

Aus dem Physiologischen Institut  
(Direktoren: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Baukrowitz,  
Prof. Dr. med. Markus Bleich und Prof. Dr. med. Peer Wulff)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**HITZE- UND CAPSAICINSENSIBILITÄT  
REGENERIERENDER HAUTAFFERENZEN DES  
NERVUS SURALIS**

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

vorgelegt von

**FABIAN BARTSCH**  
aus **Bremerhaven**

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Wilfrid Jänig  
Physiologisches Institut, CAU Kiel
2. Berichterstatter: PD Dr. med. Robert Göder  
Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie ,CAU Kiel

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2013

Zum Druck genehmigt, Kiel, den

gez.:

Prof. Dr. med. Thomas Baukrowitz  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

## Meinem Vater

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>I. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
I.1 Hautafferenzen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen	1
I.2 Regeneration eines geschädigten Nervs	2
I.3 TRPV1, Capsaicin und Hitzesensibilität	4
I.4 Experimentelle Gruppen	6
I.5 Fragestellung	8
<b>II. METHODIK</b>	<b>9</b>
II.1 Narkose und Präparation	9
II.2 Versuchsaufbau, elektrophysiologische Ableitung und Identifikation	11
II.3 Versuchsablauf	13
II.3.1 Übersicht und elektrophysiologische Ableitung einzelner Nervenfilamente	13
II.3.2 Thermosensibilität	15
II.3.3 Mechanosensibilität	15
II.3.4 Applikation von Capsaicin	16
II.4 Datenanalyse	16
<b>III. ERGEBNISSE</b>	<b>18</b>
III.1 Darstellung der Mechano-, Kälte- und Hitzesensibilität von affarenten Hautaxonen nach Quetschläsion	20
III.1.1 Hitzesensibilität	20
III.1.2 Kältesensibilität	21
III.1.3 Mechanosensibilität	21
III.1.4 Spontanaktivität	22
III.2 Hitze- und Capsaicinsensibilität	22
III.2.1 Hitze- und Capsaicinsensibilität entlang des Axons (Experiment 1+2)	22
III.2.2 Capsaicin und postganglionäre Fasern	25
III.2.3 Hitze- und Capsaicinsensibilität am Ort der Läsion (Experiment 3)	27
III.3 Kälte- und/oder Mechanosensibilität	30
III.3.1 Kältesensibilität	30

	Seite	
III.3.2	Kälte- und Hitzesensibilität	33
III.3.3	Mechanosensibilität	37
III.4	Einfluss von Capsaicin auf kutan hitzesensible Fasern (Experiment 4)	39
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>40</b>
IV.1	Faserpopulationen des Nervus suralis	40
IV.2	Transduktionskanäle und Rezeptoren für Hitze-, Kälte- und Mechanosensibilität	41
IV.2.1	Hitzesensibilität	41
IV.2.2	Kältesensibilität	43
IV.2.3	Mechanosensibilität	44
IV.3	Methodische Diskussion	45
IV.4	Hitze- und Capsaicinsensibilität	46
IV.4.1	Hitze und Capsaicinsensibilität entlang des Axons	47
IV.4.2	Hitze- und Capsaicinsensibilität am Läsionsort	49
IV.4.3	Capsaicin und postganglionäre Efferenzen	52
IV.5	Kälte- und/oder Mechanosensibilität	53
IV.5.1	Kälte- und Mechanosensibilität bei Fasern ohne Hitzesensibilität	53
IV.5.2	Kälte- und/oder Mechanosensibilität bei zusätzlich hitzesensiblen Fasern	54
IV.6	Einfluss von Capsaicin auf ausschließlich kutan hitzesensible C-Fasern (Experiment 4)	54
<b>V</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>56</b>
<b>VI</b>	<b>ANHANG</b>	<b>57</b>
VI.1	Literaturverzeichnis	57
VI.2	Lebenslauf	64
VI.3	Veröffentlichungen	65
VI.4	Danksagung	66
VI.5	Eidesstattliche Erklärung	67

# I. EINLEITUNG

Die Haut vieler Lebewesen besitzt sehr komplexe und überlebenswichtige Mechanismen, um die Umwelt wahrzunehmen, auf diese zu reagieren und mit ihr zu interagieren. Dabei können verschiedene thermische und mechanische Reize unterschieden werden. Verantwortlich hierfür sind Hautafferenzen peripherer Nerven, die an ihren Endigungen mit spezifischen Rezeptoren ausgestattet sind, welche bei adäquater Reizung elektrische Signale (Aktionspotenziale) erzeugen, die über myelinisierte (A) oder unmyelinisierte (C) Nervenfasern in das zentrale Nervensystem geleitet, dort verarbeitet und wahrgenommen werden. Die thermische Sensibilität von kutanen nozizeptiven Neuronen ist nicht nur auf das kutane rezeptive Feld oder bei geschädigten regenerierenden Afferenzen auf die regenerierenden Sprossen der Afferenzen im Nerv beschränkt, sondern erstreckt sich auch entlang des Axons (Jänig et al. 2009, Grossman et al. 2009, Gorodetskaya et al. 2009). Im Fall der Hitzesensibilität, auf die sich diese Arbeit konzentriert, sind etwa 30 bis 40% der kutan hitzesensiblen C-Fasern auch entlang des Axons erregbar (Hoffmann et al. 2008, Teliban et al. 2011).

## I.1 Hautafferenzen unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen

Afferente Nervenfasern der Haut werden anhand ihrer Leitungsgeschwindigkeiten und ihres Durchmessers in vier unterschiedliche Gruppen unterteilt. Lawson und Waddell (1991) differenzieren die verschiedenen Faserpopulationen für weibliche Wistar-Ratten (120-190g) mittels folgender Leitgeschwindigkeiten (LG):

Fasertyp	Gruppe	LG	Funktion
A $\beta$ -Fasern	II, myelinisiert	$\geq 12\text{m/s}$	Mechano
A $\delta$ -Fasern	III, myelinisiert	$= 2\text{--}12\text{m/s}$	Mechano, nozizeptiv, Kälte
C-/A $\delta$ -Fasern		$= 1,3\text{--}2\text{m/s}$	
C-Fasern	IV, unmyelinisiert	$\leq 1,3\text{m/s}$	Mechano, nozizeptiv, Kälte, Wärme

Bei Gruppe I-Fasern handelt es sich um stark myelinisierte, sehr schnell leitende Muskelafferenzen, welche hier nicht näher behandelt werden sollen.

Hautafferenzen können durch verschieden physikalische Reize erregt werden: Wärme/Hitze, Kälte, mechanische und/oder chemische Reize. Neben Fasern, welche ausschließlich durch einen speziellen Reiz erregt werden können, finden sich auch solche, die auf multiple Stimuli reagieren und als polymodal bezeichnet werden. Bei dieser

Faserpopulation handelt es sich um nozizeptive A $\delta$ - oder C-Fasern (Schaible in Schmidt, Lang & Heckmann 2010; Schaible 2010, Meyer et al. 2006).

Betrachtet man die A-Fasern eines intakten Hautnervs der Ratte (*N. suralis*), so sind 91% mechanosensibel. 5% der mechanosensiblen Fasern sind ebenfalls hitze- oder kältesensibel. 9% sind ausschließlich kältesensibel (Jänig et al. 2009). Die C-Fasern lassen sich in drei große Populationen einteilen (Kress et al. 1992; Chung et al. 1993; Jänig et al. 2009, Grossmann et al. 2009):

1. Typ 1-kältesensible Fasern (ca. 20%). Nahezu alle dieser Fasern zeigen eine hohe Rate an Spontanaktivität bei einer Hauttemperatur von etwa 30°C, welche durch Hitzereize unterdrückt werden kann. Die Schwellentemperatur für Kältereize liegt bei  $28,5 \pm 0,17$  °C, auf welche sie ein starkes Antwortverhalten zeigen. Bei dieser Population handelt es sich um nicht-nozizeptive Kälte-Fasern.

2. Typ 2-kältesensible Fasern (ca. 20%). Diese Fasern haben mit wenigen Ausnahmen keine Spontanaktivität. Die Schwellentemperatur ist erheblich niedriger (im Mittel  $15,8 \pm 7,4$  °C). Diese Fasern gelten als nozizeptiv, sind typischerweise zusätzliche hitze- und/oder mechanosensibel und sind damit eine Untergruppe polymodaler nozizeptiver C-Afferenzen.

3. Nicht-kältesensible Fasern (ca. 60%). Hierunter fallen hitze- und/oder mechanosensible Fasern.

Diese Einteilung der C-Fasern gilt sowohl für intakte Nerven, welche die Haut innervieren, für Fasern, welche regenerieren oder die Regeneration zur Haut bereits abgeschlossen haben, als auch für C-Fasern, welche auch 1-15 Monate nach einer Nervenschädigung vom Nerven noch erregbar sind (Gorodetskaya et al. 2009; Grossmann et al. 2009; Jänig et al. 2009).

Betrachtet man geschädigte Hitze-C-Fasern, so können diese ähnlich wie die Kältefasern in zwei Gruppen eingeteilt werden: Einerseits Fasern mit einer hohen ( $\geq 43^\circ$ ), andererseits Fasern mit einer niedrigen Reizschwelle ( $\leq 42^\circ\text{C}$ ) (Jänig et al. 2009, Grossman et al 2009). Sehr ähnlich ist es bei mechanosensiblen C-Fasern. Auch diese können in eine niederschwellige Gruppe mit einer Reizschwelle  $\leq 10\text{mN}$  sowie eine mit einer hohen Reizschwelle  $\geq 20\text{mN}$  eingeteilt werden. Diese Einteilung trifft auch für Kälte-C-Fasern zu, welche zusätzlich hitze- und/oder mechanosensibel sind.

## **I.2 Regeneration eines geschädigten Nervs**

Der Nervus suralis wurde entweder durch eine chronische (4-7 Tage vor dem Experiment) oder eine akute Quetschläsion geschädigt (siehe experimentelle Gruppen I.4). Somit wurde

ein Status der Regeneration hervorgerufen, welcher zu multiplen physiologischen und biochemischen Veränderungen entlang des ganzen Nervs führt. Neben einer teilweisen Demyelinisierung der A-Fasern führt die Schädigung des Nervs zu einer Beeinträchtigung des axoplasmatischen Transports. Im Bereich der Läsion kommt es zu einer Schwellung und Aussprossung des proximalen Teils der Nervenfasern, welcher weiterhin mit dem Zellkörper verbunden ist. Der distale Teil der Axone degeneriert und stirbt ab. Die Nervenzellen versuchen über die Aussprossung das eigentliche Innervationsgebiet zu erreichen und somit ihre Funktion wieder herzustellen. Ist der Nerv nicht vollkommen durchtrennt, wie es bei einer Quetschläsion der Fall ist, und ist somit die Hülle aus Schwannzellen der degenerierten Nervenfasern im distalen Teil noch intakt, können die Sprossen entlang dieser Schwannzellen wachsen, um ihr Zielgebiet zu erreichen. Wird der Nerv komplett durchtrennt, so ist eine Regeneration in dieser Form nicht möglich. Es kommt zu einem ungerichteten Wachstum der Sprossen, Schwannzellen und des umgebenden Bindegewebes. Dies führt zur Entstehung einer knotigen Auftreibung, welche man als Neurom bezeichnet. Neurome können darüber hinaus nach Schädigung auch im Verlauf des Nervs entstehen und sind nicht an den Ort der Schädigung selbst gebunden (Devor, Kapitel 58, Textbook of Pain 2006; Nerves and Nerve Injuries, Sunderland 1978).

Im gesunden Nerv reguliert der Zellkörper den Transport von Rezeptor- und Kanalmolekülen sehr genau. Spezielle Wachstumsfaktoren wie NGF (neurotrophic growth factor), GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) und weitere Faktoren werden über das Tubulussystem retrograd zum Zellkörper transportiert, wo sie Einfluss auf die Genexpression nehmen und darüber die Produktion der Proteine sowie deren Insertion in die Membran der Nervenfasern regulieren. Ist dieser Transport jedoch durch eine Quetschläsion gestört, kommt es zu multiplen Veränderungen. Die Wachstumsfaktoren erreichen den Zellkörper nicht mehr, was zu einer Änderung der Genexpression führt. Darüber hinaus kommt es zur Akkumulation von Rezeptor- und Kanalmolekülen in den sprossenden Axonen, welche zum Teil auch in die Membran des Axons integriert werden und somit dessen physiologische Eigenschaften verändern können. Devor et al. (1989) konnten zeigen, dass eine Demyelinisierung entlang des Axons oder auch im Neurom zur Akkumulation von  $\text{Na}^+$ -Kanälen führt, welche normalerweise durch das Myelin unterdrückt wird (Waxman et al. 1995). Diese Unterdrückung wird jedoch durch Demyelinisierung, Sprossung und Schwellung aufgehoben und die Genese von Aktionspotenzialen sowie die Erregbarkeit ändern sich. Die hier genannten Veränderungen können zur Bildung von Übererregbarkeit und

Spontanaktivität führen. Auch lokale Entzündungsreaktionen wirken über Mediatoren, wie zum Beispiel TNF $\alpha$ , Interleukin 1 $\beta$ , Interleukin 6 oder NGF an deren Entstehung mit. Das Spinalganglion kann ebenfalls Ursprung von Spontanaktivität sein (Devor, Kapitel 58, Textbook of Pain, 2006). Liu et al. (2000) konnten zeigen, dass umso mehr Spontanaktivität im Spinalganglion entsteht, desto näher diesem eine Schädigung des Nervs ist. Wurde der Nerv weit distal geschädigt, so entsteht dagegen die meiste Spontanaktivität in den aussprossenden Nervenendigungen bzw. im Neurom.

Ektopie Aktivität in ungeschädigten C-Fasern sowie myelinisierte Afferenzen, welche oben genannten Veränderungen nach einer Schädigung des Nervs unterliegen, werden für die Entstehung zentraler Sensibilisierung verantwortlich gemacht (Devor, Kapitel 58, Textbook of Pain, 2006). Diese führt zu einer übersteigerten Wahrnehmung von normalerweise nicht schmerzhaften physikalischen Reizen. Dabei stehen meist mechanische und auch Kältereize im Vordergrund, Hitzereize spielen eher eine untergeordnete Rolle. Somit können bereits leichte Berührungen und moderate Kälte Schmerzen auslösen (mechanische Allodynie, Kälteallodynie). Spontanaktivität in den geschädigten afferenten Neuronen trägt zum Spontanschmerz bei. Übererregbarkeit, Spontanaktivität und zentrale Sensibilisierung spielen auch bei der Entstehung von neuropathischem Schmerz eine entscheidende Rolle (Devor, Kapitel 58, Textbook of Pain, 2006).

### **I.3 TRPV1, Capsaicin und Hitzesensibilität**

Für die Reaktion auf thermische und mechanische Reize sind unterschiedliche Transduktionsmechanismen verantwortlich. Bei vielen dieser Mechanismen spielt die Familie der TRP (transient receptor potential)-Kanäle eine entscheidende Rolle, welche unspezifische Kationen-Kanäle darstellen. Sie bestehen in der Regel aus einer sechs-transmembran Domäne, einer Poren-Region sowie zytoplasmatischen Amino- und Carboxytermini und fügen sich in der Regel zu Tetrameren zusammen (Ramsey et al. 2006). An dieser Stelle soll nur kurz auf die für die Hitzesensibilität wichtigsten und bekanntesten Rezeptoren eingegangen werden.

TRPV1 (V=vanilloid) ist ein unselektiver Kanal für Kationen wie Ca<sup>2+</sup> und Na<sup>+</sup> (Caterina et al. 1997) und wird hauptsächlich auf dünnmyelinisierten A $\delta$ - oder unmyelinisierten C-Fasern exprimiert. Neben einem extrazellulären Anstieg von Protonen und der Agonisten 12-HETE (12-Hydroxyeicosatetraensäure) bzw. den Amid-Derivaten der Arachidonsäure führt vor allem die Bindung des spezifischen Agonisten Capsaicin, das

Acrylamid-Derivat der Homovanillin-Säure, zu einer Öffnung des Kanals (Caterina 2006). Desweiteren verstärkt sich die Antwort auf die chemischen Agonisten bei leichter Erwärmung über Raumtemperatur. Bei einer Temperatur über 42°C wird der Kanal auch ohne chemische Liganden aktiviert und ein Kationeneinstrom bewirkt, dass Aktionspotenziale erzeugt werden (Caterina 2006). Bei TRPV1-knockout-Mäusen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass nach Ablation des Gens für diesen Kanal nicht nur die Sensibilität für Capsaicin fehlt, sondern auch die Latenz der Reaktion auf noxische Hitzereize erhöht ist und in Verhaltensstudien die schützende Reaktion (in diesem Fall durch das Wegziehen des Schwanzes) auf noxische Hitzereizung  $\geq 50^\circ\text{C}$  ausbleibt (Caterina 2006).

TRPV3 ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler, thermosensibler Kanal mit einer Reizschwelle zwischen 34 und 39°C. Auch TRPV4 ist  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabel und thermosensitiv, hat aber eine noch niedrigere Reizschwelle von ca. 25 – 34°C. Darüber hinaus kann TRPV3 zum Beispiel durch Kampfer aktiviert werden, TRPV 4 durch hypoosmotische Reize oder Arachnoidonsäure-Derivate. Versuche mit Knockout-Mäusen zeigen, dass TRPV3 eine wichtige Rolle bei der Geschwindigkeit der Reaktion auf Hitzereize spielt und TRPV4 eher der Abgrenzung des als angenehm empfundenen Temperaturbereiches dient.

Die Transduktionsmechanismen der nicht-noxischen Kältesensibilität der primär afferenten Neurone wird höchstwahrscheinlich ausschließlich durch den TRPM8-Kanal vermittelt. Die Reizschwelle liegt in vitro bei Temperaturen unter 30°C (~25° im Mittel) und als Agonist wirken Substanzen wie Menthol, Icilin und Senföl (Belmonte et al. 2009). Die Mechanismen der noxischen Kältesensibilität hingegen sind erst zum Teil bekannt. Hier spielt möglicherweise der TRPA1-Kanal eine Rolle, dessen Reizschwelle sich in vivo bei ca. 17,5°C befindet. TRPA1 reagiert neben Icilin, Senföl und Zimtaldehyd (Story et al. 2003; Belmonte et al. 2009) auch auf Menthol in niedrigen Konzentrationen, wird jedoch durch hohe Konzentrationen blockiert (Karashima et al. 2007). Es wird stark diskutiert, ob TRPA1 spezifisch für die noxische Kältesensibilität ist (Belmonte et al. 2009, Belmonte & Viana 2008). Es könnten ebenfalls eine Vielzahl anderer Kanal-Proteine eine entscheidende Rolle spielen, besonders Kalium-Kanäle (Babes 2009).

Die Transduktionsmechanismen der Mechanosensibilität primär afferenter Neurone sind bisher unbekannt. An ihr sind vermutlich unterschiedliche Mechanismen beteiligt (Hu et al. 2006; Lumpkin & Caterina 2007).

#### **I.4 Experimentelle Gruppen**

In der vorliegenden experimentellen Arbeit wurde die Hypothese getestet, dass der TRPV1-Agonist Capsaicin die hitzesensiblen Afferenzen im Nervus suralis erregt und/oder für Hitzereize desensibilisiert ohne die Mechanosensibilität und Kaltsensibilität zu beeinflussen. Es wurden die axonale Hitzesensibilität und die Hitzesensibilität der Sprossen geschädigter Afferenzen mit neurophysiologischen Methoden getestet. Hierzu wurden vier unterschiedliche Experimente durchgeführt (Abb. I.01):

- In *Experiment 1* wurde der N. suralis wenige Stunden vor den neurophysiologischen Messungen gequetscht. Die axonale Erregbarkeit proximal der Quetschung auf thermische und mechanische Reizung vor und nach lokaler Applikation von Capsaicin wurde untersucht.
- In *Experiment 2* wurde der N. suralis 4-7 Tage vor den neurophysiologischen Messungen gequetscht. Die axonale Erregbarkeit proximal der Quetschung auf thermische und mechanische Reizung vor und nach lokaler Applikation von Capsaicin von afferenten Axonen sowie identifizierten postganglionären Axonen wurde untersucht.
- In *Experiment 3* wurde der N. suralis 4-7 Tage vor den neurophysiologischen Messungen gequetscht. Die Erregbarkeit der Sprossen der geschädigten Axone auf thermische und mechanische Reizung vor und nach lokaler Applikation von Capsaicin wurde untersucht.
- In *Experiment 4* wurden Afferenzen im Nervus suralis von der Haut funktionell als mechano-, kälte- oder hitzesensibel identifiziert. Diese Afferenzen wurden auf ihre axonale Erregbarkeit durch Capsaicin getestet.

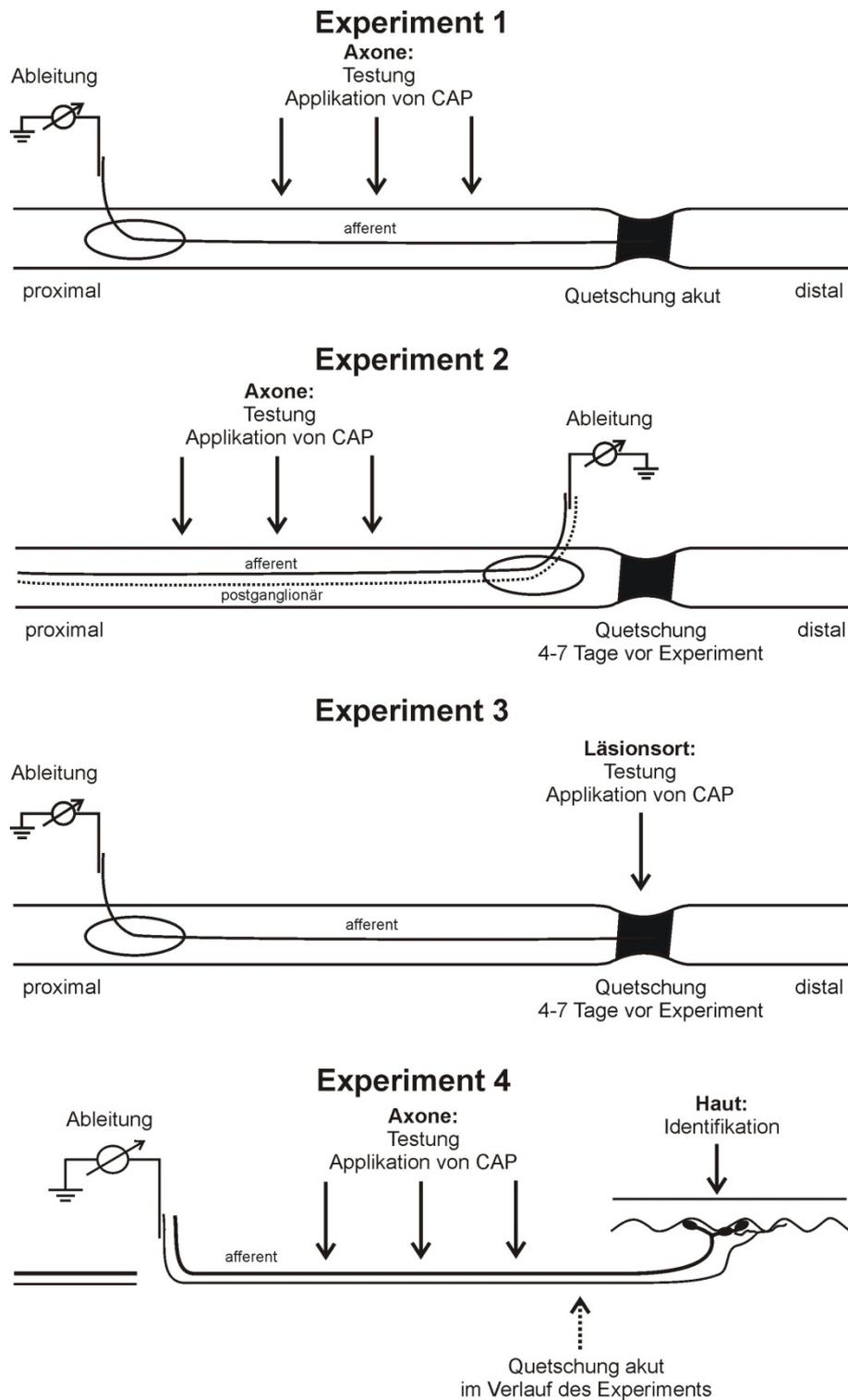


Abbildung 1.01 Übersicht über die vier experimentellen Gruppen

In **Experiment 1** proximale Ableitung und distale, akute Quetschläsion. Die Testung erfolgte entlang des Axons. Ähnlicher Aufbau in **Experiment 3**. Ebenfalls proximale Ableitung, jedoch erfolgte die Quetschläsion 4-7 Tage vor Versuchsdurchführung und die Testung am Ort der Läsion selbst. **Experiment 2** unterscheidet sich grundlegend von den erstgenannten. Bei distaler, chronischer (4-7 Tage) Quetschläsion, erfolgte die Ableitung ebenfalls so distal wie möglich. Getestet wurde entlang des Axons. In **Experiment 4** wurden bei proximaler Ableitung zuerst Nervenfasern von der Haut und entlang des Axons identifiziert. Anschließend erfolgte eine akute, distale Quetschläsion mit anschließender Testung entlang des Axons.

## I.5 Fragestellung

Anhand der vier unterschiedlichen Gruppen von Experimenten wurden folgende Fragestellungen bearbeitet. Wegen der Übersichtlichkeit sind die Fragestellungen den einzelnen Experimenten zugeordnet.

- Experimente 1 + 2 (Abb. I.01):
  - (1) Können hitzesensible Afferenzen axonal durch Capsaicin erregt und/oder desensibilisiert werden?
  - (2) Ein geschädigter Nerv unterliegt im Laufe des Regenerationsprozesses biochemischen sowie morphologischen Veränderungen. Können im Vergleich zwischen einer akuten (Experiment 1) und einer chronischen Läsion (4-7 Tage, Experiment 2) unterschiedliche Reaktionen auf Hitzereize und/oder der Applikation von Capsaicin beobachtet werden?
- Experiment 2 (Abb. I.01):
  - (3) In Experiment 2 ist die Verbindung der getesteten Filamente zum Rückenmark intakt und es konnten postganglionäre sympathische Afferenzen identifiziert werden. Haben thermische Reize und/oder Capsaicin einen Effekt auf diese Fasern?
- Experiment 3 (Abb. I.01):
  - (4) Können hitzesensible Afferenzen am Ort der Läsion durch Capsaicin erregt und/oder desensibilisiert werden?
  - (5) Grossmann et al (2009) klassifizierten die hitzesensiblen Afferenzen in eine niederschwellige (Reizschwelle  $\leq 42^{\circ}\text{C}$ ) und eine hochschwellige (Reizschwelle  $\geq 43^{\circ}\text{C}$ ) Population. Können Unterschiede zwischen diesen beiden Populationen in der Reaktion auf Capsaicin und/oder der Desensibilisierung festgestellt werden?
- Experiment 4 (Abb. I.01):
  - (6) 60 – 70% der kutan hitzesensiblen C-Fasern sind nicht entlang des Axons durch Hitzereize erregbar (s.o.). Zeigen diese Fasern trotzdem eine Reaktion auf die axonale Applikation von Capsaicin?
- Experiment 1 + 2 + 3 + 4 (Abb. I.01):
  - (7) Werden die Kälte- und/oder Mechanosensibilität von hitzesensiblen oder nicht-hitzesensiblen Afferenzen durch die Applikation von Capsaicin beeinflusst?

## II. METHODIK

### II.1 Narkose und Präparation

Es wurden an 27 männlichen Wistar Ratten (mit einem Körpergewicht zwischen 350 und 480g) Versuche durchgeführt. Der Nervus suralis wurde in zwei von vier Versuchsreihen (Experiment 2 und 3) 4-7 Tage vor dem eigentlichen elektrophysiologischen Experiment durch eine Quetschung geschädigt. Hierzu wurden die Versuchstiere mit Pentobarbital (*Narkoren*, 60 mg/kg i.p.) in Narkose versetzt. Als Kontrolle der Narkosetiefe diente das Fehlen des Corneal- wie auch der Flexorreflexe. Unter aseptischen Bedingungen wurde der Nervus suralis mit sterilen Instrumenten je nach Versuchsaufbau 18 mm (Experiment 2) bzw. 25 mm (Experiment 3) proximal des Sprunggelenks auf einer Länge von 6-10 mm freigelegt. Unter stereomikroskopischer Kontrolle wurde der Nerv durch dreimaliges Quetschen für 10 Sekunden mit einer feinen Pinzette, deren Spitzen zum Schutz mit Kunststoff überzogen wurden, geschädigt. Als Folge nahm der Nerv eine glasige Transparenz an, welche als Zeichen für eine erfolgreiche Läsion gewertet wurde. Die Breite der Läsion betrug ca. 1 mm. Anschließend wurde die Läsionsstelle 2-3 mm lateral des Nervs auf der Oberfläche des M. triceps femoris lateralis mit einem nicht resorbierbaren Faden markiert, um diese im späteren Experiment wiedererkennen zu können. Nachfolgend wurde erst der durchtrennte Muskelbauch verschlossen und anschließend die Haut. In den Experimenten 1 und 4 erfolgte keine Operation vor dem Tag des eigentlichen Experiments.

Am Versuchstag wurden die Ratten wiederum mit Pentobarbital (*Narkoren*, 60mg/kg i.p.) in Narkose versetzt. Nach Freilegung der Trachea erfolgte eine Tracheotomie mit Einbringen einer Beatmungskanüle. Die Ratten atmeten bei der chirurgischen Präparation bis zur eigentlichen elektrophysiologischen Ableitung spontan. Zur regelmäßigen Darreichung von Flüssigkeit, Medikamenten und um die Narkose aufrecht zu erhalten (*Narkoren*, 10-20mg/kg/h i.v.) wurde ein Katheter in die V. jugularis eingebracht. Ein weiterer Katheter in der Schwanzarterie diente der ständigen Messung des Blutdruckes mittels eines Druckwandlers (LM-22, List, Darmstadt) und der Durchführung regelmäßiger Blutgasanalysen (siehe Abbildung II.01). Der mittlere Blutdruck lag kontinuierlich über 70 mmHg, die Blutgasanalysen dienten der Kontrolle der Atmung sowie der späteren Beatmung, wobei als Maßstab ein  $pO_2 > 70$  mmHg und ein pH von 7,4 angestrebt wurden (ABL 5, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Kurz vor Beginn der elektrophysiologischen Ableitung wurden die Ratten durch eine intravenöse Applikation von Pancuronium (*Organon*, initiale Dosis 1mg/kg i.v.; Erhaltungsdosis 0,4mg/kg/h i.v.) relaxiert. Mit O<sub>2</sub>-angereicherter

Raumluft erfolgte die Beatmung mit einem Respirator (Respirator RUS-1301, FMI, Egelsbach) unter positivem Druck bei einer Frequenz von 70 Atemzügen/Minute. Die Körpertemperatur der Tiere wurde mit einem elektrischen Thermometer rektal gemessen und über eine servo-kontrollierten Thermomatte bei einer Temperatur von 37°C gehalten. Am Versuchsende wurden die Tiere in tiefer Narkose durch intravenöse Applikation einer gesättigten KCl-Lösung getötet.

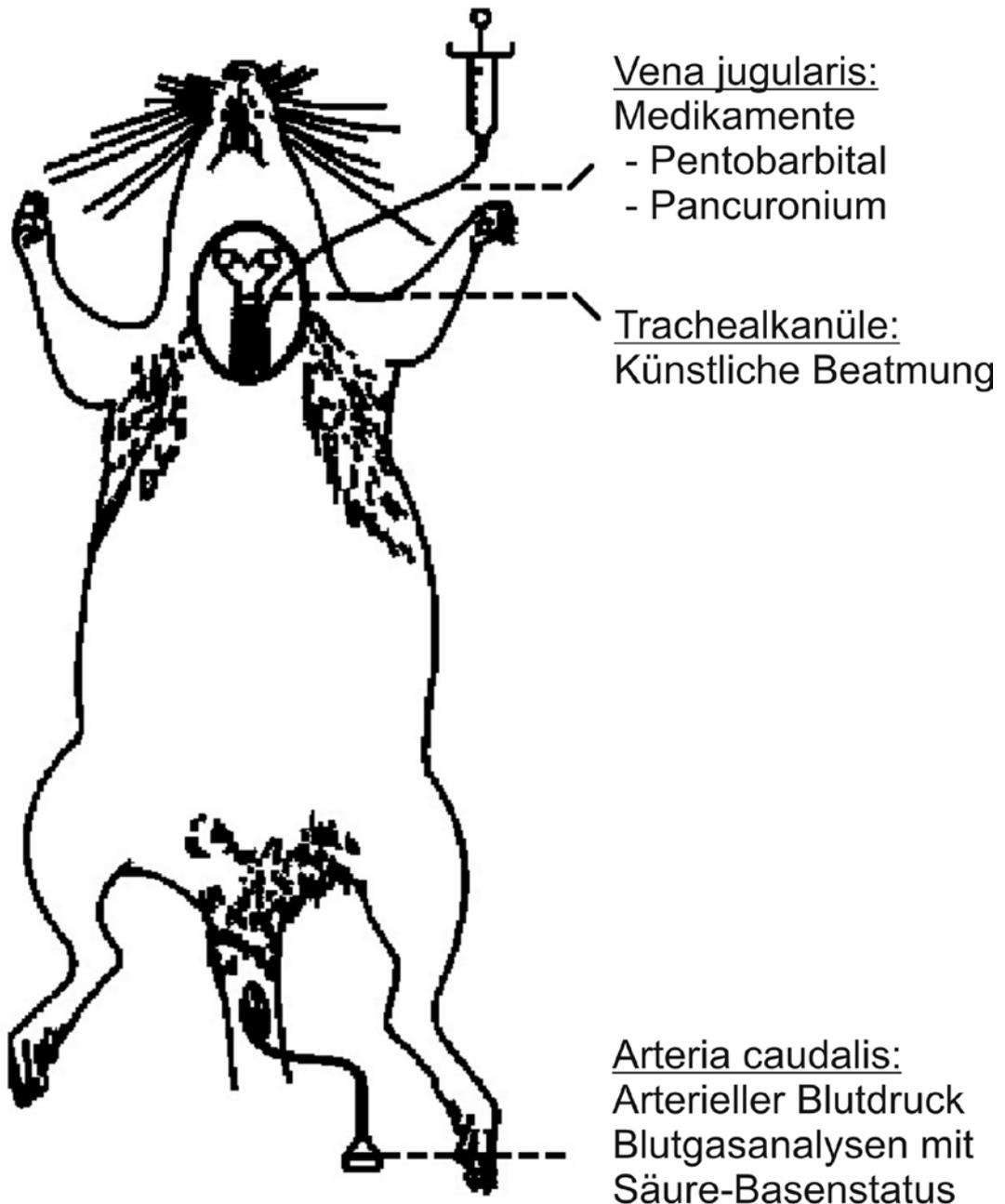


Abbildung II.01 Präparation des Versuchstiers

Der Katheter in der V. jugularis wurde zur regelmäßigen Administration vom Anästhetikum (Pentobarbital) und des Relaxans (Pancuronium) verwendet. Über den Katheter in der Schwanzarterie wurde mit einem Druckwandler der mittlere arterielle Blutdruck gemessen sowie in regelmäßigen Abständen (stündlich) Blutproben zu Bestimmung des Säure-Basen Status entnommen.

## **II.2 Versuchsaufbau, elektrophysiologische Ableitung und Identifikation**

In den vier Experimenten erfolgte die Darstellung des Nervus suralis des linken Beines mittels eines ca. 3-4 cm langen Hautschnittes und Entfernung des Musculus tripeps femoris lateralis. Der Nerv wurde von seinem umliegenden Gewebe freipräpariert und die Hautränder wurden mit Fäden an einer ovalen Metallhalterung fixiert. Der auf diese Weise gebildete Pool, wurde mit 28°C warmen Paraffinöl gefüllt. Eine schwarze Plexiglasplattform diente als Arbeitsplattform und wurde unter dem Nerv installiert. Den Nervus suralis konnte man in seinem Verlauf von distal nach proximal auf der Plexiglasplattform verfolgen und unter einem Stereomikroskop das Epineurium auf einer Länge von ca. 3-4 mm eröffnen. Mit feinen Uhrmacherpinzetten wurden möglichst feine Filamente mit Nervenfasern aus dem Nerven präpariert und an eine Platinelektrode gelegt. So konnte die elektrische Aktivität in den Axonen dieses Filaments unipolar abgeleitet werden. Eine Referenzelektrode wurde mit dem umliegenden Gewebe verbunden. Die abgeleiteten Signale wurden durch einen Differentialverstärker mit niedrigem Rauschen verstärkt (Eingangswiderstand 10 M $\Omega$ , Verstärkungsfaktor 100x – 1000x, Humbug, Digitimer Research Instruments, Hertfordshire, England), durch einen Zwischenverstärker 100-fach verstärkt, gefiltert (120 Hz bis 1.2 kHz für unmyelinisierte sowie 120 Hz bis 40 kHz für myelinisierte Fasern) und durch einen Fensterdiskriminator geleitet. Dargestellt wurden die Signale auf einem Speicheroszilloskop (Tektronix, Oregon, USA) und über Lautsprecher zur auditiven Kontrolle übermittelt. Zusätzlich wurde das Signal digital über eine Datenerfassungsschnittstelle (micro1401, Cambridge Electronic Design (CED), England) auf einen Computer übertragen und mit dem Programm „Spike 2“ (Cambridge Electronic Design (CED), England) ebenfalls dargestellt und für eine spätere offline-Analyse gespeichert (siehe Datenanalyse).

Experiment 1 (siehe Abbildung I.01):

Bei diesem Versuch wurde der Nerv akut vor Beginn der Ableitung an einem distalen Punkt durch eine feine Pinzette, dessen Spitzen mit Kunststoff überzogen waren, geschädigt. Die Applikation von Reizen und auch des Capsaicins erfolgte proximal der Läsion entlang des Axons, mindestens 4 mm vom Läsionspunkt entfernt. Die Ableitung erfolgte so proximal wie möglich, in einem Bereich, in dem der Nervus suralis mit dem Nervus ischiadicus verläuft.

Experiment 2 (siehe Abbildung I.01):

Es erfolgte 7 Tage vor dem Experiment eine sehr weit distal gelegene Quetschläsion des Nervus suralis. Die schwarze Plexiglasplattform sowie die Ableitelektrode wurden so distal

wie möglich, knapp vor dem Läsionsort, installiert. Die Testung und Applikation von Capsaicin erfolgte proximal von der Läsion und der Ableitung entlang des Axons.

Experiment 3 (siehe Abbildung I.01):

Dieser Aufbau gleicht dem Versuchsaufbau von Experiment 1. Der Nerv wurde 7 Tage vor Durchführung des eigentlichen Experiments geschädigt und die Testung und Applikation von Capsaicin erfolgte am Ort der Quetschläsion selbst.

Experiment 4 (siehe Abbildung I.01):

In diesem Experiment wurden die Ableitelektroden so proximal wie möglich platziert. Zuerst erfolgte eine Testung physikalischer Reize im Innervationsgebiet des Nervus suralis an der lateralen, plantaren, behaarten Haut der Pfote. Auf diese Weise konnten Fasern identifiziert werden, welche von der Haut erregbar waren. Darauf folgte eine Testung entlang des Axons, um die Fasern zu identifizieren, welche entlang des Nervs auf physikalische Reize reagierten. Somit zeigten sich Fasern, welche entweder ausschließlich von der Haut, ausschließlich entlang des Axons oder sowohl von der Haut als auch vom Axon erregbar waren. Anschließend wurde der Nerv so weit distal wie möglich durch eine Quetschung akut geschädigt und eine erneute Testung entlang des Axons durchgeführt. Es schloss sich die Applikation von Capsaicin und eine erneute Testung an.

#### Elektrophysiologische Identifikation

Für die elektrophysiologische Identifikation der Axone wurde der Nerv in den Experimenten 1, 3 und 4 ca. 1 cm proximal des Läsionsortes auf Reizelektroden gelegt. In Experiment 2 wurden diese ca. 2,5 cm proximal der Läsion (entspricht ca. 1,5 cm proximal der Ableitung) platziert. Der Nervus suralis wurde auf einer Länge von 5 mm vom umliegenden Gewebe befreit, mit einem der Isolation dienenden dünnen Kunststoff-Blättchen untertunnelt, und auf ein Paar Platinelektroden gelegt. Durch elektrische Stimulation mit Rechteckimpulsen einer Länge von 0.1 ms (A-Fasern) oder 0.5 ms (C-Fasern), einer Frequenz von 0.3 Hz (A-Fasern) bzw. 3 Hz (C-Fasern) und zunehmender Intensität bis 40 V konnten Fasern anhand ihrer Leitungsgeschwindigkeit als myelinisierte Fasern (A-Fasern, Leitungsgeschwindigkeit  $>2\text{m/s}$ ) oder unmyelinisierte Fasern (C-Fasern, Leitungsgeschwindigkeit  $\leq 2\text{m/s}$ ) klassifiziert werden. Darüber hinaus können Fasern auch anhand der Amplitude und Form des Aktionspotenzials sehr zuverlässig in A- und C-Fasern unterteilt werden (Michaelis et al. 1994; Blenk et al. 1996). Typisch für A-Fasern zum Beispiel ist das biphasische Bild der Aktionspotenziale.

Dies ermöglicht auch eine recht sichere Identifikation der Axone als A- oder C-Fasern, welche allein durch die elektrische Reizung nur schwer oder gar nicht zu klassifizieren waren.

## **II.3 Versuchsablauf**

### II.3.1 Übersicht und elektrophysiologische Ableitung einzelner Nervenfilamente

Der Versuchsablauf ist grundsätzlich in allen vier Experimenten identisch, lediglich in Experiment 4 weicht das experimentelle Protokolle durch die vorherige Testung der Haut etwas ab (s.u.). Abbildung II.02 zeigt eine Übersicht über das experimentelle Protokoll. Ein kurzer, hochschwelliger Reiz wurde mittels der Reizelektroden appliziert, um eine grobe Orientierung über das Vorhandensein und die Anzahl von C-Fasern in einem Filament, welches vom N. suralis isoliert worden ist, zu gewinnen. Darauf folgte die Aufnahme gegebenenfalls vorhandener Spontanaktivität über einen Zeitraum von drei bis vier Minuten, ohne jegliche Manipulation des Nervs. Anschließend wurden am Ort der Läsion (Experiment 3) oder an unterschiedlichen Orten proximal der Läsion entlang des Axons (Experiment 1 + 2) mechanische und thermische Reize appliziert (s.u.). Es folgte die Applikation von Capsaicin in einer niedrigen Konzentration. Erneut wurden mechanische und thermische Reize appliziert. Es folgte die Applikation einer höheren Konzentration Capsaicin. Anschließend erneute mechanische und thermische Testung. In manchen Experimenten schließen sich noch weitere Applikations- und Testungszyklen an. Im Anschluss erfolgte die elektrophysiologische Identifikation, wie oben beschrieben. Hierbei konnten in der Regel jeweils ca. 5-8 A- und C-Fasern pro getestetem Filament identifiziert werden. Anschließend wurden die gewonnenen Daten gesichert und die Testung dieses Filaments war beendet. Es folgte die Suche nach einem neuen stabilen Filament, welches wiederum den oben genannten Testungen unterzogen wurde. Ein Versuch umfasste in der Regel die Testung von 3-4 Filamenten.

In Experiment 4 erfolgte vor der Testung und Applikation von Capsaicin am Nerv erst eine Testung der thermischen und mechanischen Sensibilität der Haut sowie entlang des Nervs. Daraufhin wurde der Nerv durch eine Quetschung geschädigt. Anschließend erfolgte die Testung wie oben beschrieben und in Abbildung II.02 dargestellt. Wegen der vorangegangenen Testung der Haut und späterer Quetschläsion wurde in diesem Experiment lediglich ein Filament pro Versuch getestet.

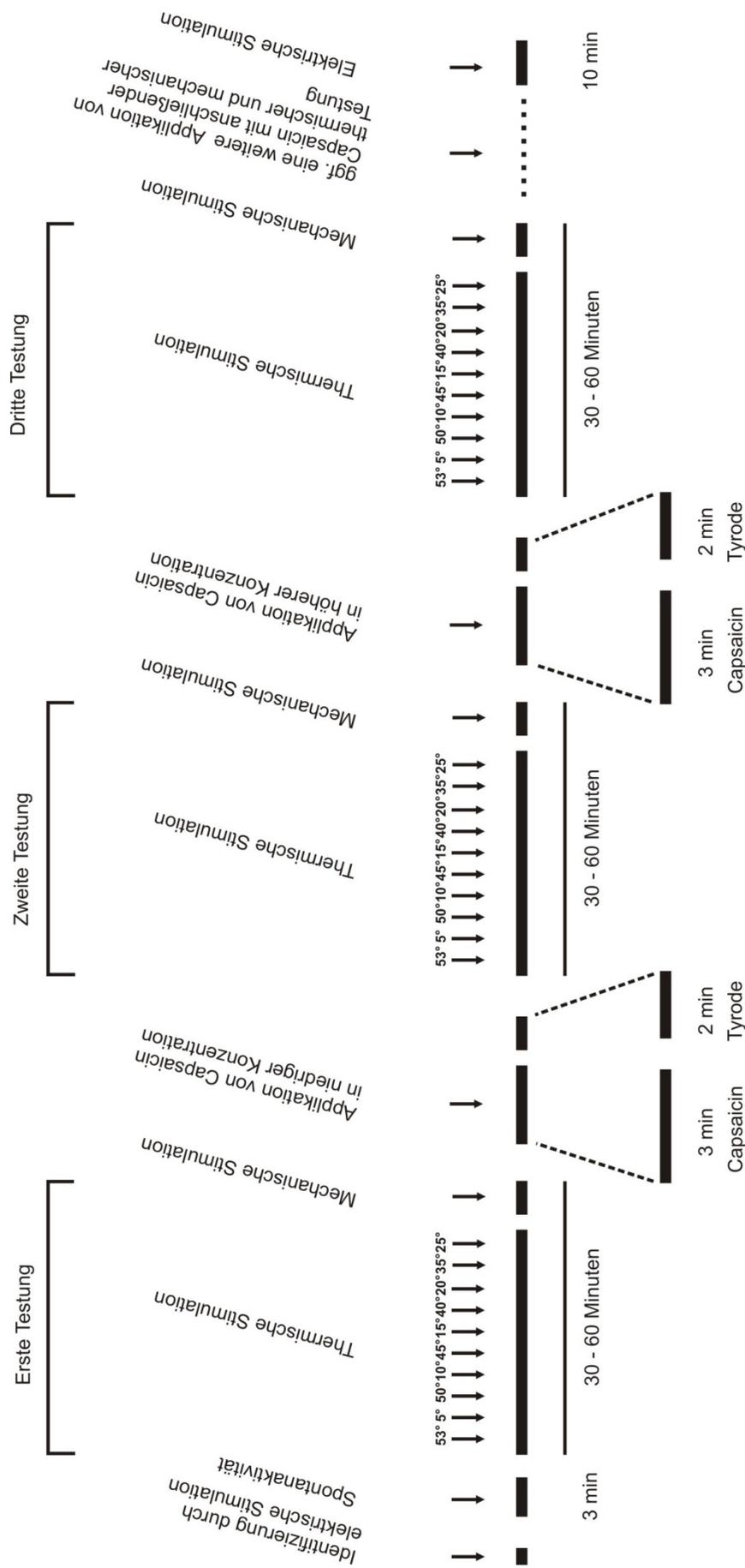


Abbildung II.02 Darstellung des zeitlichen Ablaufes der Experimente

Auf eine kurze orientierende elektrische Stimulation folgt die Aufnahme von Spontanaktivität, sofern vorhanden. Es schließt sich die erste Testung unterschiedlicher Temperaturen am Ort der Läsion oder entlang des Axons an. Würde die Schwellentemperatur erreicht und bei der nächsten Stufe keine Reizantwort mehr gesehen, dann wurde auf die weitere Testung niedrigerer (bei Hitzeereizen) bzw. höhere (bei Kältereizen) Temperaturen verzichtet. Es folgte die Testung auf Mechanosensibilität. Daraufhin wurde Capsaicin in einer niedrigen Konzentration über einen Zeitraum von 3 Minuten appliziert. Anschließend erfolgte eine zweiminütige Applikation von Tyrosine-Lösung. Es schloss sich daran die erneute thermische und mechanische Testung an. Nach Applikation von Capsaicin in einer höheren Konzentration erfolgte wiederum eine umfassende Testung. In manchen Experimenten, in denen viele unterschiedliche Konzentrationen Capsaicin getestet wurden, wiederholte sich dieses Vorgehen noch einige Male. Abschließend wurde eine ausführliche elektrische Stimulation mit Identifikation der einzelnen Fasern durchgeführt.

### II.3.2 Thermosensibilität

Die Thermosensibilität wurde in den Experimenten *1*, *2* und *4* an verschiedenen Stellen entlang des Nervs proximal zur Läsion getestet (7, 14, 21, 28, 35 und wenn möglich 42mm, gemessen vom Läsionsort). Meist zeigten sich 1-2 Abschnitte des Nervs, an denen eine oder mehrere Fasern erregt werden konnten. Diese Stellen wurden im Verlauf des Experimentes zur weiteren Testung und Applikation von Capsaicin (s.u.) genutzt. In Experiment *3* wurde ausschließlich am Ort der Läsion getestet. Hierzu wurde eine speziell angefertigte Thermode mit einer Berührungsfläche von ca. 3 mm<sup>2</sup> genutzt (Gorodetskaya et al. 2003), welche mit Wasser unterschiedlicher Temperatur perfundiert werden kann. Es wurde mit einer hohen Temperatur von ca. 53°C begonnen, um nach Hitzefasern zu suchen. Fand sich eine deutliche Aktivierung von einer oder mehrerer gut zu diskriminierender Nervenfasern an einem Punkt entlang des Nervs (Exp. *1+2+4*) bzw. am Ort der Läsion (Exp. *3*), so schloss sich dort eine ausführliche thermische Testung an, wie folgend beschrieben. War dies nicht der Fall, wurde weiter entlang des Nervs gesucht und schließlich bei Nichtvorhandensein ein neues Filament aus dem Nerven getestet (Exp. *1+2*) bzw. gleich ein neues Filament genommen (Exp. *3*). Bei der ausführlichen Testung wurden abwechselnd Hitze- und Kältereize appliziert, um einer Desensibilisierung entgegenzuwirken. So erfolgte eine Testung mit folgender Temperaturabfolge: 53° - 5° - 50° - 10° - 45° - 15° - 40° - 20° ggf. 35° - 25° C. Ein Reiz dauerte zwischen 25-30 Sekunden, die Ausgangstemperatur des Nervs betrug 28-30°C. Die Temperaturen wurden so lange getestet bis keine Aktivierung durch Hitze- oder Kältereize mehr vorhanden war. Als Aktivierung wurden bei nicht spontanaktiven Fasern 3 Aktionspotenziale während der Dauer des Reizes definiert. Dies gilt auch bei spontanaktiven Fasern mit einer Ruheaktivität unter 0,5 imp/s, wo 3 zusätzliche Aktionspotenziale registriert werden mussten. Als Erregungsschwelle gilt die höchste bzw. niedrigste Temperatur, die eine Faser aktivieren konnte. Da in Experiment *4* erst eine Testung der Haut voranging und anschließend akut eine Quetschläsion erfolgte, konnte in diesem Fall nur ein Filament pro Experiment getestet werden. Die thermische Testung der Haut erfolgte mittels eines Peltier-Elements, welches eine Kontaktfläche von ca. 1 cm<sup>2</sup> hat.

### II.3.3 Mechanosensibilität

Zur Testung der Mechanosensibilität entlang des Nervs wurden unter visueller Kontrolle durch das Stereomikroskop mit einem stumpfen Glasstab entweder am Ort der Läsion (Exp. *3*) oder entlang des Axons proximal der Läsion (Exp. *1+2+4*) phasische mechanische Reize appliziert. Gleiches gilt auch für die Testung an der Haut. Entlang des Axons in den

Experimenten 1, 2 und 4 wurde im Falle des Vorhandenseins von mechanisch aktiven Fasern detaillierter mittels kalibrierten von Frey Filamenten getestet. Die von Frey Filamente dienten der präzisen Schwellenbestimmung und besaßen abgerundete, flache Enden ( $\varnothing$  0.5mm) und eine Stärke von 0.3 bis 100mN (MARSTOCK <sup>nervetest</sup>, Fruhstorfer, Marburg). Über 10 bis 20 Sekunden wurden mit einer Frequenz von ca. 1/s Reize appliziert und die Stärke der von Frey Filamente so lange verringert, bis keine Reaktion auf die Reizung mehr zu registrieren war. Jenes Filament, bei welchem gerade noch eine Aktivierung der Nervenfasern zu verzeichnen war, wurde als Schwelle angesehen. Als Aktivierungsgrenze wurden mindestens 5 Aktionspotenziale während der 10 sekündigen Testung definiert.

#### II.3.4 Applikation von Capsaicin

An die Testung von Thermo- und Mechanosensibilität schließt sich die Applikation von Capsaicin an. Hierzu wurde Capsaicin in Tyrode (physiologische Elektrolytlösung, pH = 7,4) gelöst und somit Konzentrationen von 10, 50 und 100  $\mu$ Mol sowie 1 und 10 mMol erzeugt. Die Applikation erfolgte mit einem kleinen Stück Filterpapier (ca. 4x4 mm), welches in eine der oben genannten Konzentrationen getaucht und dann auf der zu testenden Stelle appliziert wurde. Anschließend wurde das Capsaicin entfernt und stattdessen ein in Tyrode-Lösung getränktes Filterpapierstück für 2 Minuten appliziert, um die Capsaicin-Reste auszuwaschen und einem dauerhaften Einwirken entgegenzuwirken. Die Ruhe- oder ggf. Spontanaktivität wurde über 3 Minuten vor und nach der Applikation aufgezeichnet. Je nach Experiment wurden unterschiedliche Konzentrationen benutzt, worauf in den Ergebnissen und der Diskussion näher eingegangen wird. So erfolgte in den Experimenten 1, 2 und 4 die Applikation von 100  $\mu$ Mol, 1 und 10 mMol Capsaicin, hingegen in Experiment 3 nur von 10, 50, 100  $\mu$ Mol, 1 mMol. Vor und nach jeder Applikation erfolgte wie oben bereits beschrieben eine komplette Testung der Thermo- und Mechanosensibilität.

#### II.4 Datenanalyse

Die elektrisch abgeleitete neuronale Aktivität, das EKG, der mittlere arterielle Blutdruck, die Temperatur der Stimulationsthermode und der Beatmungsdruck wurden mit einer digitalen Datenerfassungsschnittstelle (micro1401, Camebridge Electronic Design (CED), England) auf einen Computer übertragen und mit dem Programm „Spike 2“ (Camebridge Electronic Design (CED), England) dargestellt und aufgenommen. Mit diesem Programm erfolgte auch die offline Analyse, bei welcher jedes einzelne Nervenaktionspotenzial identifiziert und anhand

der Amplitude (Abweichungen nicht über 5-7%) und Form (>70% des Faserverlaufs mussten übereinstimmen) zugeordnet werden konnte. Bei der Analyse wurde wie folgt vorgegangen: Bei der Hitze- und Kältesensibilität wurden über 90 Sekunden jeweils 30 Sekunden vor, während und nach dem Stimulus die Frequenz für jede einzelne Sekunde berechnet. So konnte für jeden Stimulus sehr genau die Reizantwort dargestellt und verglichen werden. Darüber hinaus wurden wie oben bereits beschrieben die Schwellentemperaturen ermittelt, mit denen Hitze- und Kältefasern noch erregt werden konnten.

Bei der mechanischen Reizantwort wurde über einen Zeitraum von 10 Sekunden während der stärksten Aktivierung der Faser die Frequenz berechnet und summiert. Außerdem wurde bei mechanischen Reizantworten entlang des Nervs ebenfalls die Reizschwelle bestimmt.

Die Ergebnisse werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des arithmetischen Mittels („Standard error of the mean“, SEM) dargestellt, so nicht anders gekennzeichnet. Zusätzlich wurde der Wilcoxon-Rangsummentest zur Bestimmung der Signifikanz bei gepaarten Stichproben eingesetzt. Da an dieser Stelle unterschiedliche Versuchstiere und unterschiedliche Filamente miteinander verglichen werden, kann es bei der Benutzung dieses Tests theoretisch zu falsch hohen Signifikanzen kommen. Aus diesem Grund wurde jedoch besonders darauf geachtet, dass die Versuchstiere in einem engen Gewichtsbereich liegen und somit eine bestmögliche Vergleichbarkeit besteht. Darüber hinaus wurde ein Fischer-Test zur Bestimmung signifikanter Unterschiede in den Schwellenverteilungen angewendet.

### III. ERGEBNISSE

Insgesamt wurden in den Experimenten 1, 2 und 3 108 Nervenfasern getestet und analysiert, davon 88 C-Fasern und 20 A-Fasern. Diese verteilen sich auf drei unterschiedliche Experimente:

In den Experimenten 1 und 2 soll gezeigt werden, ob hitzesensible Afferenzen axonal durch Capsaicin erregt und/oder desensibilisiert werden können. Dabei soll verglichen werden, ob zwischen einer akuten (Experiment 1) und einer chronischen Läsion (Experiment 2) unterschiedliche Reaktionen beobachtet werden können. Da in Experiment 2 die Verbindung der getesteten Filamente zum Rückenmark intakt sind, wurden hier auch postganglionäre sympathische Efferenzen identifiziert und auf ihre Capsaicinempfindlichkeit untersucht. In Experiment 3 liegt eine chronische Schädigung (4-7 Tage) des Nervus suralis zu Grunde. Können hitzesensible Afferenzen am Ort der Läsion durch Capsaicin erregt und/oder desensibilisiert werden? Zeigen sich Unterschiede zwischen der niederschwelligen (Reizschwelle  $<42^{\circ}\text{C}$ ) und der hochschwelligen Population von Afferenzen (Reizschwelle  $>42^{\circ}\text{C}$ )? Experiment 4 geht der Frage nach, ob kutane hitzesensible C-Fasern, welche nicht entlang des Axons durch Hitzereize erregbar sind (60-70%), trotzdem eine Reaktion auf axonale Applikation von Capsaicin zeigen. Experiment 4 wird im Abschnitt III.4 gesondert betrachtet. Die vier experimentellen Ansätze sollen auch die Frage klären, ob die Kälte- und oder Mechanosensibilität von hitzesensiblen oder nicht hitzesensiblen Afferenzen durch die Applikation von Capsaicin beeinflusst werden.

Die Tabellen III.01 und III.02 geben eine Übersicht über die getesteten Fasern der Experimente 1, 2 und 3 mit ihren individuellen und kombinierten Antwort-Charakteristika. Angegeben sind die Häufigkeiten der einzelnen Antwortcharakteristika (Hitze-, Kälte- und Mechanosensibilität, sowie Spontanaktivität) und die Häufigkeiten aller möglichen kombinierten Antwortcharakteristika (wie Hitze- und Kältesensibilität oder alleinige Mechanosensibilität).

Axonale Testung	Experiment 1		Experiment 2		Gesamt	
	A-Fasern	C-Fasern	A-Fasern	C-Fasern	A-Fasern	C-Fasern
Anzahl Fasern gesamt	1	39	1	20	2	59

Individuelle Antwort-Charakteristika						
Spontanaktivität	0	5	0	11	0	16
Hitzesensibilität	0	25	0	7	0	32
Kältesensibilität	0	17	0	8	0	25
Mechanosensibilität	1	1	1	1	2	2

Kombinationen von Antwort-Charakteristika						
Hitze (SA)	0	20 (3)	0	4	0	24
Kälte (SA)	0	12 (1)	0	5 (3)	0	17
Mechano	1	0	1	0	2	0
Hitze/Kälte (SA)	0	4 (1)	0	2	0	6
Hitze/Mechano (SA)	0	0	0	0	0	0
Hitze/Kälte/Mechano	0	1	0	1	0	2
Kälte/Mechano	0	0	0	0	0	0
allein Capsaicin	0	1	0	0	0	1
allein Spontanaktiv	0	1	0	8*	0	9

Tabelle III.01 Übersicht der funktionellen Eigenschaften der Fasern auf axonale Testung der Experimente 1 und 2

Dargestellt sind die A- und C-Fasern der Experimente 1 und 2, in denen 2 A- und 59 C-Fasern mit axonaler Erregbarkeit auf mechanische oder thermische Reizung untersucht wurden. Es werden die individuellen von der Kombination der Antwort-Charakteristika unterschieden. (SA) gibt die Anzahl spontanaktiver Fasern an (enthalten in den Zahlen vor den Klammern). Bei den 8 mit \* gekennzeichneten allein spontanaktiven Fasern handelt es sich um postganglionäre sympathische Efferenzen (siehe auch III.2.4 sowie Abbildung III.03).

Testung am Läsionsort	Experiment 3	
	A-Fasern	C-Fasern
Anzahl Fasern gesamt	18	29

Tabelle III.02 Faser-Übersicht des Experiments 3 (Testung am Läsionsort)

Individuelle Antwort-Charakteristika		
Spontanaktivität	0	5
Hitzesensibilität	2	23
Kältesensibilität	0	9
Mechanosensibilität	18	4

Dargestellt sind die A- und C-Fasern für das Experimente 3, in dem die Erregbarkeit von insgesamt 18 A- und 29 C-Fasern am Läsionsort auf mechanische oder thermische Reizung untersucht wurden. Es werden die individuellen von der Kombination der Antwort-Charakteristika unterschieden. Werte in Klammern geben die Anzahl spontanaktiver Fasern an (enthalten in den Zahlen vor den Klammern).

Kombinationen von Antwort-Charakteristika		
Hitze (SA)	0	15 (1)
Kälte (SA)	0	5 (2)
Mechano	16	0
Hitze/Kälte (SA)	0	4
Hitze/Mechano (SA)	2	4 (1)
Hitze/Kälte/Mechano	0	0
Kälte/Mechano	0	0
allein Capsaicin	0	0
allein Spontanaktiv	0	1

### III.1 Darstellung der Hitze-, Kälte- und Mechanosensibilität von Hautafferenzen nach Quetschläsion

#### III.1.1 Hitzesensibilität

Von allen A-Fasern zeigten lediglich 2/20 eine Aktivierung auf Hitzereize. Bei beiden Fasern handelte es sich um polymodale Fasern mit Hitze- und Mechanosensibilität aus Experiment 3, in welchem am Läsionsort getestet wurde.

Anders verhält es sich mit den C-Fasern, bei denen insgesamt 55/88 der auf thermische oder mechanische Reize sensiblen Fasern auf Hitzereize reagierten. 39 dieser Fasern waren monomodal hitzesensibel; 16 Fasern waren zusätzlich durch Kälte- und/oder mechanische Reize erregbar (siehe Tabellen III.01 und III.02). Die Schwellenverteilung für die Experimente 1, 2 und 3 ist in Tabelle III.03 dargestellt. Auffällig ist die hohe Anzahl hochschwelliger Fasern bei der axonalen Testung in den Experimenten 1 und 2, welche sich bei der Testung am Läsionsort nicht fanden. Ausschließlich bei der Testung am Läsionsort in Experiment 3 zeigten sich hingegen Hitzefasern mit Schwellen unter 40°C. Die niedrigste Schwellentemperatur betrug dabei 31,1°C, die höchste 55,1°C.

Die Abbildungen III.01 A und III.04 A (s.u.) zeigen das typische Antwortverhalten von C-Fasern mit Hitzesensibilität auf einen Hitzereiz, welcher die Reizschwelle überschreitet. In Abbildung III.09 A und B ist zusätzlich das Antwortverhalten einer polymodalen C-Faser auf einen Hitze- und einen Kältereiz dargestellt. Diese Reaktionen sind auch an intakten Nervenfasern in dieser Form zu beobachten.

	Läsion	Testung	30-34,9°C	35-39,9°C	40-44,9°C	45-49,9°	50-54,9°C	>55°
A	Experiment 1	axonal	0	0	1	3	18	1
	Experiment 2	axonal	0	0	2	2	2	0
	Experiment 3	Läsionsort	2	4*	4*	7	1	0
B Vergleich	Experiment 1+2	axonal vs. Läsionsort	0	0	3	5	20	1
	Experiment 3	Läsionsort	2	4*	4*	7	1	0

Tabelle III.03 Schwellenverteilung der hitzesensiblen Fasern

A: Übersicht über die Schwellenverteilung der hitzesensiblen Fasern aus den Experimenten 1, 2 und 3. Die mit \* gekennzeichneten Zahlen enthalten jeweils eine hitzesensible A-Faser.

B: Vergleich der Schwellenverteilungen der Testung am Axon (Summe der Experimente 1 und 2) mit der Testung am Ort der Läsion (Experiment 3). Die mit \* gekennzeichneten Zahlen enthalten je eine hitzesensible A-Faser. Hier wird besonders deutlich, dass axonal getestete Fasern signifikant höhere Schwellentemperaturen besitzen als die am Läsionsort getesteten Fasern.  $p < 0.01$  Exakter Test nach Fischer;  $>45^\circ$  vs.  $<45^\circ$

### III.1.2 Kältesensibilität

Keine A-Faser war axonal kältesensibel. Bei den C- Fasern zeigten 34/88 (38,6%) eine Aktivierung auf Kältereize. Dabei waren 22 C-Fasern monomodal und 12 zusätzlich durch Hitze- und/oder mechanische Reize erregbar (siehe Tabellen III.01 und III.02). Tabelle III.04 zeigt eine Übersicht über die Schwellenverteilung der Kältefasern aus den Experimenten 1, 2 und 3. Die Schwellen sind anders als bei der Hitzesensibilität in allen Experimenten über alle Bereiche verteilt. Hierbei zeigt sich auch kein Unterschied zwischen der axonalen Testung in den Experimenten 1 und 2 sowie der Testung am Läsionsort in Experiment 3. Auffällig ist hierbei lediglich die Häufung von Fasern im Schwellenbereich zwischen 5 und 9,9°C bei der axonalen Testung (Experimente 1 und 2). Insgesamt lagen die Temperaturen zwischen 3°C als niedrigster und 24°C als höchster Schwelle. In Abbildung III.07 A (s.u.) ist eine typische Antwort auf einen Kältereiz dargestellt. Abbildung III.09 A und B zeigt die Reaktion einer polymodalen C-Faser auf Kältereizung.

In Experiment 2 zeigten 3/11 kältesensiblen Fasern zusätzlich Spontanaktivität.

	Läsion	Testung	>25°C	20 - 24,9°C	15 - 19,9°C	10 - 14,9°C	5 - 9,9°C	0 - 4,9°C
A	Experiment 1	akut axonal	0	3	3	1	8	2
	Experiment 2	chronisch axonal	0	0	3	2	3	0
	Experiment 3	chronisch Läsionsort	0	1	3	3	1	0
B Vergleich	Experiment 1+2	axonal vs.	0	3	6	3	11	2
	Experiment 3	Läsionsort	0	1	3	3	1	0

Tabelle III.04 *Schwellenverteilung der kältesensiblen Fasern*

A: Übersicht über die Schwellenverteilung der Kältefasern aus den Experimenten 1, 2 und 3.

B: Vergleich der Schwellenverteilungen der Testung am Axon (Summe der Experimente 1 und 2) mit der Testung am Ort der Läsion(Experiment 3).

Weder unter A noch unter B zeigen sich große Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Experimenten. Lediglich im Vergleich zwischen der axonalen Testung mit der am Läsionsort zeigen sich wie bei den hitzesensiblen Fasern eine gewisse Häufung im Bereich der hochschwelligeren Fasern (hier bei 5 – 9,9°C) bei axonaler Testung, es gibt jedoch keinen signifikanten Unterschied ( $p=0,38$ ). Exakter Test nach Fischer;  $>15^\circ$  vs.  $<15^\circ$

### III.1.3 Mechanosensibilität

Insgesamt wurden in den Experimenten 1, 2 und 3 20 A-Fasern durch mechanische Reize erregt. In den Experimenten 1 und 2 konnten entlang des Nervs jeweils eine mechanosensible A-Faser identifiziert werden. Experiment 3 zeigte mit 18 A-Fasern, erregbar am Ort der chronischen Läsion, die meisten Fasern mit Mechanosensibilität. 2 dieser Fasern waren polymodal und zeigten zusätzlich Hitzesensibilität. In Abbildung III.11 A ist exemplarisch die Reaktion einer A-Faser auf mechanische Reize dargestellt.

Betrachtet man die C-Fasern, so waren 6/88 durch mechanische Reize erregbar (4 Afferenzen in Experiment 3 und je eine Afferenz in Experiment 1 und 2). Alle mechanosensiblen C-Fasern waren zusätzlich hitze- und/oder kältesensibel.

#### III.1.4 Spontanaktivität

Von 20 A-Fasern zeigte keine Spontanaktivität, bei den C-Fasern hingegen 21/88. 11 C-Fasern wiesen zusätzlich zur Spontanaktivität Hitze-, Kälte- oder Mechanosensibilität auf, 10 C-Fasern waren ausschließlich spontanaktiv. In den Experimenten 1 und 3 zeigte sich jeweils eine dieser ausschließlich spontanaktiven Fasern, welche dabei in keiner Weise durch Capsaicin beeinflusst wurden. In Experiment 2, in welchem die Verbindung der Nervenfasern zum Rückenmark intakt war, zeigten sich 8 spontanaktive Fasern. Bei diesen Fasern handelt es sich um postganglionäre sympathische Fasern. Unter III.2.4 werden diese näher beschrieben.

### III.2 Hitze- und Capsaicinsensibilität

#### III.2.1 Hitze- und Capsaicinsensibilität entlang des Axons (Experiment 1 + 2)

In den Experimenten 1 und 2 erfolgte die Testung auf Hitzereizung und auf Applikation von Capsaicin entlang des Axons. Während in Experiment 1 eine akute Quetschläsion kurz vor Durchführung des Experiments erfolgte, wurde in Experiment 2 der Nervus suralis 4-7 Tage vor der Testung und Ableitung durch eine Quetschung geschädigt. Abbildung III.01 stellt ein Beispiel einer Hitzefaser nach akuter Quetschläsion aus Experiment 1 dar, welche eine starke akute Reaktion auf 10mM Capsaicin zeigte und anschließend durch hochschwellige Hitzereize nicht mehr erregbar war.

Eine solche oder vergleichbare akute Reaktion auf die Applikation von Capsaicin konnte in Experiment 1 bei 17/25 Hitze-C-Fasern registriert werden, 14 dieser Fasern reagierten bereits bei Applikation von 1mM Capsaicin, 3 taten dies erst bei 10mM Capsaicin. 5/25 der hitzesensiblen C-Fasern wurden nicht durch Capsaicin (10 mM) aktiviert, konnten jedoch nach der Applikation von 10mM Capsaicin nicht mehr durch Hitzereize erregt werden. Hierbei handelte es sich also um eine vollständige Desensibilisierung. 3/25 Hitzefasern wurden durch Capsaicin weder aktiviert noch für Hitzereize desensibilisiert.

Eine C-Faser zeigte erst nach Applikation von 10mM Capsaicin eine Reaktion auf Hitzereize, ohne zuvor eine akute Aktivierung auf Capsaicin gezeigt zu haben. Vermutlich wurde das rezeptive Feld der Faser vor Capsaicinapplikation nicht richtig erfasst, oder es

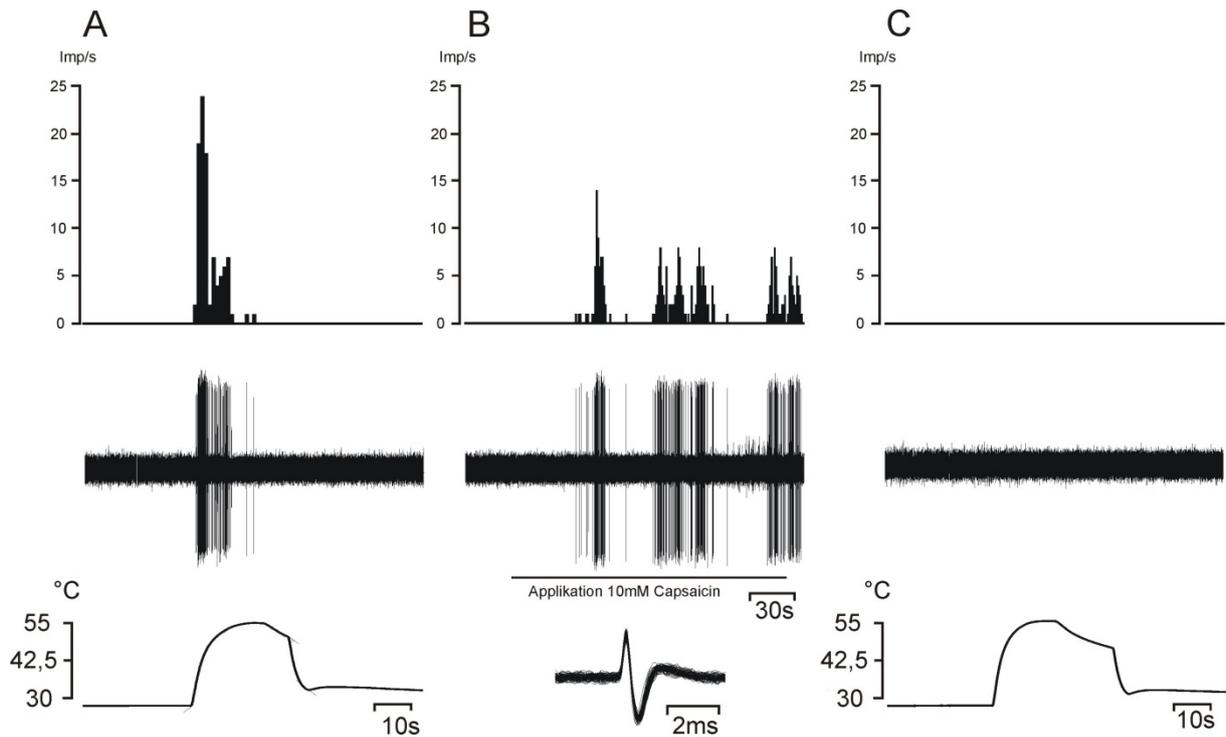


Abbildung III.01 *Reaktion einer hitzesensiblen C-Faser aus Experiment 1 auf Capsaicin (10 mMol)*

Aktivität vor (A), während (B) und nach (C) Applikation von 10mM Capsaicin entlang des Axons. (A) Aktivierung auf Hitzereizung des Nervs (ca. 50°C, unten). (B) Aktivierung durch Capsaicin. Unten: Überlagerung der Aktionspotenziale der getesteten C-Faser. (C) Keine Aktivierung durch Hitzereizung nach Applikation von Capsaicin. Neuronale Aktivität: oben Histogramm, unten Rohdaten.

erfolgte eine Sensibilisierung durch die Capsaicinapplikation (siehe auch Abbildung III.06). Darüber hinaus konnte eine Faser identifiziert werden, welche akut durch 1mM Capsaicin aktiviert wurde, aber ansonsten nicht durch Hitzereizung erregbar war. Diese Faser wird in Tabelle III.01 separat und nicht unter den Hitzefasern geführt. Auch hier konnte scheinbar das rezeptive Feld nicht erfasst werden.

In Experiment 2 wurden 5/7 hitzesensible C-Fasern durch 1mM Capsaicin aktiviert. Eine hitzesensible Faser zeigte keinerlei Reaktion auf die Applikation von Capsaicin, war aber nach Capsaicinapplikation durch Hitze nicht mehr erregbar. Zusätzlich fand sich eine Hitzefaser, welche weder auf Hitzereize noch auf 1mM Capsaicin reagierte, nach Applikation jedoch durch Hitzereize erregbar war.

Abbildung III.02 vergleicht die Antwort von hitzesensiblen C-Fasern auf einen Hitzereiz vor und nach Applikation von Capsaicin. Unter A werden über einen Zeitraum von 90 Sekunden (30 Sekunden vor, während und nach dem Hitzereiz) die Mittelwerte der Aktivität von 23/25 Hitzefasern aus Experiment 1 für jede Sekunde dargestellt. Zwei Fasern wurden dabei nicht berücksichtigt, da sie erst nach Applikation von Capsaicin auf Hitzereize reagierten. Eine dieser Fasern zeigte dabei eine Akutreaktion. Vergleicht man die Kurve vor

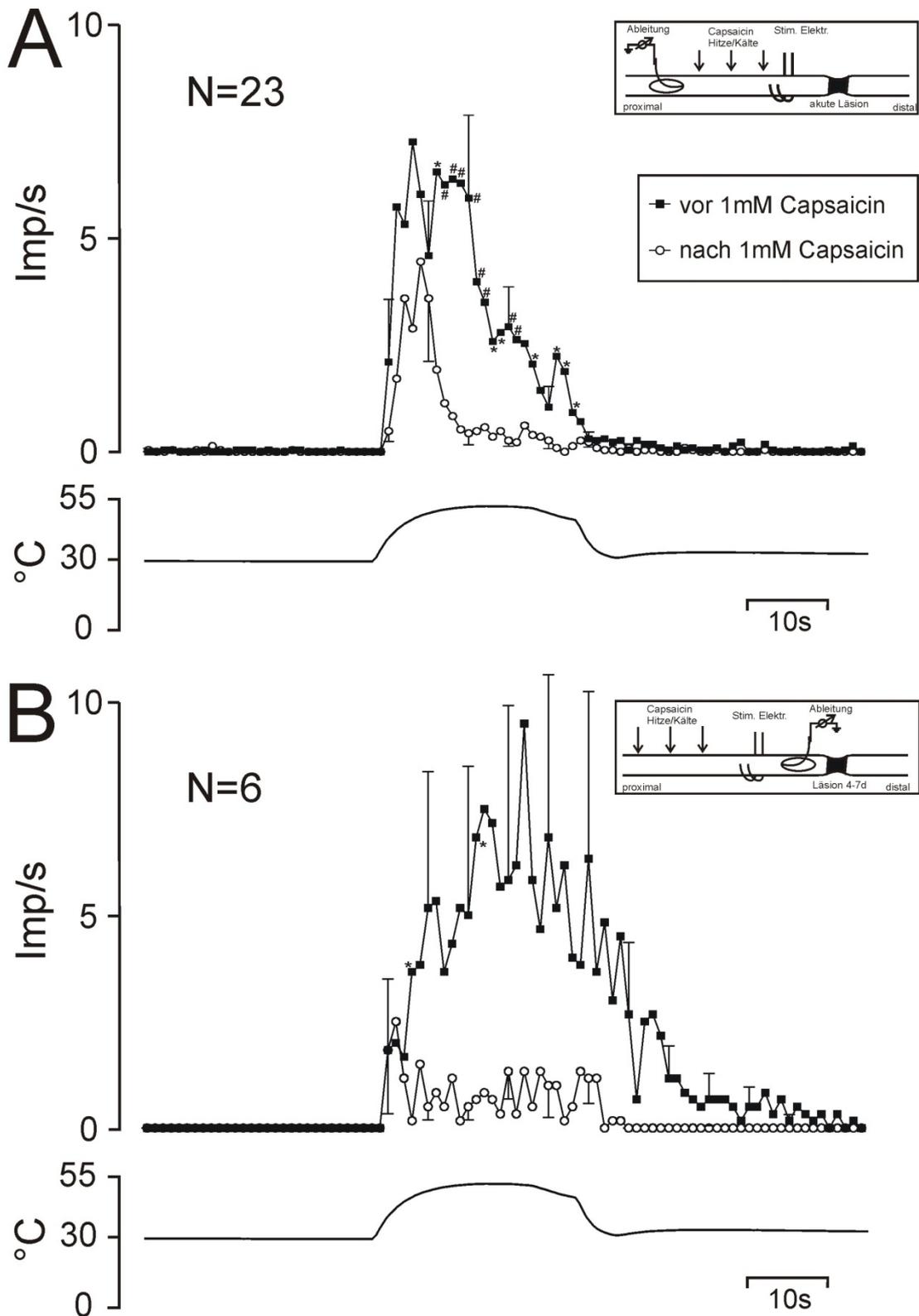


Abbildung III.02 Axonale Antwort von Afferenzen auf Hitzeereizung vor und nach Applikation von 1 mM Capsaicin auf den *N. suralis* (Experiment 1 in A und 2 in B)

A und B zeigen die Reaktion von hitzesensiblen Fasern auf Hitzeereize von ca. 50°C vor (gefüllte Quadrate) und nach (offene Kreise) Applikation von 1mM Capsaicin. Mittelwerte  $\pm$  SEM. Unten: Temperaturverlauf des Hitzeereizes von ca. 50°C. A und B zeigen eine deutliche Desensibilisierung der Afferenzen auf Hitzeereizung nach Applikation von Capsaicin.

Einsatzbilder: Versuchsaufbau der Experimente 1 und 2. \*,  $p < 0,05$ , #,  $p < 0,01$  Wilcoxon-Rangsummentest.

Applikation von Capsaicin (geschlossene Quadrate) mit der nach Capsaicin (offen Kreise), so zeigt sich eine signifikant schwächere Antwort auf Hitzereize (\*  $p < 0.05$ ; #  $p < 0.01$ , gepaarter Wilcoxon Rangsummentest). Die C-Fasern sind also durch Capsaicin für Hitzereize desensibilisiert worden. Der Höchstwert der Aktivität vor Applikation von Capsaicin lag bei  $7,2 \pm 2$  Imp/s, nach Capsaicinapplikation hingegen nur noch bei  $4,4 \pm 1,6$  Imp/s. Unter B wird auf dieselbe Weise die Hitzeantwort von 6/7 hitzesensiblen C-Fasern aus Experiment 2 (5 zeigten eine akute, 1 keine Reaktion auf Capsaicin) vor und nach Applikation von Capsaicin dargestellt. Die Faser, welche erst nach Applikation von Capsaicin durch Hitzereize erregbar war, wurde nicht berücksichtigt. Der Höchstwert der Aktivität vor Applikation von Capsaicin lag bei  $9,5 \pm 5,3$  Imp/s, nach Capsaicinapplikation hingegen nur noch bei  $2,5 \pm 1,6$  Imp/s. Aufgrund der niedrigen Anzahl von getesteten Fasern wird hier nur an zwei Punkten eine statistische Signifikanz erreicht. Im Vergleich beider Kurven ist jedoch eine deutliche Desensibilisierung wie unter A erkennbar.

Vergleicht man die beiden Graphen unter dem Gesichtspunkt, dass in Experiment 1 der Nervus suralis akut und in Experiment 2 chronisch (4-7 Tage) geschädigt wurde, so kann man sagen, dass der Effekt von Capsaicin in beiden experimentellen Gruppen gleich ist. Hitzesensible Fasern reagieren entlang des Axons eines geschädigten Nervs akut auf die Applikation von Capsaicin und werden eindeutig desensibilisiert, unabhängig davon, ob es sich um eine akute oder chronische (4-7 Tage) Läsion handelt. Demzufolge könnte man beide Datensätze addieren und diese als axonale Gruppe dem Experiment 3 gegenüberstellen.

In Experiment 1 konnte außerdem eine C-Faser identifiziert werden, welche nicht durch Hitze-, Kälte oder mechanische Reize erregbar war, jedoch eine Akutreaktion bei der Applikation von 1mM Capsaicin zeigte.

### III.2.2 Capsaicin und postganglionäre Fasern

In Experiment 2 ist bei distaler Ableitung (siehe Abbildung I.01 B) die Verbindung der getesteten Filamente zum Rückenmark intakt. Aus diesem Grund können in diesem Versuchsaufbau spontanaktive postganglionäre sympathische Efferenzen identifiziert werden, welche den Blutfluss bzw. Gefäßwiderstand von Hautgefäßen regulieren und deshalb kutane postganglionäre Vasokonstriktoraxone sind. Abbildung III.03 widmet sich diesen Fasern. Insgesamt konnten 8 C-Fasern identifiziert werden, welche ausschließlich Spontanaktivität zeigten. Diese postganglionären sympathischen Neurone zeigten kardiale

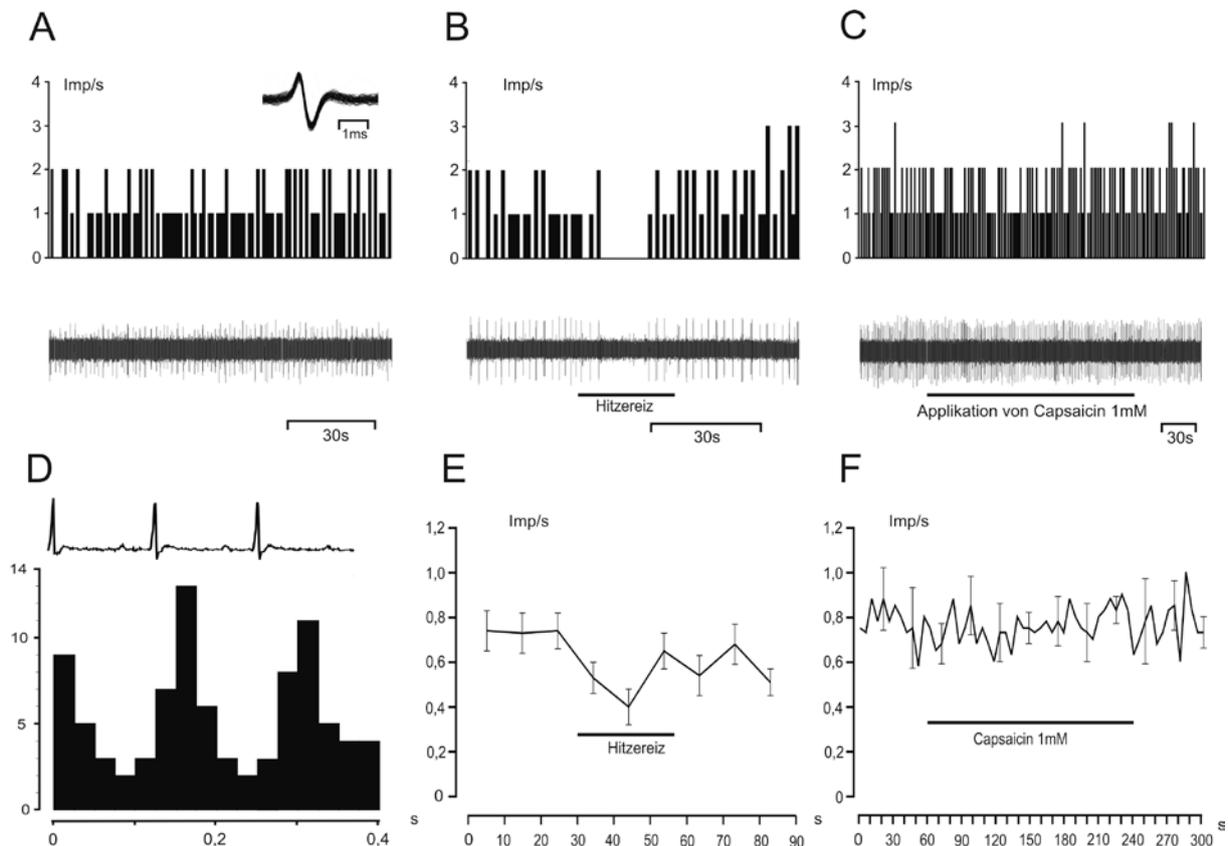


Abbildung III.03 Spontanaktivität von Nervenfasern in Experiment 2 mit distaler Ableitung

Insgesamt wurden 8 spontanaktive C-Fasern untersucht. Spontanaktivität einer C-Faser (A) und Reaktion dieser Faser auf Hitzereizung des Nerven (B) oder Capsaicinapplikation auf den Nerven (C). Oben Aktivität in Histogrammform, unten Originaldaten. (D) Spontanaktivität der Faser überlagert 500mal mit Bezug auf die R-Zacke des EKGs über einen Zeitraum von 400 Millisekunden. Siehe Korrelation der kardialen Rhythmicität der Spontanaktivität mit dem EKG. (E) Mittelwerte ( $\pm$ SEM) der Aktivität in 8 spontanaktiven postganglionären sympathischen Efferenzen vor, während und nach Hitzereizung des Nerven (siehe Markierung). Die Hemmung der Spontanaktivität ist signifikant ( $p < 0.01$ , gepaarte Wilcoxon-Rang Test). (F) Mittelwerte ( $\pm$ SEM) der Aktivität in 8 postganglionären Efferenzen vor, während und nach Applikation von 1mM Capsaicin auf den Nerven.

Rhythmicität ihrer Aktivität. Um diese darzustellen, wurde die Spontanaktivität für jeweils 0,4 Sekunden im Anschluss an die R-Zacke registriert und über 500-1000 kardiale Zyklen aufsummiert (siehe auch Häbler et al. 1991/1994). Daraus ergibt sich das charakteristische unter Abb. III.03 D gezeigte Bild. Weiterhin wurde ihre Aktivität reflektorisch durch noxische Hitzereizung des Nervus suralis gehemmt. Abb. III.03 B zeigt ein Beispiel der Hemmung der Aktivität in einer einzelnen postganglionären Faser. Unter Abb. III.03 E sind die Mittelwerte aller 8 postganglionären Fasern während eines noxischen Hitzeereizes dargestellt. Sowohl unter B als auch unter E zeigt sich die reflektorische Hemmung der Aktivität. Während noxischer Kältereizung ist keine Hemmung der Aktivität vorhanden. Hitzereizung und Capsaicin erregen diese postganglionären Fasern direkt nicht. Applikation von Capsaicin auf den N. suralis, welche auch die hitzesensiblen Afferenzen erregt (siehe z.B. Abb. III.02 B),

fürte erstaunlicherweise nicht zur reflektorischen Hemmung der Aktivität in den postganglionären Neuronen (siehe Abb. III.03; C, Aktivität einer einzelnen Faser; F, Mittelwerte aller 8 postganglionären Fasern (mit SEM)).

### III.2.3 Hitze- und Capsaicinsensibilität am Ort der Läsion (Experiment 3)

In Experiment 3 wurde die Hitze- und Capsaicinsensibilität der Nervenfasern am Läsionsort 4-7 Tage nach Nervenschädigung untersucht. Abbildung III.04 zeigt die Aktivität einer hitzesensiblen C-Fasern, welche durch Hitzereizung des Läsionsortes aktiviert wurde (A). Bei der Applikation von 50 $\mu$ M Capsaicin zeigt diese Faser eine deutliche Akutreaktion (B). Nach der Applikation von Capsaicin ist die Faser vollständig desensibilisiert (C). Es zeigt sich also das gleiche Bild wie bei der Applikation von Capsaicin entlang des Axons (vergleiche Abb. III.01).

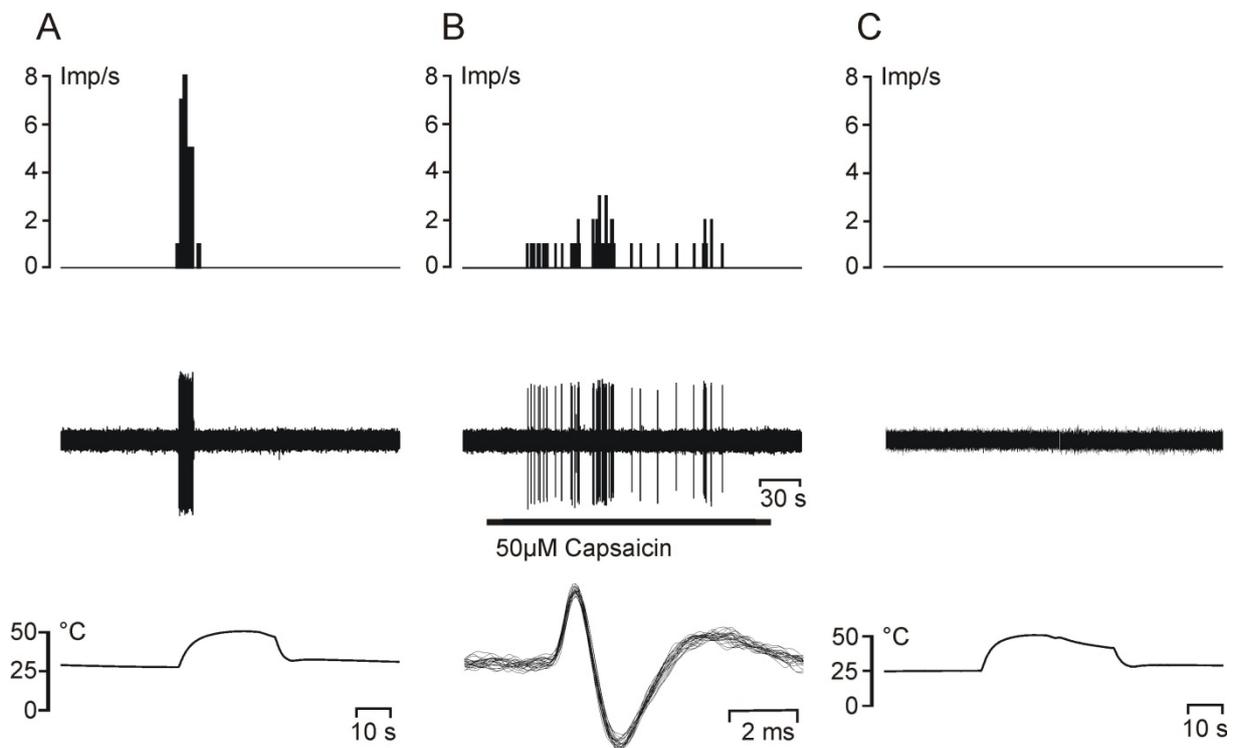


Abbildung III.04 Aktivierung einer hitzesensiblen C-Fasern auf Hitzereizung vor, während und nach Applikation von Capsaicin in Experiment 3

(A) Aktivierung auf Hitzereizung des Nervs (ca. 50°C, unten). Die Faser wurde durch Capsaicin aktiviert (B) und desensibilisiert für Hitzereizung (ca. 50°C, C). Neuronale Aktivität: unten Originalaktivität, oben Aktivität in Histogrammform. Unten ist die Temperaturkurve des Hitzereizes abgebildet. Unten in B Summation der Aktionspotenziale der hitzesensiblen C-Faser.

Eine Aktivierung durch Capsaicin, wie in Abbildung III.04 dargestellt, konnte bei 12/23 hitzesensiblen C-Fasern in Experiment 3 beobachtet werden. Keine Faser wurde durch 10 $\mu$ M Capsaicin aktiviert oder für Hitzereizung desensibilisiert (Applikation bei 7/23 C-Fasern), weswegen im weiteren Verlauf darauf verzichtet wurde 10 $\mu$ M Capsaicin zu testen. Ähnliches gilt für 50 $\mu$ M Capsaicin (Applikation bei 11/23 C-Fasern). 4 der 12 Hitze-C-Fasern welche nicht akut auf Capsaicin reagierten, zeigten jedoch eine deutliche Desensibilisierung nach Applikation von Capsaicin. Beide hitzesensiblen A-Fasern wurden akut durch Capsaicin aktiviert und ebenfalls desensibilisiert.

6 C-Fasern wurden erst nach Applikation von 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M oder 100 $\mu$ M Capsaicin durch Hitzereize erregt, ohne eine Akutreaktion auf die Applikation von Capsaicin zu zeigen. 1 C-Faser zeigte keinerlei Beeinflussung durch Capsaicin.

Abbildung III.05 vergleicht die Antwort von 17 der 23 Hitze Fasern auf einen Hitzereiz vor und nach Applikation von 100 $\mu$ M Capsaicin. Die 6/23 hitzesensiblen C-Fasern, welche erst nach Applikation der oben genannten Konzentrationen von Capsaicin auf Hitze aktiviert wurden, sind nicht berücksichtigt worden, da diese nicht von Beginn des Experiments an

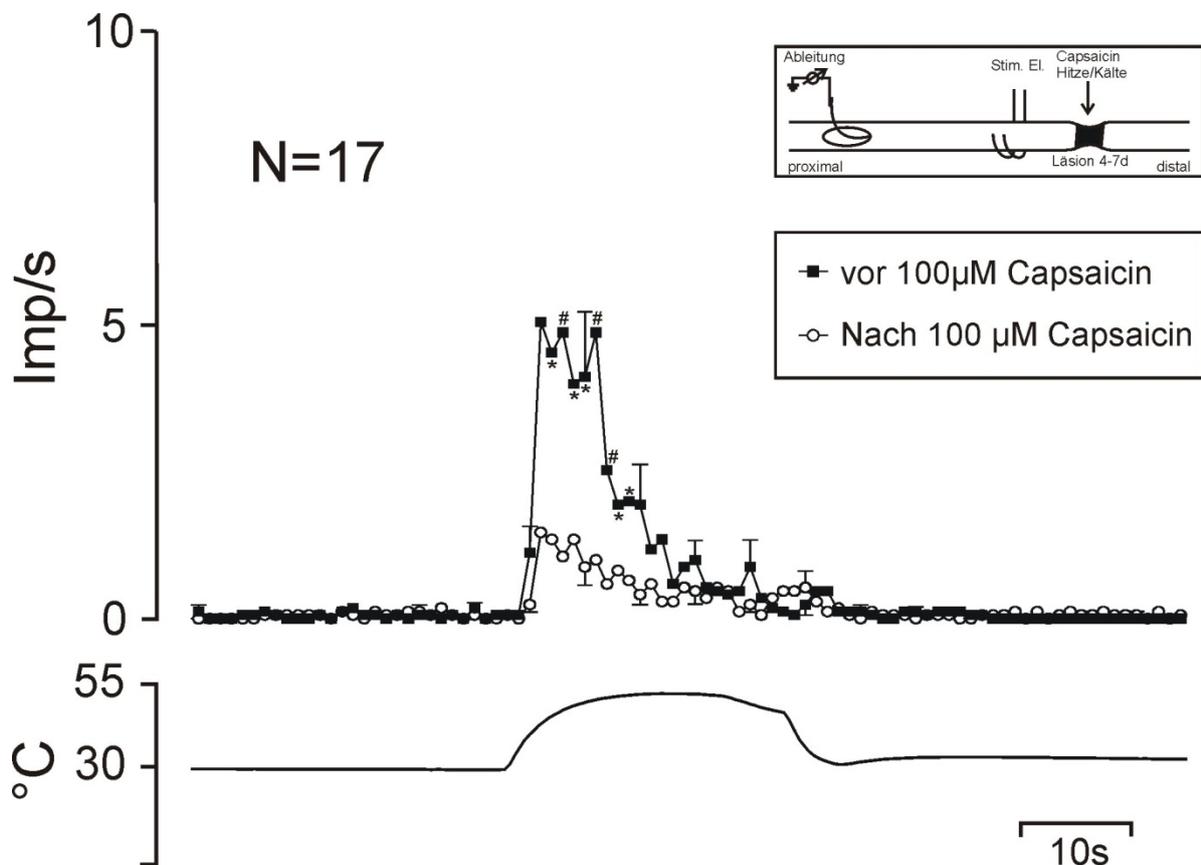


Abbildung III.05 Aktivierung von hitzesensiblen Afferenzen durch Hitzereizung vor und nach Applikation von Capsaicin am Ort der Läsion (100  $\mu$ Mol; Experiment 3)

Mittelwert  $\pm$  SEM. Nach Capsaicin ist die Hitzeantwort signifikant kleiner. \* p < 0.05, # p < 0.01, gepaarter Wilcoxon-Rangsummentest. Unten Temperaturverlauf des Hitzereizes. Inset: Versuchsaufbau des Experiments 3.

identifizierbar waren und erst durch die Applikation von Capsaicin für Hitzereize sensibilisiert wurden (siehe auch Abb. III.06, unten). Während die Fasern vor Applikation von Capsaicin (geschlossene Quadrate) eine eindeutige Reaktion auf den Hitzereiz zeigten, ist diese nach der Applikation (offene Kreise) signifikant kleiner (\*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$ , gepaarter Wilcoxon-Rangsummentest). Hier wird wiederum die Desensibilisierung sehr deutlich. Der Höchstwert der Aktivität vor Applikation von Capsaicin nahm von  $5,1 \pm 1,33$  Imp/s auf  $1,5 \pm 0,8$  Imp/s nach Applikation ab. Dieses Ergebnis ist genauso eindeutig wie bei der Applikation entlang des Axons (siehe Abbildung III.02). Es fällt jedoch auf, dass im Mittel niedrigere Frequenzen erreicht wurden als in den Experimenten 1 und 2 und dass die Aktivierung auf den Hitzereiz darüber hinaus wesentlich kürzer war.

Abbildung III.06 zeigt die Aktivität der Fasern auf die Applikation unterschiedlicher Konzentrationen von Capsaicin. Wie in Abbildung III.05 werden hierbei 17 der 23 Hitzefasern aus oben genannten Gründen berücksichtigt. Nach Applikation von  $10\mu\text{M}$  Capsaicin (N=4) scheint erst eine Sensibilisierung für Hitzereize einzutreten. Es zeigt sich eine stärkere Reaktion auf Hitzereize. Nach Applikation von  $50\mu\text{M}$  Capsaicin (N=7) ist die Aktivität während eines Hitzereizes mit der vor jeglicher Capsaicinapplikation vergleichbar. Erst durch Applikation einer Konzentration von  $100\mu\text{M}$  Capsaicin (N=16) werden die Fasern deutlich für Hitzereize desensibilisiert. Dies könnte auch erklären, warum Fasern zum Teil erst nach Applikation von Capsaicin auf Hitzereize reagierten, da sie durch die Applikation von Capsaicin erst sensibilisiert wurden.

Grossmann et al. (2009) klassifizierten die hitzesensiblen Afferenzen in eine niederschwellige (Reizschwelle  $\leq 42^\circ\text{C}$ ) und eine hochschwellige (Reizschwelle  $\geq 43^\circ\text{C}$ ) Population. 8/23 hitzesensiblen C-Fasern zeigten eine Reizschwelle unter  $\leq 42^\circ\text{C}$  und wurden demnach als niederschwellig klassifiziert. 5 dieser 8 C-Fasern zeigten eine Akutreaktion auf Capsaicin, 2 weitere C-Fasern wurden desensibilisiert. Lediglich 1/8 C-Fasern zeigte keinerlei Reaktion auf die Applikation von Capsaicin. Somit wurden insgesamt 7/8 als niederschwellig klassifizierten hitzesensiblen C-Fasern durch die Applikation von Capsaicin beeinflusst.

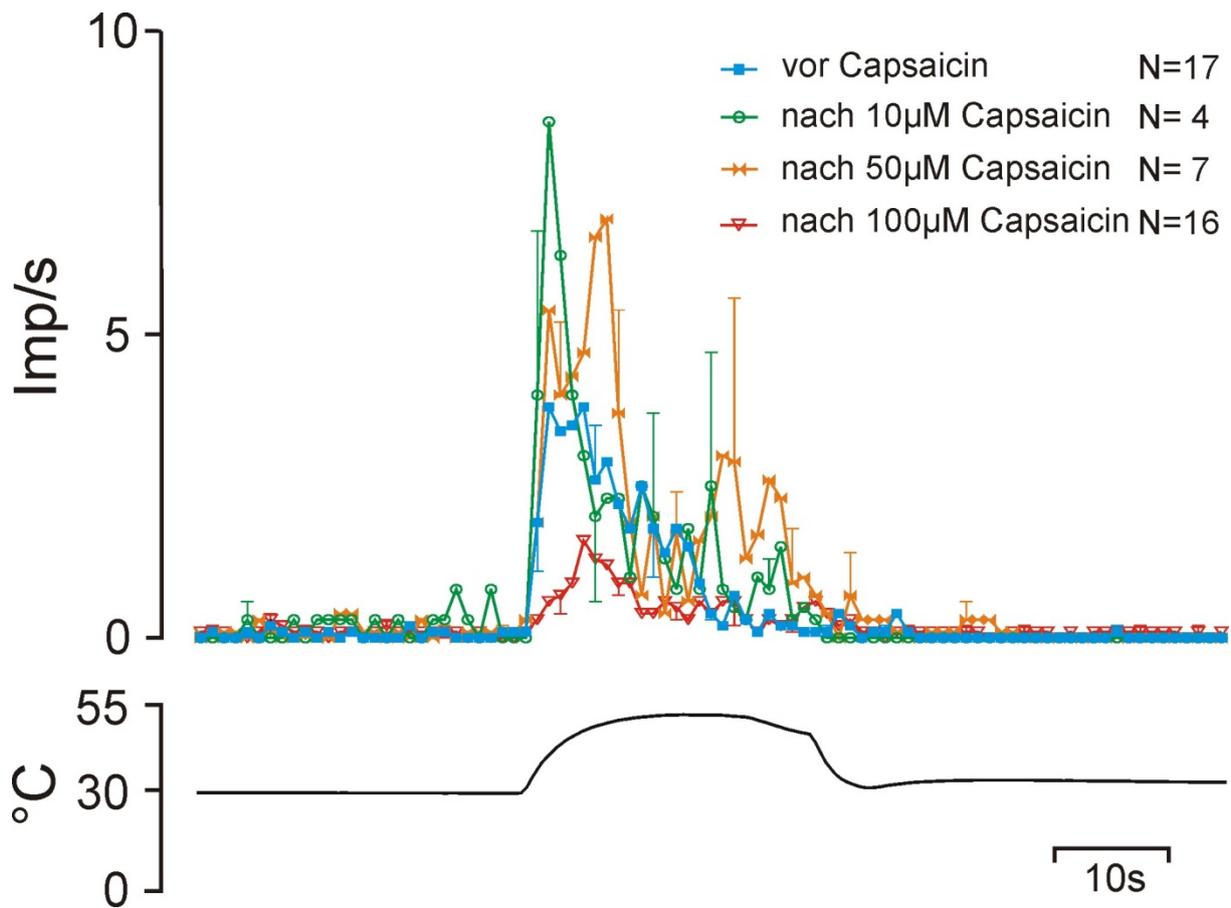


Abbildung III.06 Antwort von Afferenzen auf Hitzereizung am Läsionsort vor und nach Applikation von 10µM, 50µM und 100µM Capsaicin  
Mittelwert  $\pm$  SEM. Nach 10µM und 50µM Capsaicin ist die Hitzeantwort zunächst gesteigert. Erst nach Applikation von 100µM Capsaicin zeigt sich eine deutliche Desensibilisierung. Unten Temperaturverlauf des Hitzezeizes.

### III.3 Kälte- und/oder Mechanosensibilität

Die Tabellen III.01 und III.02 zeigen eine Übersicht über die Fasern, welche Kälte- und/oder Mechanosensibilität aufwiesen. Von den 20 A-Fasern waren alle mechanosensibel, keine zeigte Kältesensibilität. Bei den C-Fasern waren insgesamt 34 Fasern durch Kältereize erregbar, 6 wiesen Mechanosensibilität auf.

#### III.3.1 Kältesensibilität

34 kältesensible C-Fasern wurden vor, während und nach Applikation von Capsaicin entlang des Nerven (Experimente 1 und 2) oder am Nervenläsionsort (Experiment 3) untersucht. Die Aktivierung auf einen Kältereiz war in allen kältesensiblen Afferenzen unverändert nach Applikation von Capsaicin (10µM – 10mM). 22/34 kältesensiblen C-Fasern, welche ausschließlich kältesensibel waren, wurden durch Capsaicin nicht akut erregt. 12/34 kältesensiblen Fasern waren zusätzlich hitze- und zum Teil auch mechanosensibel (2 C-

Fasern). Diese Fasern werden unter III.3.2 näher behandelt. Abbildung III.07 zeigt das Beispiel einer kältesensiblen C-Faser aus Experiment 1 vor, während und nach Applikation von 1mM Capsaicin. Vor der Applikation zeigt die Faser eine Aktivierung auf einen Kältereiz. Während der Applikation von Capsaicin ist keine Aktivierung zu verzeichnen. Nach Applikation von Capsaicin zeigt sich keine Veränderung im Antwortverhalten auf einen Kältereiz. Dies ist das typische Bild, welches unabhängig von der experimentellen Gruppe in Bezug auf die Kältesensibilität beobachtet werden konnte.

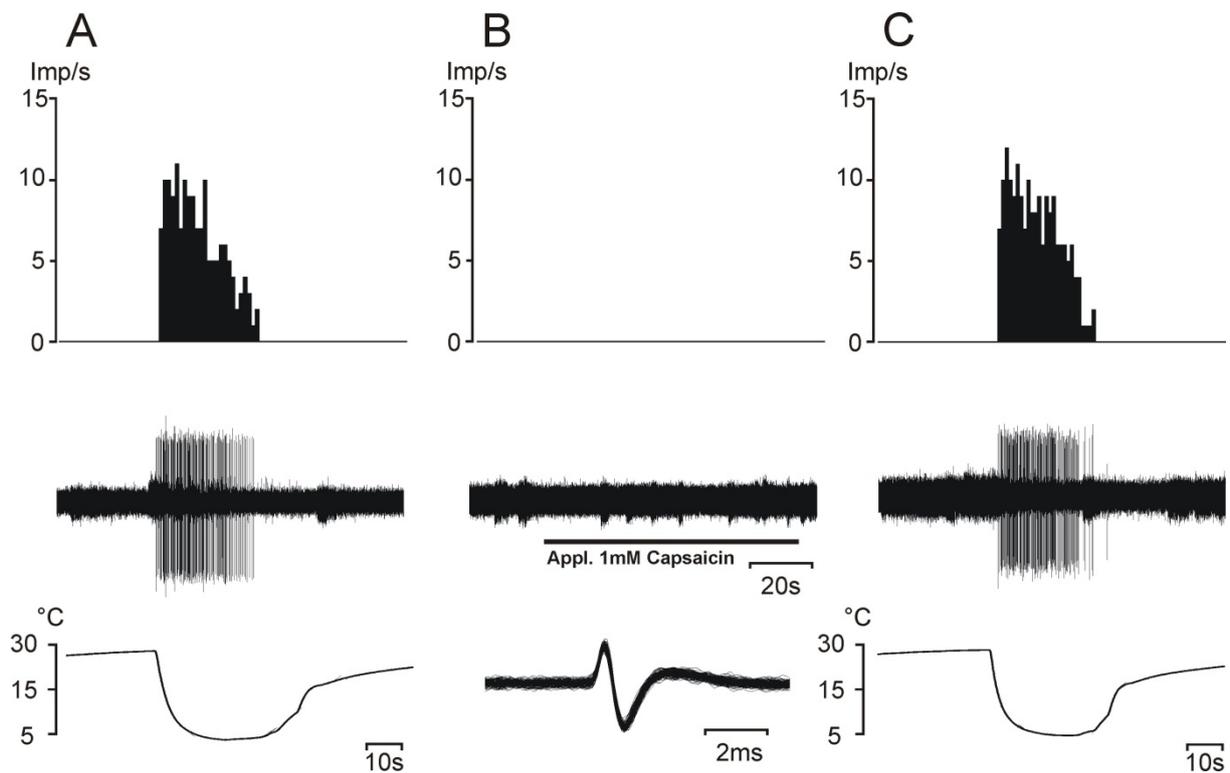


Abbildung III.07 Reaktion einer kältesensiblen C-Faser aus Experiment 1 auf Capsaicin (10 mMol)

Aktivität vor (A), während (B) und nach (C) Applikation von 1mM Capsaicin entlang des Axons.

(A) Aktivierung auf Kältereizung des Nervs (ca. 5°C, unten). (B) Keine Aktivierung durch Capsaicin. Unten: Überlagerung der Aktionspotenziale der getesteten C-Faser. (C) Nahezu identische Reaktion auf Kältereizung nach Applikation von Capsaicin. Neuronale Aktivität: oben Histogramm, unten Rohdaten.

In Abbildung III.08 werden die Antworten der Populationen von kältesensiblen C-Fasern auf einen Kältereiz vor und nach Applikation von Capsaicin für die Experimente 1, 2 und 3 dargestellt und miteinander verglichen.

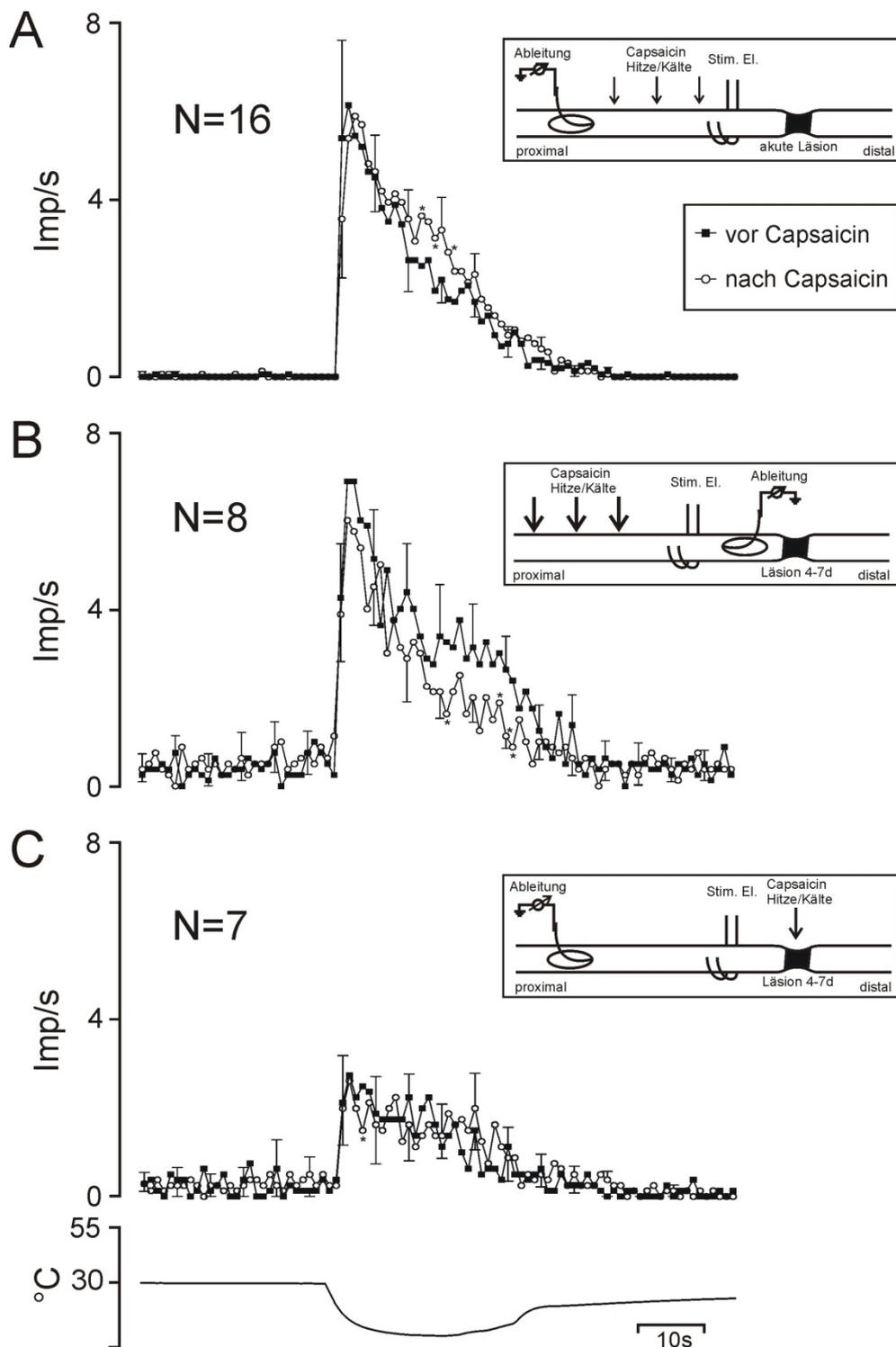


Abbildung III.08 Antwort von Afferenzen auf Hitzereizung vor und nach Applikation von Capsaicin auf den *N. suralis* (Experimente 1 in A, 2 in B (beide axonal; 1mM Capsaicin) und 3 in C (Läsion; 100µM Capsaicin)) A, B und C zeigen die Reaktion von kältesensiblen Fasern auf Kältereize von ca. 5°C vor (gefüllte Quadrate) und nach (offene Kreise) Applikation von 1mM Capsaicin in A und B sowie 100µM Capsaicin in C. Mittelwerte  $\pm$  SEM. Unten: Temperaturverlauf des Kältereizes von ca. 5°C. A, B und C zeigen praktisch keine Veränderungen der Aktivierung der Afferenzen auf Kältereize nach Applikation von Capsaicin. Einsatzbilder: Versuchsaufbau der Experimente 1, 2 und 3. \*,  $p < 0,05$ , #,  $p < 0,01$  Wilcoxon-Rangsummentest.

Abbildung III.08 A zeigt 16/17 Kältefasern aus Experiment 1. Eine Faser wurde aufgrund übermäßig hoher Aktivität im Vergleich zu den 16 anderen Fasern nicht in der Abbildung berücksichtigt. Vor der Applikation von Capsaicin (geschlossene Quadrate) zeigt sich eine deutliche Aktivierung auf den Kältereiz von etwa 5 °C. Nach Applikation von 1mM Capsaicin (offene Kreise) ist das Antwortverhalten der Kältefasern praktisch unverändert. Auch die Höchstwerte der Aktivität waren mit  $6,1 \pm 1,7$  Imp/s vor und  $5,9 \pm 1,3$  Imp/s nach der Applikation von Capsaicin gleich (\*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$ , gepaarter Wilcoxon-Rangsummentest).

Selbiges trifft auch für die 8 kältesensiblen C-Fasern aus Experiment 2 unter B zu. Die Aktivitäten bei Kältereizung sind vor und nach Applikation von 1mM Capsaicin nicht signifikant unterschiedlich. Die Höchstwerte der Aktivität sind auch hier mit  $6,9 \pm 2$  Imp/s vor und  $6 \pm 1,2$  Imp/s nach Capsaicin vergleichbar.

Ebenso stellt es sich auch in Experiment 3 dar. 7/9 Kältefasern wurden untersucht. Zwei Kältefasern wurden dabei nicht berücksichtigt, da diese zwar als eindeutig kältesensibel identifiziert werden, jedoch nicht quantitativ getestet werden konnten. Es ist auffällig, dass die Reaktion auf die Kältereize in dieser Gruppe von Fasern, bei der am Ort der chronischen Schädigung getestet wurde, wesentlich schwächer ist. Dies zeigt sich auch in den Aktivitätshöchstwerten mit  $3,1 \pm 1,4$  Imp/s vor und  $3,0 \pm 1,3$  Imp/s nach Applikation von Capsaicin. Selbiges war auch bei der Reaktion von Hitze Fasern auf Hitzeereizen beobachtet worden (s.o., sowie Vergleich Abbildung III.02 und Abbildung III.05).

### III.3.2 Kälte- und Hitzesensibilität

Betrachtet man die Kältesensibilität von Fasern, welche zusätzlich durch Hitzeereize aktiviert wurden, so zeigt sich auch hier ein sehr eindeutiges Bild. 12/34 kältesensiblen C-Fasern wurden auch durch Hitzeereize aktiviert (8 Afferenzen in Experiment 1 oder 2; 4 Afferenzen in Experiment 3). Abbildung III.09 zeigt eine C-Faser aus Experiment 2, welche sowohl hitze- als auch kältesensibel war. Nach Applikation von Capsaicin (1 mM) auf den N. suralis, welches die Afferenz aktivierte, war die Afferenz durch Hitzeereizung nicht mehr zu erregen, während die Aktivierung auf Kaltreizung unverändert war. Somit wurde die Faser für Hitzeereize desensibilisiert, die Kältesensibilität blieb davon jedoch völlig unbeeinflusst, was bei praktisch allen polymodalen Fasern mit Hitze- und Kältesensibilität beobachtet werden konnte. Dies verdeutlicht Abbildung III.10, in der die Aktivitäten von 11/12 Fasern, welche sowohl hitze- als auch kältesensibel waren, bei der Reaktion auf Hitze- (A) und 9/12 Fasern

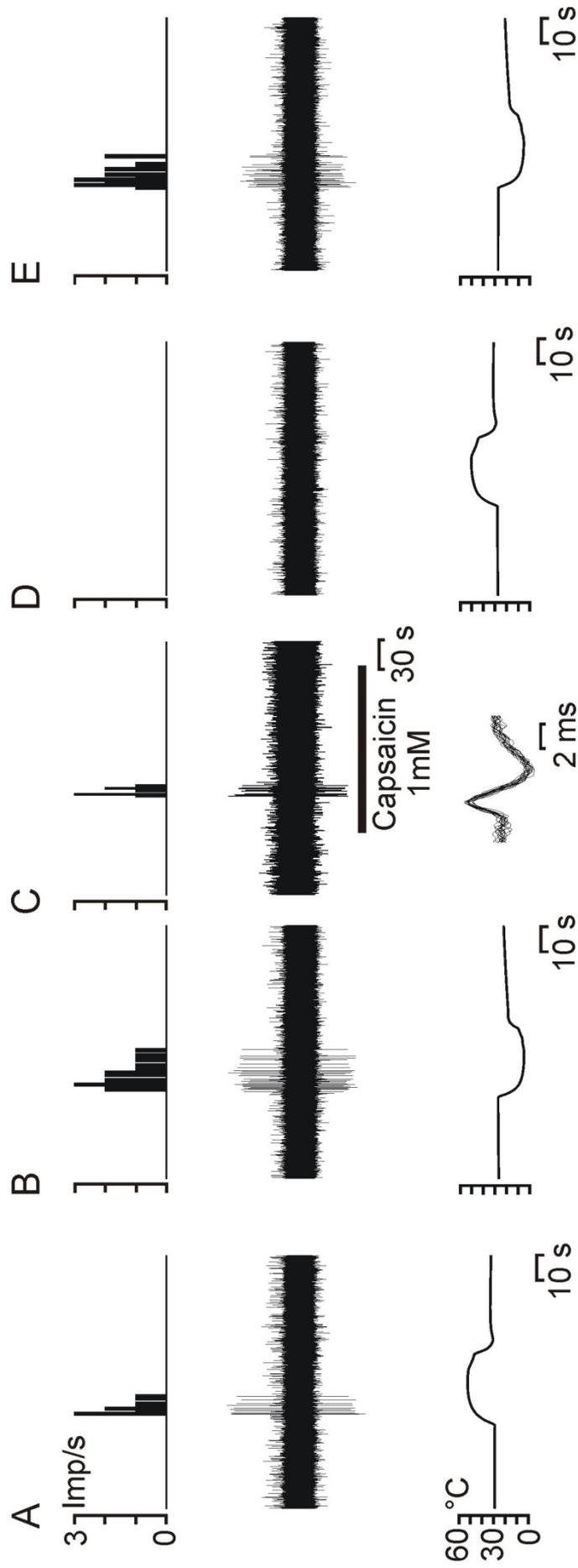


Abbildung III.09 Reaktion einer hitze- und kältesensiblen C-Faser aus Experiment 2 auf Capsaicin  
Aktivität auf Hitze vor (A), auf Kälte vor (B), während (C), auf Hitze nach (D) und auf Kälte nach (E) Applikation von 10mM Capsaicin entlang des Axons. (A) Aktivierung auf Hitzeerzeugung des Nerven (ca. 50°C, unten). (B) Aktivierung auf Kältereizung des Nerven (ca. 5°C, unten). (C) Aktivierung durch Capsaicin. Unten: Überlagerung der Aktionspotenziale der getesteten C-Faser. (D) Keine Aktivierung durch Hitzeerzeugung. (E) Unveränderte Aktivierung durch Kältereizung. Neuronale Aktivität: oben Histogramm, unten Rohdaten.

bei der Reaktion auf Kältereize (B) verglichen werden. Eine Faser zeigte erst nach Applikation von Capsaicin eine Reaktion auf Hitzereize, weswegen sie nicht in diese Abbildung einbezogen wurde. Zwei Kältefasern waren eindeutig mit einem kalten Eisenstab (ca. 5°C) als kältesensibel identifiziert worden. Während des Versuchs war jedoch eine quantitative Testung nicht möglich. Die Fasern zeigten jedoch auch weiterhin eine Aktivierung durch einen kalten Eisenstab, so dass diese weiterhin als kältesensibel geführt werden, jedoch nicht in dieser quantitativen Analyse berücksichtigt werden konnten. In Abschnitt A zeigt sich eine deutliche Desensibilisierung. Der Höchstwert der Aktivität vor Applikation von Capsaicin lag bei  $7,3 \pm 2,7$  Imp/s, nach Capsaicinapplikation hingegen nur noch bei  $2,3 \pm 1,2$  Imp/s (\*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$ , gepaarter Wilcoxon-Rangsummentest).

Betrachtet man hingegen in Abb. III.9B die Reaktion auf Kältereize vor (geschlossene Quadrate) und nach (offene Kreise) Applikation von Capsaicin, so ist die Reaktion praktisch unverändert. Auch die Höchstwerte der Aktivität sind mit  $4,3 \pm 1,2$  Imp/s vor Applikation von Capsaicin und  $4,2 \pm 2,1$  Imp/s danach praktisch gleich.

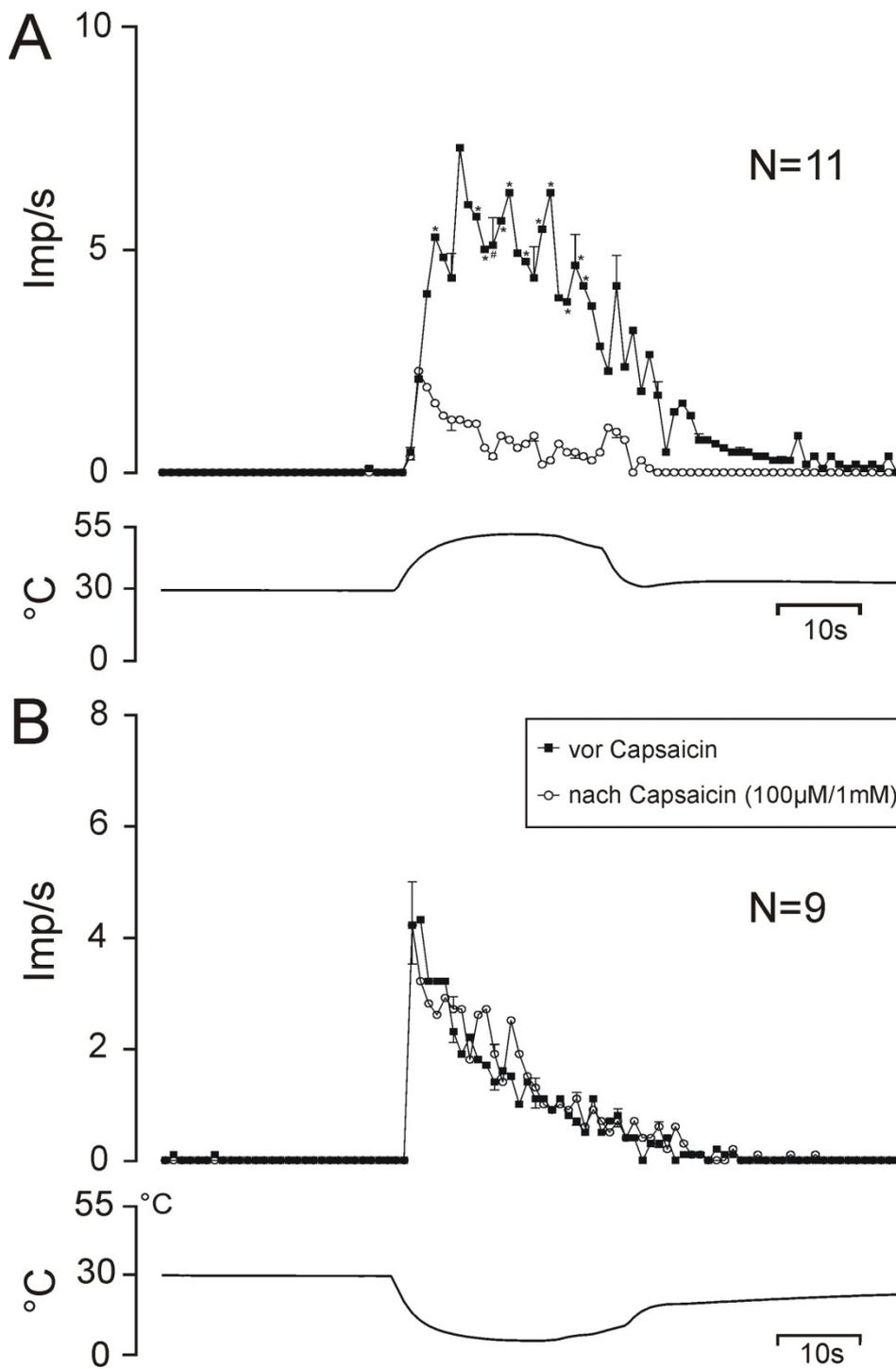


Abbildung III.10 Antwort von Afferenzen, die sowohl hitze- als auch kältesensibel waren, auf Hitze- (50°C, A) und Kältereizung (ca. 5°C, B) vor (gefüllte Quadrate) und nach (offene Kreise) Applikation von Capsaicin (1mM in den Experimenten 1+2, 100µM in Experiment 3) auf den *N. suralis*.

Mittelwert  $\pm$  SEM. Unten: Temperaturverlauf des Hitze- bzw. Kältereizes. A zeigt eine deutliche Desensibilisierung der Afferenzen auf Hitzeereize nach Applikation von Capsaicin. B zeigt eine unveränderte Reaktion der Afferenzen auf Kältereize nach Applikation von Capsaicin. \*,  $p < 0,05$ ; #,  $p < 0,01$  Wilcoxon-Rangsummentest.

### III.3.3 Mechanosensibilität

Mechanosensible A- (N=20) oder C-Fasern (N=6) wurden für mechanische Reize durch Capsaicin in Konzentrationen von 10 $\mu$ M bis 1mM nicht desensibilisiert. Je zwei dieser Fasern sind aus Experiment 1 oder 2; hier handelte es sich wahrscheinlich um perineurale Afferenzen (Tabellen III.1 und III.2). Von den 20 A-Fasern waren 2 zusätzlich hitzesensibel (beide in Experiment 3). Von den 6 C-Fasern waren alle auch hitzesensibel, 2 Fasern wiesen darüber hinaus auch Kältesensibilität auf.

Abbildung III.11 zeigt die Aktivierung einer mechanosensiblen A-Faser (Faser 1), einer mechano- und hitzesensiblen C-Faser (Faser 2) sowie einer hitzesensiblen C-Faser (Faser 3) aus Experiment 3 auf mechanische Reizung des Läsionsortes mit einem abgerundeten Glasstab vor, während und nach Applikation von 100 $\mu$ M Capsaicin. Vor der Applikation zeigt sich auf leichten Druck mit dem abgerundeten Glasstab am Ort der Läsion eine deutliche Reaktion beider mechanosensiblen Fasern (A). Während der Applikation von 100 $\mu$ M Capsaicin wird die A-Faser (Faser 1) nicht erregt, jedoch die C-Fasern (Faser 2+3) reagieren deutlich (B). Anschließend sind beide mechanosensiblen Fasern auch weiterhin durch mechanische Reize erregbar. Die A-Faser zeigt sogar eine stärkere Reaktion. Eine Standardisierung des Druckes durch den Untersucher mit dem Glasstab ist jedoch nur schwer möglich, so dass dies nicht als stärkere Aktivierung gewertet werden kann (C). Die Reaktion der C-Fasern auf Hitzereize ist in dieser Abbildung nicht dargestellt. Es zeigte sich jedoch bei beiden eine akute Aktivierung durch die Applikation von 100 $\mu$ M Capsaicin und anschließend eine deutliche Desensibilisierung auf Hitzereize.

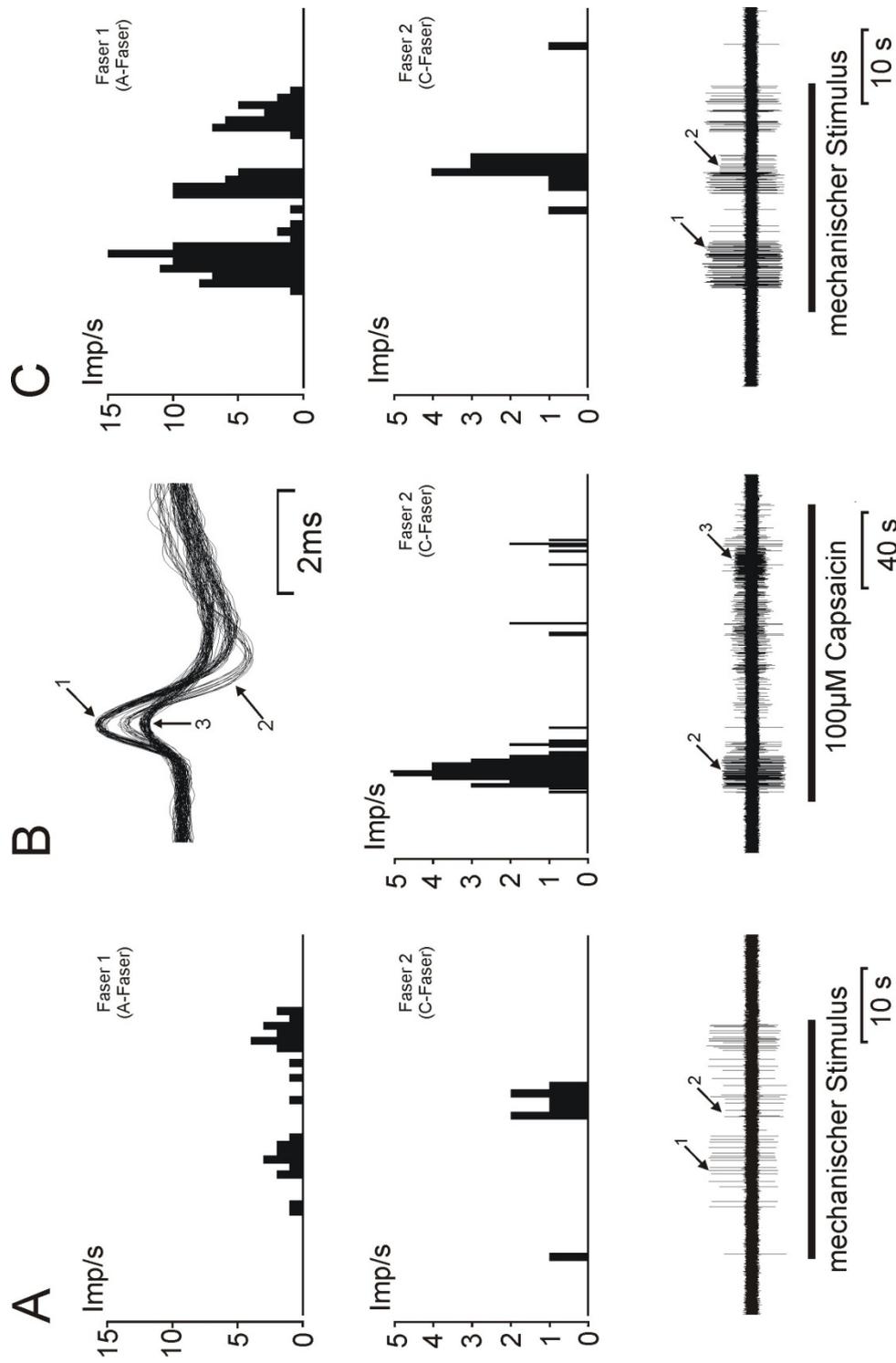


Abbildung III.11 Reaktion je einer mechanosensiblen A- (Faser 1) und C-Faser (Faser 2) aus Experiment 3 auf Capsaicin. Aktivität auf mechanische Reizung vor (A), während (B) und nach (C) Applikation von 100µM Capsaicin entlang des Axons. (A) Aktivierung auf mechanische Reizung des Nerven (mit abgerundetem Glasstab, unten). (B) Aktivierung der C-Faser (Faser 2) durch Capsaicin. Zusätzlich zeigt sich eine weitere C-Faser (Faser 3), welche akut auf Capsaicin reagiert. Oben: Überlagerung der Aktionspotenziale der getesteten A- und C-Fasern. (C) Keine Veränderung der Aktivierung von Faser 1 und 2 durch mechanische Reizung. Neuronale Aktivität: oben Histogramm Faser 1. Mitte Histogramm Faser 2. unten Rohdaten.

### **III.4 Einfluss von Capsaicin auf kutan hitzesensible Fasern (Experiment 4)**

In Experiment 4 wurden am intakten Präparat Fasern identifiziert, welche von der Haut und/oder entlang des Nervs durch Capsaicin erregbar waren. Anschließend wurde der Nerv akut durch eine Quetschläsion geschädigt und im weiteren Verlauf Capsaicin entlang des Nervus suralis appliziert. Insgesamt konnten in diesem Experiment 11 C-Fasern identifiziert werden, welche durch Hitzereizung der Haut aktiviert wurden.

5 dieser 11 Fasern waren zusätzlich auch entlang des Nervs durch Hitzereize erregbar. 4 dieser 5 Fasern zeigten eine Akutreaktion auf Capsaicin (1 mM), die weitere Faser zeigte zwar keine Akutreaktion wurde jedoch deutlich desensibilisiert. Die übrigen 6/11 Fasern waren ausschließlich an der Haut hitzesensibel. Sie konnten weder durch Hitzereizung des Nervus suralis noch durch Capsaicinapplikation (bis 10 mM) entlang des Nervs aktiviert werden. Somit korrelieren die axonale Hitze- und die axonale Capsaicinsensibilität. Ist eine Hitzefaser nicht entlang des Axons durch Hitzereize erregbar, so zeigt diese auch keine Reaktion auf die Applikation von Capsaicin am Nerven.

Die von der Haut als kälte- und mechanosensibel identifizierten A- und C-Fasern, die nicht hitzesensibel waren, zeigten ebenfalls keine Reaktion auf axonale Applikation von Capsaicin, d.h. sie wurden weder aktiviert noch für mechanische Reize oder Kältereize desensibilisiert (N=13 mechanosensible A-Fasern; N=1 mechanosensible C-Fasern; N=3 kältesensible C-Fasern).

## IV. DISKUSSION

Sowohl intakte als auch akut oder chronisch (4-7 Tage) geschädigte regenerierende Afferenzen können durch thermische und/oder mechanische Reize am Ort der Schädigung oder entlang des Nervs erregt werden. Jänig et al. (2009) sowie Teliban et al. (2011) zeigen, dass geschädigte Hautafferenzen 4-7 Tage nach einer Quetschläsion (hier Nervus suralis) im Vergleich mit dem intakten Nerv ihre funktionellen Charakteristika beibehalten. In dieser experimentellen Arbeit wurde die Hypothese getestet, dass Capsaicin die hitzesensiblen Afferenzen im Nervus suralis erregt und/oder für Hitzereize desensibilisiert ohne die Mechanosensibilität und Kältesensibilität zu beeinflussen. Hierzu dienten 4 unterschiedliche Experimente, welche unter I.4 und II.2 ausführlich erläutert wurden.

Die erhobenen Daten aus den Experimenten 1 und 2 gehen dabei der Frage nach, ob hitzesensible Afferenzen axonal durch Capsaicin erregt und/oder desensibilisiert werden können. Zeigen sich dabei Unterschiede zwischen einer akuten Schädigung des Nervs (Experiment 1) und einer Testung 4-7 Tage nach Quetschläsion?

In Experiment 3 wurde untersucht, ob Capsaicin hitzesensible Afferenzen auch am Ort der Läsion selbst erregen und/oder desensibilisieren kann. Zeigen sich Unterschiede in der Reaktion auf Capsaicinapplikation bei hitzesensiblen Afferenzen der niederschwelligen (Reizschwelle  $\leq 42^{\circ}\text{C}$ ) und der hochschwelligen (Reizschwelle  $\geq 43^{\circ}\text{C}$ ) Population? Zusätzlich kann bei intakter Verbindung zum Rückenmark gezeigt werden, ob Capsaicin und/oder thermische Reize einen Einfluss auf postganglionäre sympathische Afferenzen haben.

Werden kälte- und mechanosensible Fasern durch die Applikation von Capsaicin beeinflusst und wie verhalten sich Fasern, wenn diese zusätzlich Hitzesensibilität aufweisen? In Experiment 4 konnte zusätzlich gezeigt werden, wie kutane hitzesensible Fasern bei der axonalen Applikation von Capsaicin reagieren, wenn sie zuvor selbst keine axonale Hitzesensibilität aufwiesen.

### IV.1 Faserpopulationen des Nervus suralis

Auf die Faserpopulationen des intakten Nervus suralis wurde bereits in der Einleitung eingegangen. Kurz zusammengefasst sind 91% der A-Fasern mechanosensibel. 5% der mechanosensiblen Fasern sind ebenfalls hitze- oder kältesensibel. 9% sind ausschließlich kältesensibel (Jänig et al. 2009).

Die C-Fasern können in drei große Populationen eingeteilt werden (Kress et al. 1992; Chung et al. 1993; Jänig et al. 2009; Grossmann et al. 2009). Bei ca. 20% handelt es sich um

Typ 1-kältesensible Fasern, bei welchen es sich um nicht-nozizeptive Kältefasern mit hoher Spontanaktivität bei 30°C Haut- oder Nerventemperatur handelt. Diese Spontanaktivität kann durch Hitzereize unterdrückt werden und ab einer Schwellentemperatur von  $28,5 \pm 0,17$  °C zeigen diese Fasern eine starke Aktivierung durch Kältereize. Weitere 20% sind Typ 2-kältesensible Fasern, welche nahezu keine Spontanaktivität zeigen, eine erheblich niedrigere Schwellentemperatur von  $15,8 \pm 7,4$  °C besitzen und als nozizeptiv gelten. Zusätzlich weisen diese Fasern häufig Hitze- und/oder Mechanosensibilität auf und sind damit eine Untergruppe polymodaler nozizeptiver C-Afferenzen. Die restlichen 60% sind nicht-kältesensible Fasern, also hitze- und/oder mechanosensible C-Fasern.

Die Einteilungen der Faserpopulationen für A- und C-Fasern ändern sich auch nach einer Schädigung des Nervs nicht (Jänig et al. 2009; Gorodetskaya et al. 2003). Verglichen mit einem intakten Nerv zeigt sich bei den A-Fasern nach Schädigung kaum ein signifikanter Unterschied. 98% der A-Fasern sind in diesem Fall mechanosensibel, 24% davon zusätzlich hitze- und/oder kältesensibel. 7% der Fasern sind spontanaktiv. Bei den C-Fasern 7-14 Tage nach Nervenläsion zeigt die Verteilung der verschiedenen Faserpopulationen praktisch keine Veränderung. 22,8% sind hier Typ 1-kältesensibel, ebenfalls 22,8% Typ 2-kältesensibel und 54,3% nicht-kältesensibel. Große Unterschiede konnten jedoch sowohl bei der Inzidenz von Spontanaktivität festgestellt werden, als auch bei der Häufigkeit von Polymodalität; beide nahmen nach Nervenschädigung zu (Jänig et al. 2009; Gorodetskaya et al. 2003).

## **IV.2 Transduktionskanäle und Rezeptoren für Hitze-, Kälte- und Mechanosensibilität**

### **IV.2.1 Hitzesensibilität**

Die Transduktionskanäle, die für die Hitzesensibilität verantwortlichen gemacht werden, gehören in die Familie der transient receptor potential (TRP)-Ionenkanäle. Dabei handelt es sich um sechs-transmembranale Proteine mit einer Porenregion sowie zytoplasmatischen Carboxy- und Aminotermini, welche die unterschiedlichen Eigenschaften der TRP-Kanäle ausmachen. Darüber hinaus ordnen sich die TRP-Proteine oftmals als Tetramere an (Lumpkin & Caterina 2007; Ramsey et al. 2006). Besonders die Unterklasse TRP Vanilloid (TRPV)-Kanäle scheinen in der Hitzesensibilität eine entscheidende Rolle zu spielen.

Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf TRPV1, welcher ein unselektiver Kanal für Kationen wie  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$  ist (Caterina et al. 1997). TRPV1 wird besonders auf A $\delta$ - und C-Fasern exprimiert, welche der Hitzesensibilität dienen. Neben einem Anstieg von extrazellulären Protonen führen auch Lipxygenase-Produkte der Arachnoidonsäure sowie

deren Amid-Derivate zu einem Calcium-Einstrom. Auch einfach oder zweifach positiv geladene Kationen scheinen den TRPV1-Kanal aktivieren zu können (Ahern et al. 2005).

Als direkter Agonist des Kanal-Proteins führt jedoch vor allem Capsaicin, das Acrylamid-Derivat der Homovanillin-Säure, zu einer Öffnung des Kanals. Bei einer Temperatur über 42°C öffnet sich der Kanal auch ohne chemische Liganden. Außerdem erhöht sich die Antwort auf chemische Reize bei leichter Erwärmung über Raumtemperatur. Bei TRPV1-knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Entfernung des Gens für diesen Kanal zu einer deutlichen Reduktion der Sensibilität für Hitzeereize führt. Zusätzlich kommt es zu einer deutlichen Verlängerung der Latenzen von Schutzreflexen auf noxische Hitzeereize (Caterina et al. 2000). Davis et al. (2000) konnten darüber hinaus zeigen, dass es bei TRPV1-knockout-Mäusen mit ausgeprägten Entzündungsreaktionen im Bereich der Hinterpfote zu einem Verlust der Schutzreflexe bei thermischen Reizen kommt. Die Reaktion auf mechanische Reize bleibt dabei unverändert. Auch bei TRPV1-knockout-Mäusen kommt es jedoch nicht zum vollständigen Verlust der Sensibilität für Hitzeereize, weswegen weitere Kanal- und Rezeptormoleküle bei der Hitzesensibilität eine Rolle spielen müssen (Caterina 1997, 2006).

TRPV2 ist zu 50% seiner Aminosäuresequenzen identisch mit TRPV1. Jedoch wird dieser Rezeptor nicht durch Capsaicin erregt und hat eine höhere Reizschwelle von ungefähr 52°C. Welche Rolle TRPV2 bei der Wärme- bzw. Hitzesensibilität spielt, ist nicht abschließend geklärt (Caterina 2006). Lawson et al. (2008) bezweifeln hingegen, dass TRPV2 einen Einfluss bei der Wärme-/Hitzesensibilität hat und vermuten eher eine Rolle in der Mechanosensibilität, da TRPV2 kaum auf hitzesensiblen, häufig aber auf mechanosensiblen afferenten Neuronen exprimiert wird.

TRPV3 hat eine Reizschwelle zwischen 34 und 39°C und kann darüber hinaus zum Beispiel auch durch Kampfer aktiviert werden. TRPV4 hat eine noch niedrigere Reizschwelle von ca. 25 – 34°C und wird sowohl durch hypoosmotische Reize als auch Arachnoidonsäure-Derivate aktiviert. Ähnlich wie bei TRPV2 sind die Aminosäuresequenzen auch bei TRPV3 und TRPV4 zu 40-50% identisch mit denen von TRPV1. Sowohl TRPV3 als auch V4 werden hauptsächlich auf Keratinozyten der Epidermis exprimiert. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Wärmesensibilität nicht ausschließlich durch Nervenfasern vermittelt wird, sondern eine Kommunikation zwischen Keratinozyten und Nervenendigungen über Substanzen wie zum Beispiel ATP oder Acetylcholin erfolgt. Diese Hypothese konnte bisher jedoch nicht bewiesen werden (Caterina 2006). Versuche mit knockout-Mäusen zeigen jedoch, dass

TRPV3 eine wichtige Rolle bei der Geschwindigkeit der Reaktion auf Hitzereize spielt und TRPV4 eher der präzisen Wahrnehmung von Temperaturunterschieden zu dienen scheint (Caterina 2006).

Belmonte und Viana (2008) zeigen in ihrem Review jedoch auch, dass diese eindeutig scheinenden Funktionen und Zugehörigkeiten zu bestimmten Sensibilitäten mit Nichten als bewiesen anzusehen sind. In der Literatur wird dies oft fälschlicher Weise als klar und verstanden dargestellt. Eine Vielzahl unterschiedlicher Kanal- und Rezeptormoleküle spielen bei der Erregung von hitzesensiblen Nervenfasern eine Rolle. Besonders im Rahmen von Nervenschädigungen kann jede Veränderung der Expression zu starken Veränderungen in der Erregbarkeit auf Hitzereizung von Nervenfasern führen.

#### IV.2.2 Kältesensibilität

TRPM8 (M=melastatin) hat eine Reizschwelle bei Temperaturen unter 30°C (~25° im Mittel) und kann durch die Agonisten Menthol sowie andere Substanzen wie zum Beispiel Icilin aktiviert werden. TRPM8 kommt besonders bei einer Subpopulation von wenig bis nicht myelinisierten Nervenfasern vor (Lumpkin & Caterina 2007; Caterina 2006) und es ist davon auszugehen, dass TRPM8 im Besondern eine Rolle in der Auslösung von nicht-schmerzhaften Kälteempfindungen spielt. Babes (2009) weist allerdings darauf hin, dass auch die Kälteempfindung in ihrer Komplexität bei weitem noch nicht verstanden ist und man diese Rolle in der nicht-schmerzhaften Kälteempfindung bisher nur vermuten kann.

TRPA1 (A=ankyrin) kommt hauptsächlich in A $\delta$ - und C-Fasern vor, welche bei Erregung eine Temperatur- und/oder Schmerzempfindung auslösen. Die Reizschwelle befindet sich bei ca. 17,5°C. Der TRPA1-Rezeptor reagiert nicht auf Menthol, jedoch auch auf Icilin. Statt TRPM8 wird auf den meisten TRPA1 positiven Nervenfasern TRPV1 koexprimiert. Somit scheint es möglich, dass TRPA1 und TRPV1 interagieren. Darüber hinaus halten Story et al. (2003) es für sehr wahrscheinlich, dass es sich bei TRPA1-positiven Fasern um solche handelt, die für die Perzeption von schmerzhaften Kältereizen verantwortlich sind.

Des Weiteren spielen wahrscheinlich auch die K<sup>+</sup>-Kanäle TREK-1, TRAAK sowie der Na<sup>+</sup>-Kanal Nav 1.8 eine Rolle bei der Erregungsbildung auf Kältereize. Sowohl Babes (2009) als auch McKemy et al. (2002) weisen darauf hin, dass diese Kanäle nicht der Erregungsbildung dienen, sondern diese modulieren. Belmonte und Viana (2008) weisen in ihrem Review jedoch kritisch darauf hin, dass die Kältesensibilität ein sehr komplexes

Geschehen ist, in welches verschiedenste Ionenkanäle involviert sind. So interagieren die erregenden Kationenkanäle (TRP-Kanäle) mit verschiedenen, die Aktivität regulierenden Kalium- und Natriumkanälen, so dass die Schwelle und Aktivität variabel ist. Besonders bei peripherer Nervenschädigung kann es so zu einer veränderten Kältewahrnehmung kommen (Belmonte und Viana 2008).

#### IV.2.3 Mechanosensibilität

Die Mechanismen der Mechanosensibilität sind bisher nicht ausreichend erforscht und verstanden (Hu et al. 2006, Lumpkin & Caterina 2007). Es werden allerdings diverse Rezeptoren sowie Zellen diskutiert, welche hierbei eine Rolle spielen könnten.

Wie auch bei der Thermosensitivität werden verschieden Kationenkanäle der TRP-Familie in Verbindung mit Mechanosensibilität gebracht. So wird TRPV4 sehr stark auf Merkel-Zellen (s.u.) sowie auf schnell leitenden, stark myelinisierten afferenten Fasern exprimiert. TRPV4-knockout-Mäuse zeigen jedoch allenfalls eine dezente Minderung der Reizschwellen für mechanische Reize (Lumpkin & Caterina 2007). TRPV1 ist bei Dehnungsreflexen in der Blase und somit möglicherweise auch bei Hautafferenzen und deren Mechanosensibilität beteiligt. TRPV2 kann *in vitro* ebenfalls durch Dehnung geöffnet werden und wird auf stark myelinisierten Hautafferenzen exprimiert (Lumpkin & Caterina 2007). Bei Säugetieren gibt es zwar keine Hinweise für eine Beteiligung an mechanischer Reizwahrnehmung von TRPN1, jedoch ist dieser Kanal bei *Drosophila* in den Fühlern und Hörantennen für die Perzeption verantwortlich, so dass zumindest die Vermutung naheliegt, dass dies auch bei Säugetieren der Fall sein könnte. TRPA1 wird zwar stark in Nozizeptoren und Haarzellen exprimiert, knockout-Mäuse zeigen aber auch hier kaum signifikante Minderungen in der Erregungsbildung (Lumpkin & Caterina 2007).

Anders sieht dies beim Degenerin/Epithelial- $\text{Na}^+$ -channel (DEG/ENaC) aus. Bei DEG/ENaC-knockout-Mäusen zeigt sich eine deutliche Minderung der Mechanosensibilität (Lumpkin & Caterina 2007). Auch DEG/ENaC-Isoformen, die „acid-sensing ion channels“ (ASICs) 1, 2 und 3, spielen vermutlich eine modulatorische Rolle in der Signaltransduktion für mechanische Reize, sind aber keine aktiven Rezeptoren. Eine Überexpression von ASIC 3 führt allerdings auch zu einer Übererregbarkeit durch mechanische Reize (Lumpkin & Caterina 2007).

Bei dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* sind OSM-9/OCR-2-Kanäle höchstwahrscheinlich polymodal für hypertonische, mechanische sowie chemische Reize und

können möglicherweise durch mehrfach gesättigte Fettsäuren (PUFAs) moduliert werden (Lumpkin & Caterina 2007).

Der Kalium-Kanal TREK-1 wird durch Dehnung geöffnet und bei knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Sensibilität für niederschwellige mechanische Reize bei einer Absenz dieses Kanals deutlich gesteigert ist (Lumpkin & Caterina 2007).

Über die Rezeptorebene hinaus sind auch unterschiedliche Zellpopulationen an der Wahrnehmung mechanischer Reize beteiligt. Die Haarzellen des Gehörs sowie der Gleichgewichtswahrnehmung wandeln Schall- und Bewegungsempfindungen über die Öffnung von Ionenkanälen und Ausschüttung von Neurotransmittern in Aktionspotenziale um. Dass Keratinozyten eine entscheidende Rolle bei der Perzeption von mechanischen und auch anderen Reizen spielen können, legen folgende Tatsachen nahe: Unterschiedliche Subpopulationen von sensorischen Nervenfasern reichen in verschiedene epidermale Schichten. Darüber hinaus sind Keratinozyten in der Lage diverse modulierende, aktivierende oder inhibierende chemische Substanzen zu sezernieren. Sie exprimieren unterschiedliche Rezeptoren wie TRPV3 und V4 (s.o.), welche für die Thermosensibilität verantwortlich gemacht werden.

Bisher gibt es keine hinreichenden Beweise, dass Merkelzellen an der Mechanosensibilität beteiligt sind. Ähnlich wie bei den Keratinozyten sind jedoch viele eindeutige Hinweise vorhanden, die dafür sprechen. So besitzen Merkelzellen ähnliche Mikrovilli und auch Proteine wie Epsin, welche ebenfalls in Haarzellen des Gehörs gefunden wurden und die Transkriptionsfaktoren sind einander sehr ähnlich. Sie besitzen Vesikel, die denen der Neurotransmitterspeicherung gleichen, was ein Hinweis darauf sein könnte, dass Merkelzellen präsynaptische Funktionen haben und modulatorisch oder erregend auf stark myelinisierte Nervenfasern wirken können (Lumpkin & Caterina 2007). Halata et al. (2003) sind überzeugt, dass es sich bei Merkelzellen um Mechanorezeptorzellen handelt.

### **IV.3 Methodische Diskussion**

In dieser Arbeit wurde Capsaicin in Tyrode, einer physiologische Elektrolytlösung, pH = 7,4, gelöst. Turgut et. al (2004) beschreiben jedoch, dass Capsaicin nur schwer in Wasser zu lösen ist. Um größere Mengen in Wasser lösen zu können sollte demnach Capsaicin erst in Ethanol gelöst werden. Anschließend wird destilliertes Wasser hinzugefügt und ein Verdampfen des Ethanols abgewartet. Nelson (1919) beschreibt, dass Capsaicin einen Schmelzpunkt von 63,5°C besitzt. Zur Lösung des Capsaicins in Tyrode wurde die Capsaicinsuspension erwärmt und es kam zur vollständigen Lösung ohne Rückstände. Auch im Verlauf der Experimente,

welche über Stunden dauerten, kam es nicht zum Ausfallen des Capsaicins. Man kann also davon ausgehen, dass Capsaicin in Wasser ebenfalls in Lösung zu bringen ist, wenn man es bis zu einer Temperatur nahe dem Schmelzpunkt erhitzt. Die Produktinformation von Sigma® bestätigt dies. Dort wird von einem Schmelzpunkt zwischen 62 und 65°C gesprochen und darauf hingewiesen, dass Capsaicin in kaltem Wasser praktisch unlösbar sei, jedoch nicht in warmen.

In dieser Arbeit wurde zum Teil gezielt nach bestimmten Faserpopulationen gesucht, wie zum Beispiel Hitzefasern. So kann es zu einer Verzerrung der prozentualen Häufigkeiten bestimmter Faserpopulationen gekommen sein.

#### **IV.4 Hitze- und Capsaicinsensibilität**

Wie bereits oben beschrieben ist Capsaicin ein Agonist des TRPV1-Kanal, welcher bei der Perzeption von Hitzereizen eine entscheidende Rolle spielt. In den Experimenten 1, 2 und 3 zeigten sich 9 C-Fasern, welche erst nach Applikation von Capsaicin eine Sensibilität für Hitzereize zeigten. Eine dieser neun Fasern zeigte bei der Applikation von Capsaicin eine Akutreaktion. Die Vermutung liegt nahe, dass die Applikation von Capsaicin eine gewisse Population von potenziell hitzesensiblen Fasern erst sensibilisiert und diese anschließend durch Hitzereize erregbar sind. Möglicherweise handelt es sich dabei aber auch um ein methodisches Problem der Applikation der Hitzereize. Teilweise gestaltete es sich schwierig die besten rezeptiven Felder am Nerven für die Applikation der Hitzereize mit der Thermode zu finden. Es mag also sein, dass die rezeptiven Felder der jeweiligen Fasern vor Applikation von Capsaicin nicht adäquat erreicht wurden. Abbildung III.06 zeigt jedoch, dass nach Applikation von 10µM Capsaicin erst eine Sensibilisierung für Hitzereize einzutreten scheint. Somit ist es denkbar, dass diese Fasern durch die Applikation von Capsaicin sensibilisiert wurden. Die Faseranzahl bei 10µM (N=4) ist jedoch verhältnismäßig gering, weswegen diese Daten kritisch zu sehen sind. Kirillova (2012) zeigt jedoch, dass die Applikation von Capsaicin in niedrigen Konzentrationen bei hitzesensiblen C-Fasern im Muskelnerven der Ratte ebenfalls erst zu einer Sensibilisierung führt, bevor nach Applikation höherer Konzentrationen eine Desensibilisierung eintritt. Ähnliche Phänomene können zum Beispiel auch nach milden Verbrennung wie einem Sonnenbrand auftreten, wo es im und um das verletzte Gebiet zu einer Überempfindlichkeit für thermische und mechanische Reize kommt, bei welcher besonders die Sensibilität für Hitzereizung stark gesteigert ist (Harrison et al. 2004; Bishop et al. 2007). Auch nach topischer Applikation von niedrigen Konzentrationen

von Capsaicin auf der menschlichen Haut kommt es im Anschluss zu einer deutlichen Überempfindlichkeit für thermische Reize (Carpenter und Lynn 1981; Szolcsanyi 1977).

Jancso et. al (1978, 1984) zeigten, dass die Nervenzelldegeneration nach Applikation von Capsaicin auf sensorische Ganglienzellen des Ganglion trigeminale in neugeborenen Ratten mit einer intrazellulären Akkumulation von Calcium verbunden ist. Es lassen sich Calcium-Granula in stark geschwollenen Mitochondrien nachweisen. Calcium scheint somit eine wichtige Rolle bei der Nervenzelldegeneration zu spielen. Dass ein Calcium-Einstrom durch Capsaicin hervorgerufen werden kann ist dabei auch durch die Eigenschaften des TRPV1 als Calciumkanal zu erklären (s.o.). Capsaicin wird in diesem Zusammenhang auch beim Menschen zur Schmerztherapie, zum Beispiel bei der postherpetischen Neuralgie oder neuropathischem Schmerz, benutzt (Wallace und Pappagallo 2011, Anand und Bley 2011, Baron 2010). Capsaicin führt hierbei zu einer Defunktionalisierung von nozizeptiven Nervenfasern. So kommt es zu einem vorübergehenden Verlust des Membranpotenzials. Zusätzlich wird der Transport von neurotrophen Faktoren behindert, was wiederum zum zeitweisen Rückzug von epidermalen und dermalen Nervenfaserverminals führt (Anand und Bley 2011). Anand und Bley (2011) beschreiben darüber hinaus, dass eine periphere Überempfindlichkeit durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen wird, wie zum Beispiel durch eine veränderte Expression des TRPV1-Rezeptors sowie anderer Ionenkanäle, durch fehlende Reinnervation oder kollaterale Sprossung. Topisch appliziertes Capsaicin kann dabei zu einer Defunktionalisierung oder zum Absterben TRPV-1 exprimierender Neurone führen.

#### IV.4.1 Hitze- und Capsaicinsensibilität entlang des Axons

Betrachtet man die unter III.2.1 genannten Ergebnisse, so zeigt sich eine eindeutige Desensibilisierung von hitzesensiblen Afferenzen nach Applikation von Capsaicin. Nimmt man die Experiment 1 und 2 zusammen, so wurden 28/32 hitzesensible C-Fasern durch die Applikation von Capsaicin in Konzentrationen von 1mM und 10mM desensibilisiert. 22 dieser 32 Fasern zeigten dabei eine Akutreaktion, die übrigen 6 eine vollständige Desensibilisierung. Dieses Ergebnis lässt sich leicht erklären, wenn man die oben bereits diskutierten Eigenschaften des TRPV1-Kanals berücksichtigt (Caterina 2006, Caterina et al. 1997). Der durch die Capsaicin-Applikation ausgelöste  $Ca^{2+}$ -Einstrom führt zu einer Aktivierung der jeweiligen Faser (Akutreaktion), welche zum Teil sehr unterschiedliche Ausmaße annehmen kann. So konnten stärkste Aktivierungen mit Impulsfrequenzen von

>30 Imp/s über einen minutenlangen Zeitraum beobachtet werden und kurze Entladungen über wenige Sekunden mit anschließender Desensibilisierung. Dies kann möglicherweise durch die tatsächliche Capsaicin-Konzentration erklärt werden, welche das rezeptive Feld der hitzesensiblen Faser erreicht. Capsaicin ist sehr lipophil und penetriert aus diesem Grund die Nerven verhältnismäßig gut (Sigma® Produktinformation), dennoch kann davon ausgegangen werden, dass oberflächlich gelegene Fasern größeren Konzentrationen von Capsaicin ausgesetzt werden, als es tief im Nerven gelegene Fasern sind. Bei den oberflächlichen Fasern mag der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom so massiv sein, dass nach kurzer Aktivierung keine weiteren Aktionspotenziale mehr generiert werden können. Jancso et al. (1978, 1984) beschreiben, dass ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom vermutlich sogar eine große Rolle bei der Nervenzelldegeneration spielen könnte (s.o.). Betrachtet man die polymodalen Fasern, welche sowohl hitze- als auch kälte- und/oder mechanosensibel sind, so zeigt sich dort oft eine vollständige Desensibilisierung für Hitzereize nach Capsaicin-Applikation. Diese ist allerdings nicht durch einen Zelltod bedingt, weil die Sensibilität für Kälte und/oder mechanische Reize unverändert Bestand hat (s.u.).

Diese Ergebnisse lassen sich sehr gut mit Studien von Sauer et al. (1999 und 2001) sowie Fischer et al. (2003) vereinbaren. Sie zeigen, dass Transduktionskanäle, welche für die Hitzesensibilität verantwortlich sind, über die gesamte Nervenmembran von afferenten Neuronen verteilt sind. Zusätzlich konnte *in vitro* gezeigt werden, dass die Applikation von nozizeptiven Hitzereizen sowie von Protonen an einem isolierten Nervus ischiadicus der Ratte zur Freisetzung von calcitonin gene-related peptide (CGRP) führt. CGRP führt zu einer sehr starken Blutgefäßrelaxation. TRPV1 wird in der Membran von unmyelinisierten Fasern peripherer Nerven exprimiert und Capsaicin stimuliert die Freisetzung von CGRP durch diese Nervenfasern (Bernardini et al. 2004). Hoffmann et al. (2008) konnte zudem an einer Hautnerv-Präparation an Mäusen zeigen, dass 65,7% der Hitzefasern nicht nur im Bereich des rezeptiven Feldes an der Haut, sondern auch entlang des Axons durch Hitzereize erregt werden können. Teliban et al. (2011) zeigten ähnliche Ergebnisse wie Hoffmann et al. an der Ratte und stellten ebenfalls eine axonale Erregbarkeit für Hitze- und Kältereize dar. Jedoch waren bei Teliban et al. lediglich 34% der Hitzefasern sowohl von der Haut als auch entlang des Axons durch Hitzereize erregbar.

Vergleicht man die Ergebnisse der akuten Schädigung des Nervs (Experiment 1) mit denen 4-7 Tage nach Quetschläsion (Experiment 2), so lässt sich kein Unterschied feststellen. Es zeigt sich eindeutig, dass in beiden Fällen eine Desensibilisierung und bei den meisten Fasern auch eine Akutreaktion bei der Applikation von Capsaicin stattfindet. Dies passt sehr

gut zu den Ergebnissen von Gorodetskaya et al. (2009), welche zeigen konnten, dass sich die Häufigkeiten der Faserpopulationen bis zu 15 Monaten nach Schädigung zwar verändern, ihre Funktionalität jedoch praktisch identisch bleibt. In der Einleitung wurde jedoch bereits darauf hingewiesen, dass sich die Genexpression nach Schädigung eines Nervs verändert. Aufgrund des geschädigten Transportsystems der Nervenfasern kommt es zur Akkumulation von Rezeptor- und Kanalmolekülen, was wiederum zur Veränderung der physiologischen Eigenschaften führen kann. Michael und Priestley (1999) konnten zum Beispiel zeigen, dass die Expression des TRPV1-Kanals nach einem peripheren Nerv-Trauma herunterreguliert wird, während Carlton und Coggeshall (2001) zeigen, dass bei einer peripheren Entzündung TRPV1 hochreguliert wird. Ektoper Erregbarkeit von myelinisierten und unmyelinisierten afferenten Nervenfasern durch mechanische und/oder thermische Reize entsteht dabei innerhalb von 4-6 Stunden nach Axotomie (Michaelis et al. 1995 und Blenk et al. 1996). Diese pathologische Erregbarkeit kann dann über 10-15 Monate bestehen bleiben (Blumberg und Jänig 1984; Gorodetskaya et al. 2009). Insgesamt scheinen die Veränderungen nach Nervenschädigung den Einfluss von Capsaicin auf hitzesensible Fasern jedoch nicht zu verändern, unabhängig ob es sich um eine akute oder eine 4-7 Tage alte Schädigung handelt. Die Ergebnisse für Kälte- und Mechanosensibilität zeigen ein identisches Bild (s.u.).

In Experiment 1 zeigte sich eine C-Faser, welche weder durch Hitze noch durch Kälte oder mechanische Reize erregbar war, jedoch eine Akutreaktion auf die Applikation von 1mM Capsaicin zeigte. Man könnte nun nahelegen, dass auch nicht hitzesensible Fasern möglicherweise den TRPV1-Kanal exprimieren. Dies ist jedoch sehr fraglich, da diese eine Faser eine absolute Ausnahme darstellt und in allen vier Experimenten keine weitere Faser gefunden wurde, welche dieses Verhalten zeigte. Somit muss man davon ausgehen, dass bei dieser Faser eher ein methodisches Problem vorlag und einfach das hitzesensible rezeptive Feld in keiner der mehrfachen Testungen gefunden werden konnte. Insgesamt kann man davon ausgehen, dass der TRPV1-Kanal eine entscheidende Rolle in der Generierung von Aktivität bei hitzesensiblen Afferenzen spielt und es sich bei dieser Faser um eine Ausnahme handelt.

#### IV.4.2 Hitze- und Capsaicinsensibilität am Läsionsort

Die Ergebnisse der Hitze- und Capsaicinsensibilität am Läsionsort sind genauso eindeutig und vergleichbar mit denen aus den Experimenten 1 und 2. 16/23 hitzesensiblen C-Fasern zeigten eine Reaktion nach Applikation von Capsaicin. 12 dieser 16 C-Fasern boten dabei eine

Akutreaktion. 4/16 weitere Fasern reagierten zwar nicht akut auf die Applikation von Capsaicin, waren nach Applikation jedoch deutlich desensibilisiert. 6 Fasern zeigten erst nach Applikation von Capsaicin in unterschiedlicher Konzentration überhaupt Hitzesensibilität. Möglicherweise wurden diese Fasern durch die Applikation sensibilisiert (s.o.). Eine hitzesensible C-Faser zeigte keinerlei Veränderung durch die Applikation von Capsaicin.

Vergleicht man die Aktivitäten der unterschiedlichen Experimente, so fällt auf, dass diese in Experiment 3 im Durchschnitt deutlich niedriger sind als in den Experimenten 1 und 2 (Vergleiche die Abbildung III.02 und III.05). Nach der Quetschläsion kommt es zu einer deutlichen Abflachung des Nervs im Bereich der Läsion. Die über die Thermode applizierten Temperaturen müssten sich demnach bei größerer Auflagefläche wesentlich besser im Läsionsbereich ausbreiten können. Gerade bei tiefer gelegenen Nervenfilamenten sollte die Abschwächung durch die Entfernung zur Thermode wesentlich geringer sein und man könnte zumindest eine gleichwertig hohe Aktivität erwarten. Die niedrigere Aktivität in Experiment 3 zeigt sich jedoch auch bei der Kältesensibilität. Auch dort sind die Aktivitäten im Läsionspräparat im Durchschnitt niedriger als bei den Experimenten 1 und 2. Wie oben bereits beschrieben unterläuft der Nerv nach Schädigung diverse physiologische und biochemische Veränderungen. Neben der Beeinträchtigung des axoplasmatischen Transports kommt es vor allem durch eine Veränderung der Genexpression zu einer Akkumulation von Kanal- und Rezeptormolekülen entlang des gesamten Axons, besonders jedoch im Bereich der Aussprossungen am Ort der Läsion selbst (Devor 2006; Sunderland 1978). Bei einer vermehrten Akkumulation von Kanal- und Rezeptormolekülen sollte man ebenfalls von einer höheren durchschnittlichen Aktivität im Bereich des Läsionsortes ausgehen. Die Neurone beginnen möglichst schnell mit der Reinnervierung des ursprünglichen Innervationsgebietes. Bei einer Quetschläsion bleiben die von den Schwanzzellen gebildete Leitschienen intakt und die Nervenfasern können nach Absterben des distal der Schädigung gelegenen Anteils des Axons unmittelbar mit der Regeneration beginnen. Die aussprossenden Axone samt akkumulierten Molekülen könnten somit bereits wenige Millimeter vom Läsionsort entfernt sein und somit von der Testung nicht richtig erfasst werden. Dies ist jedoch lediglich eine Hypothese.

Im Vergleich zur axonalen Applikation von Capsaicin wurden am Läsionsort niedrigere Konzentrationen von Capsaicin benötigt, um eine Akutreaktion oder eine Desensibilisierung hervorzurufen. Capsaicin ist ein sehr lipophiles Molekül (s.o., Sigma® Produktinformation), welches den Nerven gut penetrieren und somit schnell zu den Rezeptoren diffundieren kann. Auch hier können die vorab geäußerten Vermutungen

diskutiert werden. So spricht die Abflachung des Nervs am Läsionsort für eine einfachere und schnellere Penetration des Capsaicins durch die nervalen Strukturen, so dass niedrigere Konzentrationen für eine Reaktion auf das Capsaicin notwendig waren. In diesem Fall spricht auch die höhere Rezeptordichte im Bereich des Läsionsortes für einen Effekt niedrigerer Konzentrationen von Capsaicin, da es leicht nachzuvollziehen ist, dass eine Reaktion auf Capsaicin bei größerer Rezeptordichte bereits bei geringeren Konzentrationen hervorgerufen wird.

Grossmann et al (2009) klassifizierten die hitzesensiblen Afferenzen in niederschwellige (Reizschwelle  $\leq 42^{\circ}\text{C}$ ) und hochschwellige (Reizschwelle  $\geq 43^{\circ}\text{C}$ ) Populationen. Es stellt sich nun die Frage, ob Unterschiede zwischen diesen beiden Populationen in der Reaktion auf Capsaicin und/oder der Desensibilisierung festgestellt werden können. Betrachtet man die oben bereits genannte Literatur bezüglich der für die Hitzesensibilität verantwortlichen TRPV-Kanäle, so wird dort vermutet, dass der TRPV1-Kanal speziell auf hochschwelligem Hitzefasern exprimiert wird, die TRPV3- und V4-Kanäle hingegen bei der niederschweligen Population. Insgesamt wurden in Experiment 3 8 der 23 Hitze-C-Fasern als niederschwellig kategorisiert. Insgesamt 7/8 als niederschwellig klassifizierten hitzesensiblen C-Fasern wurden durch die Applikation von Capsaicin (Akutreaktion und/oder Desensibilisierung) beeinflusst. Dies ist ein eindeutiges Ergebnis und zeigt klar auf, dass auch die niederschweligen Hitzefasern nach Nervenläsion den TRPV1-Kanal exprimieren müssen. Dies unterstützt die Aussage von Belmonte und Viana (2008), welche klar aufzeigen, dass die genauen Mechanismen der Perzeption von thermischen und mechanischen Reizen bei weitem noch nicht ausreichend verstanden sind. Es gibt viele Arbeiten zu diversen Kanal- und Rezeptorproteinen, welche bei der Hitzesensibilität vermutlich eine Rolle spielen. Ein komplexes Zusammenspiel aus multiplen unterschiedlichen Rezeptoren und Kanälen scheint für die Hitzesensibilität erforderlich zu sein (Caterina 2006, Babes 2009, Belmonte & Viana 2008).

Interessanterweise konnten niederschwellige Hitzefasern ausschließlich in Experiment 3 bei der Testung am Läsionsort identifiziert werden. Dies kann möglicherweise durch eine größere Rezeptoren- und Kanalproteindichte und somit einer denkbaren Steigerung der Sensibilität erklärt werden. Zusätzlich mag die Abflachung des Nervs im Bereich der Läsion dazu führen, dass die Thermode eine breitere Auflagefläche findet und Temperaturen somit besser auch in tiefere Abschnitte des Nervs vordringen können. Dies würde der Theorie widersprechen, dass die Reinnervierung bereits wenige Millimeter vom Läsionsort entfernt

ist, da gerade in diesem Fall kaum ein Unterschied zu den Experimenten 1 und 2 zu erwarten wäre.

#### IV.4.3 Capsaicin und postganglionäre Efferenzen

In Experiment 2 konnten bei distaler Ableitung und somit intakter Verbindung der getesteten Filamente zum Rückenmark insgesamt 8 spontanaktive postganglionäre sympathische Efferenzen identifiziert werden. Die Identifikation erfolgte durch Darstellung der kardialen Rhythmizität der spontanen Aktivität, wie von Häbler et al. (1991, 1994) beschrieben worden ist. McLachlan und Jänig (1983) haben gezeigt, dass etwa 19% aller unmyelinisierten Fasern des Nervus suralis postganglionär sympathisch sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Efferenzen durch Hitzereizung reflektorisch gehemmt werden können (siehe Abbildung III.03 B und E). Bei der eindeutigen Unterdrückung durch Hitzereize hätte man erwarten können, dass auch die Applikation von Capsaicin und die dadurch hervorgerufene Akutreaktion bei vielen Hitzefasern zu einer reflektorischen Unterdrückung führt. Die Abbildungen III.03 C und F zeigen jedoch, dass postganglionäre sympathische Fasern nicht durch die Applikation von Capsaicin in den in dieser Arbeit genutzten Konzentrationen beeinflusst werden. Möglicherweise waren die angewandten Konzentration zu niedrig, um eine ausreichend starke Aktivierung der Hitzefasern und somit eine reflektorisch ausgelöste Hemmung hervorzurufen. Die akute Aktivierung durch die Applikation von Capsaicin ist kaum mit der Aktivierung durch einen physiologischen noxischen Hitzereiz vergleichbar. Es ist denkbar, dass auch die Form der Aktivierung von Hitzefasern im zentralen Nervensystem unterschiedlich verarbeitet wird. Somit könnte die Art der Aktivierung eine unterschiedliche Reaktion der zentralen Strukturen und möglicherweise auch das Ausbleiben der reflektorischen Unterdrückung erklären.

Eine reflektorische Hemmung der Aktivität in den postganglionären sympathischen Neuronen durch noxische Kältereize, wie sie Häbler et al. (1994) darstellen konnten, konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine Unterdrückung der Aktivität durch Hitzereize dort nicht beobachtet. Dabei muss jedoch angemerkt werden, dass die Applikation der noxischen Reize bei Häbler et al. an der intakten Haut erfolgte. Die experimentellen Ansätze dieser Arbeit und der von Häbler et al. sind somit kaum vergleichbar.

Zusammenfassend führt eine Hitzereizung zu einer reflektorischen Hemmung postganglionärer sympathischer Neurone. Die Applikation von Capsaicin führt scheinbar zu

einer nicht ausreichend starken Aktivierung der Afferenzen, so dass es nicht zu einer Hemmung kommt. Ähnliches gilt für noxische Kältereize, bei denen die Gesamtaktivierung der Axone zu gering zu sein scheint. Die Typ 1-kältesensiblen Afferenzen gelten als nicht noxizeptiv. Die Typ 2-kältesensiblen Afferenzen hingegen sind noxizeptiv, können jedoch nur zu 1/3 axonal erregt werden (Teliban et al. 2011). Dies unterstützt die nicht ausreichende Gesamtaktivierung.

## **IV.5 Kälte- und/oder Mechanosensibilität**

### **IV.5.1 Kälte- und Mechanosensibilität bei Fasern ohne Hitzesensibilität**

In den Experimenten 1, 2 und 3 wurden insgesamt 34 kältesensible C-Fasern getestet, von denen nicht eine einzige durch die Applikation von Capsaicin in Konzentrationen von 10 $\mu$ M bis 1mM in ihrer Reaktion auf Kältereize beeinflusst wurde. Abgesehen von 12 C-Fasern, welche zusätzlich auch Hitzesensibilität aufwiesen (diese werden genauer unter IV.5.2 behandelt), zeigte davon keine Faser eine Akutreaktion auf die Applikation von Capsaicin. Betrachtet man die oben bereits beschriebenen Kanal- und Rezeptormoleküle, welche in der Literatur eine Rolle bei der Aktivierung durch Kältereize spielen sollen, so lässt sich dieses eindeutige Ergebnis leicht erklären. Nach bisherigem Stand der Kenntnis bindet ausschließlich der TRPV1-Kanal Capsaicin als Liganden (s.o.) und dieser wird nicht in Verbindung mit der Kältesensibilität gebracht. Weder der TRPM8-, der TRPA1-Kanal, die Kalium-Kanäle TREK-1 und TRAAK noch der Natrium-Kanal Nav1.8 werden durch die Applikation von Capsaicin beeinflusst. Eine Vielzahl an unterschiedlichen Rezeptor- und Kanal-molekülen spielen bei der Kältesensibilität eine Rolle und bereits kleinste Veränderungen der Expression können möglicherweise die Transduktionsmechanismen für Kältesensibilität in den Nervenfasern sehr verändern. An den Experimenten in dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass auch bei akuter Quetschung des Nervs oder 4-7 Tage nach Schädigung des Nervus suralis die Kältesensibilität von Afferenzen axonal und am Läsionsort nicht durch die Applikation von Capsaicin beeinflusst wird.

Gleiches gilt auch für die Mechanosensibilität von 20 A- und 6 C-Fasern. Auch diese wurde nicht durch die Applikation von Capsaicin in Konzentration von 10 $\mu$ M bis 1mM beeinflusst. Der TRPV1-Kanal ist zwar bei Dehnungsreflexen in der Blase beteiligt und man vermutet aus diesem Grund eine mögliche Rolle dieses Kanals in der Mechanosensibilität. Dennoch zeigen die Ergebnisse eindeutig, dass die Mechanosensibilität durch Capsaicin nicht beeinflusst wird. Somit ist eine Expression von TRPV1 auf mechanosensiblen Fasern

praktisch ausgeschlossen, es sei denn diese Fasern sind zusätzlich hitzesensibel. Auch dann wird die Mechanosensibilität jedoch nicht durch die Applikation von Capsaicin beeinflusst.

#### IV.5.2 Kälte- und/oder Mechanosensibilität bei zusätzlich hitzesensiblen Fasern

Insgesamt 16 kältesensible und/oder mechanosensible C-Fasern wiesen auch eine Sensibilität für Hitzereize auf. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, dass weder die Kältesensibilität noch die Mechanosensibilität von polymodalen Hitzefasern durch die Applikation von Capsaicin beeinflusst werden. Darüber hinaus kann aber auch gezeigt werden, dass sich die Hitzesensibilität wie bei monomodal-hitzesensiblen C-Fasern verhält. So zeigten praktisch alle Fasern auf die Applikation von Capsaicin eine Akutreaktion und/oder wurden für weitere Hitzereize desensibilisiert. Die hierfür ursächlichen Kanal- und Rezeptormoleküle wurden bereits an anderer Stelle dieses Kapitels sehr ausführlich diskutiert. An dieser Stelle soll jedoch betont werden, dass hitzesensible Fasern nach Applikation von Capsaicin in den angewendeten Konzentrationen keinesfalls absterben, sondern lediglich in ihrer Hitzesensibilität desensibilisiert werden. Die Sensibilität für Kälte- und/oder mechanische Reize wird durch die Applikation von Capsaicin nicht beeinflusst. Wie oben bereits erwähnt, wird Capsaicin in der Schmerztherapie genutzt (Wallace und Pappagallo 2011, Anand und Bley 2011, Baron 2010) und Jancso et al. (1978, 1984) konnten zeigen, dass ein starker Calcium-Einstrom zur Zerstörung von afferenten Nervenzellen führen kann. Jancso et al. (1977) zeigten darüber an neugeborenen Ratten, dass es zu einem lebenslangen Verlust von afferenten Neuronen mit un- oder wenig myelinisierten Axonen, deren Zellkörper in den Hinterwurzelganglien liegen, kommt, wenn Capsaicin mit hoher Dosis appliziert wird. Die in diesen Experimenten genutzten Konzentrationen zwischen 10 $\mu$ M und 10mM Capsaicin, die für maximal 180 Sekunden appliziert wurden, scheinen jedoch nicht auszureichen, um einen dermaßen ausgeprägten Calcium-Einstrom hervorzurufen.

#### **IV.6 Einfluss von Capsaicin auf ausschließlich kutan hitzesensible C-Fasern (Exp. 4)**

6 C-Fasern in Experiment 4 waren kutan hitzesensible C-Fasern, konnten aber nicht durch Hitzereizung ihrer Axone aktiviert werden. Keine dieser Faser wurde durch die axonale Applikation von Capsaicin aktiviert oder sensibilisiert. 5 Fasern zeigten neben der kutanen Hitzesensibilität auch eine Aktivierung auf Hitzereize, welche entlang des Axons appliziert wurden. Diese Fasern wurden alle auch durch die Applikation von Capsaicin am Axon beeinflusst. 4/5 C-Fasern wurden akut aktiviert und desensibilisiert. Eine C-Faser wurde lediglich desensibilisiert, ohne aktiviert zu werden. Somit korrelieren die axonale Hitze- und

die axonale Capsaicinsensibilität miteinander. Ist eine Hitzefaser nicht entlang des Axons durch Hitzeerregung erregbar, so zeigt diese auch keine Reaktion auf die Applikation von Capsaicin.

Dies ist ein erstaunliches und überraschendes Ergebnis, wenn man überlegt, dass es zwei Populationen von Hitzefasern zu geben scheint. Die eine Population ist neben der Erregbarkeit auf Hitzeerregung im Bereich des rezeptiven Feldes an der Haut sowohl für Hitzeerregung als auch für Capsaicin-Applikation entlang des Axons sensibel, während die zweite Population zwar im Bereich der Haut Hitzesensibilität zeigt, jedoch nicht entlang des Axons erregbar ist. Diese Population scheint nach oben bereits mehrfach genannten und diskutierten Ergebnissen den TRPV1-Kanal sowie andere für die Hitzesensibilität notwendigen Kanäle und Rezeptoren nicht oder nur in geringem Maße entlang des Axons zu exprimieren. Was genau unterscheidet diese beiden Populationen in ihrer physiologischen Funktion? Die Faseranzahl in dieser Arbeit ist sehr gering bei insgesamt nur 11 Fasern, wovon wiederum 5 auch entlang des Nervs erregbar waren. Die Ergebnisse sind jedoch eindeutig. In der Literatur wird dieser Sachverhalt nicht diskutiert. Teliban et al. (2011) haben die axonale Sensibilität für thermische und mechanische Reize untersucht und konnten dabei zeigen, dass sich die Sensibilität für Kälte- und Hitzeerregung nicht auf die rezeptiven Felder im Bereich der Haut beschränkt, sondern oft auch entlang des Axons nachweisbar ist. Dabei konnten nahezu alle nicht-nozizeptiven kältesensiblen C-Fasern (Typ 1) auch entlang des Axons durch Kälte erregt werden (97%). Von den nozizeptiven Kältefasern (Typ 2) waren 39% durch Kältereize entlang des Axons erregbar. Betrachtet man die Hitzesensibilität, so konnten 34% der an der Haut hitzesensiblen C-Fasern auch entlang des Axons durch Hitzeerregung aktiviert werden. Dies deckt sich mit unseren Beobachtungen, in denen ca. 45% der hitzesensiblen C-Fasern auch entlang des Nervs erregbar waren. An dieser Stelle sei nochmal darauf hingewiesen, dass die Faseranzahl in dieser Arbeit jedoch keinesfalls repräsentativ ist. Hoffmann et al. (2008) konnte an Mäusen zeigen, dass ca. 66% der hitzesensiblen C-Fasern auch entlang des Axons erregbar sind. Der geringere Anteil in dieser Arbeit (5/11) sowie in der Arbeit von Teliban et al. (2011) (34%) mag zustande kommen, da sowohl bei Teliban et al. als auch in dieser Arbeit mit 50°C als Höchsttemperatur gearbeitet wurde und möglicherweise die sehr hochschwelligeren Hitzefasern mit Schwellentemperaturen >50°C nicht identifiziert werden konnten. Es werden weitere Studien notwendig sein, um diesen Sachverhalt bezüglich unterschiedlicher Populationen von Hitzefasern und deren physiologischer und funktioneller Unterschiede weiter aufzuklären.

## V. Zusammenfassung

- (1) Hitzesensible Afferenzen werden axonal bei akuter (Experiment 1) oder 4-7 Tage nach Schädigung (Experiment 2) des Nervus suralis gleichermaßen durch die Applikation von Capsaicin aktiviert und desensibilisiert.
- (2) Ein Unterschied im Antwortverhalten der Hitzefasern zwischen akuter Schädigung oder 4-7 Tage Läsion ist nicht zu beobachten.
- (3) Postganglionäre sympathische Efferenzen werden durch die Applikation von Capsaicin weder aktiviert noch unterdrückt oder auf andere Art und Weise beeinflusst.
- (4) Auch am Ort der Läsion (Experiment 3) können hitzesensible Afferenzen durch Capsaicin erregt und desensibilisiert werden. Anders als in den Experimenten 1 und 2 fällt die Hitzeantwort (und auch die Kälteantwort) insgesamt jedoch wesentlich geringer aus.
- (5) Ein Unterschied in der Reaktion bzw. der Desensibilisierung durch Capsaicin ist bei niederschwelligen im Vergleich zu hochschwelligen Hitzefasern nicht zu beobachten. Beide reagieren auf dieselbe Weise.
- (6) Kutane hitzesensible Afferenzen zeigen nur dann eine Aktivierung bei Applikation von Capsaicin entlang des Axons, wenn auch eine axonale Sensibilität für Hitzereize vorhanden ist.
- (7) Weder die Kälte- noch die Mechanosensibilität von Hautafferenzen wird durch die Applikation von Capsaicin entlang des Nervs oder am Ort der Läsion beeinflusst, unabhängig davon, ob die Fasern zusätzlich Hitzesensibilität aufweisen.

## VI ANHANG

### VI.1 Literaturverzeichnis

Anand P, Bley K (2011) - **Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch.** British Journal of Anaesthesia 107 (4): 490–502 (2011)

Ahern GP, Brooks IM, Miyares RL, and Wang XB (2005) - **Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling.** J Neurosci 25: 5109–5116, 2005

Babes A (2009) - **Ion channels involved in cold detection in mammals: TRP and non-TRP mechanisms.** Biophys Rev. 2009 1:193-200

Baron R, Binder A, Wasner G. (2010) **Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment.** Lancet Neurol. 2010 Aug;9(8):807-19.

Belmonte C, Viana F. (2008) **Molecular and cellular limits to somatosensory specificity.** Mol Pain. 2008;4:14.

Belmonte C, Brock JA, Viana F (2009) **Converting cold into pain.** Exp Brain Res. 2009 Jun;196(1):13-30. Epub 2009 Apr 28.

Bernardini N, Neuhuber W, Reeh PW, Sauer SK. (2004) **Morphological evidence for functional capsaicin receptor expression and calcitonin gene-related peptide exocytosis in isolated peripheral nerve axons of the mouse.** Neuroscience. 2004;126:585-90.

Bishop T, Hewson DW, Yip PK, Fahey MS, Dawbarn D, Young AR, McMahon SB (2007) - **Characterisation of ultraviolet-B-induced inflammation as a model of hyperalgesia in the rat.** Pain. 2007; 131:70-82.

Blenk KH, Jänig W, Michaelis M, Vogel C. (1996) **Prolonged injury discharge in unmyelinated nerve fibres following transection of the sural nerve in rats.** Neurosci Lett. 1996; 215:185-8.

Blumberg H, Jänig W. (1984) **Discharge pattern of afferent fibers from a neuroma.** Pain. 1984; 20:335-53.

Carlton SM, Coggeshall RE. (2001) **Peripheral capsaicin receptors increase in the inflamed rat hindpaw: a possible mechanism for peripheral sensitization.** Neurosci Lett. 2001;310:53-6.

Carpenter SE and Lynn B (1981) - **Vascular and sensory responses of human skin to mild injury after topical treatment with capsaicin.** Br J Pharmacol. 1981; 73: 755–758

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. (1997) - **The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway.** Nature. 1997; 389:816-24.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D.(2000) - **Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor.** Science. 2000; 288:306-13.

Caterina MJ (2006) **Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation.** Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2007; 292:R64-76.

Chung K, Park MJ, Sheen K, Chung JM. (1993) **Neonatal sciatic nerve lesion triggers the sprouting of fibers in the contralateral ventral root of the rat.** Brain Res. 1993 Dec 31;632(1-2):80-5.

Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ, Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA. (2000) - **Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia.** Nature. 2000 May 11;405(6783):183-7.

Devor M, Keller CH, Deerinck TJ, Levinson SR, Ellisman MH (1989) - **Na<sup>+</sup> channel accumulation on axolemma of afferent endings in nerve end neuromas in Apterotonotus.** Neurosci Lett. 1989; 102:149-54.

Devor (2006) - **Response of nerves to injury in relation to neuropathic pain.** In: McMahon SB, Koltzenburg M (Herausgeb.), Wall and Melzack's Textbook of Pain, 5. Ausgabe, Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh, pp905-927

Fischer MJ, Reeh PW & Sauer SK (2003) **Proton-induced calcitonin generelated peptide release from rat sciatic nerve axons, in vitro, involving TRPV1.** Eur. J. Neurosci., 18, 803–810.

Gorodetskaya N, Constantin C, Janig W (2003) **Ectopic activity in cutaneous regenerating afferent nerve fibers following nerve lesion in the rat.** Eur J Neurosci 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.** J Neurophysiol. 2009 Dec;102(6):3129-41. Epub 2009 Sep 9.

Grossmann L, Gorodetskaya N, Teliban A, Baron R, Jänig W (2009) **Cutaneous afferent C-fibers regenerating along the distal nerve stump after crush lesion show two types of cold sensitivity.** Eur J Pain. 2009 Aug;13(7):682-90. Epub 2008 Oct 30.

Häbler HJ, Jänig W, Krummel M, Peters OA. (1991) **Reflex patterns of postganglionic neurons supplying the hindlimb of the rat (Abstract).** Pfluegers Arch. 418, Suppl. : R36, 1991.

Häbler HJ, Jänig W, Krummel M, Peters OA. (1994) **Reflex patterns in postganglionic neurons supplying skin and skeletal muscle of the rat hindlimb.** J Neurophysiol. 1994 Nov;72(5):2222-36.

Halata, Z., Grim, M. & Bauman, K. I. (2003) - **Friedrich Sigmund Merkel and his 'Merkel cell', morphology, development, and physiology: review and new results.** *Anat. Rec.* 271A, 225–239 (2003).

Harrison GI, Young AR, McMahon SB (2004) - **Ultraviolet Radiation-Induced Inflammation as a Model for Cutaneous Hyperalgesia.** J Invest Dermatol. 2004 Jan;122(1):183-9.

Hoffmann T, Sauer SK, Horch RE & Reeh PW (2008) **Sensory transduction in peripheral nerve axons elicits ectopic action potentials.** J. Neurosci., 28, 6281–6284.

Hu J, Milenkovic N, Lewin GR (2006) **The high threshold mechanotransducer: a status report.** Pain. 2006 Jan;120(1-2):3-7. Epub 2005 Dec 15.

Jancso G, Kiraly E, and Jancso-Gabor A (1977) - **Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurons.** Nature 270: 741–743, 1977.

Jancsó G, Sávy G, Király E. (1978) **Appearance of histochemically detectable ionic calcium in degenerating primary sensory neurons.** Acta Histochem. 1978;62(2):165-9.

Jancsó G, Karcsú S, Király E, Szebeni A, Tóth L, Bácsy E, Joó F, Párducz A. (1984) **Neurotoxin induced nerve cell degeneration: possible involvement of calcium.** Brain Res. 1984 Mar 19;295(2):211-6.

Jänig W, Grossmann L, Gorodetskaya N. (2009) - **Mechano- and thermosensitivity of regenerating cutaneous afferent nerve fibers.** Exp Brain Res. 2009 Jun;196(1):101-14. Epub 2009 Jan 13.

Karashima Y, Damann N, Prenen J, Talavera K, Segal A, Voets T, Nilius B. (2007) **Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1.** J Neurosci. 2007 Sep 12;27(37):9874-84.

Kirillova I (2012) **Mechano- and thermosensitivity of muscle afferents 4 hours to 7 days after nerve injury and their responsiveness to TRP agonists.** Dissertation. Math-Naturwiss. Fakultät, Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (2012)

Kress, M., Koltzenburg, M., Reeh, P.W. & Handwerker, H.O. (1992) **Responsiveness and functional attributes of electrically localized terminals of cutaneous C-fibers in vivo and in vitro.** J. Neurophysiol., 68, 581–595.

Lawson SN, Waddell PJ (1991) **Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons.** J Physiol. 1991 Apr;435:41-63.

Lawson JJ, McIlwrath SL, Woodbury CJ, Davis BM, Koerber HR. (2008) - **TRPV1 unlike TRPV2 is restricted to a subset of mechanically insensitive cutaneous nociceptors responding to heat.** J Pain. 2008 Apr;9(4):298-308. Epub 2008 Jan 28.

Liu CN, Wall PD, Ben-Dor E, Michaelis M, Amir R, Devor M (2000) **Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury.** Pain. 2000 Apr;85(3):503-21

Lumpkin EA, Caterina MJ. (2007) - **Mechanisms of sensory transduction in the skin.** Nature. 2007 Feb 22;445(7130):858-65.

McLachlan EM & Jänig W (1983) - **The cell bodies of origin of sympathetic and sensory axons in some skin and muscle nerves of the cat hindlimb.** Journal of Comparative Neurology 214,115-130.

McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D (2002) - **Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation.** Nature. 2002 Mar 7;416(6876):52-8. Epub 2002 Feb 10.

Meyer RA, Ringkamp M, Campbell JN, Raja SN (2006) **Peripheral mechanisms of cutaneous nociception.** In: McMahon SB, Koltzenburg M (Herausgeb) Wall and Melzack's Textbook of Pain, 5. Ausgabe. Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh, pp 3-34.

Michael GJ, Priestley JV (1999) **Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy.** J Neurosci. 1999 Mar 1;19(5):1844-54.

Michaelis M, Göder R, Häbler HJ, Jänig W (1994) **Properties of afferent nerve fibres supplying the saphenous vein in the cat.** J Physiol. 1994 Jan 15;474(2):233-43.

Michaelis M, Blenk KH, Jänig W, Vogel C (1995) **Development of spontaneous activity and mechanosensitivity in axotomized afferent nerve fibers during the first hours after nerve transection in rats.** J Neurophysiol. 1995 Sep;74(3):1020-7.

Nelson EK (1919) **The Constitution of Capsaicin, the pungent principle of Capsaicin.** J. Am. Chem. Soc., 1919, 41 (7), pp 1115–1121

Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) - **An Introduction to TRP Channels.** Annu Rev Physiol. 2006;68:619-47.

Sauer SK, Bove GM, Averbeck B & Reeh PW (1999) **Rat peripheral nerve components release calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 in response to noxious stimuli: evidence that nervi nervorum are nociceptors.** Neuroscience, 92, 319–325.

Sauer SK, Reeh PW & Bove GM (2001) **Noxious heat-induced CGRP release from rat sciatic nerve axons in vitro.** Eur. J. Neurosci., 14, 1203–1208.

Schaible HG. (2010) **The role of TNF-alpha as pain mediator.** Z Rheumatol. 2010 May;69(3):237-9.

Schaible HG in Schmidt, Lang und Heckmann (Herausgeb.) (2010), **Physiologie des Menschen**, Auflage 31, Springer-Medizin Verlag, Heidelberg

Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson DA, Hwang SW, McIntyre P, Jegla T, Bevan S, Patapoutian A (2003) - **ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures.** Cell. 2003 Mar 21;112(6):819-29.

Sunderland (1978) **Chapter: Regeneration of the axon and associated changes.** In: Nerves and Nerve Injuries. Churchill Livingstone, Edinburgh, London & New York, pp108-132.

Szolcsanyi J (1977) - **A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain.** J Physiol 73: 251–259, 1977.

Teliban A, Bartsch F, Struck M, Baron R, Jänig W. (2011) **Axonal thermosensitivity and mechanosensitivity of cutaneous afferent neurons.** Eur J Neurosci. 2011 Jan;33(1):110-8. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07471.x. Epub 2010 Nov 3.

Turgut C, Newby BM, Cutright TJ. (2004) **Determination of optimal water solubility of capsaicin for its usage as a non-toxic antifoulant.** Environ Sci Pollut Res Int. 2004;11(1):7-10.

Wallace M, Pappagallo M. (2011) - **Qutenza®: a capsaicin 8% patch for the management of postherpetic neuralgia.** Expert Rev Neurother. 2011 Jan;11(1):15-27.

Waxman S L, Kocsis J, Stys P K (1995) **Chapter 21: Pathology of demyelinated and dysmyelinated axons.** In: The axon. Oxford University Press, New York, pp391-411

Weitere Quellen:

Sigma® Produktinformation Capsaicin

## **VI.2 Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

Name Fabian Bartsch  
Geburtsdatum- und ort 28.09.1984 in Bremerhaven  
Staatsangehörigkeit deutsch

### **Beruflicher Werdegang**

2011 Ab dem 01.05.2011 angestellt als Assistenzarzt in der Allgemein- und Abdominalchirurgie (Direktor Prof. Dr. med. H. Lang) an der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
2006/2007 Dezember bis Januar: Hilfwissenschaftler im Präparierkurs des Anatomischen Instituts der Universität Kiel

### **Studium**

2010 Im Oktober erfolgreiche Teilnahme am 2. Staatsexamen mit Erteilung der Approbation am 27.10.2010  
2009/2010 Im August 2009 Beginn des praktischen Jahres mit dem Wahlfach Radiologie, im Dezember Wechsel in die Chirurgie (beides am Universitätsklinikum Kiel)  
Im April 2010 Wechsel in die Innere Medizin am Westküstenklinikum Heide  
2007 Im April Beginn einer experimentellen Doktorarbeit am Physiologischen Institut der Universität Kiel im Bereich der Neurophysiologie in Zusammenarbeit mit dem Institut für Schmerzforschung und –therapie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
2006 Im Sommer 2006 erfolgreiche Teilnahme am 1. Staatsexamen  
2004 Zum Wintersemester 04/05 Beginn des Studiums der Medizin an der Christian Albrechts-Universität zu Kiel

### **Schulische Ausbildung**

1997-2004 Kreisgymnasium Wesermünde (Bremerhaven)  
Abitur 2004 (Note 1,5): Biologie (Leistungskurs), Chemie (Leistungskurs), Geschichte (drittes Prüfungsfach) und Deutsch (viertes Prüfungsfach)  
Das Abiturzeugnis schließt das große Latein ein  
1995-1997 Orientierungsstufe Schule Schiffdorf  
1991-1995 Grundschule Schiffdorf

### VI.3 Veröffentlichungen

#### **Axonal thermosensitivity and mechanosensitivity of cutaneous afferent neurons.**

Teliban A, **Bartsch F**, Baron R, Struck M, Jänig W

Eur J Neurosci. 2011 Jan;33(1):110-8. doi: 10.1111/j.1460-9568.2010.07471.x. Epub 2010 Nov 3.

#### **Effect of local and intravenous lidocaine on ongoing activity in injured afferent nerve fibers.**

Kirillova I., Teliban A., Gorodetskaya N., Grossmann L., **Bartsch F**, Rausch V, Struck M, Tode J, Baron R, Jänig W

Pain. 2011 Jul;152(7):1562-71. Epub 2011 Apr 6.

Poster - 3rd International Congress on Neuropathic Pain, Athen 2010

#### **Thermo- and mechanosensitivity of cutaneous afferent axons.**

Teliban A, **Bartsch F**, Struck M, Baron R, Jänig W

Poster - 3rd International Congress on Neuropathic Pain, Athen 2010

#### **Excitability of unmyelinated afferent nerve fibers by physiological stimuli along the sural nerve.**

Struck M, Teliban A, **Bartsch F**, Baron R, Jänig W

Postervortrag - 56. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft e.V.

#### **2012 Praeoperative Inoperabilitätsabschätzung bei Klatskin-Tumoren – wie hoch ist die Sensitivität?**

C.P. Kaudel, **F. Bartsch**, P. Gaßmann, S. Heinrich, J. Mittler, J. Baumgart, H. Lang

Postervortrag - 56. Jahreskongress der Saarländisch-Pfälzischen Internistengesellschaft e.V.

#### **2012 Ist die praeoperative 3 dimensionale Nachbearbeitung von Staging-CT Bildern bei Patienten mit ausgedehnten Lebertumoren sinnvoll?**

C.P. Kaudel, **F. Bartsch**, P. Gaßmann, S. Heinrich, J. Mittler, J. Baumgart, H. Lang

#### **VI.4 Danksagung**

Bei einer experimentellen Arbeit dieses Ausmaßes gilt es vielen Menschen zu danken, die mich auf dem Weg zur Fertigstellung begleitet und unterstützt haben.

Zunächst möchte ich Herr Prof. Dr. med. Wilfrid Jänig für die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten herzlich danken. Sie haben mich gelehrt wissenschaftlich zu denken, wissenschaftlich zu arbeiten und für Ihre Unterstützung, Ihre Ratschläge und das kritische Lesen dieser Arbeit bin ich Ihnen sehr dankbar.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Alina Teliban und Marek Struck, welche viel Zeit mit mir im Labor bei der experimentellen Arbeit und auch den Analysen verbracht haben und ohne deren Mithilfe diese Arbeit nicht zu Stande gekommen wäre.

Ein besonderer Dank für Ihre stetige Unterstützung gilt meinen Freunden und Kollegen Tim Optenhöfel und Vanessa Rausch, welche mir oft mit Rat zur Seite standen und dank Ihrer Hilfe maßgeblich an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren.

Danken möchte ich auch Prof. Dr. med. Ralf Baron, welcher unsere gesamte Arbeitsgruppe finanziell unterstützt und diese experimentelle Arbeit erst möglich gemacht hat.

Zuletzt danke ich meiner Mutter und meinem Bruder, welche mir in meinem Leben stets eine große Hilfe waren und mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Besonders danken möchte ich meinem Vater, welcher viel zu früh von uns ging, aber immer mein größtes Vorbild war und sein wird.

## **VI.5 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation, abgesehen von der Beratung durch meinen wissenschaftlichen Lehrer und der Verwendung der angegebenen Hilfsmittel, nach Inhalt und Form meine eigene ist. Sie hat weder ganz noch teilweise an einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Die Arbeit ist unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis entstanden und die Tierversuche wurden vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt und unter Einhaltung der Tierschutz-Bestimmungen durchgeführt.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift