Ionenkanälen, insbesondere der Natrium- und Kalium-Kanäle, führt im *in vitro*-Modell (Amir *et al.*, 2002) und in der mathematischen Simulation (Kovalsky *et al.*, 2009) zur Entstehung von Spontanaktivität.

Die genaue Zusammenstellung von Ionenkanälen in geschädigten spontanaktiven afferenten Neuronen ist unklar. Wahrscheinlich ist eine Vielzahl von Kanälen an der Entstehung von Spontanaktivität beteiligt. Insbesondere Tetrodotoxin-sensible Natriumkanäle vom Typ $Na_v1.3$ und $Na_v1.7$, sowie Tetrodotoxin-resistente Natriumkanäle vom Typ $Na_v1.8$ und $Na_v1.9$ scheinen eine Rolle zu spielen (Amir *et al.*, 2006; Cummins *et al.*, 2007; Kirillova *et al.*, 2011b). Lidocain, als Antagonist an spannungsgesteuerten Natriumkanälen, hemmt zwar dosisabhängig und insbesondere lokal appliziert die Spontanaktivität in einigen Muskelafferenzen, aber nicht in allen (Kirillova *et al.*, 2011b). Die Betrachtung nur einzelner Ionenkanäle oder Ionenkanalgruppen, in der Hoffnung eine wirksame Therapie bei neuropathischen Schmerzen zu finden, ist vermutlich nicht zielbringend. Vielmehr ist

vor dem Hintergrund der hier erhobenen Daten zunächst zu prüfen, inwiefern und in welchem Ausmaß Spontanaktivität in geschädigten Muskelafferenzen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen eine Rolle spielt.

5. Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden experimentellen Studie an adulten Ratten wurden die funktionellen Eigenschaften geschädigter Muskelafferenzen, 20 und 80 Tage nach Kreuzanastomose des proximalen Teils des durchtrennten N. gastrocnemius-soleus lateralis an den distalen Stumpf des durchtrennten N. suralis, untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass nahezu alle afferenten A- und C-Fasern ektope Aktivität entwickeln.

Bei den getesteten Sensibilitäten und der Spontanaktivität zeigten sich nur wenige Unterschiede zu intakten Muskelafferenzen. Verglichen mit den Daten 4-7 Tage nach Nervenschädigung (Kirillova *et al.*, 2011a) konnte bei A-Fasern ein Rückgang der thermischen Sensibilität, insbesondere der Kältesensibilität, beobachtet werden. C-Fasern zeigten sich diesbezüglich unverändert. Die Spontanaktivität von nicht regenerierten A- und C-Fasern nahm im Verlauf ab. Lediglich die Gruppe der zur Haut regenerierten A-Fasern zeigte eine deutlich erhöhte Entladungsfrequenz.

A-Fasern regenerierten in den N. suralis und zur Haut, C-Fasern hingegen kaum.

Aus den Ergebnissen der Studie ließ sich folgern, dass der regenerative Prozess vermutlich keinen Einfluss auf Mechano-, Kälte- oder Hitzesensibilität hat. Außerdem ergab sich, dass der Einfluss des Spinalganglions auf die getesteten Sensibilitäten und insbesondere auf die Spontanaktivität zu vernachlässigen ist.

Zusammenfassend lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. 20 Tage nach Kreuzanastomose sind nahezu alle afferenten A- und C-Fasern des N. gastrocnemius-soleus lateralis ektop aktiv. Sie sind mechano-, kälte- und/oder hitzesensibel und/oder spontanaktiv.
2. 80 Tage nach Kreuzanastomose verringert sich die Anzahl von A- und C-Fasern mit ektopter Aktivität.
3. Der Ort der elektrophysiologischen Ableitung (N. ischiadicus bzw. Hinterwurzel L4/L5) und der Zeitpunkt der Untersuchung nach Kreuzanastomose (20 bzw. 80 Tage) haben keinen signifikanten Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften (Mechano-, Kälte-, Hitzesensibilität, Spontanaktivität).
4. Mechanosensibilität findet sich häufiger in A- als in C-Fasern. Fast alle A- und die meisten C-Fasern sind mechanosensibel. Die Reizschwellen der mechanosensiblen Afferenzen sind sehr niedrig.
5. Die Hälfte der C-Fasern mit ektopter Aktivität, aber deutlich weniger A-Fasern zeigen Kälte- und/oder Hitzesensibilität.
6. Fast die Hälfte der C-Fasern mit ektopter Aktivität, aber eine deutlich geringere Anzahl A-Fasern sind spontanaktiv. Die Entladungsfrequenz spontanaktiver A-Fasern ist signifikant höher als die der C-Fasern mit Spontanaktivität.
7. Die funktionellen Eigenschaften von A-Fasern mit Leitungsgeschwindigkeiten <20 m/s unterscheiden sich signifikant von denen der C-Fasern.
8. A-Fasern regenerieren bereitwillig in den N. suralis und die Haut (Lewin & McMahon, 1991), C-Fasern zeigen nahezu keine Regenerationsbereitschaft. Die Verteilung der funktionellen Eigenschaften unter den regenerierten A-Fasern unterscheidet sich nicht von der unter den nicht-regenerierten, die Entladungsfrequenz regenerierter spontanaktiver A-Fasern ist allerdings deutlich erhöht.
9. Der indirekt gemessene Einfluss des Spinalganglions auf die Spontanaktivität von afferenten A- und C-Fasern ist zu vernachlässigen.

Vor dem Hintergrund der hier erhobenen Daten und der Daten früherer Studien an akut geschädigten und intakten Muskelafferenzen stellt sich für mich die Frage

a) inwiefern und in welchem Ausmaß die Spontanaktivität in C-Fasern einen Einfluss auf die Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen hat,

b) ob die A-Fasern nicht eine größere Rolle spielen, als bisher angenommen,

c) ob die niedrigen Reizschwellen insbesondere auf mechanische Stimulation in geschädigten Muskelafferenzen ein Zeichen peripherer Sensibilisierung und entscheidend bei der Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen sind.

Es bleibt weiter zu untersuchen, ob und wie die polymodalen, meiner Meinung nach nozizeptiven C-Fasern auf Menthol, Capsaicin oder Zimtaldehyd/Senföl reagieren.

Anhand dieser Rezeptoragonisten lassen sich möglicherweise nozizeptive von nicht-nozizeptiven C-Fasern unterscheiden.

Es bleibt zukünftigen Studien überlassen, die dargelegten grundlegenden Untersuchungen in den Kontext „Neuropathische Schmerzen“ einzubetten.

6. Literaturverzeichnis

- Adreani CM, Hill JM & Kaufman MP. (1997). Responses of group III and IV muscle afferents to dynamic exercise. *J Appl Physiol* **82**, 1811-1817.
- Amir R, Argoff CE, Bennett GJ, Cummins TR, Durieux ME, Gerner P, Gold MS, Porreca F & Strichartz GR. (2006). The role of sodium channels in chronic inflammatory and neuropathic pain. *J Pain* **7**, S1-29.
- Amir R, Liu CN, Kocsis JD & Devor M. (2002). Oscillatory mechanism in primary sensory neurones. *Brain* **125**, 421-435.
- Baron R. (2009). Neuropathic Pain: Clinical. In *Science of Pain*, ed. Allan I. Basbaum MCB. Academic Press Elsevier, Oxford.
- Baron R, Jänig W & Kollmann W. (1988). Sympathetic and afferent somata projecting in hindlimb nerves and the anatomical organization of the lumbar sympathetic nervous system of the rat. *The Journal of Comparative Neurology* **275**, 460-468.
- Belmonte C & Viana F. (2008). Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Molecular Pain* **4**, 14.
- Berberich P, Hoheisel U & Mense S. (1988). Effects of a carrageenan-induced myositis on the discharge properties of group III and IV muscle receptors in the cat. *Journal of Neurophysiology* **59**, 1395-1409.
- Blumberg H & Jänig W. (1984). Discharge pattern of afferent fibers from a neuroma. *Pain* **20**, 335-353.
- Bounoutas A & Chalfie M. (2007). Touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. *Pflugers Arch* **454**, 691-702.
- Burchiel KJ, Russell LC, Lee RP & Sima AA. (1985). Spontaneous activity of primary afferent neurons in diabetic BB/Wistar rats. A possible mechanism of chronic diabetic neuropathic pain. *Diabetes* **34**, 1210-1213.
- Cummins TR, Sheets PL & Waxman SG. (2007). The roles of sodium channels in nociception: Implications for mechanisms of pain. *Pain* **131**, 243-257.
- D'Mello R & Dickenson AH. (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *British Journal of Anaesthesia* **101**, 8-16.
- Devor M. (2006a). Centralization, central sensitization and neuropathic pain. Focus on "sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons". *Journal of Neurophysiology* **96**, 522-523.

- Devor M. (2006b). Response of nerves to injury in relation to neuropathic pain. In *Wall and Melzack's Textbook of Pain*, ed. McMahon SL KM, pp. 905-927. Churchill Livingstone, London.
- Devor M. (2009). Ectopic discharge in A-beta afferents as a source of neuropathic pain. *Experimental Brain Research Experimentelle Hirnforschung* **196**, 115-128.
- Dickenson AH & Sullivan AF. (1987). Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. *Neuropharmacology* **26**, 1235-1238.
- Franz M & Mense S. (1975). Muscle receptors with group IV afferent fibres responding to application of bradykinin. *Brain Research* **92**, 369-383.
- Gorodetskaya N, Constantin C & Jänig W. (2003). Ectopic activity in cutaneous regenerating afferent nerve fibers following nerve lesion in the rat. *The European Journal of Neuroscience* **18**, 2487-2497.
- Gorodetskaya N, Grossmann L, Constantin C & Jänig W. (2009). Functional properties of cutaneous A- and C-fibers 1-15 months after a nerve lesion. *Journal of Neurophysiology* **102**, 3129-3141.
- Grossmann L, Gorodetskaya N, Baron R & Jänig W. (2009a). Enhancement of ectopic discharge in regenerating A- and C-fibers by inflammatory mediators. *Journal of Neurophysiology* **101**, 2762-2774.
- Grossmann L, Gorodetskaya N, Teliban A, Baron R & Jänig W. (2009b). Cutaneous afferent C-fibers regenerating along the distal nerve stump after crush lesion show two types of cold sensitivity. *European Journal of Pain (London, England)* **13**, 682-690.
- Hains BC, Saab CY & Waxman SG. (2005). Changes in electrophysiological properties and sodium channel Nav1.3 expression in thalamic neurons after spinal cord injury. *Brain* **128**, 2359-2371.
- Hanna RL & Kaufman MP. (2003). Role played by purinergic receptors on muscle afferents in evoking the exercise pressor reflex. *J Appl Physiol* **94**, 1437-1445.
- Hayes SG, Kindig AE & Kaufman MP. (2005). Comparison between the effect of static contraction and tendon stretch on the discharge of group III and IV muscle afferents. *J Appl Physiol* **99**, 1891-1896.
- Hayes SG, McCord JL, Rainier J, Liu Z & Kaufman MP. (2008). Role played by acid-sensitive ion channels in evoking the exercise pressor reflex. *American Journal of Physiology* **295**, H1720-1725.
- Hertel HC, Howaldt B & Mense S. (1976). Responses of group IV and group III muscle afferents to thermal stimuli. *Brain Research* **113**, 201-205.

- Hoheisel U, Reinohl J, Unger T & Mense S. (2004). Acidic pH and capsaicin activate mechanosensitive group IV muscle receptors in the rat. *Pain* **110**, 149-157.
- Hoheisel U, Unger T & Mense S. (2005). Excitatory and modulatory effects of inflammatory cytokines and neurotrophins on mechanosensitive group IV muscle afferents in the rat. *Pain* **114**, 168-176.
- Iggo a. (1961). non-myelinated afferent fibres from mammalian skeletal muscle. *The Journal of Physiology* **155**, 54P.
- Jänig W & Baron R. (2011). Pathophysiologie des Schmerzes. In *Integrative Schmerztherapie*, ed. Fischer L & Peuker E. Hippokrates, Stuttgart.
- Jänig W, Grossmann L & Gorodetskaya N. (2009). Mechano- and thermosensitivity of regenerating cutaneous afferent nerve fibers. *Experimental Brain Research Experimentelle Hirnforschung* **196**, 101-114.
- Kaufman MP & Hayes SG. (2002). The exercise pressor reflex. *Clin Auton Res* **12**, 429-439.
- Kirilova I & Jänig W. (unveröffentlicht). Responses of cold- or heat-sensitive injured muscle afferent fibers to the TRPV1 and TRPM8 channel Agonists.
- Kirilova I, Rausch VH, Tode J, Baron R & Jänig W. (2011a). Mechano- and thermosensitivity of injured muscle afferents. *Journal of Neurophysiology* **105**, 2058-2073.
- Kirilova I, Teliban A, Gorodetskaya N, Grossmann L, Bartsch F, Rausch VH, Struck M, Tode J, Baron R & Jänig W. (2011b). Effect of local and intravenous lidocaine on ongoing activity in injured afferent nerve fibers. *Pain* **152**, 1562-1571.
- Kovalsky Y, Amir R & Devor M. (2009). Simulation in sensory neurons reveals a key role for delayed Na⁺ current in subthreshold oscillations and ectopic discharge: implications for neuropathic pain. *Journal of Neurophysiology* **102**, 1430-1442.
- Kumazawa T & Mizumura K. (1977). Thin-fibre receptors responding to mechanical, chemical, and thermal stimulation in the skeletal muscle of the dog. *The Journal of Physiology* **273**, 179-194.
- Latremoliere A & Woolf CJ. (2009). Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain* **10**, 895-926.
- Lawson SN & Waddell PJ. (1991). Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *The Journal of Physiology* **435**, 41-63.

- Lewin GR & McMahon SB. (1991). Physiological properties of primary sensory neurons appropriately and inappropriately innervating skin in the adult rat. *Journal of Neurophysiology* **66**, 1205-1217.
- McLachlan EM, Jänig W, Devor M & Michaelis M. (1993). Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature* **363**, 543-546.
- Mense S. (1993). Nociception from skeletal muscle in relation to clinical muscle pain. *Pain* **54**, 241-289.
- Mense S. (2003). [What is different about muscle pain?]. *Schmerz (Berlin, Germany)* **17**, 459-463.
- Mense S & Meyer H. (1985). Different types of slowly conducting afferent units in cat skeletal muscle and tendon. *The Journal of Physiology* **363**, 403-417.
- Mense S & Stahnke M. (1983). Responses in muscle afferent fibres of slow conduction velocity to contractions and ischaemia in the cat. *The Journal of Physiology* **342**, 383-397.
- Merskey H. (1994). Logic, truth and language in concepts of pain. *Qual Life Res* **3 Suppl 1**, S69-76.
- Michaelis M, Liu X & Janig W. (2000a). Axotomized and intact muscle afferents but no skin afferents develop ongoing discharges of dorsal root ganglion origin after peripheral nerve lesion. *J Neurosci* **20**, 2742-2748.
- Michaelis M, Liu X & Jänig W. (2000b). Axotomized and intact muscle afferents but no skin afferents develop ongoing discharges of dorsal root ganglion origin after peripheral nerve lesion. *J Neurosci* **20**, 2742-2748.
- Mitchell JH, Schmidt, R. F. . (1983). Cardiovascular reflex control by afferent fibers from skeletal muscle receptors. In *Handbook of Physiology*, ed. J.T. Shepherd FMA, pp. 623-658. American Physiological Society.
- Mitchell SW. (1872). *Injuries of nerves and their consequences*. J.B. Lippincott & Co, Philadelphia.
- Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H & Woolf CJ. (2002). Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* **22**, 6724-6731.
- Napadow V, Kettner N, Ryan A, Kwong KK, Audette J & Hui KK. (2006). Somatosensory cortical plasticity in carpal tunnel syndrome--a cross-sectional fMRI evaluation. *NeuroImage* **31**, 520-530.
- Paintal AS. (1960). Functional analysis of group III afferent fibres of mammalian muscles. *The Journal of Physiology* **152**, 250-270.

- Papir-Kricheli D & Devor M. (1988). Abnormal impulse discharge in primary afferent axons injured in the peripheral versus the central nervous system. *Somatosensory & Motor Research* **6**, 63-77.
- Peyronnard JM, Charron LF, Lavoie J & Messier JP. (1986). Motor, sympathetic and sensory innervation of rat skeletal muscles. *Brain Research* **373**, 288-302.
- Proske U & Gandevia SC. (2009). The kinaesthetic senses. *The Journal of Physiology* **587**, 4139-4146.
- Reinohl J, Hoheisel U, Unger T & Mense S. (2003). Adenosine triphosphate as a stimulant for nociceptive and non-nociceptive muscle group IV receptors in the rat. *Neuroscience Letters* **338**, 25-28.
- Schmelz M, Schmidt R, Bickel A, Torebjork HE & Handwerker HO. (1998). Innervation territories of single sympathetic C fibers in human skin. *Journal of Neurophysiology* **79**, 1653-1660.
- Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E & Handwerker H. (1995). Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci* **15**, 333-341.
- Serra J. (2010). Microneurography: an opportunity for translational drug development in neuropathic pain. *Neuroscience Letters* **470**, 155-157.
- Sittiracha T & McLachlan EM. (1986). Evaluation of the effects of various additives on retrograde labelling by horseradish peroxidase applied to intact and transected hindlimb nerves of rat and rabbit. *Neuroscience* **18**, 763-772.
- Sleeper AA, Cummins TR, Dib-Hajj SD, Hormuzdiar W, Tyrrell L, Waxman SG & Black JA. (2000). Changes in expression of two tetrodotoxin-resistant sodium channels and their currents in dorsal root ganglion neurons after sciatic nerve injury but not rhizotomy. *J Neurosci* **20**, 7279-7289.
- Speckmann EJ. (2005). Allgemeine Neurophysiologie. In *Physiologie*, ed. Hescheler DS. Elsevier, München Jena.
- Sunderland SS. (1978). *Nerves and Nerve Injuries*. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Swett JE, Torigoe Y, Elie VR, Bourassa CM & Miller PG. (1991). Sensory neurons of the rat sciatic nerve. *Experimental Neurology* **114**, 82-103.
- Teliban A, Bartsch F, Struck M, Baron R & Jänig W. (unveröffentlicht).
- Treede RD, Jensen TS, Campbell JN, Cruccu G, Dostrovsky JO, Griffin JW, Hansson P, Hughes R, Nurmikko T & Serra J. (2008). Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* **70**, 1630-1635.

Waddell PJ, Lawson SN & McCarthy PW. (1989). Conduction velocity changes along the processes of rat primary sensory neurons. *Neuroscience* **30**, 577-584.

Wall PD & Devor M. (1983). Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. *Pain* **17**, 321-339.

Wieseler-Frank J, Maier SF & Watkins LR. (2005). Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. *Neuro-Signals* **14**, 166-174.

Woolf CJ & Salter MW. (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science (New York, NY)* **288**, 1765-1769.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Wilfried Jänig, für die tolle und persönliche Betreuung über 6 Jahre danken. Er war immer für uns da.

Desweiteren möchte ich meiner Arbeitsgruppe, Irina Kirillova und Vanessa Rausch, für die gute Zusammenarbeit danken. Ohne sie hätte ich das nicht geschafft.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, Karin und Bernd Tode, und meiner Freundin, Gertje Carstensen, danken. Sie haben mich immer unterstützt.

8. Anhang

15. Sep. 2008

127

Ministerium für Landwirtschaft,
Umwelt und ländliche Räume
des Landes Schleswig-Holstein



Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume |
Postfach 50 09 | 24062 Kiel

Herrn
Prof. Dr. Wilfrid Jänig
Physiologisches Institut
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel
Olshausenstr. 40
24098 Kiel

Ihr Antrag vom: 03.09.2008

Mein Zeichen: V 312-72241.121-2 (68-6/06)

Herr Buttchereit

Telefon: 0431 988-7128

Telefax: 0431 988-7042

nachrichtlich:

Herrn Prof. Dr. Gerhard Schultheiß
Tierschutzbeauftragter der
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
Olshausenstraße 40
24098 Kiel

11. September 2008

Verwendung von Wirbeltieren zu Versuchszwecken

Sehr geehrter Herr Prof. Jänig,

aufgrund Ihres o. a. Antrages verlängere ich die Gültigkeitsdauer meiner Genehmigung vom 15. September 2008 für das Versuchsvorhaben „Sympathisch-afferente Kopplung in tiefen somatischen Geweben und an regenerierenden Afferenzen“ bis zum 30. September 2009.

Mit freundlichen Grüßen

Dr. Irmer

I. Kirillova, V. H. Rausch, J. Tode, R. Baron and W. Jänig
Mechano and thermosensitivity of injured muscle afferents
J Neurophysiol, V. 105, 2058-2073.

Injury of limb nerves leading to neuropathic pain mostly affects also deep somatic nerves including muscle nerves. Here we investigated the functional properties of injured afferent fibers innervating the lateral gastrocnemius-soleus muscle 4-13 hours (time period, TP I) and 4-7 days (TP II) after nerve crush in anesthetized rats using neurophysiological recordings either from the sciatic nerve (165 A-, 137 C-fibers) or from the dorsal root L5 (43 A-, 28 C-fibers). Ongoing activity and responses to mechanical or thermal stimulation of the injury site of the nerve were studied quantitatively. Of the electrically identified A- and C-fibers 5% and 38% exhibited ectopic activity, respectively in TP I and 51% and 61%, respectively in TP II. Thus, all afferent fibers in an injured muscle nerve developed ectopic activity since about 50% of the fibers in a muscle nerve are somatomotor or sympathetic postganglionic. Ongoing activity was present in 50% of the afferent A-fibers (TP II) and in 53-56% of the afferent C-fibers (TP I and TP II). In TP II mechanical, cold and heat sensitivity were present in 91%, 63% and 52% of the afferent A-fibers and in 50%, 40% and 66% of the afferent C-fibers. The cold and heat activation thresholds were 5-27°C and 35-48°C, respectively, covering the noxious and innocuous range. Most afferent fibers showed combinations of these sensitivities. Mechano- and cold sensitivity had a significantly higher representation in A-fibers than in C-fibers, but heat sensitivity in C-fibers than in A-fibers. These functional differences between A- and C-fibers applied to large- as well as small-diameter A-fibers. Comparing the functional properties of injured muscle A- and C-afferents with those of injured cutaneous A- and C-afferents shows that both populations of injured afferent neurons behave differently in several aspects.

Key words: Muscle afferents, nerve injury, ectopic impulse activity, mechano- and thermosensitivity, neuropathic pain

I. Kirillova, A. Teliban, N. Gorodetskaya, L. Grossmann, F. Bartsch, V. H. Rausch, M. Struck, J. Tode, R. Baron, W. Jänig
Effect of local and intravenous lidocaine on ongoing activity in injured afferent nerve fibers
Pain, V.152, 1562-1571.

Lidocaine applied systemically or locally attenuates neuropathic pain in patients. Here we tested the hypothesis that ectopic activity in injured afferent A- or C-fibers is suppressed by lidocaine. In rats the sural nerve (skin nerve) or lateral gastrocnemius-

soleus nerve (muscle nerve) was crushed. Four to 8 days after crush lesion afferent fibers were isolated from the lesioned nerves in bundles rostral to the injury site. Ongoing ectopic activity was recorded from 75 A-fibers (muscle N=43, skin N=32) and 69 C-fibers (muscle N=30, skin N=39). Most afferent fibers were functionally characterized by their responses to mechanical and thermal (mostly heat) stimuli applied at or distal to the nerve injury site. Low-threshold cold-sensitive cutaneous C-fibers were excluded from the analysis (see [31,32]). Lidocaine was either applied to the nerve at or distal to the injury site in concentrations of 1-1000 µg/ml or injected intravenously in doses of 0.09–9 mg/kg (skin) or 0.047 – 4.7 mg/kg (muscle). 1) Local application of lidocaine depressed ectopic activity in A- and C-fibers dose-dependently. Depression was weaker in C- than in A-fibers. 2) Intravenous application of lidocaine depressed ongoing ectopic activity in A- and C-fibers dose-dependently. 3) Responses to heat or mechanical stimulation of the injured nerve were not suppressed at the highest concentrations of lidocaine. 4) The results support the hypothesis that decrease of neuropathic pain following local or systemic application of a local anesthetic is related to decrease of ectopic ongoing activity in injured afferent nerve fibers.

J. Tode, I. Kirillova, V. Rausch, R. Baron, W. Jänig

Discharge characteristics of regenerating muscle afferents in a chronically lesioned nerve model (*Poster*)

Third International Congress on Neuropathic Pain, Athens, May 2010, Program, Workshop Summaries and Plenary Abstracts, Abstract 55, p. 28

Introduction: Injury of muscle nerves may be followed by deep somatic neuropathic pain. Ectopic activity in injured muscle afferents has to date not been systematically investigated.

Objectives: We studied the ectopic discharge characteristics of chronically injured muscle afferents

Methods: The central stump of the Lateral Gastrocnemius-Soleus (LGS) nerve was cross-unioned (CU) to the distal stump of the Sural nerve in 34 rats. Activity was recorded neurophysiologically from afferent myelinated (A-) and unmyelinated (C-) nerve fibres isolated from the LGS proximal to the CU 20 or 80 days after injury.

Results: Recordings were made from 139 A-fibres and 89 C-fibres. (1) Almost all ectopically active A-fibres were mechanosensitive, 23% of them were cold- and/or heat-sensitive or showed additionally these thermosensitivities. (2) Ectopically active C-fibres were mechano-, cold- or heat-sensitive or showed combinations of these sensitivities. (3) Most A-fibres regenerated into the Sural nerve, 75% showing responses to physiological stimulation of the sural nerve 20d after CU and 70% responses to physiological stimulation of skin 80d after CU. (4) More than 90% of the ectopically active C-fibres were activated by physiological stimuli from the CU or from the nerve proximal to the injury 20d and 80d after CU. (5) 46% of the ectopically active C-fibres and 17% of ectopically active A-fibres showed ongoing activity.

Conclusions: Twenty and 80 days following injury to the LGS nerve, most ectopically active A-fibres are mechanosensitive and readily regenerate. Ectopically active C-fibres are mechano-, cold- and/or heat-sensitive, but rarely regenerate across the nerve injury.

I. Kirillova, V. Rausch, J. Tode, R. Baron, W. Jänig
Patterns of ongoing activity in chronically injured muscle afferents (*Poster*)
Third International Congress on Neuropathic Pain, Athens, May 2010, Program, Workshop Summaries and Plenary Abstracts, Abstract 23, p. 23

Introduction: Ongoing activity (OA) in injured myelinated (A-) and unmyelinated (C-) afferents is important for the development and maintenance of neuropathic pain.

Objectives: We studied the ectopic OA of injured muscle afferents.

Methods: Using electrophysiological recordings from single afferent A- or C-fibers in vivo in rats we investigated rate and pattern of ectopic OA in injured muscle afferents of the lateral gastrocnemius-soleus nerve (LGS) in four time periods (TP) after nerve crush or after cross-union of the LGS to the sural nerve: 1-13 hours (TP1), 4-7 days (TP2), 20 days (TP3), and 80 days (TP4).

Results: In all, 736 A-fibers and 413 C-fibers were studied. (1) The frequency of OA in A-fibers was 2%, 20.5%, 9.4% and 8% in TP1, TP2, TP3, and TP4, respectively. (2) The rate of OA in A-fibers was 10.1 ± 1.4 imp/s (mean \pm SD). The pattern of activity was irregular (16%), regular (46%) or bursting (38%). (3) The frequency of OA in C-fibers was 21%, 31.4%, 20.5% and 24% in TP1, TP2, TP3, and TP4, respectively. (4) The rate of OA in C-fibers was 0.51 ± 0.1 imp/s (mean \pm SD). The pattern of OA in C-fibers was irregular or irregular bursting. (5) In both A- and C-fibers OA and responsiveness to thermal or mechanical stimulation were correlated. Conclusions: The proportions of afferent A- and C-fibers exhibiting OA and the rates of OA are significantly higher in an injured muscle nerve than in an skin nerve. These data support the idea that ectopic discharges in injured muscle afferents are important in the generation of neuropathic pain.

I. Kirillova, V. Rausch, J. Tode, R. Baron, W. Jänig
Ectopic activity in muscle regenerating afferent nerve fibers following nerve crush lesion in the rat (*Presentation*)
NeuPSIG Satellite on Neuropathic Pain to the Glasgow 2008 World Congress on Pain. Programme & Abstract book. Abstract 13, p. 15

Ectopic impulses in the injured myelinated and unmyelinated afferents occurring spontaneously or being evoked by mechanical or thermal stimulation are considered to be crucial for the development of neuropathic pain. However, the role of the afferent innervation of deep somatic tissues in neuropathic pain remains unclear and has not been investigated so far.

Using electrophysiological recordings from single nerve fibers in vivo in the rat, we investigated the ectopic discharge characteristics of lesioned muscle afferents within 1 – 13 hours (*time period 1*) and 4-7 days (*time period 2*) after crush injury of the *gastrocnemius-soleus* nerve and compared these results with those obtained on lesioned cutaneous afferents.

Conclusions: (1) Within time period 1 the proportion of A-fibers developing ectopic activity after nerve lesion is significantly higher in a skin nerve than in a muscle nerve, whereas the proportion of C-fibers with ectopic activity is significantly higher in a muscle nerve than in a skin nerve. (2) Within time period 2 the proportion of C-fibers developing ectopic activity is significantly higher in a muscle nerve than in a skin nerve, whereas the proportion of A-fibers with ectopic activity is similar in muscle and skin nerves. (3) Lesioned muscle afferents show the same combinations of sensitivities as lesioned skin afferents, but in different proportions. (4) Many A- and C-fibers innervating skeletal muscle lacking normally cold-sensitivity develop cold-sensitivity 4-7 days after crush lesion.

Supported by BMBF, DFG and Pfizer.

I. Kirillova, V. Rausch, J. Tode, N. Gorodetskaya, R. Baron, W. Jänig
Ectopic discharges of lesioned muscle afferent fibers: an electrophysiological study (Poster)

Der Schmerz, Band 21. Supplement. Oktober 2007, P6.6, p. 95

Mechanical, metabolic or viral lesions of peripheral nerves followed by degeneration and regeneration of afferent nerve fibers can lead to neuropathic pain. Ectopic impulses in the injured myelinated and unmyelinated afferents occurring spontaneously as well as being evoked by mechanical or thermal stimulation are considered to be crucial for the development of this pain.

The goals of this study were to investigate the ectopic discharge characteristics of lesioned myelinated and unmyelinated muscle afferents within 1 – 13 hours (*time period 1*) and 4-7 days (*time period 2*) after crush injury of the *gastrocnemius-soleus* nerve and compare these results with those obtained on lesioned cutaneous afferents.

Time period 1 (1-13 hours after crush lesion). (1) Twelve out of 363 electrically identified A-fibers developed at least one type of ectopic activity. Seven were mechanosensitive only. Five fibers were spontaneously active, one each responding additionally either to cold or to heat stimulation. (2) Fifty-six out of 125 electrically identified C-fibers developed ectopic activity (45%). Thirty-eight C-fibers were spontaneously active (30%; rate ranged from 0,1 to 7 imp/s (median 0,43, mean 0,95 imp/s)). The majority of these spontaneously active C-fibers (31/35; 89%) responded to mechanical and/or thermal stimulation. Mechanosensitivity was observed in 38/125 of C-fibers (30%). Thermal sensitivity was observed in 29/125 of C-fibers (23%). Most (27/29) of these thermosensitive C-fibers were activated by heating, only 2 fibers by cooling and 2 by both heating and cooling stimulation.

Time period 2 (4 - 7 days after crush lesion). (1) Forty-one out of 98 electrically identified A-fibers (42%) developed at least one type of ectopic activity. 22/41 A-fibers were spontaneously active (rate ranged from 0,09 to 89 imp/s (median 12,88, mean 15,73)), 7 of them being spontaneously active only and the remaining A-fibers being either mechano- or thermosensitive. 10/41 A-fibers were mechanosensitive only, 19/41 A-fibers mechano- and cold-sensitive, and 5/41 A-fibers mechano-, cold- and heat-sensitive. (2) Thirty-seven out of 67 electrically identified C-fibers exhibited ectopic activity (55%). 13/37 C-fibers were spontaneously active (rate ranged from 0,28 to 1,95 imp/s (median 0,16, mean 0,35)), all of them being heat-sensitive. 22 C-fibers were mechanosensitive, 18 of them being additionally either cold-sensitive or both cold- and heat-sensitive. 22 C-fibers were heat-sensitive, 11 of them being additionally either mechanosensitive or both mechano- and cold-sensitive. 16 C-fibers were cold-sensitive, 13 of them being additionally either mechanosensitive or both mechanosensitive and heat-sensitive.

Conclusions. (1) In time period 1, the proportion of A-fibers developing ectopic activity after nerve lesion is significantly higher in skin nerve than in muscle nerve, whereas the proportion of C-fibers with ectopic activity is significantly higher in muscle nerve than in skin nerve (Michaelis et al J Neurophysiol Vol. 74, 1 3, 1995; Neuroscience Vol. 94, 1. 1, 1999). (2) In time period 2, the proportion of C-fibers developing ectopic activity is significantly higher in muscle nerve than in skin nerve (in particular in view of the fact that 45% of muscle C-fibers are postganglionic!), whereas the proportion of A-fibers with ectopic activity is similar in muscle and skin nerve (Gorodetskaya et al Eur J Neurosci Vol. 18, 2003). (3) Many A- and C-fibers innervating skeletal muscle lacking normally cold-sensitivity develop cold-sensitivity 5-7 days after crush lesion.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Jan Tode



Veröffentlichungen

- Feb 2011 I.Kirillova, V.H. Rausch, J. Tode, R. Baron, W. Jänig
Mechano- and thermosensitivity of injured muscle afferents
J Neurophysiol 105: 2058–2073, 2011
First published February 9, 2011
- Feb 2011 I.Kirillova, A. Teliban, N. Gorodetskaya, L. Grossmann, F. Bartsch, V.H. Rausch, M. Struck, J. Tode, R. Baron, W. Jänig
Effect of local and intravenous lidocaine on ongoing activity in injured afferent nerve fibers Pain 152: 1562–1571, 2011
First published February 22, 2011
- Mai 2010 J. Tode, I. Kirillova, V.H. Rausch, R. Baron, W. Jänig
Discharge characteristics of regenerating muscle afferents in a chronically lesioned nerve model
Third International Congress on Neuropathic Pain, Athens, May 2010, Program, Workshop Summaries and Plenary Abstracts, Abstract 55, p. 28
- Mai 2010 I. Kirillova, V.H. Rausch, J. Tode, R. Baron, W. Jänig
Patterns of ongoing activity in chronically injured muscle afferents.
Third International Congress on Neuropathic Pain, Athens, May 2010, Program, Workshop Summaries and Plenary Abstracts, Abstract 23, p. 23
- Aug 2008 I. Kirillova, V. Rausch, J. Tode, R. Baron, W. Jänig
Ectopic activity in muscle regenerating afferent nerve fibers following nerve crush lesion in the rat
NeuPSIG Satellite on Neuropathic Pain to the Glasgow 2008 World Congress on Pain. Programme & Abstract book. Abstract 13, p. 15
- Okt 2007 I. Kirillova, V.H. Rausch, J. Tode, N. Gorodetskaya, R. Baron, W. Jänig
Ectopic discharges of lesioned muscle afferent fibers: an electrophysiological study.
Der Schmerz, Band 21. Supplement. Oktober 2007, P6.6, p. 95

