

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

**THERMO- UND MECHANOSENSIBILITÄT
AFFERENTER UND EFFERENTER AXONE DES
N. SURALIS DER RATTE**

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

vorgelegt von
MAREK STRUCK
aus Kiel

Kiel 2012

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

**THERMO- UND MECHANOSENSIBILITÄT
AFFERENTER UND EFFERENTER AXONE DES
N. SURALIS DER RATTE**

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

vorgelegt von
MAREK STRUCK
aus Kiel

Kiel 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wilfrid Jänig

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Wasner

Tag der mündlichen Prüfung: 06.11.2013

Diese Arbeit sei meinen lieben Eltern und all denjenigen
gewidmet, die mich durch ihre Liebe und Kraft unterstützt
haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methoden	8
2.1. Quetschläsion	8
2.2. Operative Vorbereitung des Tieres am Versuchstag	9
2.3. Versuchsablauf	10
2.4. Elektrophysiologische Datenerhebung	11
2.5. Elektrische Identifikation der Nervenfasern	12
2.6. Testung der Mechanosensibilität	14
2.7. Testung der Thermosensibilität	15
2.8. Postexperimentelle Datenanalyse	17
3. Ergebnisse	19
3.1. Leitungsgeschwindigkeiten von A- und C-Fasern	21
3.2. Charakterisierung afferenter Nervenfasern	24
3.2.1. Axonale Hitzesensibilität – Akut-Kohorte	24
3.2.2. Axonale Hitzesensibilität – Chronisch-Kohorte	25
3.2.3. Axonale Kältesensibilität – Akut-Kohorte	31
3.2.4. Axonale Kältesensibilität – Chronisch-Kohorte	31
3.2.5. Axonale Kältesensibilität – Typ-1- und Typ-2-kaltsensible Afferenzen	36
3.2.6. Mechanosensibilität	37
3.3. Vergleich der funktionellen Eigenschaften von A- und C-Fasern nach akuter oder chronischer Nervenläsion	38
3.4. Postganglionäre Vasokonstriktorneurone	39
3.4.1. Spontanaktivität	39
3.4.2. Kardiale Rhythmik	40
3.4.3. Barorezeptorreflexe	41
3.4.4. Reflexantworten auf noxische Reize	43

4. Diskussion	46
4.1. Zusammensetzung des N. suralis – Anteil der axonal erregbaren Fasern an den elektrisch identifizierten Fasern.....	46
4.2. Axonale Thermosensibilität - Allgemeines.....	50
4.2.1. Axonale Hitzesensibilität.....	51
4.2.2. Axonale Kaltsensibilität.....	53
4.3. Axonale Mechanosensibilität.....	54
4.4. Postganglionäre Vasokonstriktorneurone - Spontanaktivität.....	55
4.5. Postganglionäre Vasokonstriktorneurone –Reflexantworten auf noxische Reize.....	57
5. Zusammenfassung	59
6. Literaturverzeichnis	61
7. Wissenschaftliche Beiträge	69
8. Danksagungen	70

1. Einleitung

"Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit einer tatsächlichen oder potentiellen Gewebeschädigung einhergeht beziehungsweise mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird." So lautet die Definition für Schmerz, die die *International Association for the Study of Pain* (IASP) 1979 formuliert hat.

Schmerz ist seit jeher das Hauptmotiv für den Arztbesuch und hat in Folge einer potentiellen oder tatsächlichen Gewebeschädigung eine warnende Funktion. Tritt er ohne einen adäquaten noxischen Reiz auf, persistiert und chronifiziert, wird der Schmerz selbst zur Krankheit.

Unter normalen Umständen werden noxische Ereignisse von unmyelinisierten (C-Fasern) oder dünn myelinisierten (A δ -Fasern) Nervenfasern an höhere Zentren des Gehirns vermittelt. Eine besondere Form des Schmerzes ist der neuropathische Schmerz, der auf eine direkte Schädigung des peripheren oder zentralen Nervensystems zurückzuführen ist. Ursache kann eine virale Infektion (wie beim Zoster ophthalmicus), eine Polyneuropathie, eine Querschnittslähmung oder eine periphere Nervenläsion sein. Nach der Läsion eines peripheren Nervs treten Symptome auf, die sich durch die beteiligten anatomischen Strukturen und pathophysiologischen Vorgänge erklären lassen. Im Folgenden werden zunächst die relevanten anatomischen Strukturen anhand des N. suralis der Ratte beschrieben, da dieser für die vorliegende Arbeit untersucht wurde. Im Anschluss werden pathophysiologische Vorgänge, die nach einer Nervenläsion stattfinden beschrieben.

Der N. suralis der Ratte enthält 1500 unmyelinisierte sympathische, 1100 myelinisierte afferente und 2800 unmyelinisierte afferente Axone (Schmalbruch 1986). Weiterhin sind auch ca. 80 myelinisierte efferente Axone beschrieben, auf die im Folgenden nicht eingegangen werden soll, da sie für diese Arbeit keine Rolle spielen (Peyronnard & Charron 1982). In der Arbeit von Baron et al. (1988) werden demgegenüber 590 sympathische und 3610 afferente Axone geschätzt.

Bei dem überwiegenden Teil der unmyelinisierten sympathischen (postganglionären) Axone handelt es sich um Axone von Vasokonstriktorneuronen. Diese Neurone zeigen eine spontane, rhythmische Aktivität (kardio- oder respirationsabhängige Rhythmik, Gregor et al. 1977; Jänig 1988; Häbler et al. 1993; Häbler et al. 1994;

Johnson & Gilbey 1996; Häbler et al. 1999). Weiterhin zeichnen sie sich durch Reflexmuster aus, bei der die spontane Aktivität inhibiert wird. Diese Inhibition kann durch noxische Reizung der Haut ausgelöst werden und führt zu einer ipsilateralen Vasodilatation (Lovén 1866; Jänig 1985). Auch durch die Erhöhung des intraarteriellen Druckes wird die Spontanaktivität über die arteriellen Barorezeptorreflexe gehemmt (Blumberg et al. 1980). Dieses Phänomen ist bei kutanen Vasokonstriktorneuronen allerdings deutlich geringer ausgeprägt (und bei manchen kutanen Vasokonstriktorneuronen nicht vorhanden) als bei muskulären Vasokonstriktorneuronen (Häbler et al. 1993; Häbler et al. 1994). Durch Stimulation von arteriellen Chemorezeptoren (z.B. durch Injektion von CO₂ gesättigter Kochsalzlösung in die A. carotis in die Nähe des Glomus caroticum oder durch Hypoventilation) zeigen die meisten kutanen postganglionären Neurone ebenfalls eine Hemmung der spontanen Aktivität. Neurone, die eine solche Reflexantwort ausprägen, innervieren vermutlich arterielle Blutgefäße, die für die Thermoregulation wichtig sind, und Kapazitätsgefäße. Die meisten muskulären und eine kleine Fraktion der kutanen postganglionären Neurone werden im Gegensatz dazu durch eine Hyperkapnie erregt. Diese innervieren vermutlich Widerstandsgefäße (Blumberg et al. 1980).

Der Großteil der myelinisierten Afferenzen ist mechanosensibel für Druck und Berührung. Diese lassen sich in stark myelinisierte (A β -) und dünn myelinisierte (A δ -) Fasern gliedern. Bei den stark myelinisierten Fasern handelt es sich um schnell adaptierende (assoziiert mit Haarfollikeln, Meissner- oder Pacini-Körperchen) oder langsam adaptierende (assoziiert mit Merkel-Zellen oder Ruffini-Körperchen) mechanosensible Nervenfasern mit niedriger Reizschwelle. Die dünn myelinisierten Fasern setzen sich einerseits aus hochschwelligem mechanosensiblen (nozizeptiven) Fasern und niederschwellige Afferenzen, die D-Haare innervieren, zusammen (Koltzenburg et al. 1997; Treede 2010).

Die unmyelinisierten afferenten Axone (C-Fasern) lassen sich in drei funktionelle Gruppen aufteilen (Gorodetskaya et al. 2009; Grossmann et al. 2009a; Grossmann et al. 2009b; Jänig, W. et al. 2009):

(1) Kaltsensible Afferenzen, die sich wie nicht-nozizeptive Neurone verhalten (Typ-1-kaltsensible Neurone)

Diese Neurone zeigen eine niedrige Reizschwelle auf Kältereize und sind selten zusätzlich hitzesensibel. Als Transduktionsmolekül der Typ-1 kaltsensiblen C- und A δ -Fasern gilt dabei der Menthol-/Icillin-sensitive TRPM8-Rezeptor (McKemy et al. 2002; Story et al. 2003; Bandell et al. 2004; Madrid et al. 2006; Bautista et al. 2007). Kürzlich wurde gezeigt, dass Typ-1-kaltsensible afferente Nervenfasern durch Menthol spezifisch erregt werden können (Teliban et al. 2012 eingereicht). Typ-1-kaltsensible afferente Neurone werden durch Erwärmung gehemmt, sehr wenige werden durch Erhitzung erregt. Sie sind nicht mechanosensibel.

(2) Kaltsensible Neurone, die sich wie nozizeptive Neurone verhalten (Typ-2- kaltsensible Neurone)

Neurone dieser Art haben eine hohe Reizschwelle auf Kaltreizung und sind zusätzlich meist hitzesensibel und/oder mechanosensibel. Diese Subpopulation von C-Fasern (polymodale nozizeptive C-Fasern) ist möglicherweise an der Wahrnehmung von noxischen Kaltreizen beteiligt (Campero et al. 1996; Gorodetskaya et al. 2003). Das Transduktionsmolekül, das für diese Sensibilität diskutiert wird, ist der TRPA1-Rezeptor. Dieser Rezeptor lässt sich durch die Agonisten Zimtaldehyd oder Senf-Öl aktivieren (Story et al. 2003; Bandell et al. 2004; Jordt et al. 2004; Karashima et al. 2009). Niedrige Dosen von Menthol sollen den TRPA1-Kanal ebenfalls aktivieren, während er durch hohe Dosen Menthol blockiert wird (Karashima et al. 2007). Viele kaltsensible Neurone exprimieren allerdings weder TRPM8 noch TRPA1 (Munns et al. 2007), sodass zu vermuten ist, dass es noch weitere Rezeptoren geben muss, die an der Transduktion von Kälte beteiligt sind. Die meisten Typ-2-kaltsensiblen Afferenzen können auch durch noxische Hitzereizung und durch noxische mechanische Reize erregt werden.

(3) Nicht-kaltsensible Neurone, die auf Hitze und/oder mechanische Reize reagieren

Die meisten Vertreter dieser Art sind polymodal und können in weitere Untergruppen eingeteilt werden. Sie reagieren selektiv auf Hitze, auf Hitze- und mechanische Reize oder nur auf mechanische Reize (Kress et al. 1992; Leem et al. 1993). Die Hitzesensibilität ist vermutlich auf den Capsaicin-sensitiven TRPV1-Rezeptor zurückzuführen (Caterina et al. 1997; Caterina 2007). Dieser Rezeptor ist an einen

unselektiven Kationenkanal gekoppelt, der auf die neuronale Plasmamembran bei einer Temperatur von über 42°C depolarisierend wirkt. Der TRPV1-Kanal wurde sowohl im Axoplasma, in Transportvesikeln, als auch in der Plasmamembran von unmyelinisierten C-Fasern nachgewiesen (Bernardini et al. 2004). Auch TRPV3 und TRPV4 scheinen dabei eine Rolle zu spielen, wobei ihr tatsächlicher Beitrag zur Hitzesensibilität eher gering eingeschätzt wird (Huang et al. 2011). Darüber hinaus wird der Beitrag von TRPV2 zur Hitzeperzeption diskutiert (Lawson et al. 2008).

Wird ein peripherer Nerv geschädigt, kommt es zunächst zu degenerativen Veränderungen (Wallerische-Degeneration). 30-60% der kutanen unmyelinisierten afferenten Nervenfasern sterben ab. Von dieser Degeneration sind auch die sympathischen postganglionären Neurone betroffen. Wird demgegenüber ein Muskelnerv geschädigt, ändert sich die Zahl der afferenten Neurone mit unmyelinisierten Axonen nicht (Jänig & McLachlan 1984; Vestergaard et al. 1997; Hu, P. & McLachlan 2003).

Ein weiteres Phänomen, das nach Nervenläsionen (Durchtrennung, Quetschung, Ligatur) auftritt, ist die sog. ektope Aktivität. Darunter versteht man zwei verschiedene Sachverhalte. Einerseits handelt es sich dabei um die Erregbarkeit eines afferenten Neurons durch physiologische Stimuli an einem Ort, der nicht seinen physiologischen rezeptiven Enden entspricht (Koschorke et al. 1991; Gorodetskaya et al. 2003; Gorodetskaya et al. 2009); andererseits können primär afferente Neurone nach Läsion ektope spontane Aktivität entwickeln (Michaelis et al. 1995; Blenk et al. 1996; Michaelis et al. 1997; Michaelis et al. 1998; Rivera et al. 2000; Gorodetskaya et al. 2003). Art und Muster der ektopen Aktivität hängen dabei vom Typ der geschädigten Nervenfasern ab (Blumberg & Janig 1984) und sie tritt bereits innerhalb von 24 Stunden nach einer Nervenläsion auf (Blenk et al. 1996). Nach Durchtrennung oder Ligatur lassen sich viele afferente Nervenfasern durch mechanische und/oder thermische Stimulation am Läsionsort erregen (Blumberg & Janig 1984; Michaelis et al. 1995; Blenk et al. 1996; Michaelis et al. 1999). Diese ektope Erregbarkeit findet sich sowohl nach der Quetschung des Nervs als auch nach manueller Readaptation mit Nervennaht distal der Läsionsstelle, wenn die unterbrochenen Axone wieder aussprossen (Gorodetskaya et al. 2003; Gorodetskaya et al. 2009; Grossmann et al. 2009a; Grossmann et al. 2009b; Jänig, W. et al. 2009).

Nach Nervenverletzungen werden unter dem Einfluss entzündungsrelevanter Zytokine (Tumornekrosefaktor [TNF]- α , Interleukin [IL]-1, [IL]-6) (Watkins & Maier 2002) vermehrt inflammatorische Mediatoren wie Prostaglandin E₂ (PGE₂), Bradykinin, Serotonin und Histamin im perineuralen Gewebe gefunden (Richardson & Vasko 2002). Diese können spontane ektope Aktivität hervorrufen oder verstärken (Eliav et al. 2001; Dilley & Bove 2008b; Grossmann et al. 2009b), wobei der Unterbrechung des axonalen Transportes eine entscheidende Rolle zugewiesen wird (Devor & Govrin-Lippmann 1983; Amano et al. 2001; Armstrong et al. 2004). So entwickeln nach Applikation von Kolchizin oder Vinblastin etwa $\frac{1}{3}$ der intakten nozizeptiven C-Fasern axonale mechanische Sensibilität (Dilley & Bove 2008a). Nach der Verletzung eines Nervs werden vermehrt Transduktionsmoleküle, Ionenkanäle und Rezeptoren für inflammatorische Mediatoren in die neuronale Plasmamembran eingebaut, was zu einer Induktion und zur Unterhaltung von neuropathischem Schmerz führen kann. So nehmen z. B. die TNF- α -Konzentration und die Dichte von TNF- α -Rezeptoren nach Verletzung peripherer Nerven im Spinalganglion zu (Schafers et al. 2003; Ohtori et al. 2004). Außerdem werden die hitze- bzw. kaltsensiblen ionenkanalgekoppelten Rezeptoren TRPV1 (Hudson et al. 2001; Hong & Wiley 2005) und TRPA1 (Obata et al. 2005) nach Läsion vermehrt gebildet. Dies kann die periphere Grundlage für die Entwicklung von Kälte- bzw. Hitzehyperalgesie bei Patienten mit neuropathischen Schmerzsyndromen darstellen. Es ändert sich auch das Expressionsmuster von spannungsabhängigen Natriumkanälen. Es kommt zu einer Herabregulierung der Na_v1.8 und Na_v1.9 Kanäle und einer verstärkten Transkription des Na_v1.3 Kanals (Waxman et al. 1994; Dib-Hajj et al. 1996; Hains et al. 2003). Dieser Kanal scheint dabei eine Schlüsselrolle bei der Entstehung spontaner ektoper Aktivität zu spielen (Hains et al. 2003; Wood et al. 2004). Anhäufungen dieser Natriumkanäle können die Schwelle zur Bildung von Aktionspotentialen erniedrigen und so zur Entstehung spontaner ektoper Aktivität beitragen (Omana-Zapata et al. 1997). Der Ursprung dieser Aktivität kann dabei am Läsionsort selbst sein (Jänig, W. 1988; Devor & Seltzer 1999), ein Ursprung proximal des Läsionsortes im Verlauf von kutanen Afferenzen wird ebenfalls diskutiert. Bei afferenten Neuronen, die die Skelettmuskulatur innervieren, kann ektope Aktivität ihren Ursprung auch im zugehörigen Spinalganglion haben (Michaelis et al. 2000).

Ein Phänomen, das man von der ektopen Erregbarkeit abgrenzen muss, ist die axonale Erregbarkeit. Darunter versteht man die Erregbarkeit von afferenten Axonen entlang ihres Verlaufs, d. h. nicht an den rezeptiven Enden in der Haut oder den aussprossenden axonalen Enden unter regenerativen Bedingungen (Hoffmann et al. 2008; Teliban et al. 2011). Hoffmann et al. (2008) haben an einem Nerv-Haut-Präparat der Maus *in vitro* gezeigt, dass etwa $\frac{2}{3}$ der hitzesensiblen C-Fasern, die durch Hitzestimuli an der Haut, auch entlang ihrer Axone durch die gleichen Stimuli erregbar sind. Eine axonale Kälte- oder Mechanosensibilität trat dabei wesentlich weniger auf (Hoffmann et al. 2008). Grundlage für die vorliegende Arbeit sind die Befunde von Teliban et al. (2011). Hier wurde im Gegensatz zu den Ergebnissen von Hoffmann et al. (2008) für die Ratte *in vivo* gezeigt, dass periphere afferente Axone sowohl kalt- als auch hitzesensibel sein können. Dabei sind nahezu alle nichtnozizeptiven (Typ-1-) kaltsensiblen Neurone sowohl von der Haut als auch durch direkte Stimulation des Nervs (das heißt des Axons) erregbar (96%). Für die nozizeptiven (Typ-2-) kaltsensiblen und/oder hitzesensiblen Neurone gelten jeweils ähnliche Verhältnisse (40 bzw. 35%). Die Mechanosensibilität scheint im Gegensatz dazu übereinstimmend mit den Ergebnissen von Hoffmann et al. (2008) auf die rezeptiven Enden in der Haut beschränkt zu sein. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Transduktionsmoleküle für Kälte und Hitze (Rezeptoren der TRP-Familie) nicht nur in die Plasmamembran der rezeptiven Nervenendigungen in der Haut, sondern auch entlang ihres axonalen Verlaufs in die Plasmamembran eingebaut sind.

Die vorliegende Arbeit beschreibt quantitativ die axonale Erregbarkeit kutaner myelinisierter und unmyelinisierter Afferenzen und unmyelinisierter sympathischer Nervenfasern durch thermische und mechanische Stimuli. Die Experimente wurden an chronisch geschädigten (7-10 Tage nach Quetschläsion, chronisch-Kohorte) und an akut läsionierten (0-10 Stunden vor dem Experiment, akut-Kohorte) Axonen des N. suralis der Ratte durchgeführt.

Die Fragen, die sich aufgrund der experimentellen Untersuchungen von Teliban et al. (2011) stellen und deren Beantwortung Ziel der vorliegenden experimentellen Arbeit ist, lauten:

- (1) Gibt es quantitative Unterschiede in der axonalen Erregbarkeit auf mechanische und thermische Reize zwischen chronisch geschädigten und intakten Nervenfasern?
- (2) Lassen sich Typ-1- und Typ-2-kaltsensible Afferenzen anhand ihrer Reiz-Antwort-Kurven und Reizschwellen unterscheiden (Grossmann et al. 2009b)?
- (3) Können postganglionäre Axone durch Hitze- oder Kältereize erregt werden (Smith et al. 2004; Munns et al. 2007)?
- (4) Postganglionäre Neurone weisen Spontanaktivität auf, die sich durch noxische Reizung der Haut reflektorisch hemmen lässt (Lovén 1866; Habler et al. 1994). Können die gleichen Reflexantworten durch noxische Hitze- und Kältereizung der Axone im Nerven ausgelöst werden?
- (5) Entwickeln afferente Neurone nach chronischer Läsion Spontanaktivität, die ihren Ursprung proximal der Läsion in den aussprossenden Axonen oder dem Spinalganglion hat (Michaelis et al. 2000)?

2. Material und Methoden

Die Versuche wurden an 26 männlichen Wistar-Ratten zwischen 300 g und 420 g (im Mittel 370 g) durchgeführt. Es wurden zwei Versuchsgruppen gebildet, um die axonale Erregbarkeit einerseits unter regenerativen und andererseits unter akut geschädigten Bedingungen zu untersuchen. Bei der ersten Versuchsgruppe (N = 11 Ratten) wurden die Daten 1-10 Stunden nach einer Quetschläsion des N. suralis erhoben („akut-Kohorte“). Bei der zweiten Versuchsgruppe (N = 15 Ratten) wurde die Quetschläsion 7-10 Tage vor dem Experiment durchgeführt („chronisch-Kohorte“, siehe Abschnitt 2.1.).

Am Versuchstag folgte dann die operative Vorbereitung des Tieres (siehe Abschnitt 2.2.), die die Grundvoraussetzung zu seiner stabilen Überwachung und Anästhesie darstellte. Anschließend wurden afferente und efferente A- und C-Fasern des N. suralis mit elektrophysiologischen Methoden untersucht. Hierbei wurden Leitungsgeschwindigkeit, Spontanaktivität und funktionelle Eigenschaften der Fasern gemessen (siehe Abschnitt 2.3.). Am Ende eines jeden Versuchs wurde das Tier durch die Injektion von gesättigter KCl-Lösung getötet.

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

2.1. Quetschläsion

Vor der Durchführung der Quetschläsion wurden die Tiere intraperitoneal mit Pentobarbital (Narcoren®, Merial, Hallbergmoos, Deutschland) in einer Dosierung von 60 mg/kg Körpergewicht anästhesiert. Zur Kontrolle einer ausreichenden Narkosetiefe wurde die Abwesenheit von Flexoren- und Kornealreflexen überprüft. Im Anschluss wurde der N. suralis unter aseptischen Bedingungen ca. 1 cm proximal des Knöchels unter visueller Kontrolle präpariert. Dazu wurde die ischiocrurale Muskulatur gespalten, der N. suralis dargestellt und mit einer feinen Uhrmacherpinzette (mit stumpfer Spitze) dreimal für die Dauer von 10 s gequetscht. Nach der Quetschung war der Nerv an der gequetschten Stelle transparent, während das Epineurium intakt erschien. Danach wurde die Läsionsstelle mit einem nicht-

resorbierbaren Faden auf dem M. gastrocnemius lateralis markiert. Diese Markierung diente dem problemlosen Auffinden der Läsionsstelle nach 7-10 Tagen während des elektrophysiologischen Experimentes. Die Operationswunde wurde anschließend schichtweise wieder verschlossen, die Hautnaht erfolgte intradermal. Bei den regelmäßig durchgeführten Kontrollen zeigten sich stets reizlose Wundverhältnisse. Es erfolgte immer eine sanatio per primam intentionem.

2.2. Operative Vorbereitung des Tieres am Versuchstag

Am Versuchstag wurden die Tiere wiederum mit Pentobarbital (Narcoren®, Merial, Hallbergmoos, Deutschland) in einer Dosierung von 60mg/kg Körpergewicht intraperitoneal betäubt. Um eine stetige Gabe von Medikamenten und Flüssigkeit intravenös zu gewährleisten, wurde zunächst ein Katheter in die V. jugularis interna eingebracht. Dazu wurde die Vene nach distal mit einem Seidenfaden abgebunden, anschließend eröffnet, ein Katheter eingeführt und mit Seidenfäden fixiert. Die Narkose wurde mit Pentobarbital (Narcoren®, Merial, Hallbergmoos, Deutschland) in einer Dosierung von 10-20 mg/kg/h intravenös aufrechterhalten.

Zur Kontrolle des arteriellen Blutdruckes mittels eines Druckwandlers (LM-22, List, Darmstadt, Deutschland) sowie zur regelmäßigen Überwachung der arteriellen Blutgase wurde ein Katheter in die Schwanzarterie der Ratte eingebracht. Die Implantation wurde nach demselben Schema wie bei dem venösen Katheter durchgeführt. Zur Überprüfung einer ausreichenden Ventilation wurden regelmäßig (1x/h) arterielle Blutgasanalysen durchgeführt. Dabei wurde Werte des arteriellen pO_2 von >70 mm Hg und ein pH-Wert von $7,4 \pm 0,05$ als ein guter Zustand des Tieres interpretiert. In den meisten Fällen war es möglich, den arteriellen Sauerstoffdruck bei ≥ 100 mm Hg zu halten.

Die artifizielle Ventilation des Tieres wurde über einen Beatmungstubus (Eigenanfertigung) gewährleistet. Dazu wurde eine Tracheotomie durchgeführt, der Tubus eingesetzt und fixiert. Bis zum Beginn der Datenerhebung atmeten die Tiere spontan. Vor der ersten Ableitung von Aktionspotentialen wurden die Tiere mit Pancuronium (N. V. Organon, Oss, Niederlande, Initial 1 mg/kg KG i.v., Erhaltungsdosis 0,4 mg/kg/h) relaxiert. Die artifizielle Beatmung erfolgte unter

positivem Druck (<10 cm H₂O) mit 70 Atemzügen/Minute und O₂ angereicherter Luft (etwa 40% Sauerstoff, Respirator: RUS-1301, FMI, Egelsbach). Die rektale Körpertemperatur des Tieres wurde kontinuierlich mittels eines elektronischen Thermometers überwacht und mit einer elektrischen Heizmatte bei 37 °C gehalten. Die Überwachung der Herzaktivität erfolgte über die Ableitung eines EKGs. Im Anschluss wurde die Haut über dem linken Bein dorsal in Längsrichtung gespalten. Der M. gluteus maximus und der M. triceps surae wurden dargestellt und ersterer teilweise reseziert. Unterhalb des Muskels wurde im Anschluss der N. ischiadicus mit seinen Ästen, dem N. tibialis, dem N. peroneus communis, dem N. suralis, dem N. gastrocnemius-soleus lateralis und medialis sichtbar. Die Haut wurde mit Einzelknopfnähten an einen metallenen Ring fixiert, um einen Pool zu formen. Der N. suralis wurde soweit wie möglich nach proximal vom N. ischiadicus separiert und vom umliegenden Bindegewebe befreit. Der Nerv wurde in seiner Kontinuität nicht unterbrochen. Bei der Präparation wurde sorgfältig darauf geachtet, dass die den Nerv versorgenden Gefäße erhalten blieben. Der Pool wurde dann mit 36 °C warmem Paraffinöl gefüllt, was dem Austrocknen des Gewebes entgegenwirkte und der elektrischen Isolierung diente. Der N. suralis wurde distal vom umliegenden Gewebe isoliert und anschließend auf eine feststehende Kunststoff-Plattform platziert. Über diesem Teil des Nervs wurde die Ableitelektrode aus Platin positioniert. Der auf der Plattform befindliche Teil des Nervs wurde mit einem feinen Rasiermessersplitter längs gespalten. Anschließend wurden mit feinen Uhrmacherpinzetten einzelne Nervenfaserbündel aus dem eröffneten Abschnitt des Nervs separiert und über die Ableitelektrode unipolar abgeleitet. Die Referenzelektrode wurde mit dem umliegenden Gewebe des Pools verbunden (siehe Abb. 2.2.).

2.3. Versuchsablauf

Die Versuchsdurchführung erfolgte stets nach einem festgelegten Protokoll. War ein Nervenfaserbündel erfolgreich auf der Ableitelektrode platziert worden, wurde zunächst darauf geachtet, ob einzelne Nervenfasern spontane Aktivität aufwiesen. War dies der Fall, wurde die Spontanaktivität zunächst für mindestens 3 min ohne jegliche Beeinflussung des Nervs durch thermische und mechanische Stimuli

aufgenommen. Im nächsten Schritt wurde der Nerv elektrisch stimuliert, um zu überprüfen, wie viele Nervenfasern sich in dem Bündel befanden (siehe Abschnitt 2.5.). Waren spontan aktive Nervenfasern im Bündel enthalten, wurde in einigen Fällen Noradrenalin (10 µg/kg Körpergewicht, in vier Experimenten) injiziert. Diese Injektion diente der Identifikation postganglionärer Vasokonstriktorneurone, die bei Erhöhung des arteriellen Blutdruckes eine reflektorische Hemmung der Spontanaktivität aufweisen (Adrian & Bronk 1932; Iggo & Vogt 1962; Blumberg et al. 1980). Im Anschluss wurde die axonale Mechano- und Thermosensibilität systematisch entlang des N. suralis getestet (siehe Abschnitt 2.7.).

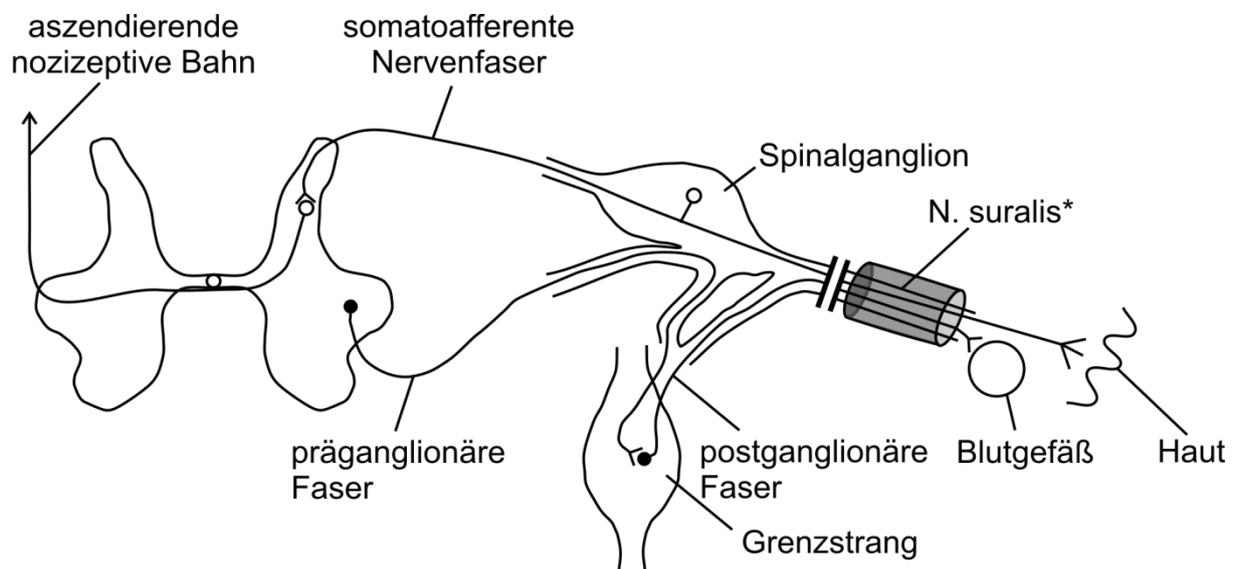


Abb. 2.1. Anatomische Grundlagen

Das Schema zeigt vereinfacht die anatomische Organisation der untersuchten Nervenfasern. Der N. suralis enthält afferente und sympathische Nervenfasern. Die Perikaryen der präganglionären Neurone liegen in den Seitenhörnern der Rückenmarkssegmente L1 – L3, die Zellkörper der meisten afferenten Neurone in den Spinalganglien L4 und L5 (wenige in L6). Der grau markierte Bereich des N. suralis ist in Abb. 2.2. vergrößert dargestellt.

2.4. Elektrophysiologische Datenerhebung

Die neuronale Aktivität wurde verstärkt (Eingangswiderstand des Verstärkers 10 MΩ, Vorverstärkung 100x, Nachverstärkung 100x) und über ein elektrisches Filtersystem (120 Hz-1,2 kHz für unmyelinisierte und 120 Hz – 12 kHz für myelinisierte Fasern) gefiltert, zusätzlich wurde ein sog. „Hum Bug“ (Digitimer Ltd., 37 Hydeway, Welwyn Garden City, Hertfordshire, England) zwischengeschaltet. Dabei handelt es sich um einen Eliminator von elektrischen Interferenzen einer Frequenz von 50 oder 60 Hz

und anhaltenden sinusförmigen Interferenzen. Die Signale wurden auf einem Speicheroszilloskop (Tektronix, Oregon, USA) visualisiert und zur akustischen Kontrolle auf Lautsprecher übertragen.

Sämtliche Daten (EKG, Beatmungsdruck/-frequenz, Blutdruck, Aktionspotentiale) wurden in Echtzeit über das Datenerfassungsgerät micro1401-3 (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) in einen Computer mit der Analyse-Software Spike II (Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) eingespeist. Das System erlaubt eine Darstellung der erhobenen Daten in Echtzeit und eine postexperimentelle Analyse der digitalisierten Aktionspotentiale mit einer zeitlichen Auflösung von 10 kHz (siehe Abschnitt 2.8.).

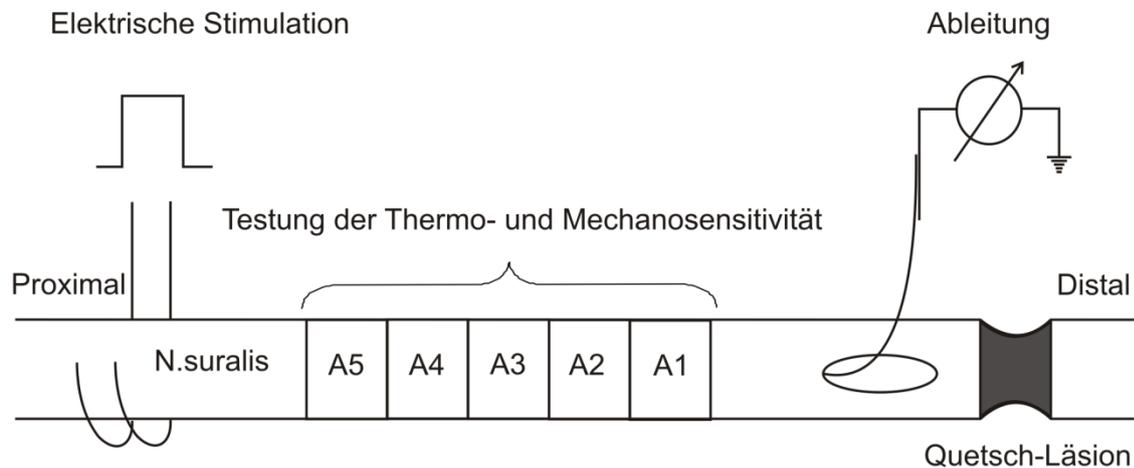


Abb. 2.2. Schematisierter Versuchsaufbau

„Proximal“ bezeichnet das Ende des N. suralis, das in Richtung des Spinalganglions weiterführt, „Distal“ das Ende, das in Richtung der Hinterpfote der Ratte führt. A1-A5 sind die Areale des Nerven, die zwischen der Ableit- und der Stimulationselektrode mit mechanischen und thermischen Reizen getestet wurden. Jedes Areal hatte eine Länge von 3 mm.

2.5. Elektrische Identifikation der Nervenfasern

Zur elektrischen Identifikation der aufgelegten Nervenfasern wurde der Nerv über die paarigen Platinelektroden proximal der Ableitelektrode elektrisch gereizt (siehe Abb. 2.2.). Es wurden Rechteckimpulse einer Dauer von 0,1 ms (für A-Fasern) und 0,5 ms (für C-Fasern) mit einer aufsteigenden Spannung bis 40 V angelegt. Als Differenzierungsmerkmal zwischen den Fasern wurde die Leitungsgeschwindigkeit herangezogen (>2 m/s für A-Fasern, <2 m/s für C-Fasern (Lawson, S. N. & Waddell 1991)). Bei Fasern, die nicht eindeutig durch die Leitungsgeschwindigkeit

identifizierbar waren, wurden zusätzlich die Höhe, Form und Länge des Aktionspotentials berücksichtigt (siehe Abb. 2.5.). Diese Methode weist eine Sicherheit von etwa 93 % auf (Blenk et al. 1996). C-Fasern weisen typischerweise ein triphasisches, A-Fasern ein biphasisches Aktionspotential auf (dies gilt in dieser Studie bedingt durch die elektronischen Filter über die die Aktionspotentiale registriert wurden, siehe dazu Abschnitt 2.4. und Abb. 2.3.). Typische Formen der Aktionspotentiale von A- und C-Fasern sind in Abb. 2.3. und 2.5. gezeigt. Gelegentlich wurde die Größe der elektrisch und der durch physiologische Stimuli evozierten Aktionspotentiale verglichen, um sie A- oder C-Fasern zuzuordnen. War das Aktionspotential einer Faser größer, als die Aktionspotentiale der C-Fasern, die durch elektrische Reizung im Faserbündel ausgelöst wurden, wurde die Nervenfaser als A-Faser klassifiziert. War das Aktionspotential einer Faser kleiner, als die der elektrisch evozierten A-Faser Aktionspotentiale, wurde die Faser als C-Faser klassifiziert.

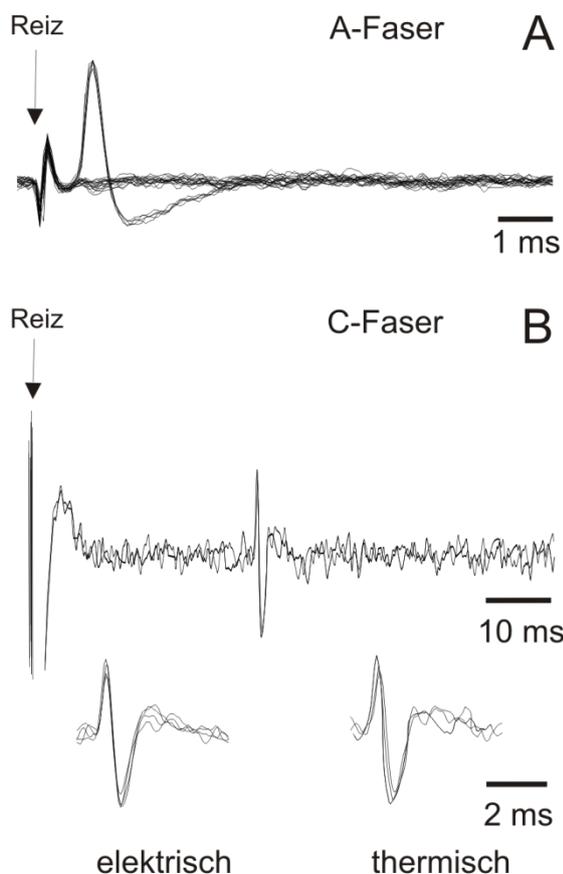


Abb. 2.3. Elektrische Identifikation von A- und C-Fasern aus Filamenten des N. suralis

A. Aktivierung einer afferenten A-Faser durch elektrische Reizung des N. ischiadicus. Das Reizartefakt ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Afferenz wurde unterschwellig und überschwellig gereizt.

B. Aktivierung einer afferenten C-Faser durch elektrische Reizung des N. ischiadicus. Der untere linke Teil der Abbildung zeigt das elektrisch evozierte Aktionspotential. Der rechte untere Teil der Abbildung zeigt Aktionspotentiale, die durch thermische Reizung des N. suralis evoziert wurden. Der Vergleich von Form und Amplitude der Aktionspotentiale zeigt, dass es sich um Ableitungen von derselben Afferenz handelt. Alle Aktionspotentiale sind mehrere Male überlagert.

Die Leitungsgeschwindigkeit lässt sich anschließend leicht aus der zeitlichen Differenz zwischen dem Reizartefakt und dem Aktionspotential einerseits und der Entfernung zwischen Ableit- und Stimulationselektrode andererseits errechnen.

Bei der Analyse der elektrisch identifizierten Nervenfasern und der Kalkulation ihrer Leitungsgeschwindigkeiten fiel auf, dass ein systematischer Fehler gemacht wurde. Die elektrische Reizschwelle einer Nervenfaser steht in Abhängigkeit von ihrer Leitungsgeschwindigkeit (siehe Abb. 2.4.). Erhöht man die Reizstärke (die Spannung) kommt es, bei ungenügender elektrischer Isolierung gegen das umliegende Gewebe (z. B. über Flüssigkeitsbrücken), zu einer Fernreizung des Nervens. Dabei werden Axone nicht an der Kathode der paarigen Reizelektrode depolarisiert, sondern an einer anderen Stelle des Nervens, deren Lokalisation nicht beeinflussbar ist. Die so ausgelösten Aktionspotentiale wurden fälschlicherweise für zusätzliche A- bzw. C-Fasern gehalten. Sie fallen durch eine hohe elektrische Reizschwelle und eine vergleichbar langsame Leitungsgeschwindigkeit auf. Auf diese Weise hat sich die Gruppe der langsam leitenden A-Fasern bzw. schnell leitenden C-Fasern artifiziell erhöht. In Abb. 2.4. sind die falsch identifizierten A- und C-Fasern hervorgehoben (Kreise um die Datenpunkte). Diese wurden bei allen folgenden Kalkulationen/Auswertungen eliminiert, so dass in allen weiteren Abbildungen/Ausführungen nur der bereinigte Datensatz verwendet wurde.

2.6. Testung der Mechanosensibilität

Die Mechanosensibilität wurde zunächst durch einen Glas-Stab mit stumpfer Spitze (Durchmesser etwa 1 mm) mittels sanftem Druck entlang des N. suralis getestet (siehe Abb. 2.2.). Wurde eine axonale mechanische Erregbarkeit in einem oder mehreren Arealen festgestellt, wurde dort die Reizschwelle mit geeichten von-Frey-Filamenten in einer aufsteigenden Stärke von 0.3-100 mN (Marstock nervtest, Fruhstorfer, Schriesheim, Germany) bestimmt (siehe Tab. 2.1.). Die Reize wurden unter visueller Kontrolle (durch ein Stereomikroskop) mit einer Frequenz von ca. 1 Hz für eine Dauer von 10-40 s appliziert.

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

Tab. 2.1. Umrechnungs- und Eich-tabelle der in dieser Studie verwendeten von Frey Filamente in [mN].

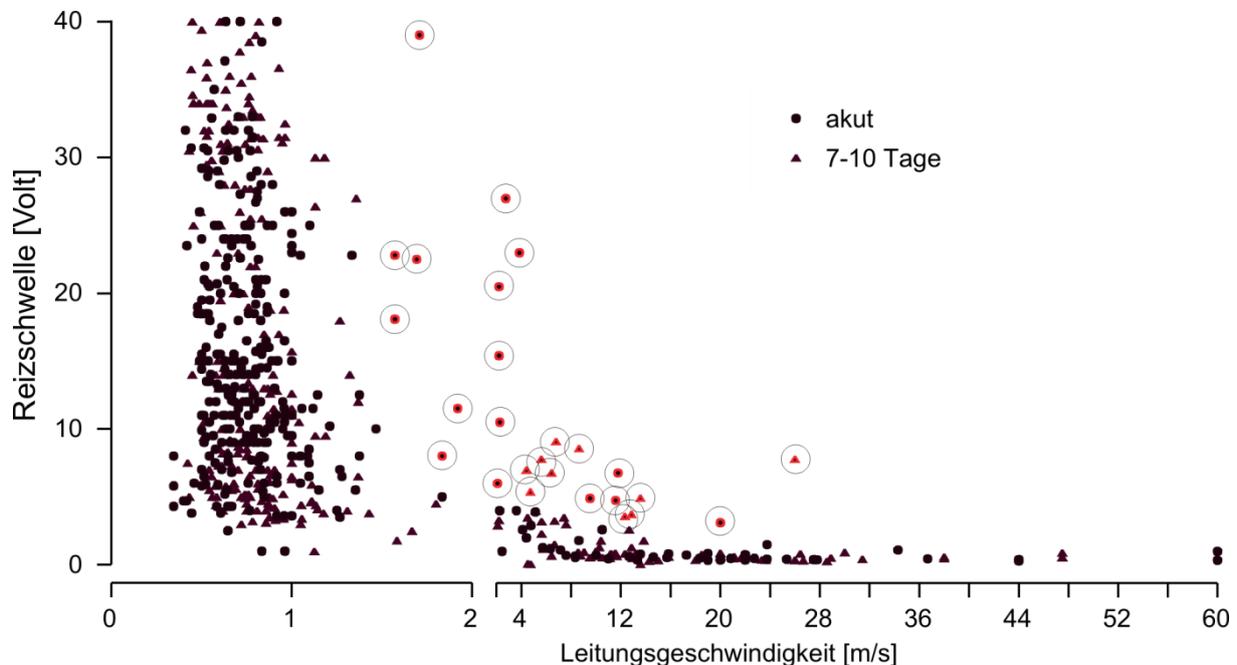


Abb. 2.4. Beziehung zwischen der elektrischen Reizschwelle und der Leitungsgeschwindigkeit von C- und A-Fasern.

Die Abszisse ist bei 2 m/s geteilt, vor und nach der Teilung liegt eine unterschiedliche Skalierung vor. Es zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit der elektrischen Reizschwelle von der Leitungsgeschwindigkeit. Bei den Datenpunkten, die mit einem Kreis versehen sind, handelt es sich um Aktionspotentiale, die durch Fernreizung ausgelöst wurden (siehe Abschnitt 2.5.). Sie fallen durch eine relativ hohe elektrische Reizschwelle im Verhältnis zur Leitungsgeschwindigkeit auf. Diese Artefakte (n=26) wurden in allen folgenden Auswertungen und Abbildungen eliminiert.

2.7. Testung der Thermosensibilität

Im nächsten Schritt wurden 5 °C- bzw. 50-55 °C-Reize mit Hilfe von Kupferstäben (Durchmesser der Spitze etwa 1 mm) auf fünf Areale entlang des N. suralis appliziert (siehe Abb. 2.2.). Waren Nervenfasern durch die thermische Stimulation des Nervs erregbar, wurden die fünf Areale mit einer wasserdurchströmten Thermode (Oberfläche 2 mm²) systematisch mit verschiedenen Temperaturen getestet (Gorodetskaya et al. 2003). Dabei wurden hitzesensible Fasern mit absteigenden Temperaturen von 55 °C bis 30 °C in 5 °C Schritten und kaltsensible Fasern mit aufsteigenden Temperaturen von 5 °C bis 30 °C in 5 °C Schritten gereizt. Die

Temperatur des Pools lag zwischen 28 °C und 30 °C. Als Toleranzbereich für die applizierten Temperaturen wurde ein Bereich von ± 2 °C gewählt. Die Applikationsdauer des thermischen Reizes lag bei 20-35 s. Diese Testung diente einerseits der Bestimmung der Reizschwelle, andererseits wurden aus den ermittelten Daten Reiz-Antwort-Kurven und Box-Whisker-Plots berechnet (siehe Abb. 2.6., Abb. 3.4. C, Abb. 3.7., Abb. 3.8. C, Abb. 3.11., Abb. 3.12.). Die Testung der Erregbarkeit und Diskriminierung der Reizschwelle wurde für jedes der 5 Areale wiederholt, sodass mindestens 10 (bei sehr hohen Reizschwellen) und höchstens 55 Stimuli (bei sehr niedrigen Reizschwellen) für eine Nervenfasern appliziert wurden. Bei dem weiteren Vorgehen wurde für die verschiedenen Fasern jeweils nach bestimmten Mustern vorgegangen:

(1) *Spontan aktive (postganglionäre) Neurone:*

Die Aktivität der postganglionären Neurone wurde vor, während und nach noxischen Hitzereizen (Temperatur >50 °C) oder noxischen Kaltreizen (Temperatur 5 °C), die für 20-35 s auf den N. suralis appliziert wurden, registriert. Die Aktivität der so getesteten postganglionären Neurone wurde offline über alle Neurone gemittelt und im Verlauf 30 s vor dem Hitzereiz und 120 s nach Reizbeginn über die Zeit dargestellt. Für die Applikation von Kaltreizen wurde im gleichen Modus vorgegangen. Diese Vorgehensweise diente der Detektion von Reaktionen auf noxische Temperatur-Stimuli (siehe Abb. 3.18., Abb. 3.19., Abb. 3.20.).

(2) *Afferente temperatursensible Neurone*

Wurden Fasern dieses Typs identifiziert und Kaltstimuli bzw. Hitzestimuli appliziert, wurde aus den ermittelten Daten die Reizschwelle bestimmt. Als Reizschwelle wurde die Temperatur angesehen, bei der mindestens 3 Aktionspotentiale generiert wurden (siehe Abb. 3.5. B, Abb. 3.9. B). Weiterhin wurden Reiz-Antwort-Kurven erstellt. Für diese Darstellung wurde die Aktivität der Nervenfasern in den ersten 20 Sekunden des thermischen Reizes ausgewertet. Dabei wurden einerseits die mittlere Aktivität der ersten fünf Sekunden nach Aktivierung gegen die Stärke des applizierten Reizes aufgetragen (dynamische Phase der Reizantwort) und andererseits für die

letzten 10 Sekunden (statische Phase der Reizantwort). Die Verteilung der Reizantworten aller Fasern dieses Typs wurde anschließend auch als Box-Whisker-Plots dargestellt (siehe Abb. 2.6.).

2.8. Postexperimentelle Datenanalyse

Die Daten wurden nach dem Experiment offline mit der Analyse-Software Spike II (Cambridge Electronic Design Ltd, Cambridge, UK) analysiert. Mit Hilfe der Software war es möglich, die Aktionspotentiale mehrerer Nervenfasern anhand ihrer Amplitude und Form zu differenzieren und den einzelnen Nervenfasern zuzuordnen. Dabei wurden zunächst mehrere ähnliche Aktionspotentiale zu einer Schablone zusammengefasst. Anschließend wurden alle Aktionspotentiale, deren Bildpunkte zu mindestens 80 % deckungsgleich mit der Schablone waren und/oder deren Amplitude höchstens 5 % von der Amplitude der Schablone abwichen, einer Nervenfaser zugeordnet (siehe Abb. 2.5.).

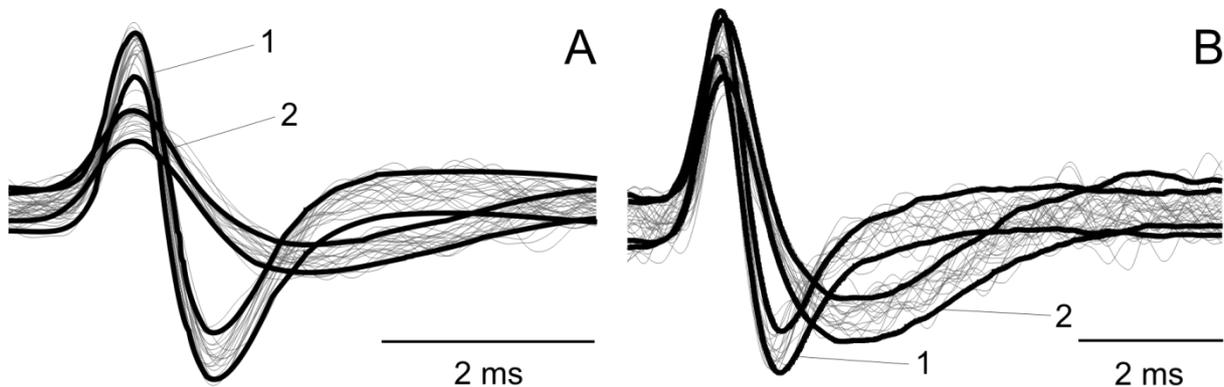


Abb. 2.5. Zuordnung von Aktionspotentialen zu einer Nervenfaser

Die dicken Linien markieren die Grenzen der Schablonen. Die dünnen Linien stellen Aktionspotentiale dar, die eine große Übereinstimmung mit der jeweiligen Schablone zeigen und demzufolge einer Nervenfaser zugeordnet werden.

(A) Die Aktionspotentiale unterscheiden sich hauptsächlich durch ihre Amplitude. Das mit (2) markierte Signal weist eine Abweichung $>5\%$ gegenüber der Amplitude von (2) auf.

(B) Hier besteht der Unterschied hauptsächlich in der Form der Signale. Die Bildpunkte der Schablone von (1) stimmen weniger als 80 % mit denen der Schablone von (2) überein. Sie werden dementsprechend einer anderen Nervenfaser zugeordnet.

Die Spontanaktivität der postganglionären Neurone wurde vor Applikation eines Kalt- oder Hitzereizes für 3-5 Minuten aufgenommen. Das Auftreten von Aktionspotentialen wurde anschließend offline mit der R-Zacke des EKGs korreliert.

Dazu wurden jeweils 180 s der Spontanaktivität in 400 ms-Abschnitte geteilt, an deren Beginn jeweils die R-Zacke eines QRS Komplexes stand, und überlagert. Im Mittel fanden bei der Ratte innerhalb von 400 ms 2-3 Herzaktionen statt. Anschließend wurde analysiert, in welchem Abstand die Aktionspotentiale in diesem Zeitfenster von der R-Zacke entfernt lagen. Auf diese Weise erhält man sog. „Post R-Zacken-Histogramme“ (siehe Abb. 3.16. A). Die Differenz zwischen der maximalen und der minimalen Aktivität wurde als Anteil der maximalen Aktivität ausgedrückt. Auf diese Weise erhält man einen prozentualen Wert zwischen 0 und 100 %. Werte zwischen 60-100 % wurden als stark kardiorhythmisch angesehen, zwischen 40-60 % als schwach und Werte <40 % als nicht kardiorhythmisch (Häbler et al. 1994).

Die statistische Überprüfung der Daten der vorliegenden explorativen Studie wurde mit dem χ^2 -Test, dem t-Test und dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Die Frage nach Normalverteilung wurde mittels des Shapiro-Wilk Tests bei Stichproben mit $n < 50$ und dem Kolmogorow-Smirnow-Test bei $n > 50$ beantwortet. Die Verteilungen von Entladungsfrequenzen wurden als Boxplot modifiziert nach Velleman & Hoaglin („ABC of EDA“, Duxberry Press 1981, Boston, Massachusetts, USA) mit Median, 1. und 3. Quartil, oberem und unterem Whisker (1,5 x Quartilabstand), und Ausreißern (>1,5 x Quartilabstand) dargestellt (siehe Abb. 2.6.). Viele Angaben beziehen sich auf den Mittelwert (\bar{x}), den Median (\tilde{x}), die Standardabweichung (s) oder den Standardfehler (δ_n). Im weiteren Verlauf werden nur die mathematischen Symbole verwendet.

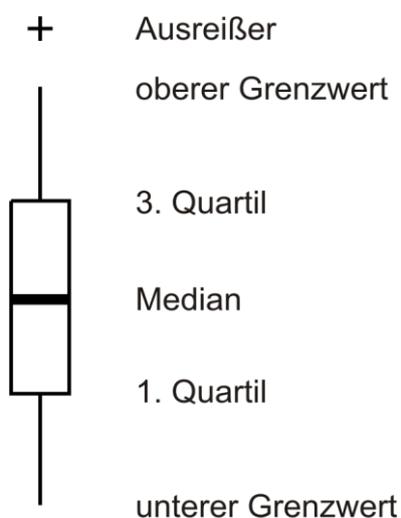


Abb. 2.6. Boxplot modifiziert nach Velleman & Hoaglin (1981)

Im Folgenden werden nur Boxplots dieses Musters verwendet. Ausreißer entsprechen Werten die größer als das 1,5-fache des Interquartilabstandes betragen. Der obere bzw. untere Grenzwert (das äußere Ende jeden Whiskers) bildet höchstens Werte bis zum 1,5-fachen des Interquartilabstandes ab. Die Box (Box zwischen 3. und 1. Quartil) umfasst die mittleren 50 % der Verteilung.

Der Querstrich in der Box markiert den Median. Die Messgrößen "Median" und "Quartil" sind im Gegensatz z. B. zum Mittelwert Kenngrößen, die weniger von der Verteilung der Messwerte abhängen.

Einzelwerte sind im Boxplot nicht sichtbar, stattdessen werden Kennwerte von Verteilungen als Diagramm abgebildet.

3. Ergebnisse

Die Experimente wurden in zwei Gruppen durchgeführt. Bei einer Gruppe wurde wie im Abschnitt 2.1. erläutert eine Quetschläsion 7-10 Tage vor dem Experiment durchgeführt („chronisch-Kohorte“), in der anderen Gruppe Stunden vor dem Experiment („akut-Kohorte“, siehe Abb. 2.2. und Abschnitt 2.1.) In beiden Experimenten erlaubte der experimentelle Aufbau nicht die rezeptiven Felder der Afferenzen auf der Haut zu untersuchen. Allerdings wiesen Teliban et al. (2011) nach, dass sich Nervenfasern, die durch thermische Stimulation ihrer kutanen rezeptiven Felder erregbar sind, durch die gleichen Stimuli auch im axonalen Verlauf erregen lassen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie basieren auf insgesamt 101 Filamenten, die in 26 Experimenten untersucht wurden. Dabei wurden 484 C-Fasern (einschließlich 87 postganglionäre Vasokonstriktorneurone) und 113 A-Fasern elektrisch identifiziert. 172 C-Fasern (36% der elektrisch erregbaren Fasern) und 4 (3,5%) A-Fasern, die entweder durch physiologische Thermo- oder Mechanostimulation des N. suralis erregbar waren oder spontane Aktivität zeigten, wurden detaillierter untersucht. Dabei stammen die Daten von 91 C- und 3 A-Fasern aus der akut-Kohorte und 81 C-Fasern und 1 A-Faser aus der Kohorte der Tiere mit chronischer Nervenläsion (siehe Tab. 3.1. und Tab. 4.1.). Die Anzahl der individuellen Nervenfasern (efferente/afferente A- und C-Fasern) entsprach nahezu der realen Zusammensetzung des N. suralis der Ratte, da in der Auswertung alle Nervenfasern einbezogen wurden, die elektrisch identifiziert wurden (siehe dazu Abschnitt 4.1.).

In der akut-Kohorte wurden in 11 Experimenten 54 Nervenfaserbündel untersucht und dabei 274 C-Fasern und 47 A-Fasern elektrisch identifiziert. 29/54 (53,7%) der Nervenfaserbündel wiesen Nervenfasern auf, die entweder axonal erregbar waren oder Spontanaktivität aufwiesen. Von den C-Fasern waren 55 Fasern spontan aktiv, 21 waren durch Kälte und 17 durch Hitze erregbar. 2 der thermosensiblen C-Fasern waren sowohl durch Hitze als auch durch Kälte erregbar. Zusätzlich waren in dieser Gruppe noch 3 A-Fasern mechanosensibel (siehe Tab. 3.1.). In der chronisch-Kohorte (7-10 Tage) wurden in 15 Experimenten 47 Filamente untersucht und 210 C-Fasern und 66 A-Fasern elektrisch identifiziert. 23/47 (49%) der Nervenfaserbündel wiesen Nervenfasern auf, die entweder axonal erregbar oder

spontan aktiv waren. Von 210 C-Fasern waren 32 spontan aktiv, 33 waren durch Kälte und 20 durch Hitze erregbar. 4 der thermosensiblen C-Fasern waren sowohl durch Hitze als auch durch Kälte entlang des Nervs erregbar. Eine A-Faser wies Hitzesensibilität auf (siehe Tab. 3.1).

A	elektrisch und axonal erregbare Nervenfasern			
	akut		7-10 Tage nach Läsion	
	A-Fasern	C-Fasern	A-Fasern	C-Fasern
Anzahl elektrisch erregbarer Fasern	47	274	66	210
Anzahl der Fasern mit axonaler Erregbarkeit	3	36	1	49

B	Funktionelle Eigenschaften			
	akut		7-10 Tage nach Läsion	
	A-Fasern	C-Fasern	A-Fasern	C-Fasern
Spontanaktivität (SA)	0	55	0	32
Thermische Sensibilität	0	36	1	49
Hitzesensibilität	0	17	1	20
Kaltsensibilität	0	21	0	33
Mechanosensibilität	3	0	0	0
Gesamt	3 (6,4%)	91 (33%)	1 (1,5%)	81(39%)

C	Kombinationen funktioneller Eigenschaften			
	akut		7-10 Tage nach Läsion	
	A-Fasern	C-Fasern	A-Fasern	C-Fasern
ausschließlich Spontanaktivität	0	55	0	32
Kaltsensibilität/SA	0/0	19/0	0/0	29/0
Hitzesensibilität/SA	0/0	15/0	1/0	16/0
Kalt-&Hitzesensibilität/SA	0/0	2/0	0/0	4/0
Mechano-&Kaltsensibilität/SA	0/0	0/0	0/0	0/0
Mechano-&Hitzesensibilität/SA	0/0	0/0	0/0	0/0
Mechano-&Hitze-&Kaltsensibilität/SA	0/0	0/0	0/0	0/0
Mechanosensibilität/SA	3/0	0/0	0/0	0/0

Tab. 3.1. Eigenschaften und Eigenschaftskombinationen der A- und C-Fasern beider Kohorten
 Fasern mit kombinierter Hitze- und Kaltsensibilität sind in beiden Rubriken aufgeführt. Deshalb ist die Summe der beiden Kategorien höher als die Zahl der Fasern mit Thermosensibilität.

3.1. Leitungsgeschwindigkeiten von A- und C-Fasern

Die Ermittlung der Leitungsgeschwindigkeit diente der Einteilung der Nervenfasern innerhalb eines Nervenfaserbündels in A- und C-Fasern. Dabei wurden alle Nervenfasern mit einer Leitungsgeschwindigkeit ≤ 2 m/s als C-Fasern definiert und alle Nervenfasern mit einer Leitungsgeschwindigkeit > 2 m/s als A-Fasern (Harper & Lawson 1985a; Harper & Lawson 1985b, siehe auch Abb. 3.1. und Abb. 3.2.). Die Leitungsgeschwindigkeit errechnet sich aus der Distanz zwischen Stimulations- und Ableitelektrode und der zeitlichen Latenz, mit der das Aktionspotential auftritt (siehe Abschnitt 2.5., Abb. 2.2., Abb. 2.3. und Abb. 2.4.). Die mittlere Distanz zwischen den beiden Elektroden betrug $21,2 \pm 2$ mm ($\bar{x} \pm s$, akut-Kohorte) und $20,5 \pm 3$ mm ($\bar{x} \pm s$, chronisch-Kohorte).

Die Leitungsgeschwindigkeit der A-Fasern betrug im Mittel $18,1 \pm 2$ m/s ($\bar{x} \pm \delta_n$, akut, $\bar{x} = 15,7$ m/s) und $17,3 \pm 2,1$ m/s ($\bar{x} \pm \delta_n$, chronisch, $\bar{x} = 13,7$ m/s). Der Unterschied zwischen den Leitungsgeschwindigkeiten der beiden Kohorten ist statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-U-Test $p=0,25$). Lediglich 3% der elektrisch erregbaren A-Fasern wiesen auch eine axonale Erregbarkeit auf (siehe Abb. 3.2. und Tab. 3.2.). Von diesen konnten alle vier auch elektrisch identifiziert werden. Von der gängigen Einteilung der A-Fasern in $A\alpha$, β und δ (Villiere & McLachlan 1996) wurde abgesehen, da es bis auf die Leitungsgeschwindigkeit kein weiteres Unterscheidungskriterium gab, wie z. B. funktionelle Eigenschaften. Auch fehlten bei der Analyse der Leitungsgeschwindigkeiten typische Gipfel der Untergruppen (siehe Abb. 3.2.).

17,6 % (13 % in der akut- und 23 % in der chronisch-Kohorte), der elektrisch erregbaren C-Fasern konnten auch axonal erregt werden (siehe Abb. 3.1.). Gemessen an der Zahl der afferenten C-Fasern sind dies 16,5 % in der akut- und 27,5 % in der chronisch geschädigten Kohorte (Vergl. Tab. 3.1. und Tab. 4.1.). Dieser Unterschied ist hoch signifikant (χ^2 -Test, $p<0,01$). Die mittlere Leitungsgeschwindigkeit aller elektrisch identifizierten C-Fasern betrug $0,77 \pm 0,015$ m/s ($\bar{x} \pm \delta_n$, akut, $\bar{x} = 0,73$ m/s) und $0,79 \pm 0,016$ m/s ($\bar{x} \pm \delta_n$, chronisch, $\bar{x} = 0,76$ m/s). Von den axonal erregbaren oder sympathischen C-Fasern konnten 146/172 (85 %) eindeutig elektrisch identifiziert werden (siehe Abb. 3.1.). Die mittlere Leitungsgeschwindigkeit der axonal erregbaren und elektrisch identifizierten

Nervenfasern lag bei $0,75 \text{ m/s} \pm 0,01 \text{ m/s}$ ($\bar{x} \pm \delta_n$, $\bar{x} = 0,71 \text{ m/s}$, akut) und bei $0,79 \text{ m/s} \pm 0,016 \text{ m/s}$ ($\bar{x} \pm \delta_n$, $\bar{x} = 0,78 \text{ m/s}$, chronisch). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$). Es zeigt sich eine Rechtsverschiebung der Leitungsgeschwindigkeiten der C-Fasern in der chronisch-Kohorte gegenüber der akut-Kohorte (siehe Abb. 3.1.). Dieses Ergebnis ist mit vorherigen Studien vereinbar, in denen gezeigt wurde, dass die Leitungsgeschwindigkeit eines Neurons positiv mit der Größe seines Zellkörpers und Axons korreliert ist (Harper & Lawson 1985). Bereits in den ersten Tagen nach einer Nervenläsion degenerieren unter den kutanen unmyelinisierten afferenten Neuronen vorzugsweise langsam leitende Afferenzen mit kleinem Zellkörper (Jänig & McLachlan 1984; Vestergaard et al. 1997; Hu, P. & McLachlan 2003). Dieser Sachverhalt führt zu einer Selektion der schnell leitenden Afferenzen in der chronisch-Kohorte und erklärt die Rechtsverschiebung. Der Großteil der C-Fasern weist unabhängig von der Kohorte eine Leitungsgeschwindigkeit zwischen 0,5 und 1 m/s auf. Die Leitungsgeschwindigkeiten der C-Fasern sind normalverteilt (Kolmogorov-Smirnov-Test).

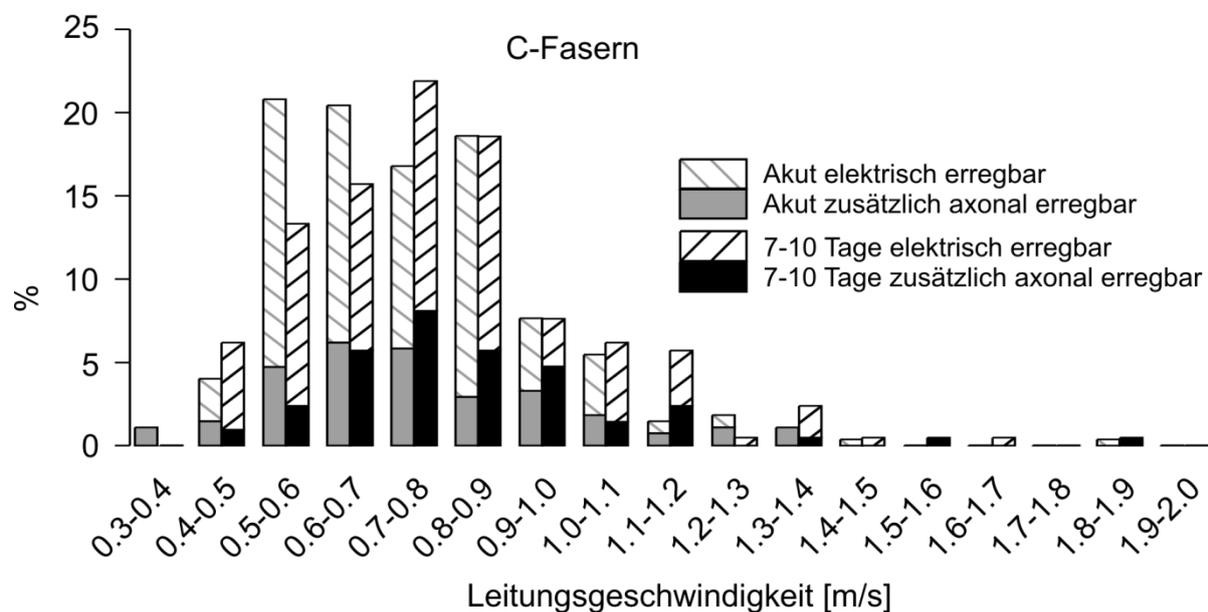


Abb. 3.1. Übersicht über die Leitungsgeschwindigkeiten von C-Fasern

Verteilung der Leitungsgeschwindigkeiten von C-Fasern aufgetrennt für die akut-Kohorte (grau/grau gestreift) und die 7-10-Tage-Kohorte (schwarz/schwarz gestreift). Die grauen bzw. schwarzen Balken bilden die C-Fasern mit thermischer Erregbarkeit oder Spontanaktivität ab. Die gestreiften Balken entsprechen den elektrisch erregbaren C-Fasern ohne axonale Erregbarkeit oder Spontanaktivität. Für die Akut-Kohorte gilt: elektrisch erregbare C-Fasern $n=274$, davon axonal erregbar $n=36$, für die chronisch-Kohorte gilt: elektrisch erregbare C-Fasern $n=210$, davon axonal erregbar $n=49$. Die mittlere Leitungsgeschwindigkeit der axonal erregbaren und elektrisch identifizierten Nervenfasern lag bei $0,75 \pm 0,01 \text{ m/s}$ ($\bar{x} \pm \delta_n$, $\bar{x} = 0,71 \text{ m/s}$, akut) und bei $0,79 \pm 0,016 \text{ m/s}$ ($\bar{x} \pm \delta_n$, $\bar{x} = 0,78 \text{ m/s}$, chronisch). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist statistisch signifikant (Mann-Whitney-U-Test, $p < 0,05$).

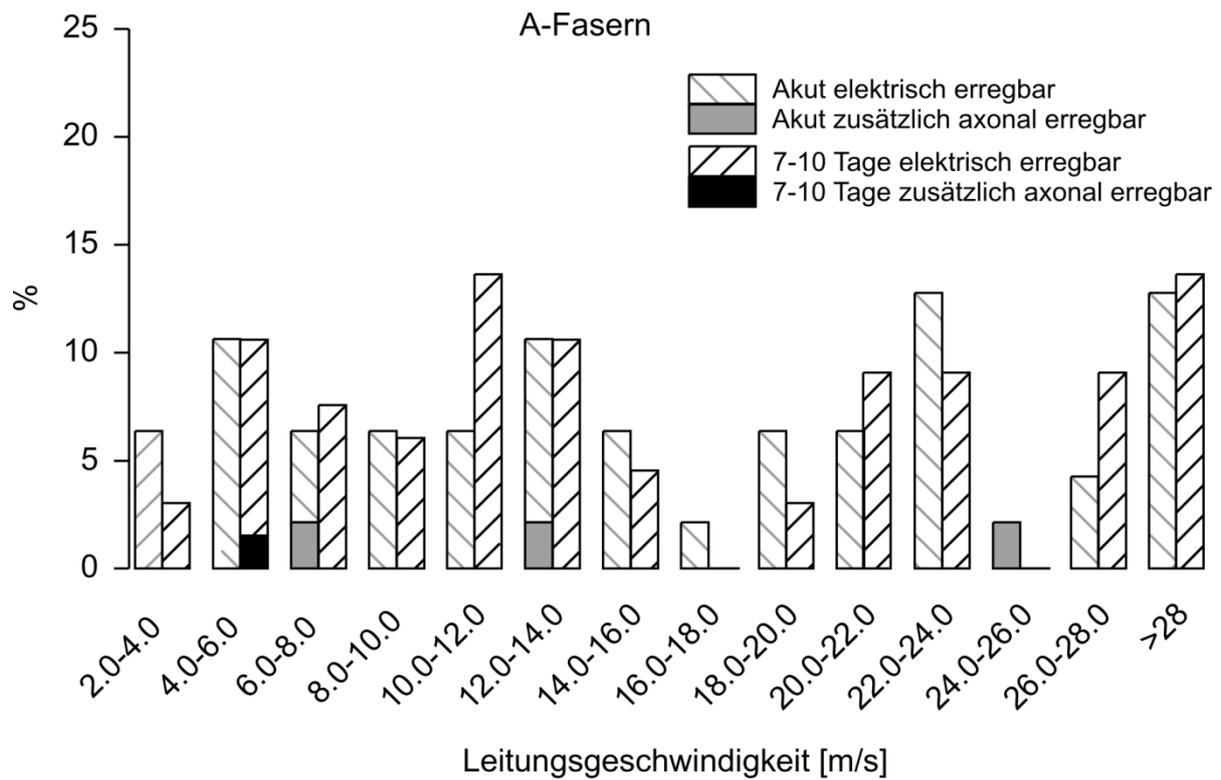


Abb. 3.2. Übersicht über die Leitungsgeschwindigkeiten von A- Fasern

Verteilung der Leitungsgeschwindigkeiten von A-Fasern aufgetrennt für die Kohorte, 0-10 Stunden nach Nervenläsion (grau/grau gestreift) und 7-10 Tage nach Nervenläsion (schwarz/schwarz gestreift). Die Farbgebung der Datenbalken entspricht der in Abb. 3.1. Für die Akut-Kohorte gilt: elektrisch erregbare A-Fasern n=47, davon axonal erregbar n=3, für die chronisch-Kohorte gilt: elektrisch erregbare A-Fasern n=66, davon axonal erregbar n=1.

3.2. Charakterisierung afferenter Nervenfasern

Auch unter nicht-regenerativen Bedingungen sind Axone entlang ihres Verlaufs erregbar (Teliban et al. 2011). In der Arbeit von Teliban et al. (2011) wurde gezeigt, dass afferente Neurone nicht nur in ihren rezeptiven Enden in der Haut durch Kälte- und Hitzeerze erregbar sind, sondern auch entlang des axonalen Verlaufs. Axonale Thermosensibilität wurde dabei für nahezu alle Typ-1-kaltsensiblen und etwa ein Drittel der Typ-2-kaltsensiblen oder hitzesensiblen Nervenfasern nachgewiesen. Aufgrund des experimentellen Aufbaus in der vorliegenden Studie ließen sich keine Rückschlüsse ziehen, ob es sich bei den Fasern, die axonal erregbar waren, um die gleichen Fasern handelte, die auch durch Stimulation der Haut erregbar gewesen wären. Allerdings kann aufgrund der Ergebnisse von Teliban et al. davon ausgegangen werden, dass dies der Fall ist. Hier wurden 397 afferente C-Fasern und 113 A-Fasern analysiert. Da sich die Reizantworten der afferenten Nervenfasern in beiden Kohorten bezüglich ihres Aussehens nicht unterscheiden, zeigen die folgenden Abbildungen Beispiele, die für beide Kohorten repräsentativ sind: Abb. 3.3., Abb. 3.4., Abb. 3.8. und Abb. 3.13. .

3.2.1. Axonale Hitzesensibilität – Akut-Kohorte

Von 91 C-Fasern in der akut-Kohorte erwiesen sich 17 als rein hitzesensibel, 2 waren zusätzlich kaltsensibel. Keine dieser Fasern zeigte spontane Aktivität oder Aktivierung durch mechanische Reizung (siehe Tab. 3.1.). Die Reizschwellen lagen zwischen 44 und 53 °C und im Mittel bei $50,6 \pm 2,4$ °C ($\bar{x} \pm s$, $\bar{x} = 52$ °C, vergl. Abb. 3.5. B, weiße Säulen).

Die Reizantworten der hitzesensiblen Fasern in der Akut-Kohorte wiesen insgesamt eine graduierte Abhängigkeit von der Stärke des applizierten Stimulus auf und zeigten im Mittel eine phasische Reizantwort, d. h. die Frequenz war zum Reizbeginn am höchsten und nahm dann ab (siehe Abb. 3.7.). Im Einzelfall war es allerdings auch möglich, dass eine sehr kurze phasische Reizantwort vorherrschte oder es eine ausgeprägte statische Reizantwort gab (Vergl. Abb. 3.3. und Abb. 3.4.).

Die Anzahl der erregbaren Areale pro Nervenfasern lag zwischen 1 und 4 Arealen. Eine Erregbarkeit von allen Arealen aus wurde nicht beobachtet, auch wenn davon auszugehen ist, dass es diesen Fall theoretisch auch geben muss. 5/15 (33 %) Fasern waren von einem einzelnen Areal aus erregbar, 4/15 (27 %) von zwei, 5/15 (33 %) von drei sowie 1/15 (7 %) von vier. Dies bedeutet eine durchschnittliche Erregbarkeit von 2,1 Arealen aus (siehe dazu auch Abb. 3.5. und Abb. 3.6.). Eine Erregbarkeit war insgesamt von 32 der 75 getesteten Areale (42%) aus möglich, wobei die erregbaren Areale diskontinuierlich entlang der Axone verteilt waren und die Erregbarkeit umso stärker ausgeprägt war, je weiter distal das getestete Areal lag (siehe Abb. 3.6. B). Für eine ausführliche Diskussion siehe Abschnitt 4.2.1. .

3.2.2. Axonale Hitzesensibilität – Chronisch-Kohorte

In der chronisch-Kohorte waren von 81 C-Fasern 20 durch Hitze erregbar, 4 C-Fasern wiesen zusätzlich eine Sensibilität für Kälte auf. Unter den rein hitzesensiblen C-Fasern betrug die maximale Reizschwelle 54 °C, die minimale 40,3 °C. Die Reizschwelle lag dabei im Mittel bei $50,1 \pm 3,8$ °C ($\bar{x} \pm s$, $\bar{x} = 51$ °C). Die Mehrzahl der Nervenfasern war zwischen 51 °C und 54 °C erregbar (siehe Abb. 3.5. B und Abb. 3.7., graue Säulen). Die Reizantworten der hitzesensiblen Fasern wiesen eine graduierte Abhängigkeit von der Stärke des applizierten Stimulus auf und zeigten im Mittel eine phasische Reizantwort. Allerdings gab es auch Fälle, bei denen lediglich eine kurze salvenartige Reizantwort stattfand. Abb. 3.3. zeigt eine ausgeprägte statische Reizantwort einer hitzesensiblen C-Faser auf einen Hitzestimulus von 53 °C, während Abb. 3.9. die salvenartige Antwort einer hitzesensiblen C-Faser auf Stimuli verschiedener Stärke zeigt (Abb. 3.4.).

Die hitzesensiblen Fasern waren von 1-5 verschiedenen getesteten Arealen aus erregbar. 9/16 (56,25 %) Fasern waren von einem einzelnen Areal aus erregbar, 1/16 (6,25 %) von zwei, 1/16 (6,25 %) von drei, 3/16 (18,75 %) von vier und 2/16 (12,5 %) von allen. Im Mittel bedeutet dies eine Erregbarkeit von 2,3 Arealen aus (siehe dazu Abb. 3.5. A). Auch hier waren die Nervenfasern in den am weitesten distal gelegenen Arealen am häufigsten erregbar (siehe dazu Abb. 3.6.). Es wurden insgesamt Aktivierungen auf 36 der getesteten 80 Areale (45%) festgestellt.

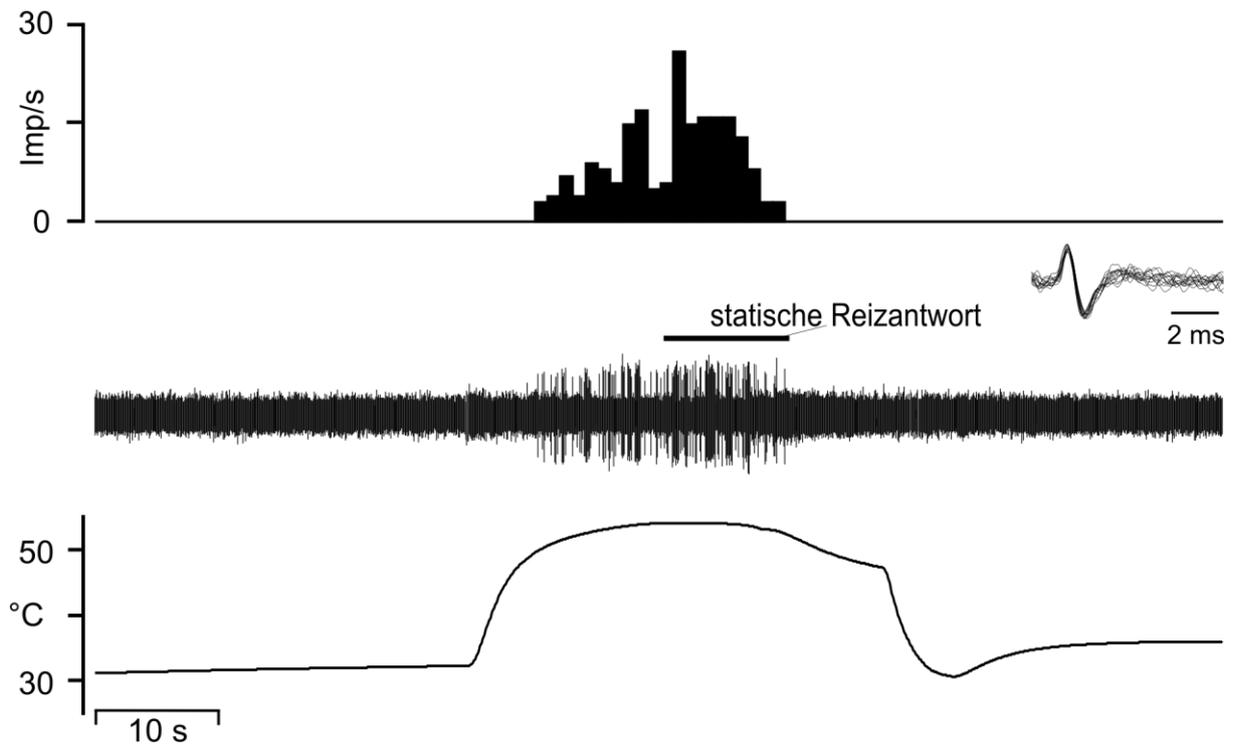


Abb. 3.3. Aktivierung einer hitzesensiblen C-Faser mit ausgeprägter statischer Reizantwort

Die Abbildung zeigt das Beispiel einer hitzesensiblen C-Faser, die durch axonale Hitzeapplikation erregbar ist. Im Gegensatz zu der C-Faser in Abb. 3.4. zeigt diese Faser allerdings überwiegend eine statische Reizantwort, verglichen mit der dynamische Reizantwort der meisten hitzesensiblen C-Fasern.

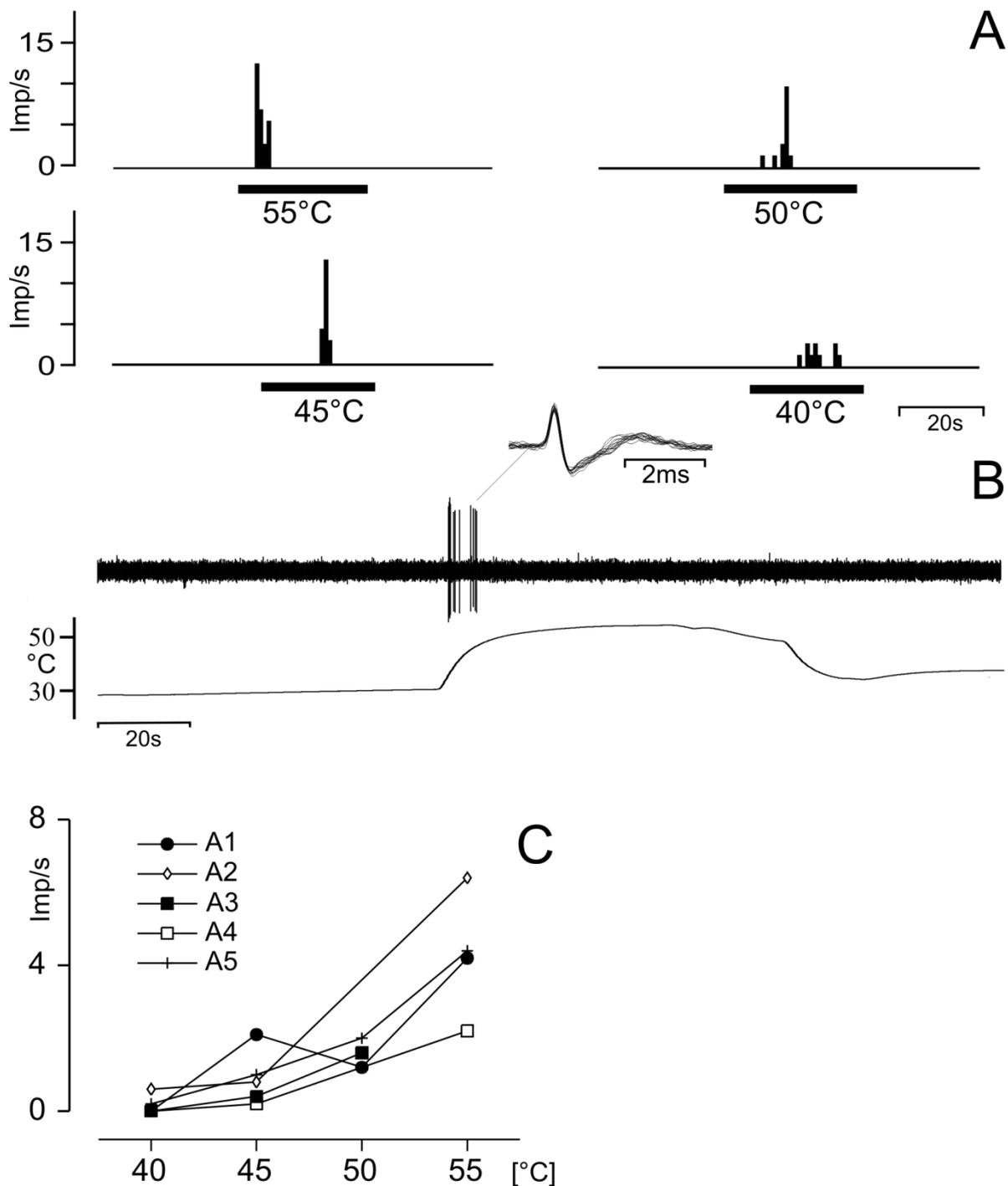


Abb. 3.4. Aktivierung einer afferenten C-Faser durch Hitzestimuli verschiedener Stärke, appliziert mit einer Thermode auf fünf benachbarte Areale entlang des N. suralis (siehe Abb. 2.2.)

- A. Histogramme der Aktivität. Es wurden Hitzereize von 40, 45, 50 und bis zu 55°C appliziert. Die graduierte Reizantwort ist zu erkennen.
- B. Originalaufnahme der Aktivität auf einen Hitzereiz von 53°C. Einsatzbild: einige Aktionspotentiale der C-Faser überlagert.
- C. Reiz-Antwort-Kurven der Aktivität während Hitzereizen, appliziert auf fünf benachbarte Areale entlang des N. suralis. Die Reiz-Antwort-Kurven sind für die gesamte Dauer der Reizantwort dargestellt, da sich in diesem Beispiel die Reizantwort extrem kurz und salvenartig gestaltete.

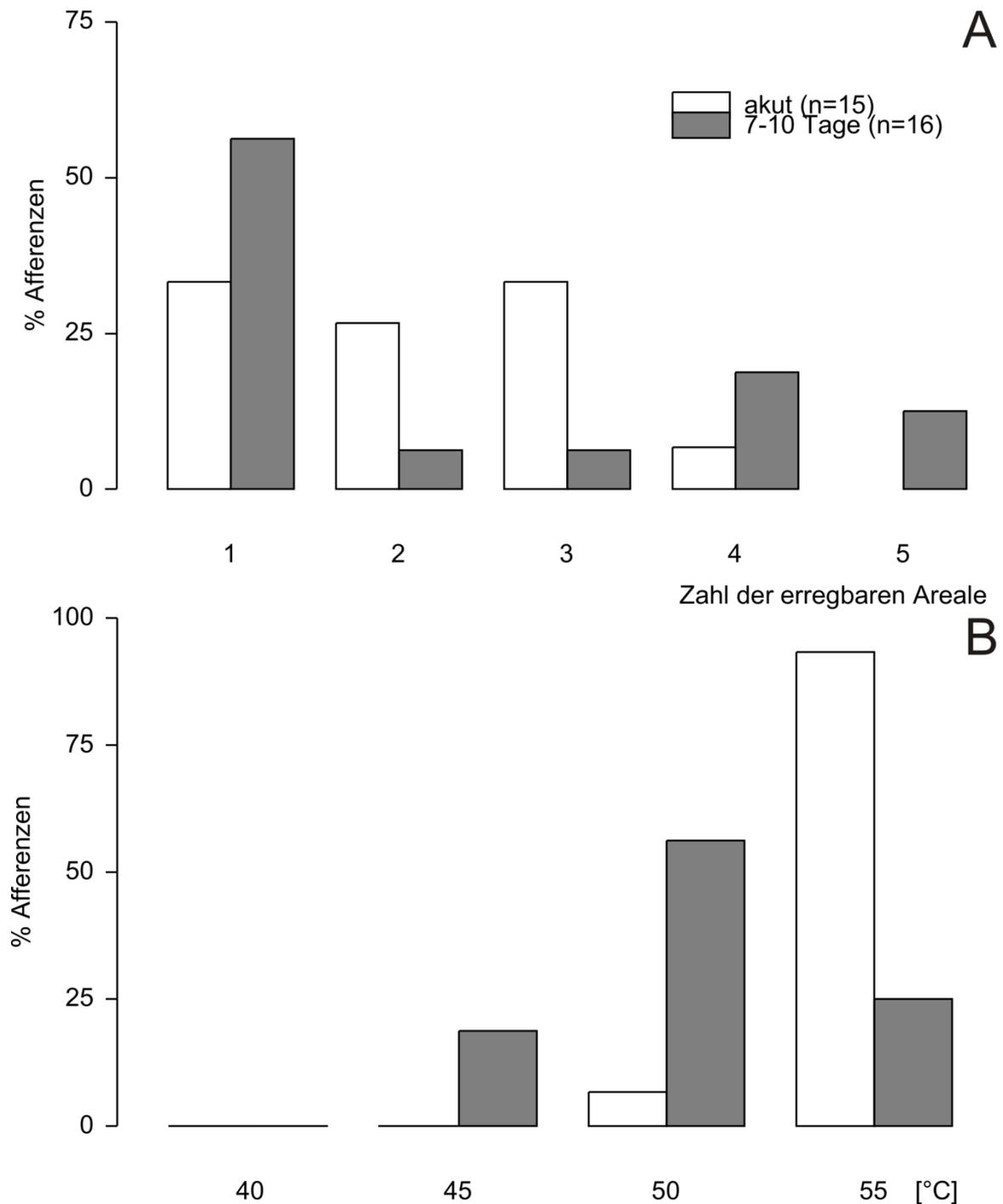


Abb. 3.5. Anteil der 5 getesteten Nervenareale von denen die C-Fasern durch Hitzeerregung erregt werden konnten und ihre Reizschwellen

- A. Ausmaß der Erregbarkeit der hitzesensiblen C-Fasern entlang des N. suralis. Die Daten (in %) geben an, welcher Anteil der C-Fasern bezogen auf die Gesamtheit der hitzesensiblen C-Fasern durch Reizung von einem bis zu fünf Arealen erregbar war. Nach akuter Nervenläsion n=15, 7-10 Tage nach Nervenläsion n=16.
- B. Verteilung der Reizschwellen auf axonale Hitzestimulation. Die Reizschwellen repräsentieren Daten von bis zu fünf Arealen. War eine Nervenfasern von mehreren Arealen erregbar und wies unterschiedliche Reizschwellen auf, ist die mittlere Reizschwelle einbezogen worden. Dies ist z. B. auch der Grund dafür, dass in dieser Abbildung keine C-Faser in der Rubrik [40°C] erscheint, obwohl das Beispiel in Abb. 3.9. Aktivität bei 40°C zeigt. Die mittlere Reizschwelle der in Abb. 3.4. gezeigten C-Faser beträgt 45°C. Die Temperaturangaben beziehen sich jeweils auf einen Bereich von $\pm 2^\circ\text{C}$.

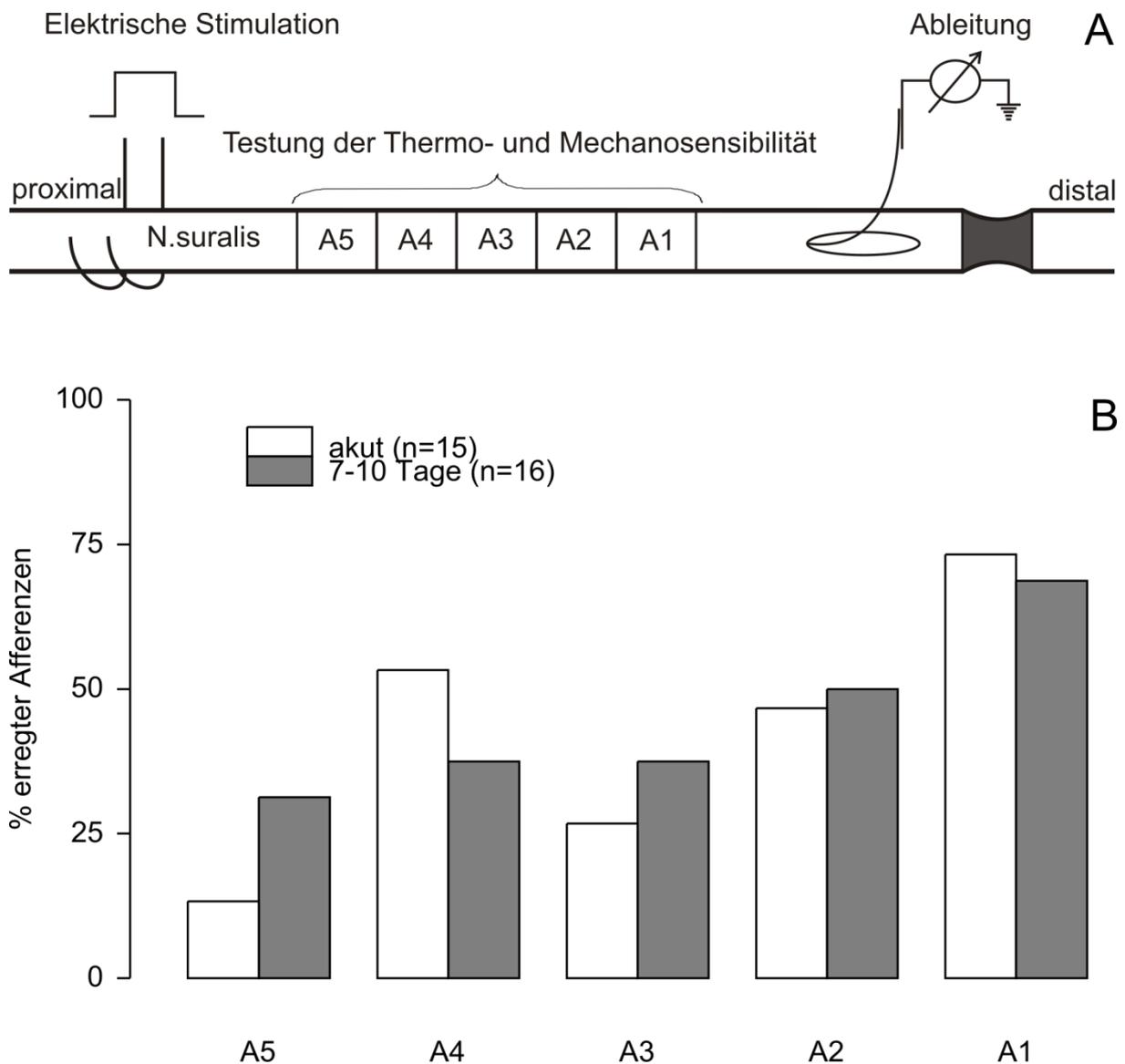


Abb. 3.6. Axonale Erregbarkeit individueller hitzesensibler C-Fasern entlang des Nervs

- A. Schematisierte Zeichnung des experimentellen Aufbaus. Die Aktivität in den afferenten Axonen wurde distal abgeleitet. Der N. suralis wurde proximal zur Identifizierung der Axone elektrisch gereizt. Zwischen den paarigen Stimulationselektroden und der Ableitelektrode lagen die Areale A1-A5, die durch Hitze-, Kälte- und mechanische Reize getestet wurden. Die Mittelpunkte benachbarter Areale lagen 3 mm auseinander.
- B. Verteilung der axonalen Erregbarkeit der individuellen hitzesensiblen C-Fasern über den Nerv. Die prozentualen Angaben pro gereiztes Nervenareal A1 bis A5 beziehen sich auf die Gesamtsumme der hitzesensiblen Fasern, die auf allen fünf benachbarten Arealen getestet wurden.

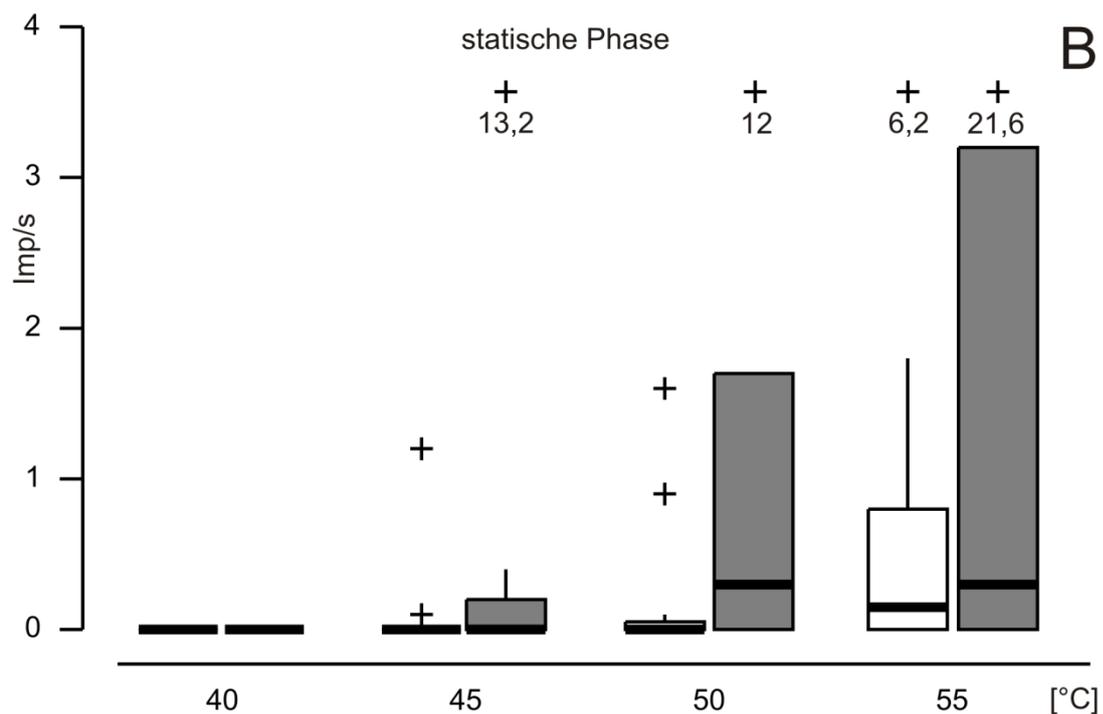
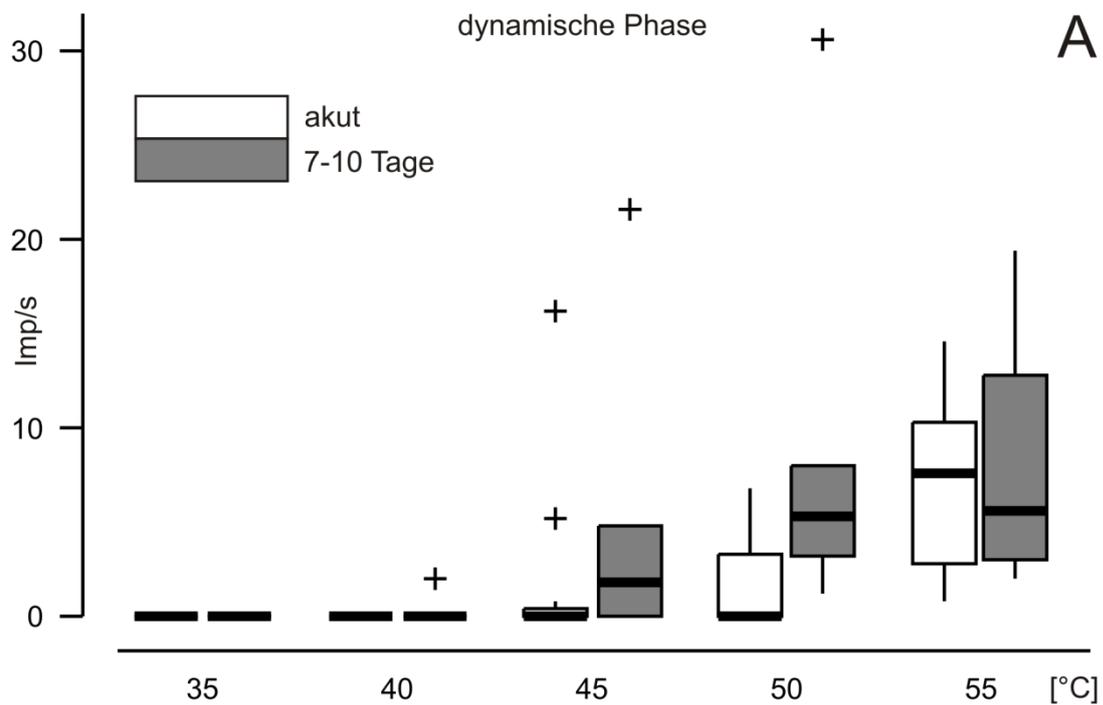


Abb. 3.7. Reizantworten hitzesensibler Afferenzen

Reizantwort von hitzesensiblen C-Fasern auf Hitzestimuli getrennt für die dynamische (A) und für die statische (B) Reizantwort 0-10 Stunden nach der Nervenläsion (weiß, n=16) und 7-10 Tage nach Nervenläsion (grau, n= 10). Darstellung in Form von Box-Whisker-Plots. Die Kreuze sind Messwerte, die mehr als das 1,5-fache des Quartilsabstandes vom oberen Quartil abweichen. Sie wurden als Ausreißer interpretiert. Die Zahlwerte unter den Kreuzen entsprechen Ausreißern, die extrem abweichen und sich nicht auf die Ordinate beziehen.

3.2.3. Axonale Kaltsensibilität – Akut-Kohorte

21 der 91 elektrisch identifizierbaren Nervenfasern der Akut-Kohorte waren durch Kälte erregbar. 2 Fasern waren zusätzlich hitzesensibel (siehe Tab. 3.1). Diese sind in den Abbildungen dieses Kapitels nicht berücksichtigt. Die Aktivierungsschwellen lagen zwischen 4 °C und 27 °C. Die Reizschwelle lag im Mittel bei $12,5 \pm 5,1$ °C ($\bar{x} \pm s$, $\bar{x} = 11,5$ °C, Abb. 3.9. B, weiße Säulen). Die Reizantwort der Kaltfasern bestand aus einer dynamischen und einer tonischen Phase und war graduiert (siehe Abb. 3.8. B und Abb. 3.11.). Keine der untersuchten kaltsensiblen C-Fasern wies eine spontane Aktivität oder Kombination mit mechanischer Sensibilität auf.

Die Verteilung der erregbaren Areale war homogen über den gesamten getesteten Nerv verteilt. Es wurden insgesamt Aktivierungen von 48/105 (45,7%) Arealen aus festgestellt, im Mittel waren die getesteten Nervenfasern von 2,3 Arealen aus erregbar. Dabei konnten die kaltsensiblen C-Fasern von 1 bis zu allen 5 Arealen aus erregt werden. 5/19 (26%) waren von einem, 3/19 (16%) von zwei, 5/19 (26%) von drei, 2/19 (11%) von vier und 4/19 (21 %) von allen getesteten Arealen aus erregbar (siehe Abb. 3.9. A und Abb. 3.10., weiße Säulen).

3.2.4. Axonale Kaltsensibilität – Chronisch-Kohorte

33 der 81 elektrisch identifizierbaren Nervenfasern in der 7-10 Tage Kohorte waren durch Kälte erregbar, 4 zusätzlich durch Hitze (siehe Tab. 3.1.). Die Aktivierungsschwellen lagen zwischen 4 °C und 27 °C. Die Reizschwelle lag im Mittel bei 13 ± 6 °C ($\bar{x} \pm s$, $\bar{x} = 11,5$ °C, siehe Abb. 3.9. B, graue Säulen). Die Verteilung der erregbaren rezeptiven Felder war auch hier homogen über den gesamten getesteten Nerv verteilt. Es wurden insgesamt Aktivierungen von 93/165 (56,4 %) der getesteten Areale aus festgestellt. Die kaltsensiblen C-Fasern konnten ebenfalls von 1 bis zu allen 5 Arealen aus erregt werden. 9/29 (31%) waren von einem, 4/29 (14%) von zwei, 2/29 (7%) von drei, 6/29 (21%) von vier und 8/29 (28 %) von allen getesteten Arealen aus erregbar (siehe Abb. 3.9. B und Abb. 3.10., graue Säulen). Im Mittel waren die getesteten Nervenfasern von 3 Arealen aus erregbar.

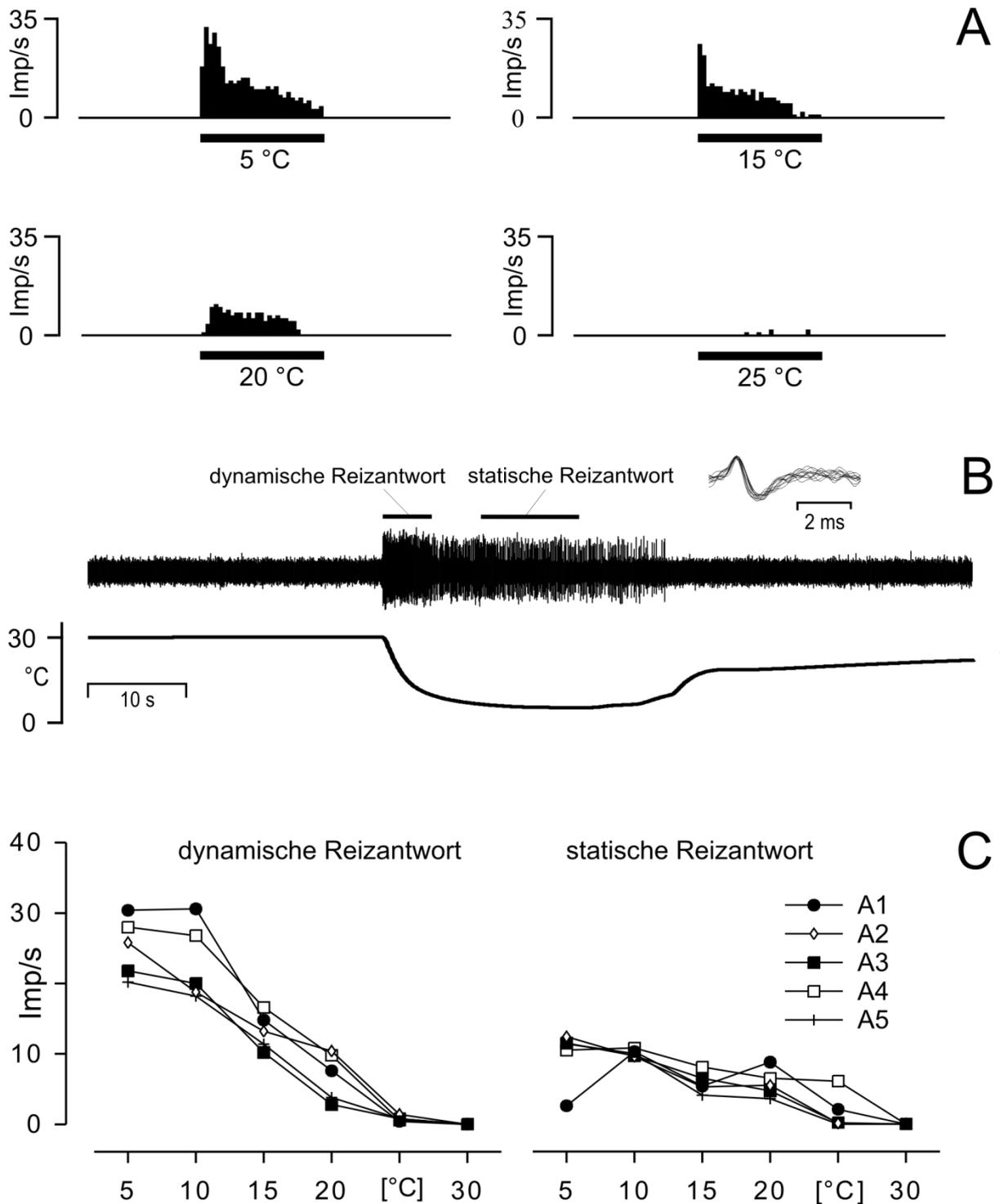


Abb. 3.8. Aktivierung einer afferenten C-Faser durch Kaltstimuli verschiedener Stärke appliziert mit einer Thermode auf fünf benachbarte Areale entlang des *N. suralis* (siehe Abb. 2.2.)

- A. Histogramme der Aktivität bei axonalen Kaltreizen von 5, 10, 20 und 25°C. Die graduierte Reizantwort ist deutlich zu erkennen.
- B. Originalaufnahme der Aktivität auf einen Kaltreiz von 5°C. Einsatzbild: einige Aktionspotentiale der C-Faser überlagert.
- C. Reiz-Antwort-Kurven der Aktivität der afferenten C-Faser auf Kaltreize, appliziert auf fünf benachbarte Areale entlang des *N. suralis*. Die Reiz-Antwort-Kurven sind für die dynamische Reizantwort (in den ersten 5 Sekunden nach Reizanfang) und die statische Reizantwort (Sekunde 10-20 nach Reizanfang) dargestellt.

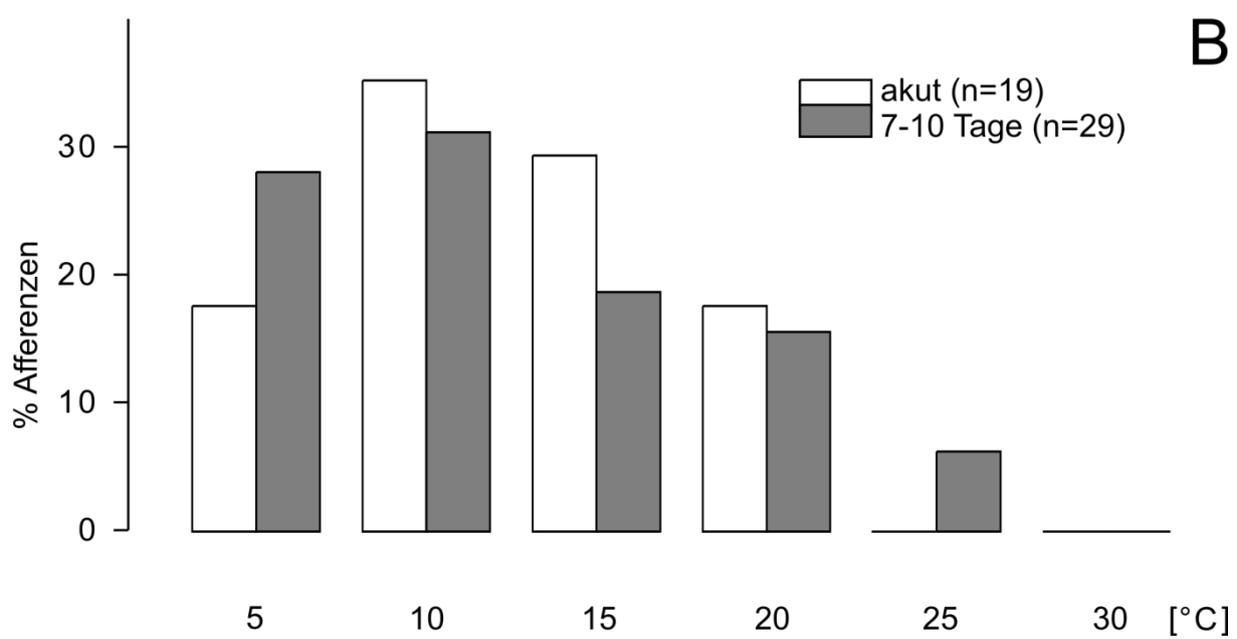
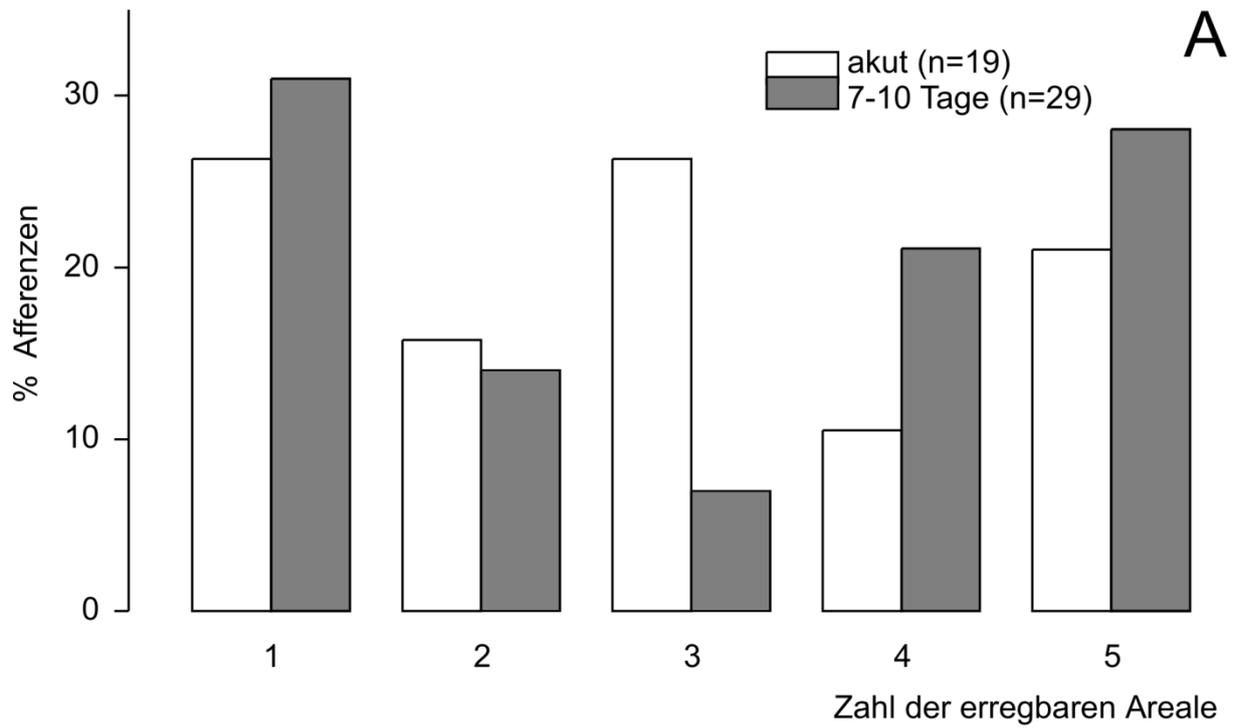


Abb. 3.9. Anteil der 5 getesteten Nervenareale von denen die C-Fasern durch Kaltreize erregt werden konnten und ihre Reizschwellen

A. Ausmaß der Erregbarkeit der kaltsensiblen C-Fasern entlang des N. suralis. Die Daten (in %) geben an, welcher Anteil der C-Fasern bezogen auf die Gesamtheit der kaltsensiblen C-Fasern durch Reizung von einem bis zu fünf Arealen erregbar war. Nach akuter Nervenläsion n=19, 7-10 Tage nach Nervenläsion n=29.

B. Verteilung der Reizschwellen auf axonale Kaltstimulation. Die Reizschwellen repräsentieren Daten von bis zu fünf Arealen. War eine Nervenfasern von mehreren Arealen aus erregbar und wies auf verschiedenen Arealen unterschiedliche Reizschwellen auf, wurde der Mittelwert kalkuliert und abgebildet. Die Temperaturangaben beziehen sich jeweils auf einen Bereich von $\pm 2^\circ\text{C}$.

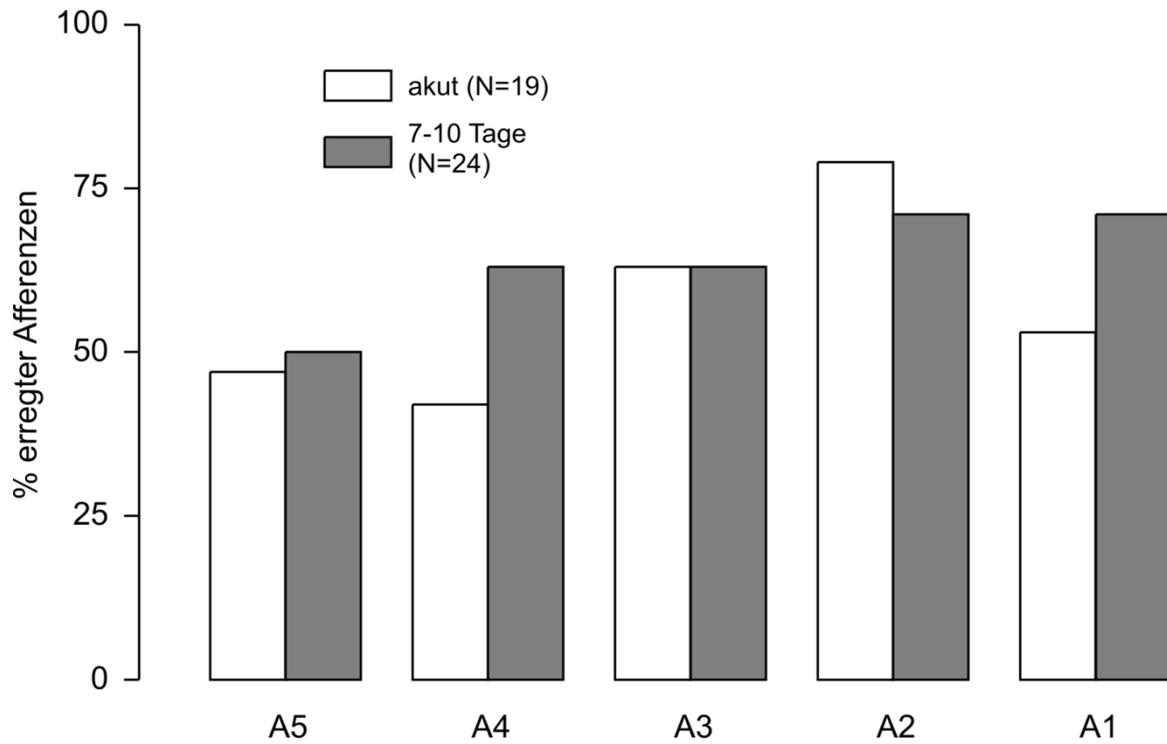


Abb. 3.10. Axonale Erregbarkeit individueller kaltsensibler C-Fasern entlang des Nervs

Für diese Abbildung gilt der gleiche experimentelle Aufbau, wie er in Abb. 3.6. A skizziert ist. Gezeigt ist die Verteilung der axonalen Erregbarkeit der individuellen kaltsensiblen C-Fasern über den Nerv. Die prozentualen Angaben pro gereiztes Nervenareal A1 bis A5 beziehen sich auf die Gesamtsumme der kaltsensiblen Fasern, die auf allen fünf benachbarten Arealen getestet wurden.

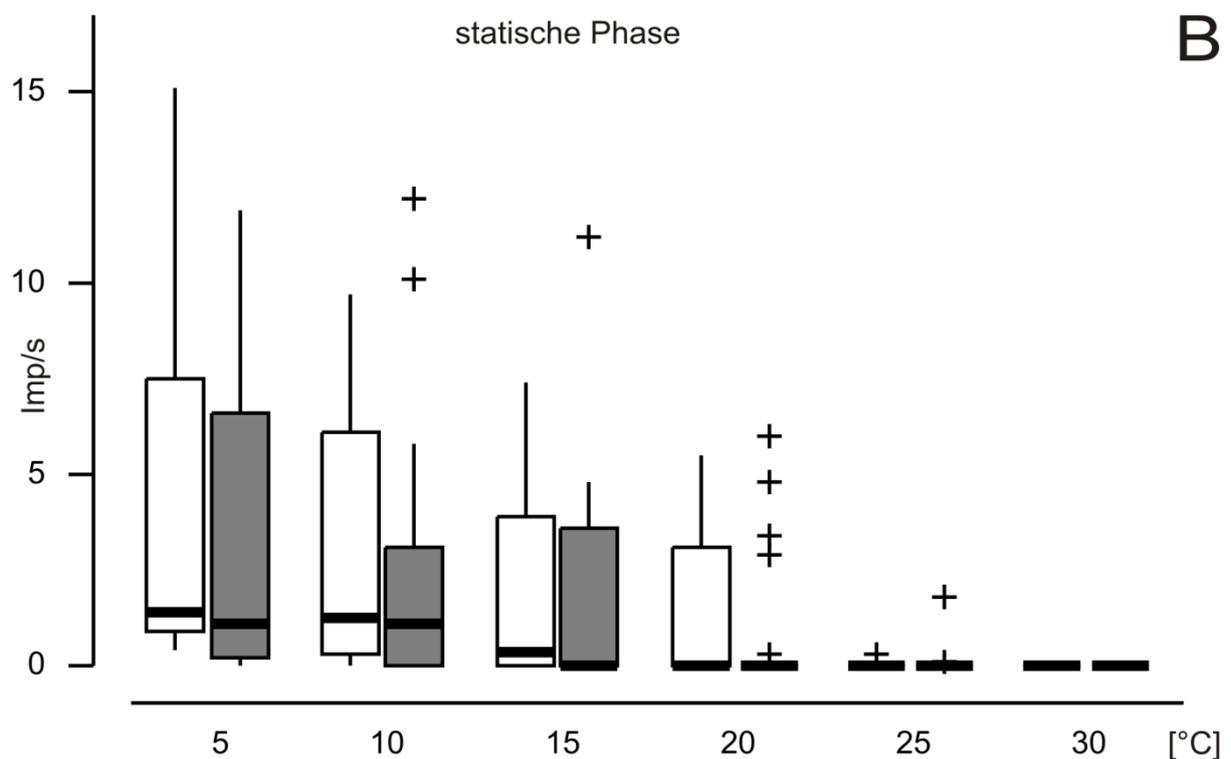
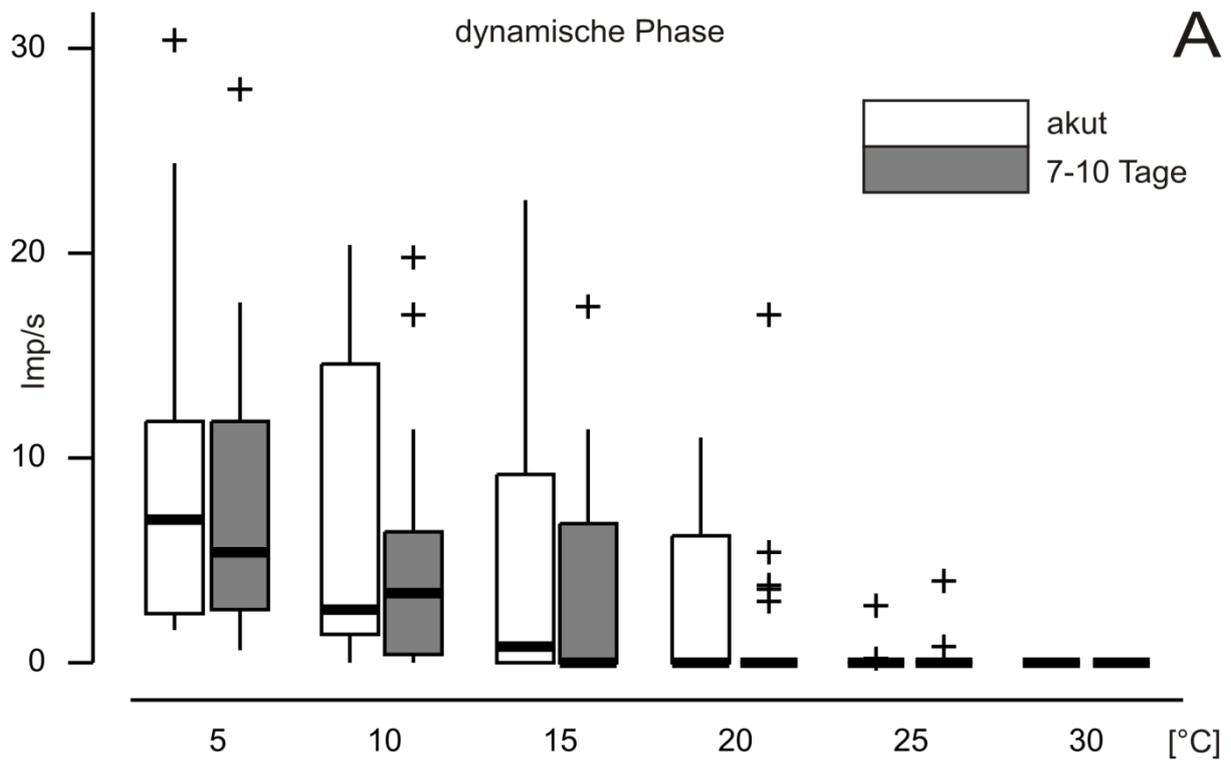


Abb. 3.11. Reizantworten kaltsensibler Afferenzen

Reizantwort von kaltsensiblen C-Fasern auf Kaltstimuli getrennt für die dynamische (A) und für die statische (B) Reizantwort 0-10 Stunden nach der Nervenläsion (weiß, n=14) und 7-10 Tage nach Nervenläsion (grau, n= 21). Darstellung in Form von Box-Whisker-Plots. Die Kreuze sind Messwerte, die mehr als das 1,5-fache des Quartilsabstandes vom oberen Quartil abweichen. Sie wurden als Ausreißer interpretiert.

3.2.5. Axonale Kaltsensibilität – Typ-1- und Typ-2-kaltsensible Afferenzen

Teliban et al. (2011) zeigten, dass mehr Typ-1-kaltsensible als Typ-2-kaltsensible Afferenzen axonal erregbar sind (100% vs. 39%). Die Frage, die sich daraus ergibt, ist, ob dieser Unterschied möglicherweise in einer unterschiedlichen Ausprägung der axonalen Erregbarkeit begründet ist. Wenn dies der Fall ist, müsste sich dies in einem Unterschied der Reizantworten von kaltsensiblen Afferenzen niederschlagen, die einerseits von max. 2 Arealen aus und andererseits von 3-5 Arealen aus erregbar waren. In Abb. 3.12. sind die kaltsensiblen C-Fasern beider Gruppen zusammengelegt und anhand der Ausprägung ihrer axonalen Erregbarkeit (max. von 2 Arealen oder von 3-5 Arealen aus erregbar) wieder aufgetrennt worden. Es ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied und somit keine Differenzierbarkeit zwischen hypothetischen Typ-1- und Typ-2-Afferenzen anhand der Ausprägung ihrer axonalen Sensibilität (Mann-Whitney-U-Test: $p=0,5$).

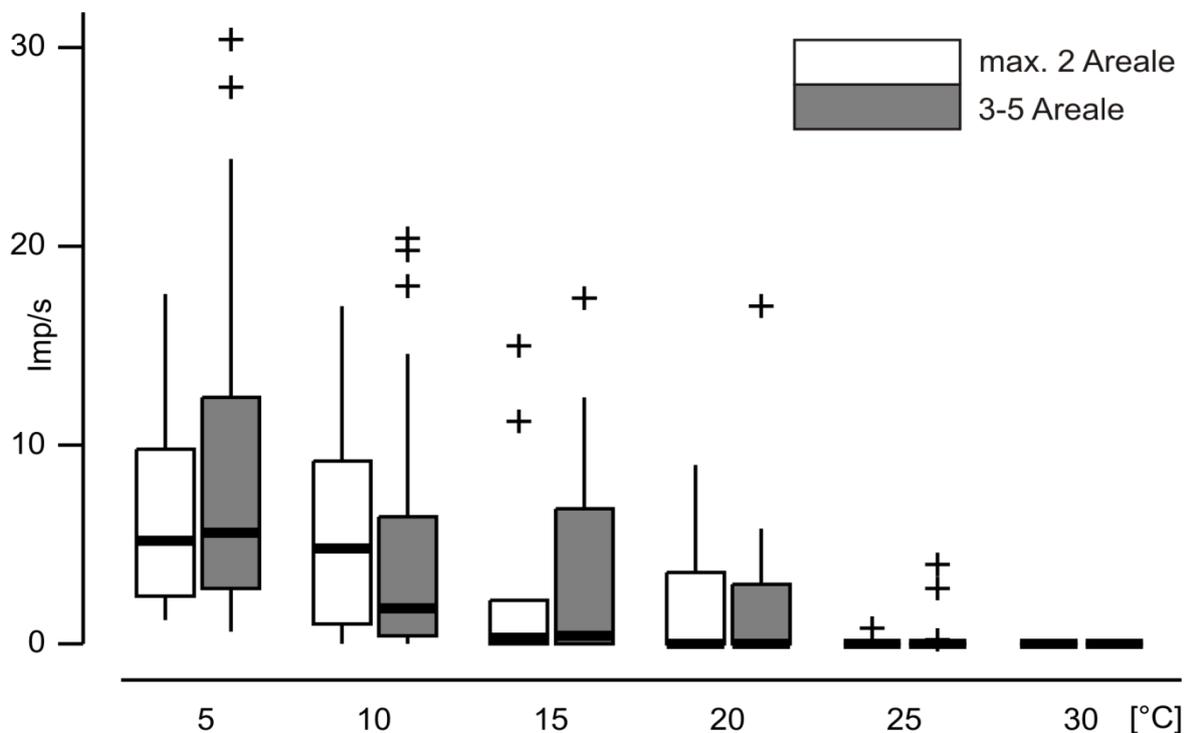


Abb. 3.12. Vergleich der Reizantwortkurven von afferenten kaltsensiblen C-Fasern

Die abgebildeten Reizantwortkurven stammen von allen kaltsensiblen C-Fasern beider Kohorten ($n=35$). In dieser Abbildung sind diese je nach Grad ihrer axonalen Erregbarkeit aufgeteilt, d. h. die Fasern, die von 1-2 (weiß) oder 3-5 Arealen (grau) entlang des N. suralis erregbar waren. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Stärke der Reizantwort (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,5$).

3.2.6. Mechanosensibilität

Unter den untersuchten Nervenfasern waren lediglich 3/57 (5,3 %) A-Fasern in der akut- und 0/76 A-Fasern in der chronisch-Kohorte mechanosensibel. Bei diesen handelt es sich vermutlich um mechanosensible Afferenzen des Epineuriums (Hromada 1963; Sauer et al. 1999; Bove 2008). Unter den drei mechanosensiblen A-Fasern waren zwei nur von einem Areal aus erregbar und eine Faser von drei Arealen. Alle drei Fasern wiesen recht niedrige Reizschwellen im Bereich von 0,3 - 0,7 mN auf und zeigten ähnliche Eigenschaften wie schnell adaptierende mechanosensible Afferenzen der Haut, d. h. auf jede kurze mechanische Stimulation folgten einige Aktionspotentiale (Treede 2010a). Eine anhaltende Entladung bei einer andauernden mechanischen Stimulation mit gleichbleibender Intensität, wie bei langsam adaptierenden mechanosensiblen Afferenzen, wurde nicht beobachtet. Diese Beobachtung bestätigt Teliban et al. (2011) und zeigt, dass die Mechanosensibilität der afferenten Fasern unter physiologischen Bedingungen auf die rezeptiven Enden in den Zielgeweben (hier die Haut) beschränkt ist.

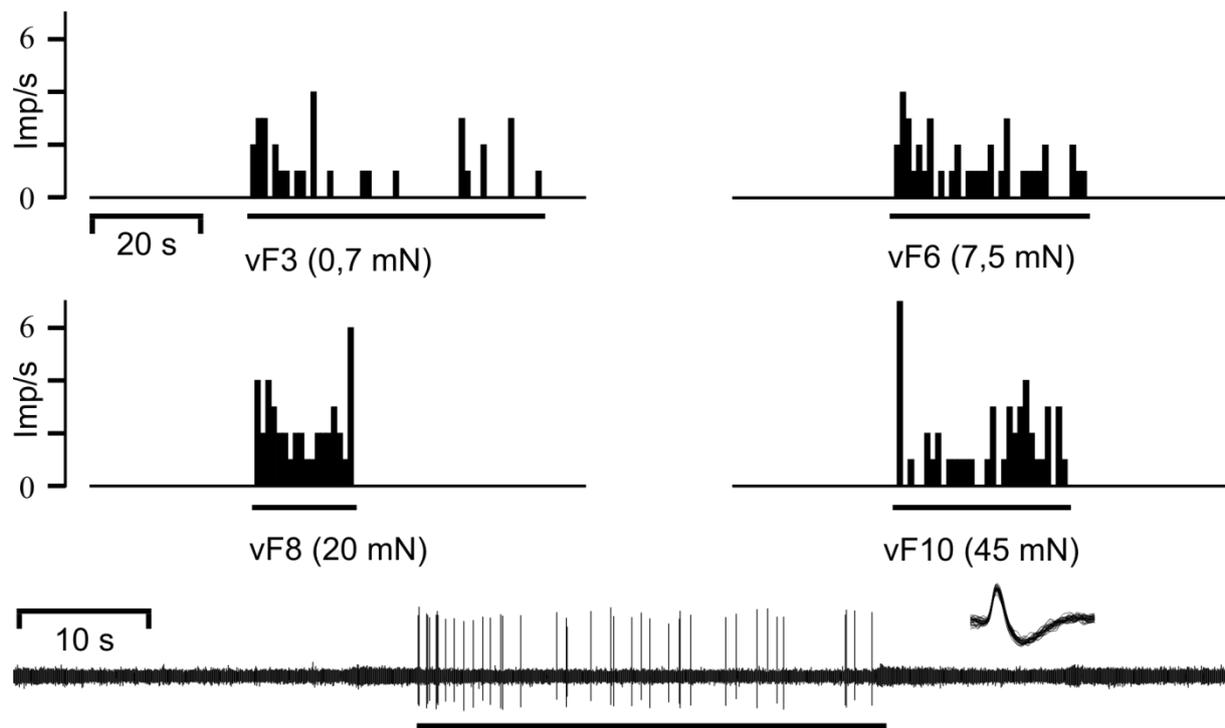


Abb. 3.13. Beispiel einer mechanosensiblen A-Faser des Epineuriums

Phasische mechanische Reize verschiedener Stärke (Dauer der repetitiven Reizung mit etwa 1 Hz indiziert durch Balken). Die Ordinate zeigt die Aktivität der Faser in Impulsen pro Sekunde. Die A-Faser hatte eine Aktivierungsschwelle von 0,45 mN. Der untere Teil der Abbildung zeigt eine Originalaufnahme vor, während und nach einer mechanischen Reizung des Nerven mit einem von-Frey-Haar der Stärke 6 (7,5 mN, durch den Balken indiziert). Einsatzbild: Aktionspotentiale mehrfach überlagert.

3.3. Vergleich der funktionellen Eigenschaften von A- und C-Fasern nach akuter oder chronischer Nervenläsion

In der Verteilung der funktionellen Eigenschaften unterschieden sich die beiden Gruppen (akut bzw. chronisch) lediglich im Anteil der axonal erregbaren afferenten C-Fasern in der chronisch-Kohorte (gemessen an den afferenten C-Fasern). Hier liegt die axonale Erregbarkeit statistisch hoch signifikant größer als in der akut-Kohorte (16,5 % in der akut-Kohorte vs. 27,5 % in der chronisch-Kohorte, $p = 0,007$, χ^2 -Test, für die Diskussion siehe Abschnitt 4.2.). Dies ist auf die höhere Anzahl axonal erregbarer kaltsensibler Afferenzen in der chronisch-Kohorte zurückzuführen, sie machen in der akut-Kohorte einen Anteil von ca. 8,5 % und in der chronisch-Kohorte von 16,3 % aus ($p = 0,02$, χ^2 -Test). Auffallend ist in beiden Kohorten die nahezu vollständige Abwesenheit der axonalen Erregbarkeit von myelinisierten Nervenfasern (siehe Abb. 3.2. und Tab. 3.1.).

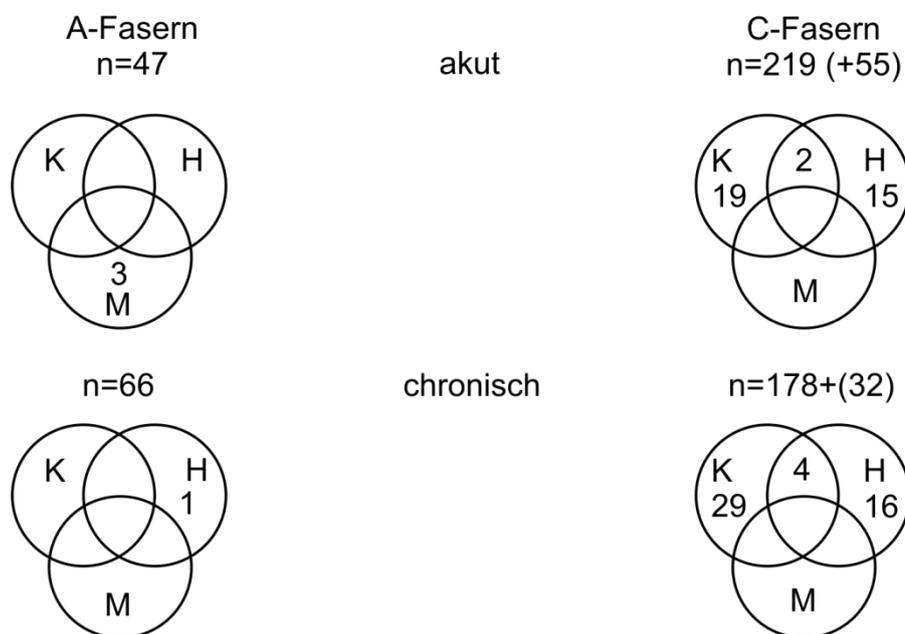


Abb. 3.14. Vergleich der funktionellen Eigenschaften von A- und C-Fasern

n = Anzahl der elektrisch identifizierten Nervenfasern (+postganglionäre Vasokonstriktorneurone, siehe C-Fasern), K = kaltsensibel, H = hitzesensibel, M = mechanosensibel Nervenfasern, die durch physiologische Stimuli entlang ihres axonalen Verlaufs erregbar waren. Es zeigt sich eine überwiegende Mehrheit der axonal erregbaren afferenten C-Fasern unabhängig von der Kohorte. Der Anteil der axonal erregbaren kaltsensiblen Afferenzen ist in der chronisch-Kohorte höher als in der akut-Kohorte.

3.4. Postganglionäre Vasokonstriktorneurone

Bei den postganglionären Vasokonstriktorneuronen handelt es sich um noradrenerge Neurone, deren Stimulation zu einer Vasokonstriktion der innervierten Blutgefäße führt. Ihre Axone zweigen sich innerhalb der Effektororgane stark auf und bilden zahlreiche Varikositäten. Hier werden auch die Überträgerstoffe synthetisiert und gespeichert und wiederverwertet. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Noradrenalin, das seinen Effekt auf Gefäße über α_1 -Rezeptoren vermittelt. Zudem weisen postganglionäre Vasokonstriktorneurone spontane Aktivität auf, die eine kardiale oder respirationsabhängige Rhythmik zeigt (siehe Abschnitt 3.4.2.). Diese Aktivität ist durch noxische Reize und Stimulation von Barorezeptoren unterdrückbar (siehe Abschnitt 3.4.3. und 3.4.4.). In der vorliegenden Studie wurden die postganglionären Vasokonstriktorneurone anhand ihrer Spontanaktivität und der daraus errechneten kardialen Rhythmik identifiziert. Weiterhin wurden Barorezeptorreflexe und nozizeptive vermittelte Reflexe als typische Eigenschaften von Vasokonstriktorneuronen angesehen und getestet.

3.4.1. Spontanaktivität

Die spontane Aktivität zeigte in der Akut-Kohorte eine durchschnittliche Entladungsrate von $0,72 \pm 0,06$ Imp/s ($\bar{x} \pm \delta_n$) mit einer maximalen Aktivität von 2,1 Imp/s und einer minimalen Aktivität von 0,03 Imp/s. Der Median lag bei 0,65 Imp/s. In der chronisch-Kohorte lag die durchschnittliche Entladungsrate bei $0,54 \pm 0,05$ Imp/s ($\bar{x} \pm \delta_n$) mit einem Maximum von 1,21 Imp/s und einem Minimum von 0,07 Imp/s. Der Median lag bei 0,45 Imp/s. Die Spontanaktivität der postganglionären Vasokonstriktorneurone in der chronisch-Kohorte war statistisch signifikant niedriger ($p < 0,01$, Mann-Whitney-U-Test, siehe Abb. 3.15. und Abb. 3.20). Spontan aktive Nervenfasern, die gleichzeitig thermosensibel waren wurden nicht gefunden, was zu dem Schluss führte, dass sämtliche spontan aktiven Nervenfasern in der vorliegenden Studie dem sympathischen Nervensystem zuzuordnen waren. Es wurde kein Anhalt dafür gefunden, dass ektoper Spontanaktivität in afferenten Fasern mit einem Ursprung proximal der Nervenläsion, z. B. im Spinalganglion aufgetreten ist.

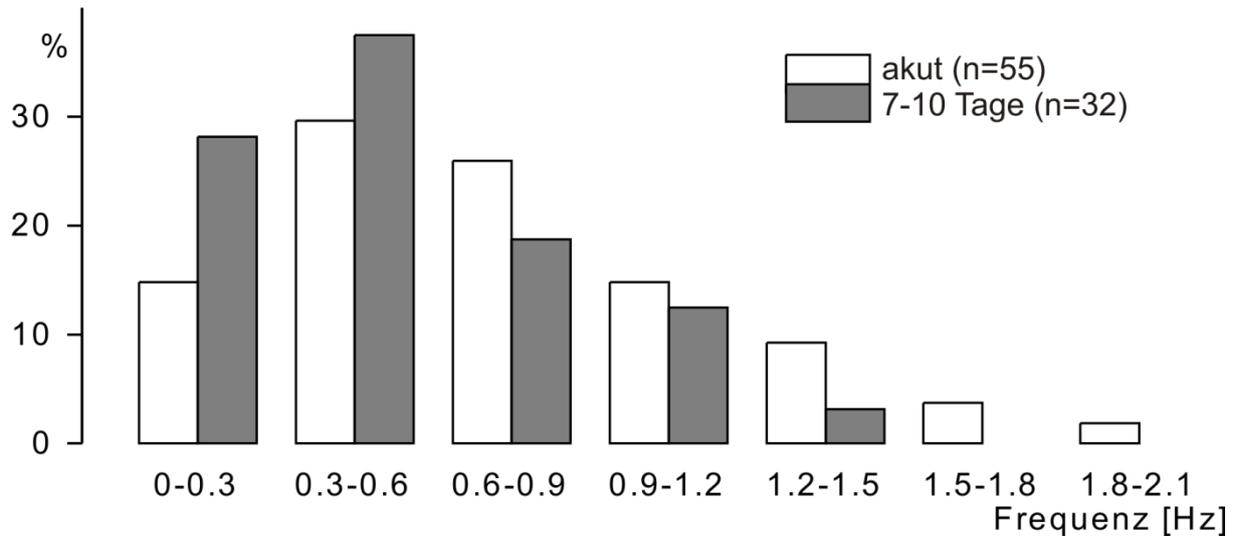


Abb. 3.15. Verteilung der spontanen Aktivität postganglionärer Neurone

Die Spontanaktivität der postganglionären Vasokonstriktorneurone wurde über 3 min aufgenommen und gemittelt und anhand ihrer Entladungsfrequenz aufgeteilt. Postganglionäre Neurone zeigen 7-10 Tage nach Nervenläsion eine signifikant niedrigere Entladungsrate als Neurone nach akuter Nervenläsion ($p < 0.01$, Mann-Whitney-U-Test). Die Angaben in % beziehen sich auf die Gesamtzahl der postganglionären Neurone.

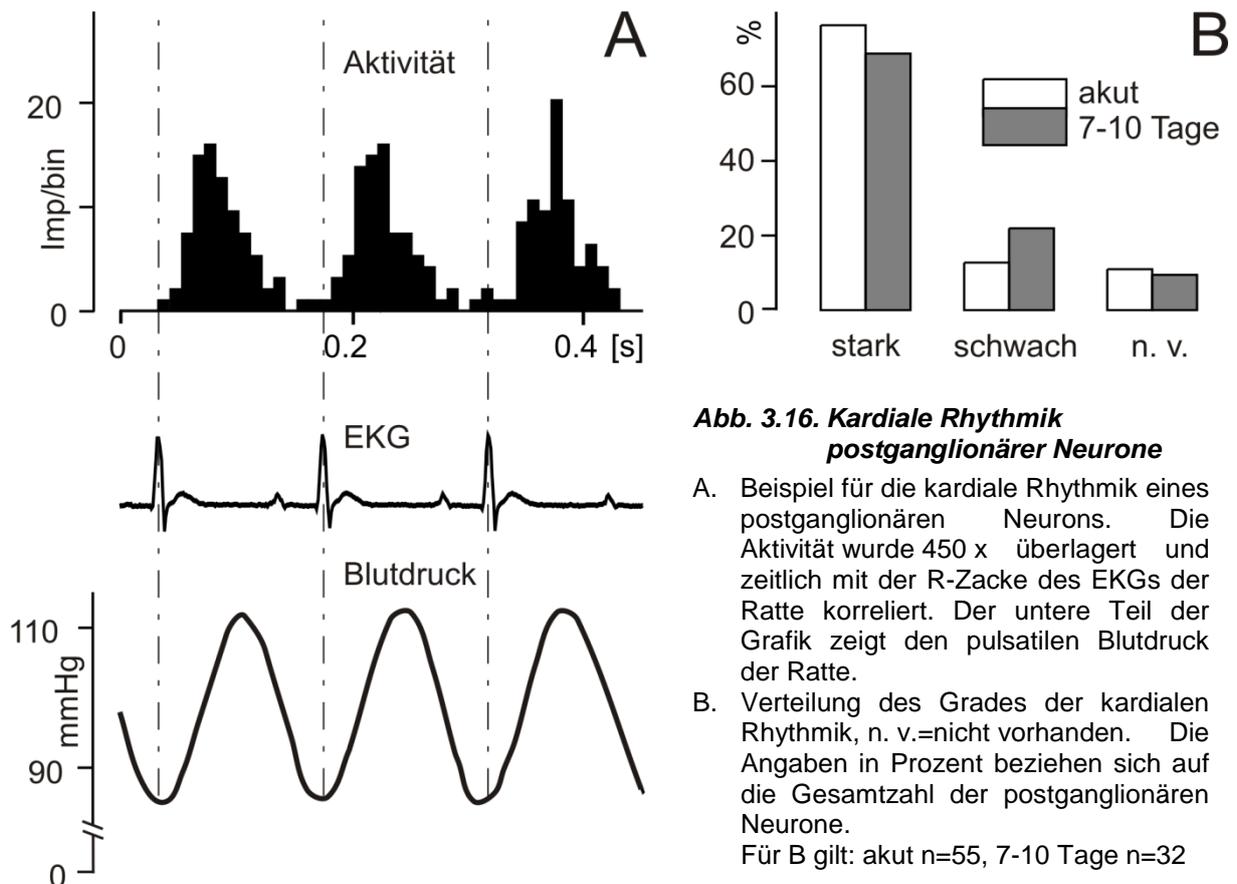
3.4.2. Kardiale Rhythmik

Ein weiteres Charakteristikum zur Identifikation der postganglionären Neurone war die kardiale Rhythmik (Gregor et al. 1977; Blumberg et al. 1980; Blumberg & Jänig 1985; Häbler et al. 1994; Häbler et al. 1999). Diese ist das Korrelat der periodischen afferenten Aktivität von Barorezeptoren, die im Rhythmus der systolisch-diastolischen Blutdruckschwankungen zu einer reflektorischen Hemmung der Vasokonstriktorneurone führt (siehe Abb. 3.16.). Für gewöhnlich prägen kutane Vasokonstriktorneurone eine geringe kardiale Rhythmik ihrer Aktivität aus (für einen detaillierten Überblick siehe Jänig 1988), wobei der Grad der kardialen Rhythmik unter pathologischen Zuständen auch erhöht sein kann (Blumberg & Janig 1983; Blumberg & Janig 1985). In der vorliegenden Studie wurde sie anhand von „Post-R-Zacken-Histogrammen“ ermittelt (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.8.). Dabei wurde die Aktivität der postganglionären Vasokonstriktorneurone in Bezug auf die R-Zacke des EKGs der Ratte gemessen (siehe Abb. 3.16. A). Für weitere Details siehe Häbler et al. (1994).

Für die akut läsionierte Kohorte galt, dass von 55 spontan aktiven C-Fasern 42 (76 %) eine starke, 7 (13 %) eine schwache und 6 (11 %) keine kardiale Rhythmik

aufwiesen. Insgesamt ergab sich aus den Daten eine durchschnittliche kardiale Rhythmik von $71 \pm 20,2\%$ ($\bar{x} \pm s$).

Von den 33 spontan aktiven Fasern der chronisch läsierten Kohorte wiesen 23 (70 %) eine starke, 7 (21 %) eine schwache und 3 (9%) keine erkennbare kardiale Rhythmik auf (siehe Abb. 3.16. B). Daraus ergab sich insgesamt eine durchschnittliche kardiale Rhythmik von $73 \pm 20,5 \%$ ($\bar{x} \pm s$). Zwischen den beiden Kohorten bestand kein statistisch signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Ausprägung der kardialen Rhythmik.



3.4.3. Barorezeptorreflexe

Ein typisches Kriterium von Vasokonstriktorneuronen stellt die Unterdrückbarkeit ihrer Spontanaktivität bei einer Erhöhung des arteriellen Blutdruckes dar. Diese kann experimentell durch eine intravenöse Injektion von Noradrenalin (NA, 1 bzw. 5 μg) ausgelöst werden (Blumberg et al. 1980; Häbler et al. 1994), was zu einer Erhöhung des Blutdruckes um mehr als 50 mmHg führte. In vier Experimenten der akuten

Kohorte wurde NA appliziert und führte erwartungsgemäß zu einer Unterdrückung der Aktivität der postganglionären Neurone. Die Inhibition war meist prompt und vollständig. Abb. 3.17. zeigt ein repräsentatives Beispiel für die Hemmung der Aktivität eines kutanen postganglionären Neurons durch Erhöhung des intraarteriellen Druckes. In einem Fall fand keine Inhibition der spontanen Aktivität statt. Blumberg et al. (1980) schlugen vor, die Neurone, die durch Stimulation von Barorezeptoren unterdrückbar waren, Widerstandsgefäßen zuzuordnen, diejenigen, die keine Unterdrückbarkeit aufwiesen, Kapazitäts- und Shuntgefäßen. Die Reaktion der postganglionären Neurone auf Stimulation von Barorezeptoren mit intravenösen Injektionen von NA wurde nicht weitergehend systematisch untersucht, da die Injektion von NA zu instabilen Vitalparametern bei den Tieren führte. Vorrangiges Ziel dieser Studie war es zudem die axonal auslösbaren Reflexantworten postganglionärer Neurone zu untersuchen (siehe Abschnitt 3.4.4.). Für eine detaillierte Beschreibung der Barorezeptorreflexe von postganglionären Vasokonstriktorneuronen siehe Häbler et al. (1994) und Blumberg et al. (1980).

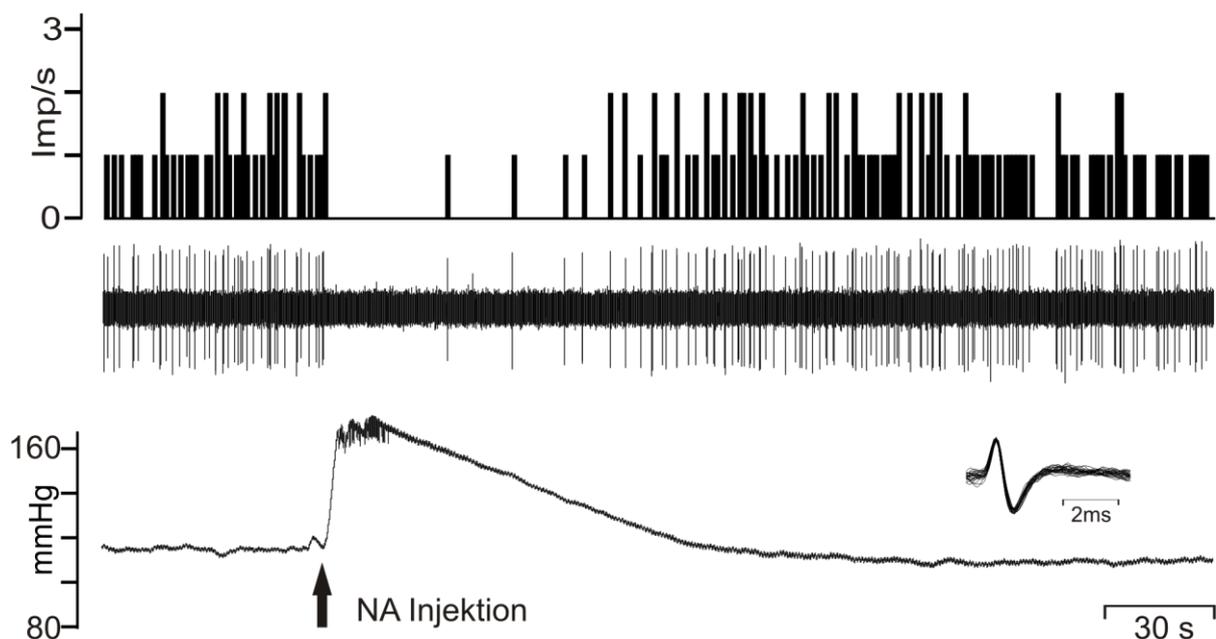


Abb. 3.17. Reflexantworten postganglionärer Neurone - Barorezeptorreflex

Reflektorische Inhibition eines postganglionären Neurons nach intravenöser Injektion von 1 µg Noradrenalin (NA). Gezeigt sind der arterielle Mitteldruck, die Originalaufnahme und ein Histogramm der Aktivität des postganglionären Neurons. Das Einsatzbild zeigt die Aktionspotentiale der C-Faser einige Male überlagert.

3.4.4. Reflexantworten auf noxische Reize

Postganglionäre Vasokonstriktorneurone zeigen eine Inhibition ihrer Aktivität durch noxische Stimulation der Haut der ipsilateralen Seite ihres Innervationsgebietes. Dieses Phänomen ist vermutlich auf die Unterdrückung ihrer spontanen Aktivität über einen Reflexbogen auf spinaler Ebene zurückzuführen (Horeysecck & Jänig 1974; Jänig 1975; Grosse & Jänig 1976). Siehe dazu auch Abschnitt 4.2. .

In der vorliegenden Studie wurde eine reflektorische Unterdrückbarkeit der Aktivität durch noxische Kaltstimuli nicht beobachtet, ebenso wenig wie eine reflektorische Erregung (Abb. 3.19. A). Eine solche reflektorische Erregung wurde auch durch mechanischer Reizung der Haut beobachtet (Häbler et al. 1994), konnte jedoch bei axonaler mechanischer Stimulation nicht beobachtet werden. Allerdings wurde auf die Verwendung von mechanischen Stimuli im noxischen Bereich verzichtet, da dies zwangsläufig zu einer Zerstörung des Nervs und damit zur Beendigung des Experimentes geführt hätte.

Eine inhibitorische Reflexantwort konnte in der vorliegenden Studie nur durch axonale Hitzestimulation nachgewiesen werden (Abb. 3.18. und Abb. 3.19.). Dabei war die Spontanaktivität der läsierten Kohorte im Mittel sowohl vor, als auch nach dem Stimulus signifikant niedriger als die der akut läsierten Kohorte (0,5 Imp/s vs. 0,7 Imp/s; $p < 0,001$, Mann-Whitney-U-Test). Eine Erregung, auch durch moderate Hitzereize, wurde nicht festgestellt. Die Inhibition war, ausgehend von einer Spontanaktivität von 0,7 Imp/s (\bar{x} , akut-Kohorte) und 0,5 Imp/s (\bar{x} , chronisch-Kohorte), für einige Fasern komplett (0 Imp/s, siehe Abb. 3.18. und 3.19.) und ging im durchschnittlichen Minimum auf 0,1 Imp/s (akut) und 0,15 Imp/s (7-10 Tage) zurück (siehe Abb. 3.20.). Die reflektorische Hemmung der Spontanaktivität überdauerte im Mittel den noxischen Reiz. Im Anschluss erreichte die Aktivität der postganglionären Vasokonstriktorneurone wieder ihr Ausgangsniveau (siehe Abb. 3.20.).

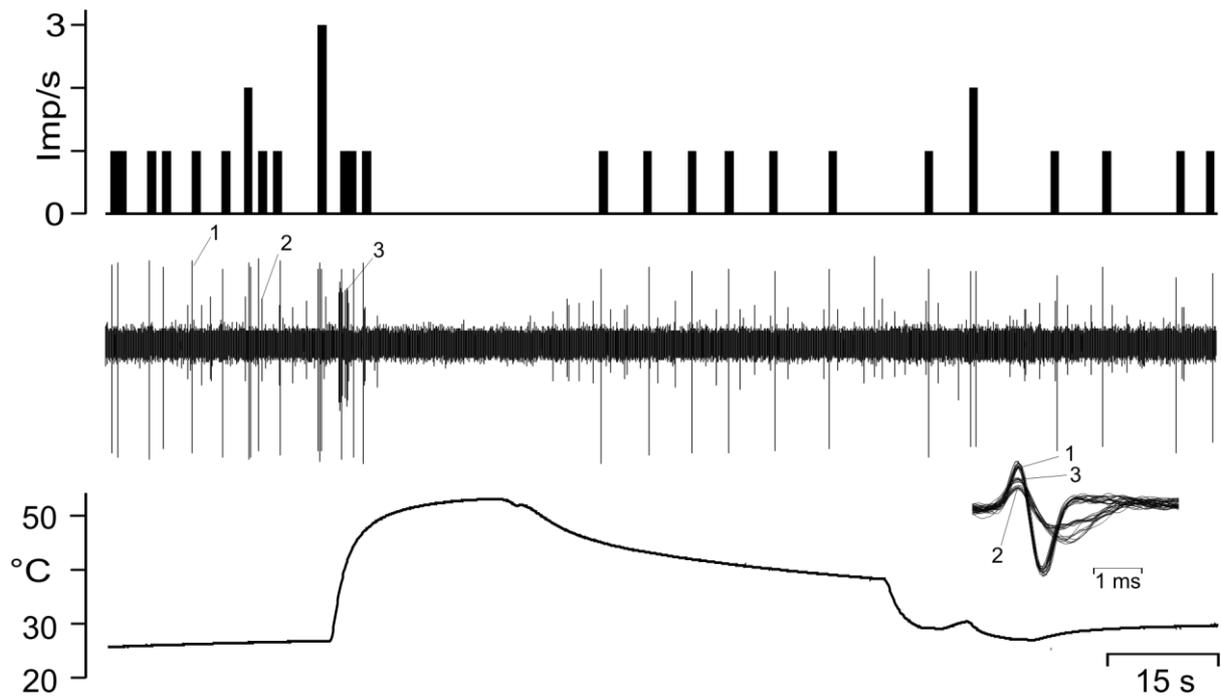


Abb. 3.18. Reflexantworten postganglionärer Neurone auf einen noxischen Hitzereiz

Reflektorische Inhibition von zwei postganglionären Neuronen (1 und 2 im Einsatzbild) auf einen noxischen Hitzereiz (53°C), der mit einer Thermode direkt auf den N. suralis appliziert wurde. Gezeigt sind der Temperaturverlauf, die Originalaufnahme und ein Histogramm. Das Histogramm zeigt nur die Aktivität einer einzelnen Faser (1 im Einsatzbild). Eine weitere C-Faser wird durch den Hitzereiz aktiviert und zeigt keine Spontanaktivität (3 im Einsatzbild). Diese Faser ist afferent.

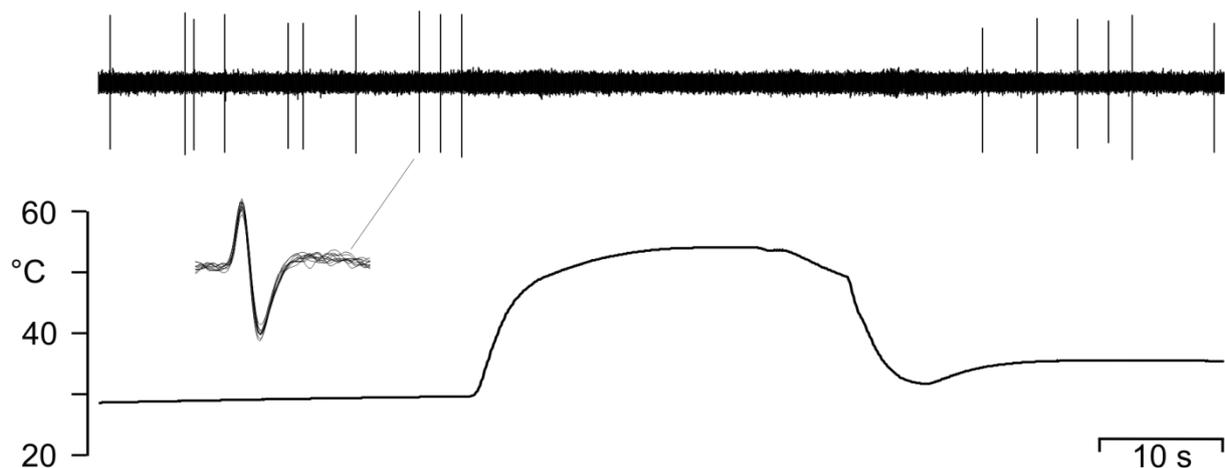


Abb. 3.19. Reflexantwort eines postganglionären Neurons auf einen noxischen Hitzereiz

Die Abbildung zeigt die Originalaufnahme eines postganglionären Vasokonstriktorneurons während eines noxischen Hitzeizes (54 °C). Hier wird deutlich, dass die Unterdrückung der Spontanaktivität des Neurons den Hitzestimulus überdauert.

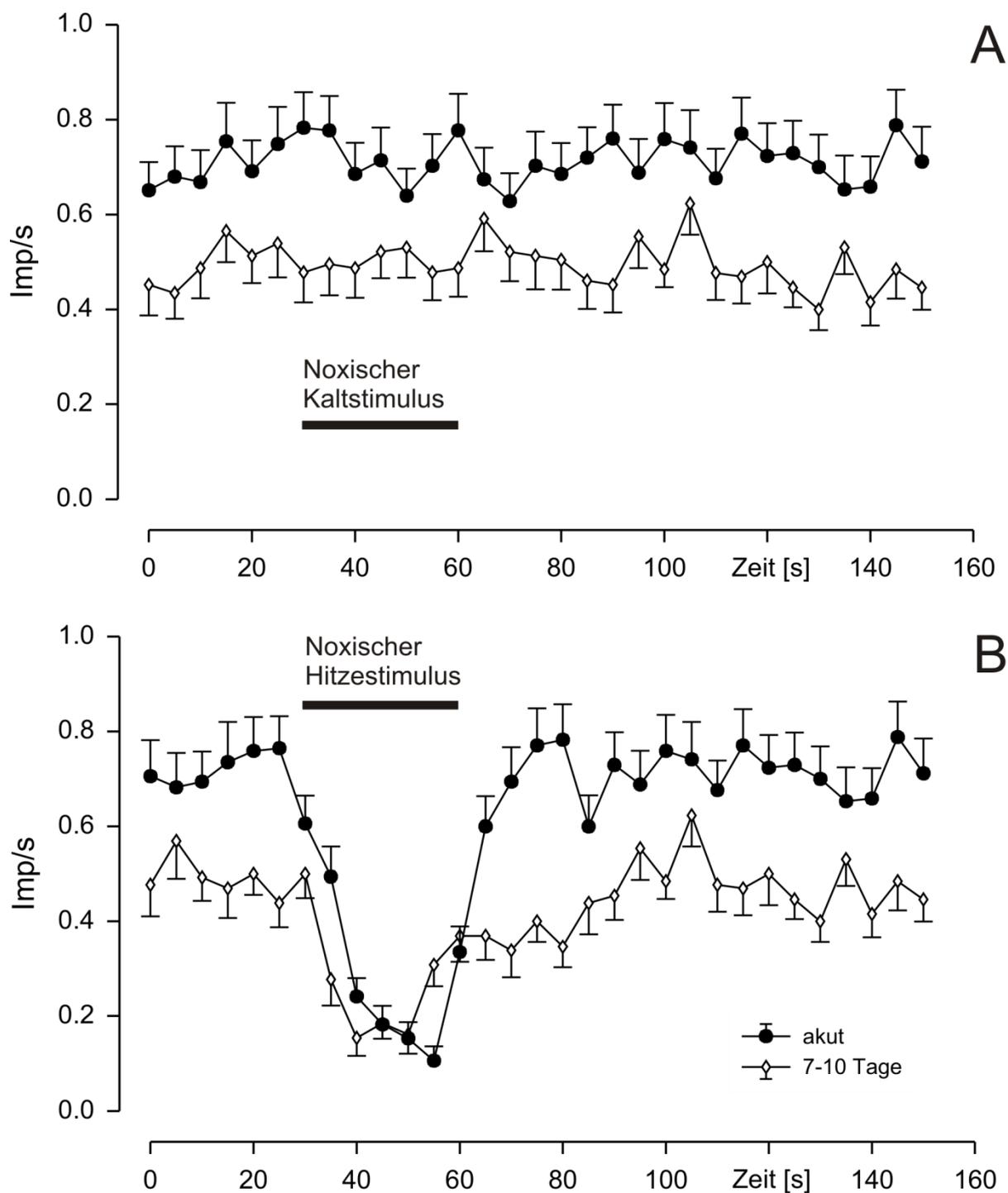


Abb. 3.20. Durchschnittliche Reflexantwort postganglionärer Neurone auf thermische noxische Stimuli

Durchschnittliche Aktivität der postganglionären Neurone vor, während und nach einem noxischen Kalt- (5°C, A) oder Hitzereiz (>50°C, B), der direkt auf den N. suralis appliziert wurde. Die Datenpunkte entsprechen jeweils $\bar{x} \pm \bar{\sigma}_n$, n=35 (akut, Kaltreiz), n=34 (akut, Hitzereiz) und n=26 (7-10 Tage nach Nervenläsion, Hitzereiz), n=24 (7-10 Tage nach Nervenläsion, Kaltreiz). Der horizontale Balken zeigt die Dauer der Reize an.

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Studie war es die axonale Thermo- und Mechanosensibilität von primär afferenten und postganglionären Axonen quantitativ zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass Untergruppen von unmyelinisierten Afferenzen axonale Thermosensibilität aufweisen und dass ihre Reizantwort abhängig von der Reizstärke ist. Dabei ist nicht die gesamte axonale Plasmamembran thermosensibel, vielmehr scheinen die thermosensiblen Areale der Axone diskontinuierlich verteilt zu sein. Diese Feststellung gilt insbesondere für die Hitzesensibilität. Myelinisierte und postganglionäre Axone sind nicht thermosensibel, allerdings wird die Spontanaktivität von postganglionären Neuronen durch noxische Hitzereizung der kutanen Afferenzen reflektorisch gehemmt. Diese reflektorische Hemmung konnte durch noxische Kaltreize nicht nachgewiesen werden.

Die Studie fußt auf den Daten von 397 unmyelinisierten afferenten Axonen, 113 myelinisierten afferenten Axonen und 87 (unmyelinisierten) postganglionären Neuronen. In etwa der Hälfte der Experimente waren die Axone im regenerativen Zustand.

4.1. Zusammensetzung des N. suralis – Anteil der axonal erregbaren Fasern an den elektrisch identifizierten Fasern

Die Faserkomposition des N. suralis der Ratte wurde eingehend untersucht (Peyronnard & Charron 1982; Schmalbruch 1986; Baron et al. 1988). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die Nervenfaserbündel unter visueller Kontrolle mit feinen Uhrmacherpinzetten präpariert. Dabei gab es keine Möglichkeit die Zusammensetzung dieser Bündel zu beeinflussen, was bedeutet, dass jedes Bündel eine zufällige Zusammensetzung von Nervenfasern beinhaltete. Daher sollte die Zusammensetzung des N. suralis hinsichtlich der afferenten und efferenten Axone, die hier bestimmt wurden, der tatsächlichen Zusammensetzung entsprechen und mit den Zahlen bestehender Studien übereinstimmen. Das gilt allerdings nur unter der Annahme, dass die Präparationsmethode nicht zur einer Selektion von schneller

leitenden Axonen führt. In den folgenden Ausführungen sind die Daten der akut- und der chronisch-Kohorte teilweise zusammengefasst worden. Es handelt sich ausdrücklich um den Vergleich zwischen den erhobenen Daten und Schätzwerten aufgrund bestehender Daten. Es wurden folgende Studien in diese Betrachtungen einbezogen: Jenq & Coggeshall (1984), Jenq & Coggeshall (1985), Schmalbruch (1986), Baron et al. (1988), Leem et al. (1993), Grossmann et al. (2009b), Jänig et al. (2009), Teliban et al. (2011).

Der Anteil der axonal erregbaren Fasern scheint auf den ersten Blick relativ gering zu sein. Lediglich 36/274 (13 %) der C-Fasern der akut-Kohorte und 49/210 (23 %) der C-Fasern der chronisch-Kohorte waren durch thermische Stimuli axonal erregbar. Fasst man beide Kohorten zusammen entspricht dies 85/484 (17,6 %) aller C-Fasern (inklusive postganglionärer Vasokonstriktorneurone) bzw. 85/397 (21,4 %) aller afferenten C-Fasern (d. h. wenn man die Zahl der postganglionären Axone abzieht). Vergleicht man diese Ergebnisse allerdings mit den Daten der oben erwähnten Studien, sind die Zahlen plausibel.

Zunächst sei zugrundegelegt, dass 18 % aller unmyelinisierten Nervenfasern nicht durch thermische Stimuli erregbar und sympathisch postganglionär waren (Baron et al. 1988). In dieser Studie wurden tatsächlich 87 postganglionäre Axone anhand ihrer Eigenschaften und Reflexantworten identifiziert, was exakt dem Schätzwert von 87 entspricht (18 % von 484 unmyelinisierten Nervenfasern). Die restlichen 397 C-Fasern müssen afferente Nervenfasern gewesen sein (ein kleiner Teil, der hier nicht berücksichtigt wird, ist „stummen“ postganglionären Vasokonstriktorneuronen zuzuordnen, bei sehr wenigen handelt es sich um Sudomotorneurone, Jänig et al. 1983; Baron et al. 1988). Weiterhin ist auch unter den afferenten Nervenfasern ein bestimmter Teil „stumm“, d. h. unter physiologischen Bedingungen nicht erregbar. Dieser Anteil ist allerdings schwer abzuschätzen, da sich die Angaben in der Literatur stark unterscheiden (Kress et al. 1992; Leem et al. 1993). Daher werden diese ebenfalls nicht mit in die Berechnung einbezogen.

Im nächsten Schritt wird der Anteil der Nervenfasern geschätzt, die durch thermische Stimuli axonal erregbar sind. Die grundlegende Annahme ist dabei, dass es sich bei den Nervenfasern, die axonal erregbar sind, um die gleiche Population handelt, die unter regenerativen Bedingungen ektop erregbar ist. Diese Nervenfasern machen

einen Anteil von 54 % aus (Grossmann et al. 2009b). Bezogen auf die 397 afferenten C-Fasern entspricht dies einer Zahl von 214 C-Fasern. Es ist zu erwarten, dass ca. 21 % dieser 214 C-Fasern Typ-1-kaltsensibel sind (Grossmann et al. 2009b), von denen wiederum 96% axonal erregbar sind (Teliban et al. 2011), d. h. 43 C-Fasern (20 % von 214 Fasern). Da eine Differenzierung zwischen Typ-2-kaltsensiblen und rein hitzesensiblen Afferenzen unter den experimentellen Bedingungen nicht möglich ist, wird diese Gruppe als „thermosensibel, aber nicht ausschließlich Typ-1-kaltsensibel“ zusammengefasst. In dieser Gruppe müssten zwischen 62 % und 34 % der C-Fasern sein, je nachdem, welchen Anteil mechanosensibler C-Fasern man unterstellt. Diese mechanosensiblen C-Fasern machen zwischen 17 und 45 % aus und gelten als nicht axonal erregbar (Teliban et al. 2011). Die thermosensiblen C-Fasern, die keine Typ-1-Kaltsensibilität aufweisen, sind zu etwa 36 % axonal erregbar (Teliban et al. 2011), was einem absoluten Wert zwischen 26 und 48 C-Fasern entspricht (22-12 % von 214 Fasern). Fasst man die Erwartungswerte der thermosensiblen Afferenzen zu einer Gesamtgruppe zusammen, würde man erwarten, dass insgesamt zwischen 69 (17,4 %) und 91 (22,9 %) der 397 afferenten C-Fasern durch thermale Stimuli axonal erregbar sind. In der vorliegenden Studie wurde ein Anteil von 21,4 % durch thermische Stimuli erregbare C-Fasern gemessen. Dieser Wert entspricht dem Erwartungswert (siehe Tab. 4.1.).

Der Anteil der postganglionären Vasokonstriktorneurone stimmt ebenfalls mit dem Erwartungswert überein. Sie machten in der Akut-Kohorte etwa 20% aller unmyelinisierten Fasern aus (55/274), in der 7-10-Tage-Gruppe 15 % (32/210), verglichen mit 18 % (87/484) bei Baron et al. (1988). Es ist zu beachten, dass sich die Angaben in Prozent jeweils auf alle unmyelinisierten Nervenfasern beziehen.

Insgesamt lässt sich sagen, dass die vorliegenden Daten sehr gut zu bereits bestehenden Daten passen und sich dadurch der relativ geringe Anteil der axonal erregbaren Nervenfasern, gemessen an der Zahl der elektrisch identifizierten Fasern, erklären lässt.

In der folgenden Tabelle (Tab. 4.1.) sind die tatsächlich gemessenen Werte grau hinterlegt, weiß hinterlegt sind die Schätzwerte, die aufgrund bestehender Studien berechnet wurden. Die Tabelle bettet den Anteil der axonal erregbaren C-Fasern in einen plausiblen Kontext.

	akut	7-10 Tage	Gesamt
C-Fasern Anzahl elektrisch <u>gemessen</u>	274	210	484
A-Fasern Anzahl elektrisch <u>gemessen</u>	47	66	113
A- und C-Fasern Anzahl gesamt, elektrisch <u>gemessen</u>	321	276	597
C-Fasern in % <u>gemessen</u> (Literatur: 72 % Schmalbruch et al., 80 % Jenq et al.1985)	85%	76%	81%
A-Fasern in % <u>gemessen</u> (Literatur: 28 % Schmalbruch et al., 20% Jenq et al. 1985)	15%	24%	19%
<u>Geschätzte</u> Anzahl postggl. 18 % (Baron et al. 1988) 321/276	49	38	87
<u>Gemessene</u> Anzahl postganglionärer Neurone	55	32	87
<u>Geschätzte</u> Anzahl afferenter C-Fasern mit thermo-/ mechanosensibler C-Fasern (alle "gemessenen" C-Fasern minus "gemessene" postganglionäre)	219	178	397
<u>Geschätzte</u> Anzahl afferenter C-Fasern mit ektopter Erregbarkeit (54% von 219 bzw. 178; Grossmann et al. 2009, Baron et al. 1988)*	118	96	214
<u>Geschätzte</u> Anzahl axonal erregbarer (96% Teliban et al. 2011)Typ-1-kaltsensibler C-Fasern (21% Jänig et al. 2009) der potentiell ektopter erregbaren Fasern (118/96)**	24	19	43
<u>Gemessene</u> Anzahl kaltsensibler Axone	19	29	48
<u>Geschätzte</u> Anzahl hitzesensibler und Typ-2-kaltsensibler C-Fasern (62% Jänig et al. 2009) davon ca. 36% axonal erregbar (Teliban et al. 2011), bei 17% mechanosensiblen C-Fasern***	26	21	48
<u>Geschätzte</u> Anzahl hitzesensibler und Typ-2-kaltsensibler C-Fasern (62% Jänig et al. 2009) davon ca. 36% axonal erregbar (Teliban et al. 2011), bei 45% mechanosensiblen C-Fasern***	14	12	26
<u>Gemessene</u> Anzahl hitzesens. bzw. hitze- und kältesensibler Axone	17	20	37
<u>Geschätzter</u> Anteil der C-Fasern, die durch thermische Stimuli erregt werden können (Jänig et al. 2009, Teliban et al. 2011)***	von 17,4% bis 22,9%		
<u>GEMESSENER</u> Anteil der C-Fasern, die durch thermische Stimuli erregt werden können	21,40%		

Tabelle 4.1. Faserkomposition des N. suralis, Vergleich zwischen gemessenen und erwarteten Werten

Die Tabelle zeigt einen Vergleich zwischen der Anzahl der gemessenen afferenten und efferenten Nervenfasern und Schätzwerten, die auf vorhergehenden Studien basieren (Jenq & Coggeshall 1985; Schmalbruch 1986; Baron et al. 1988; Grossmann et al. 2009b; Jänig, W. et al. 2009; Teliban et al. 2011).

* 54% aller afferenten C-Fasern. Bei Grossmann et al. (2009) sind 49,2 % aller C-Fasern (inklusive postganglionärer) ektopter erregbar. Es wird angenommen, dass 14 % aller C- und A-Fasern, bzw. 18 % aller unmyelinisierten Fasern im N. suralis postganglionäre Axone sind (Baron et al. 1988).

** Gemessen an der Anzahl der Neurone, die potentiell ektopter erregbar sind. Dieser Schätzung liegt die Annahme zugrunde, dass alle Afferenzen, die nicht ektopter vom Schädigungsort aus erregbar sind auch nicht axonal erregbar sind.

*** Diese beiden Werte geben eine Spanne an je nachdem, ob man 17% oder 45% mechanosensible C-Fasern zugrunde legt (Jänig et al. 2009).

4.2. Axonale Thermosensibilität - Allgemeines

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es nur hinsichtlich des Anteils der axonal thermosensiblen C-Fasern einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kohorten gab. In der Akut-Kohorte waren 36/219 (16,4 %) C-Fasern thermosensibel, in der chronisch-Kohorte 49/178 (27,5 %). Dieser Unterschied ist statistisch hoch signifikant ($p = 0,007$, χ^2 -Test) und könnte darauf beruhen, dass es nach einer Nervenläsion zu einem Untergang von kleinkalibrigen kutanen afferenten und efferenten Neuronen mit unmyelinisierten Axonen kommt (Jänig & McLachlan 1984, Vestergaard et al. 1997, Hu, P. & McLachlan 2003, siehe auch Abschnitt 3.1.). Eine Vermutung, die daraus resultiert ist, dass dickere unmyelinisierte Axone leichter axonal erregbar sind. Bei einer relativen Erhöhung des Anteils von dicken unmyelinisierten Axonen in der chronisch-Kohorte aufgrund des Untergangs der dünnen, würde dies den höheren Anteil der axonal erregbaren Nervenfasern erklären. Zudem geht die Erhöhung des erregbaren Anteils hauptsächlich auf die kaltsensiblen Afferenzen zurück, die, zumindest was die Typ-1-Kaltsensibilität betrifft, leichter axonal erregbar sind (Teliban et al. 2011).

Die Reizschwellen der hitzesensiblen C-Fasern unterschieden sich zwischen den beiden Kohorten nicht ($p = 0,64$, Mann-Whitney-U-Test). Dies gilt auch für die kaltsensiblen C-Fasern ($p = 0,58$, Mann-Whitney-U-Test). Hinsichtlich des Grades der axonalen Erregbarkeit wurde ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt (siehe Abb. 3.5., 3.6., 3.9. und 3.10.). Dies gilt sowohl für die kaltsensiblen C-Fasern ($p = 0,77$, Mann-Whitney-U-Test), als auch für die hitzesensiblen C-Fasern ($p = 0,09$, Mann-Whitney-U-Test). Es scheint sowohl für die kaltsensiblen als auch für die hitzesensiblen C-Fasern keine Rolle für die Reizantwort zu spielen, wo im Verlauf des Nervs gereizt wurde (proximal vs. distal im Verlauf, siehe Abb. 2.2., Abb. 3.6. und Abb. 3.10.). Die Reizantworten, die von verschiedenen Arealen aus evoziert wurden, unterschieden sich nicht (siehe Abb. 3.8. und Abb. 3.4.), konnten allerdings hinsichtlich der Reizschwelle differieren. Eine Beobachtung ist, dass die axonale Erregbarkeit der individuellen Afferenzen auf bestimmte Areale entlang des Nervens beschränkt zu sein scheint (siehe Abb. 3.5. A und Abb. 3.9. A). Dieses Phänomen wird besonders bei den hitzesensiblen C-Fasern deutlich. Das könnte bedeuten, dass es, ähnlich wie auf der Haut, distinkte rezeptive Felder im

axonalen Verlauf gibt. Diese entsprechen eventuell Arealen, an denen eine Akkumulation von Transduktionsmolekülen auftritt. Eine Unterscheidung zwischen Typ-1- und Typ-2-kaltsensiblen Afferenzen ist aufgrund der hier vorliegenden Messungen nicht möglich (siehe Abschnitt 3.2.5. und 4.2.2.).

4.2.1. Axonale Hitzesensibilität

Ein Großteil der hitzesensiblen Nervenfasern wies axonale Reizschwellen ≥ 50 °C auf (siehe Abschnitt 3.2.1. und 3.2.2., Abb. 3.5. B). Daher ist zu vermuten, dass nicht alle in einem Filament enthaltenen hitzesensiblen Nervenfasern durch axonale Hitze-Stimulation erregt werden konnten, da darauf verzichtet wurde, höhere Temperaturen als 55 °C zu applizieren. Temperaturen dieser Höhe können zu einer Sensibilisierung, Desensibilisierung oder Zerstörung von afferenten Nervenfasern führen. Verglichen mit den Daten von Hoffmann et al. (Reizschwelle: $41,5 \pm 4,3$ °C, $\bar{x} \pm s$) und Teliban et al. (Reizschwelle: $45,5 \pm 0,67$ °C, $\bar{x} \pm s$) sind die Reizschwellen recht hoch (Hoffmann et al. 2008; Teliban et al. 2011). Allerdings handelt es sich in der Studie von Hoffmann et al. um eine Studie an isolierten Haut-Nervenpräparaten der Maus, die daher nur bedingt vergleichbar ist. Die mittlere Stärke der Reizantworten liegt demgegenüber allerdings in einem vergleichbaren Bereich. Der Unterschied zu Teliban et al. (2011) liegt auch im experimentellen Prozedere, da sehr genau darauf geachtet wurde, dass die axonale Erregbarkeit auf einem Areal des Nervs getestet wurde, das auf die Stimulation mit Hitze am sensibelsten reagierte. In der vorliegenden Studie wurde darauf keine Rücksicht genommen. Es wurde vielmehr versucht eine Aussage über das Verteilungsmuster (kontinuierlich vs. diskontinuierlich) der axonalen Erregbarkeit zu treffen, indem unabhängig von der Stärke der Reizantwort fünf Areale entlang des N. suralis getestet wurden. Die Reizschwellen konnten innerhalb dieser Areale recht stark schwanken und individuell bis zu 12 °C voneinander abweichen. So lagen die maximal gemessenen Reizschwellen mit $51,5 \pm 2,6$ °C signifikant höher als die minimal gemessenen mit $48,9 \pm 3,5$ °C ($\bar{x} \pm s$, $p < 0.001$, Mann-Whitney-U-Test, die Daten beider Kohorten wurden bei dieser Berechnung zusammengefasst).

In der vorliegenden Studie zeigten etwa 10 % aller afferenten C-Fasern axonale Hitzesensibilität (37/397 C-Fasern), was den Befunden von Blenk et al. (1996) bei akut axotomierten Nervenenden entspricht. Diese Übereinstimmung legt nahe, dass in der Studie von Blenk et al. (1996) nichts anderes gemessen wurde als das Phänomen der axonalen Sensibilität. Die axonale Hitzesensibilität lässt sich auch durch die Beobachtungen von Sauer et al. (1999, 2001) sowie Fischer et al. (2003) plausibel erklären. In vitro wurde gezeigt, dass die Applikation von noxischen Hitzereizen bzw. Protonen, appliziert auf den N. ischiadicus der Ratte, dazu führte, dass Calcitonin gene related peptide (CGRP) sezerniert wurde, was für ein Vorkommen des TRPV1 Rezeptors in der axonalen Plasmamembran spricht. Zudem wiesen Bernardini et al. (2004) den TRPV1-Rezeptor in der axonalen Plasmamembran markloser Nervenfasern peripherer Nerven elektronenmikroskopisch nach und zeigten, dass es durch Stimulation mit Capsaicin zur vesikulären Exozytose von CGRP kommt (Bernardini et al. 2004).

Was das quantitative Ausmaß der axonalen Erregbarkeit angeht, konnte in der vorliegenden Studie kein grundlegender Unterschied zwischen den beiden untersuchten Kohorten gefunden werden. In der Gruppe der Tiere mit akuter Nervenläsion war eine Aktivität von 42 %, in der 7-10-Tage-Kohorte von 45% der getesteten Areale auslösbar. Allerdings fiel auf, dass eine Aktivierung vornehmlich durch Reizung der weiter distal befindlichen Areale auslösbar war. Da dieses Phänomen sowohl in der akut- als auch in der chronisch-Kohorte auftrat, ist es unwahrscheinlich, dass dies am regenerativen Zustand der Axone in der chronisch-Kohorte lag. Vielmehr dürfte es sich um ein experimentelles Problem handeln, da immer zunächst die am weitesten distal gelegenen Areale getestet wurden, was im Verlauf zu einer Desensibilisierung der afferenten Nervenfasern geführt haben könnte.

Die grundsätzlichen Beobachtungen stimmen mit bestehenden Studien überein. Afferente Axone sind durch axonale Reizung mit Hitze erregbar und weisen graduierte Reizantworten auf. Die Areale, von denen aus diese Afferenzen erregt werden können, sind diskontinuierlich entlang des axonalen Verlaufs verteilt.

4.2.2. Axonale Kältesensibilität

Die Typ-1-kältesensiblen C-Fasern sind nicht-nozizeptive Afferenzen, die eine niedrige Reizschwelle für Kältereize haben und selten zusätzlich hitzesensibel sind. Der entscheidende Rezeptor für diese Eigenschaft ist vermutlich der mentholsensible Kanal TRPM8 (McKemy et al. 2002; Story et al. 2003; Bandell et al. 2004; Bautista et al. 2006; Madrid et al. 2006). Dieser Rezeptor kann durch topische Applikation von Menthol zu einer Aktivierung von Typ-1-kältesensiblen Afferenzen führen (unpublizierte Beobachtung Teliban et al. 2012). Eine ursächliche Zunahme der quantitativen Erregbarkeit entlang des axonalen Verlaufs, bedingt durch den regenerativen Zustand der Nervenfasern 7-10 Tage nach einer Nervenläsion, von 45 % auf 56 % kann diskutiert werden, steht allerdings im Gegensatz zu den Befunden (akut/chronisch) bei den hitzesensiblen Fasern.

Teliban et al. (2011) haben im Gegensatz zu Hoffmann et al. (2008) gezeigt, dass die Kältesensibilität nicht auf die axonalen Enden in der Haut beschränkt ist, sondern auch entlang des axonalen Verlaufs evozierbar ist. Die axonale Erregbarkeit wurde dabei insbesondere für Typ-1-kältesensible C-Fasern (nahezu 100 % axonale Erregbarkeit) nachgewiesen und weniger ausgeprägt für Typ-2-kältesensible C-Fasern (etwa 1/3 axonale Erregbarkeit). Dieses Ergebnis wurde durch die vorliegende Studie bestätigt, auch wenn es bedingt durch das experimentelle Prozedere nicht möglich war, zwischen Typ-1- und Typ-2-kältesensiblen C-Fasern zu unterscheiden, da keine Spontanaktivität registriert werden konnte. Es wurde kein Unterschied zwischen den Reizantworten von kältesensiblen C-Fasern gefunden, die von 1-2 oder von 3-5 Arealen entlang des N. suralis aus erregt werden konnten (siehe Abb. 3.12.). Somit scheint es hinsichtlich des Verteilungsmusters der axonalen Kältesensibilität keinen Unterschied zwischen Typ-1- und Typ-2-kältesensiblen Afferenzen zu geben. Zudem ist es zu erwarten, dass es sich bei den axonal erregbaren kältesensiblen Afferenzen lediglich in 25 % der Fälle um Typ-2-kältesensible Neurone handelt (d. h. 12/48 kältesensiblen C-Fasern, Grossman et al. 2009, Teliban et al. 2011), was eine Differenzierung möglicherweise ebenfalls erschwert.

Eine Erklärung dafür, warum in vorhergehenden Studien (Lawson, J. J. et al. 2008; Jankowski et al. 2009), die an intakten und regenerierenden C-Fasern des N. suralis

bzw. an Nn. dorsales zur haarigen Haut der Maus durchgeführt wurden, nahezu keine Kältesensibilität nachgewiesen werden konnte, kann an dieser Stelle nicht gegeben werden.

Für die Reizschwellen der kaltsensiblen Axone gilt ähnliches, wie für die hitzesensiblen: Die Reizschwellen individueller Nervenfasern schwankten ebenfalls in den gereizten Arealen recht stark. Die minimal gemessenen Reizschwellen lagen mit $9,6 \pm 5,6$ °C signifikant niedriger als die maximal gemessenen mit $12,5 \pm 6,1$ °C ($\bar{x} \pm s$, $p < 0.05$, Mann-Whitney-U-Test, die Daten beider Kohorten wurden bei dieser Berechnung zusammengefasst).

4.3. Axonale Mechanosensibilität

Hitzesensible C-Fasern sind nozizeptiv und vermutlich meistens polymodal (zusätzlich kalt- und/oder mechanosensibel). Wie bereits von Teliban et al. gezeigt wurde, scheint die Mechanosensibilität allerdings auf die rezeptiven Enden in der Haut bzw. auf die axonalen Enden regenerierender C- und A-Fasern beschränkt zu sein (Gorodetskaya et al. 2003; Gorodetskaya et al. 2009; Jänig, W. et al. 2009; Teliban et al. 2011). Axonale Mechanosensibilität konnte in dieser Studie für nur sehr wenige A-Fasern nachgewiesen werden. Bei diesen Afferenzen handelte es sich vermutlich um epineurale Afferenzen (Hromada 1963; Sauer et al. 1999; Bove 2008). Möglicherweise können sehr starke mechanische Stimuli die axonale Membran mechanosensibler Afferenzen depolarisieren und Aktionspotentiale generieren. Allerdings wurde in dieser Studie darauf verzichtet derartige Stimuli zu applizieren, da dies unweigerlich zu einer Beschädigung der Axone geführt hätte. In der vorliegenden Studie wurden lediglich mechanische Stimuli bis 100 mN (dies entspricht einem von-Frey-Haar der Stärke 12) appliziert und damit gezeigt, dass Stimuli dieser Größenordnung keine Erregung kutaner afferenter C-Fasern hervorrufen. Unter inflammatorischen und regenerativen Bedingungen ändern sich diese Verhältnisse jedoch. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit dem kompletten Freund's Adjuvans zur Ausprägung axonaler Mechanosensibilität von unmyelinisierten afferenten C-Fasern und dünn myelinisierten afferenten A- δ -Fasern führt (Bove et al. 2003; Dilley et al. 2005; Dilley & Bove 2008b; Dilley & Bove 2008a; Bove 2009). Diese ektopen Mechanosensibilität tritt insbesondere bei Axonen auf, die

tief-somatische Gewebe innervieren, was eine Rolle bei chronischen Entzündungsschmerzen spielen kann. Die Transduktionsmechanismen, die hinter der Mechanosensibilität stehen, sind bis heute weitgehend unverstanden; aber es liegt nahe, dass es mehr als einen Mechanismus der Transduktion von mechanischen Reizen gibt (Lewin & Moshourab 2004; Kung 2005; Hu, J. et al. 2006; Lumpkin & Caterina 2007). Allerdings scheint sie auf die rezeptiven Enden in der Haut oder regenerierende Nervenenden beschränkt zu sein.

4.4. Postganglionäre Vasokonstriktorneurone - Spontanaktivität

Verglichen mit vorhergehenden Studien war die Entladungsrate der Vasokonstriktorneurone relativ gering (Jänig & Kümmel 1977; Häbler et al. 1994; Johnson & Gilbey 1996; Häbler et al. 1999). Hier lagen die Entladungsraten bei $1,1 \pm 0,4$ Imp/s ($\bar{x} \pm s$), $1,12 \pm 0,65$ Imp/s ($\bar{x} \pm s$), $0,81 \pm 0,04$ Imp/s ($\bar{x} \pm \delta_n$) und bei $1,0$ Imp/s (\bar{x}) bei intakten Nerven. Die Daten von Jänig und Kümmel (1977) stammen von der Katze, die der anderen Studien von postganglionären Neuronen, die die Schwanzarterie der Ratte innervieren und somit nur bedingt vergleichbar sind. Weiterhin fällt auf, dass die durchschnittliche Frequenz der Ruheaktivität in der 7-10-Tage-Kohorte signifikant niedriger war als die der Akut-Kohorte ($p < 0,01$, Mann-Whitney-U-Test). Dieses Ergebnis ließe sich mit der Beobachtung vereinbaren, dass es z. B. nach einem operativen Eingriff (mit oder ohne Nervenläsion) zu einer Hyperämie und einer Ruhigstellung im operierten Gebiet kommt. Auch während der frühen Phase des komplexen regionalen Schmerzsyndroms mag dies eine Rolle spielen. Hier kommt es im Wesentlichen zu den klassischen Zeichen einer Entzündung: Schwellung, Rötung, Überwärmung, Schmerz, Funktionsstörung. Vor allem die Schwellung, Rötung und Überwärmung lassen sich durch eine eingeschränkte Aktivität von postganglionären Vasokonstriktorneuronen erklären. Allerdings lässt sich diese verminderte Aktivität nur auf Umwegen erklären: Nervenläsionen führen zu ektopter Spontanaktivität in geschädigten afferenten Neuronen (Jänig 1988; Koschorke et al. 1991; Michaelis et al. 1995; Michaelis et al. 2000; Gorodetskaya et al. 2003; Devor 2009; Gorodetskaya et al. 2009; Grossmann et al. 2009a). Unter normalen Umständen führt die noxische Reizung der Haut über

einen spinalen Reflexbogen zur Hemmung von postganglionären Vasokonstriktorneuronen und damit zu einer Erweiterung der innervierten Gefäße (Lovén 1866; Horeysek & Jänig 1974; Jänig & Kümmel 1977; Jänig 1985; Häbler et al. 1994). Es liegt nahe, dass auch ektope Aktivität afferenter C-Fasern über diesen spinalen Reflexbogen (Bove 2009) zu einer Hemmung der Spontanaktivität im Innervationsterritorium der kutanen Vasokonstriktorneurone führen kann. Dieser Reflex wurde bei Katzen und Ratten beschrieben und existiert vermutlich auch beim Menschen. Dieses Phänomen wurde bereits von Bove et al. (2009) beschrieben, allerdings lagen hier die Entladungsraten der postganglionären Vasokonstriktorneurone bedeutend höher ($2,26 \pm 1,33$ Imp/s bei Kontrolltieren, $1,48 \pm 1,23$ Imp/s unter inflammatorischen Bedingungen, $\bar{x} \pm s$) als in der vorliegenden Studie. Eine Vermutung ist allerdings, dass hier ein Fehler bei der Analyse der laufenden Aktivität unterlaufen ist, da die repräsentative Aufnahme eines postganglionären Neurons (Fig. 2. A., Bove 2009) eindeutig die Aktivität von mindestens zwei Neuronen zeigt. Allerdings zeigen sie eine Unterdrückung durch die Injektion von Noradrenalin und den damit verbundenen Anstieg des arteriellen Blutdruckes. Eventuell müsste, sofern es sich hier um einen systematischen Fehler handelt, die Frequenz deutlich nach unten korrigiert werden. Dennoch ist es ein Ergebnis von Bove (2009), dass es unter inflammatorischen (und somit regenerativen) Bedingungen zu einer Erniedrigung der Aktivität von postganglionären Neuronen kommt. Dieser Befund wurde auch in der vorliegenden Studie deutlich.

Der Grad der kardialen Rhythmik von kutanen Vasokonstriktorneuronen wurde in bestehenden Studien gering eingestuft (Gregor et al. 1977; Blumberg et al. 1980; Janig & Szulczyk 1980; Janig & Szulczyk 1981; Janig 1984; Blumberg & Janig 1985). Bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde der Großteil der postganglionären Vasokonstriktorneurone unabhängig davon, ob eine akute oder chronische Nervenläsion vorlag, als hoch kardiorhythmisch in ihrer Aktivität eingestuft (akut: $71 \% \pm 20,2\%$, chronisch: $73\% \pm 20,5\%$, $\bar{x} \pm s$). Eine theoretische Erklärung wäre, dass die Aktivität in einem Teil der postganglionären Neurone durch ektope afferente Aktivität reflektorisch gehemmt wurde, was möglicherweise insbesondere für postganglionäre Neurone mit einer niedrigen kardialen Rhythmik gilt. Dieses Phänomen könnte zu einer Erhöhung des Anteils kardiorhythmischer Vasokonstriktorneurone führen.

4.5. Postganglionäre Vasokonstriktorneurone – Reflexantworten auf noxische Reize

Bei Häbler et al. (1994) wurde die Reflexantwort von muskulären und kutanen Vasokonstriktorneuronen durch Stimulation der Haut des Abdomens oder der Hinterpfote mit noxischen mechanischen Reizen und Kälte (als Kältereiz diente Chloräthylsprit) untersucht. Dabei zeigten 46 % der kutanen Vasokonstriktorneurone eine Unterdrückung, 37 % eine Aktivierung und 18 % keine Antwort auf eine Kaltreizung. Für die mechanische Reizung im noxischen Bereich gelten folgende Zahlen: 53 % zeigten eine Unterdrückung, 19 % eine Aktivierung und 28 % keine Antwort. Hier wurde auch gezeigt, dass ein hoher Grad der kardialen Rhythmik mit einer geringen Ausprägung der inhibitorischen Reflexe korrelierte oder diese Neurone zu einer Aktivierung neigten.

Eine inhibitorische Reflexantwort von kutanen Vasokonstriktorneuronen durch axonale Stimulation mit Kälte oder mechanischen Reizen konnte in den Experimenten der vorliegenden Studie nicht ausgelöst werden. Es wurde allerdings gezeigt, dass ihre spontane Aktivität durch axonale Hitzestimulation inhibiert werden konnte. Eine Aktivierung konnte durch keinen Reiz erreicht werden. Eine Erklärung dafür, dass sich postganglionäre Vasokonstriktorneurone bei axonaler Reizung anders verhalten, als bei der kutanen Reizung, ist schwierig. Man könnte annehmen, dass die Reflexantwort durch die Hitzeapplikation so ausgeprägt war, weil die applizierten Temperaturen entsprechend hoch genug waren. Die Reizschwelle der hier beschriebenen hitzesensiblen Neurone lag im Mittel bei ca. 50 °C und damit relativ hoch. Eine Erklärung dafür ist, dass in der vorliegenden Studie nicht gezielt die sensibelsten Areale im axonalen Verlauf, sondern systematisch fünf Areale entlang des Nervens getestet wurden und die mittlere Reizschwelle berechnet wurde (siehe Abschnitt 4.2.1.). Vermutlich erregte die Reizung des N. suralis auch hitzesensible Afferenzen (deren Reizantwort in der Ableitung nicht registriert wurde) in ihren empfindlichsten Arealen, was wiederum zur reflektorischen Hemmung der postganglionären Vasokonstriktorneurone führte. Dieser Umstand galt allerdings auch für die kaltsensiblen Nervenfasern (siehe Abschnitt 4.2.2.), was es umso erstaunlicher macht, dass eine reflektorische Hemmung durch Kaltreize nicht auftrat. Eine Begründung dafür wäre, dass die axonale Kaltreizung laut Teliban et al. (2011)

in nozizeptiven Typ-2-kaltsensiblen Axonen nur wenige Aktionspotentiale auslöst. Wird der inhibitorische Reflex über diese Afferenzen vermittelt, kann die Kombination aus ihrer hohen Reizschwelle und der niedrigen Reizantwort der Grund dafür sein, dass es nicht zur Auslösung des Reflexes kam.

Eine Reflexantwort auf mechanische Stimuli war nicht zu erwarten, da die Stimuli lediglich bis zu einer Höhe von 100 mN appliziert wurden und damit deutlich unterhalb des noxischen Bereichs lagen. Auf eine Applikation höherer Kräfte wurde verzichtet, da dies zu einer Schädigung der Axone geführt hätte.

5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Studie war, das Verhalten von kutanen myelinisierten und unmyelinisierten Afferenzen und Efferenzen durch axonal applizierte thermische und mechanische Stimuli quantitativ zu beschreiben. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde der N. suralis von Ratten systematisch auf fünf definierten Abschnitten mit Kälte-, Hitze- und mechanischen Stimuli gereizt und die Reizantwort von afferenten und efferenten Nervenfasern mit elektrophysiologischen Methoden registriert. Es wurden Daten von insgesamt 101 Nervenfaserbündeln ausgewertet, die im Rahmen von 26 Experimenten (11 Tiere mit akuter Nervenläsion und 15 Tieren mit chronischer Nervenläsion) erfasst wurden. Dabei wurden in beiden Kohorten insgesamt 597 Axone untersucht, von denen 87 als efferent (von postganglionären Vasokonstriktorneuronen) und 510 als afferent identifiziert wurden. Von den 510 afferenten Nervenfasern waren 397 unmyelinisierte und 113 myelinisierte Axone. Von den 397 unmyelinisierten Axonen konnten 85 (21,4 %) durch axonale Thermostimulation erregt werden, wobei die kaltsensiblen Afferenzen etwas häufiger erregbar zu sein schienen als die hitzesensiblen (56% kaltsensibel, 44% hitzesensibel).

In beiden Kohorten zeigten die afferenten Nervenfasern ein graduiertes Reizantwortverhalten. Die Reizschwellen der Afferenzen lagen in der akut-Kohorte bei $12,5 \pm 5,1$ °C für kaltsensible und $50,6 \pm 2,4$ °C für hitzesensible und in der chronisch-Kohorte bei 13 ± 6 °C für kaltsensible und $50,1 \pm 3,8$ °C für hitzesensible Nervenfasern ($\bar{x} \pm s$). Dabei konnten die Nervenfasern in der akut-Kohorte von 45 % (Kälte) und 42 % (Hitze) aller getesteten Areale aus erregt werden, in der chronisch-Kohorte von 56 % (Kälte) und 45 % (Hitze). Der Anteil der axonal erregbaren Nervenfasern in der 7-10-Tage-Kohorte lag mit 27,5% höher, als in der akut-Kohorte (16,4%). Die Areale des N. suralis von denen aus Aktionspotentiale durch thermische Reizung erzeugt werden konnten, scheinen dabei diskontinuierlich entlang des N. suralis verteilt zu sein, weshalb anzunehmen ist, dass auch die Transduktionsmoleküle nur diskontinuierlich in die axonale Plasmamembran integriert sind. Dieser Sachverhalt galt insbesondere für die hitzesensiblen Afferenzen.

Eine Differenzierung zwischen Typ-1- und Typ-2-kaltsensiblen Afferenzen anhand der räumlichen Ausdehnung ihrer axonalen Sensibilität war nicht möglich. Die Nervenfasern zeigen in der Gruppe der Axone, die von bis zu zwei und in der Gruppe, die von drei und mehr Arealen aus erregbar waren, keinen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich ihrer Reizantwort.

Es konnte gezeigt werden, dass eine axonale Mechanosensibilität praktisch nicht existiert und es sich bei den wenigen Fällen vermutlich um epineurale Afferenzen handelt.

Ein weiteres Ergebnis der Studie ist, dass die direkte Hitzestimulation peripherer Axone zu einer reflektorischen Hemmung von postganglionären Vasokonstriktorneuronen führt. Eine Hemmung durch noxische Kaltreize oder mechanische Reize konnte nicht nachgewiesen werden, ebenso wenig wie eine Aktivierung durch thermische oder mechanische Stimulation. Ein signifikanter Unterschied zwischen den postganglionären Vasokonstriktorneuronen der beiden Kohorten bestand in der niedrigeren Höhe der Spontanaktivität in der chronisch-Kohorte ($0,72 \pm 0,06$ Imp/s vs. $0,54 \pm 0,05$ Imp/s, $\bar{x} \pm \delta_n$). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass kutane Vasokonstriktorneurone unter regenerativen Bedingungen einer ständigen Hemmung über einen spinalen Reflexbogen unterliegen, auf dessen afferenten Seite die ektope Aktivität aus den regenerierenden Enden chronisch geschädigter Afferenzen steht.

Die spontan aktiven Neurone in der vorliegenden Studie konnten postganglionären Vasokonstriktorneuronen zugeordnet werden. Ektope Aktivität kutaner afferenter Neurone mit einem Ursprung proximal der Läsionsstelle oder im Spinalganglion konnte nicht nachgewiesen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Phänomen der axonalen Erregbarkeit dem Phänomen der ektopen Erregbarkeit regenerierender aussprossender Axone ähnelt. Dieser Sachverhalt, wie auch die kontinuierliche Hemmung der Aktivität postganglionärer Vasokonstriktorneurone unter regenerativen Bedingungen kann unter pathophysiologischen Bedingungen eine Rolle bei der Entstehung, dem Verlauf und der Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzsyndrome spielen.

6. Literaturverzeichnis

Adrian, E. D., Bronk, D. W. (1932): Discharges in mammalian sympathetic nerves. *J Physiol*, 74, 115-133

Amano, R., Hiruma, H., Nishida, S., Kawakami, T., Shimizu, K. (2001): Inhibitory effect of histamine on axonal transport in cultured mouse dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Res*, 41, 201-206

Armstrong, B. D., Hu, Z., Abad, C., Yamamoto, M., Rodriguez, W. I., Cheng, J., Lee, M., Chhith, S., Gomariz, R. P., Waschek, J. A. (2004): Induction of neuropeptide gene expression and blockade of retrograde transport in facial motor neurons following local peripheral nerve inflammation in severe combined immunodeficiency and BALB/C mice. *Neuroscience*, 129, 93-99

Bandell, M., Story, G. M., Hwang, S. W., Viswanath, V., Eid, S. R., Petrus, M. J., Earley, T. J., Patapoutian, A. (2004): Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. *Neuron*, 41, 849-857

Baron, R., Janig, W., Kollmann, W. (1988): Sympathetic and afferent somata projecting in hindlimb nerves and the anatomical organization of the lumbar sympathetic nervous system of the rat. *J Comp Neurol*, 275, 460-468

Bautista, D. M., Jordt, S. E., Nikai, T., Tsuruda, P. R., Read, A. J., Poblete, J., Yamoah, E. N., Basbaum, A. I., Julius, D. (2006): TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. *Cell*, 124, 1269-1282

Bautista, D. M., Siemens, J., Glazer, J. M., Tsuruda, P. R., Basbaum, A. I., Stucky, C. L., Jordt, S. E., Julius, D. (2007): The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. *Nature*, 448, 204-208

Bernardini, N., Neuhuber, W., Reeh, P. W., Sauer, S. K. (2004): Morphological evidence for functional capsaicin receptor expression and calcitonin gene-related peptide exocytosis in isolated peripheral nerve axons of the mouse. *Neuroscience*, 126, 585-590

Blenk, K. H., Michaelis, M., Vogel, C., Janig, W. (1996): Thermosensitivity of acutely axotomized sensory nerve fibers. *J Neurophysiol*, 76, 743-752

Blumberg, H., Janig, W. (1983): Changes of reflexes in vasoconstrictor neurons supplying the cat hindlimb following chronic nerve lesions: a model for studying mechanisms of reflex sympathetic dystrophy? *J Auton Nerv Syst*, 7, 399-411

Blumberg, H., Janig, W. (1984): Discharge pattern of afferent fibers from a neuroma. *Pain*, 20, 335-353

Blumberg, H., Janig, W. (1985): Reflex patterns in postganglionic vasoconstrictor neurons following chronic nerve lesions. *J Auton Nerv Syst*, 14, 157-180

- Blumberg, H., Janig, W., Rieckmann, C., Szulczyk, P. (1980): Baroreceptor and chemoreceptor reflexes in postganglionic neurones supplying skeletal muscle and hairy skin. *J Auton Nerv Syst*, 2, 223-240
- Bove, G. M. (2008): Epi-perineurial anatomy, innervation, and axonal nociceptive mechanisms. *J Bodyw Mov Ther*, 12, 185-190
- Bove, G. M. (2009): Focal nerve inflammation induces neuronal signs consistent with symptoms of early complex regional pain syndromes. *Exp Neurol*, 219, 223-227
- Bove, G. M., Ransil, B. J., Lin, H. C., Leem, J. G. (2003): Inflammation induces ectopic mechanical sensitivity in axons of nociceptors innervating deep tissues. *J Neurophysiol*, 90, 1949-1955
- Campero, M., Serra, J., Ochoa, J. L. (1996): C-polymodal nociceptors activated by noxious low temperature in human skin. *J Physiol*, 497 (Pt 2), 565-572
- Caterina, M. J. (2007): Transient receptor potential ion channels as participants in thermosensation and thermoregulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292, R64-76
- Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., Julius, D. (1997): The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389, 816-824
- Devor, M. (2009): Ectopic generators. In: *Science of pain*, 1, 83-88, Elsevier,
- Devor, M., Govrin-Lippmann, R. (1983): Axoplasmic transport block reduces ectopic impulse generation in injured peripheral nerves. *Pain*, 16, 73-85
- Devor, M., Seltzer, Z. (1999): *Pathophysiology of damaged nerves in relation to chronic pain*. 4, Churchill Livingstone, Edinburgh
- Dib-Hajj, S., Black, J. A., Felts, P., Waxman, S. G. (1996): Down-regulation of transcripts for Na channel alpha-SNS in spinal sensory neurons following axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 14950-14954
- Dilley, A., Bove, G. M. (2008a): Disruption of axoplasmic transport induces mechanical sensitivity in intact rat C-fibre nociceptor axons. *J Physiol*, 586, 593-604
- Dilley, A., Bove, G. M. (2008b): Resolution of inflammation-induced axonal mechanical sensitivity and conduction slowing in C-fiber nociceptors. *J Pain*, 9, 185-192
- Dilley, A., Lynn, B., Pang, S. J. (2005): Pressure and stretch mechanosensitivity of peripheral nerve fibres following local inflammation of the nerve trunk. *Pain*, 117, 462-472
- Eliav, E., Benoliel, R., Tal, M. (2001): Inflammation with no axonal damage of the rat saphenous nerve trunk induces ectopic discharge and mechanosensitivity in myelinated axons. *Neurosci Lett*, 311, 49-52

- 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., Janig, W. (2009): Functional properties of cutaneous A- and C-fibers 1-15 months after a nerve lesion. *J Neurophysiol*, 102, 3129-3141
- Gregor, M., Janig, W., Wiprich, L. (1977): Cardiac and respiratory rhythmicities in cutaneous and muscle vasoconstrictor neurones to the cat's hindlimb. *Pflugers Arch*, 370, 299-302
- Grosse, M., Janig, W. (1976): Vasoconstrictor and pilomotor fibres in skin nerves to the cat's tail. *Pflugers Arch*, 361, 221-229
- Grossmann, L., Gorodetskaya, N., Baron, R., Janig, W. (2009a): Enhancement of ectopic discharge in regenerating A- and C-fibers by inflammatory mediators. *J Neurophysiol*, 101, 2762-2774
- Grossmann, L., Gorodetskaya, N., Teliban, A., Baron, R., Janig, W. (2009b): Cutaneous afferent C-fibers regenerating along the distal nerve stump after crush lesion show two types of cold sensitivity. *Eur J Pain*, 13, 682-690
- Häbler, H. J., Bartsch, T., Janig, W. (1999): Rhythmicity in single fiber postganglionic activity supplying the rat tail. *J Neurophysiol*, 81, 2026-2036
- Häbler, H. J., Janig, W., Krummel, M., Peters, O. A. (1993): Respiratory modulation of the activity in postganglionic neurons supplying skeletal muscle and skin of the rat hindlimb. *J Neurophysiol*, 70, 920-930
- Häbler, H. J., Janig, W., Krummel, M., Peters, O. A. (1994): Reflex patterns in postganglionic neurons supplying skin and skeletal muscle of the rat hindlimb. *J Neurophysiol*, 72, 2222-2236
- Hains, B. C., Klein, J. P., Saab, C. Y., Craner, M. J., Black, J. A., Waxman, S. G. (2003): Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurosci*, 23, 8881-8892
- Hallin, R. G., Torebjork, H. E. (1974): Single unit sympathetic activity in human skin nerves during rest and various manoeuvres. *Acta Physiol Scand*, 92, 303-317
- Harper, A. A., Lawson, S. N. (1985): Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol*, 359, 31-46
- Hoffmann, T., Sauer, S. K., Horch, R. E., Reeh, P. W. (2008): Sensory transduction in peripheral nerve axons elicits ectopic action potentials. *J Neurosci*, 28, 6281-6284
- Hong, S., Wiley, J. W. (2005): Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem*, 280, 618-627

- Horeysek, G., Janig, W. (1974): Reflexes in postganglionic fibres within skin and muscle nerves after noxious stimulation of skin. *Exp Brain Res*, 20, 125-134
- Hromada, J. (1963): ON THE NERVE SUPPLY OF THE CONNECTIVE TISSUE OF SOME PERIPHERAL NERVOUS SYSTEM COMPONENTS. *Acta Anat (Basel)*, 55, 343-351
- Hu, J., Milenkovic, N., Lewin, G. R. (2006): The high threshold mechanotransducer: a status report. *Pain*, 120, 3-7
- Hu, P., McLachlan, E. M. (2003): Selective reactions of cutaneous and muscle afferent neurons to peripheral nerve transection in rats. *J Neurosci*, 23, 10559-10567
- Huang, S. M., Li, X., Yu, Y., Wang, J., Caterina, M. J. (2011): TRPV3 and TRPV4 ion channels are not major contributors to mouse heat sensation. *Mol Pain*, 7, 37
- Hudson, L. J., Bevan, S., Wotherspoon, G., Gentry, C., Fox, A., Winter, J. (2001): VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur J Neurosci*, 13, 2105-2114
- Iggo, A., Vogt, M. (1962): The mechanism of adrenaline-induced inhibition of sympathetic preganglionic activity. *J Physiol*, 161, 62-72
- Jänig, W. (1985): Organization of the lumbar sympathetic outflow to skeletal muscle and skin of the cat hindlimb and tail. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*, 102, 119-213
- Jänig, W. (1975): Central organization of somatosympathetic reflexes in vasoconstrictor neurones. *Brain Res*, 87, 305-312
- Jänig, W. (1984): Vasoconstrictor systems supplying skeletal muscle, skin, and viscera. *Clin Exp Hypertens A*, 6, 329-346
- Jänig, W. (1988): Pathophysiology of nerve following mechanical injury. Elsevier Science Publishers, Amsterdam
- Jänig, W., Grossmann, L., Gorodetskaya, N. (2009): Mechano- and thermosensitivity of regenerating cutaneous afferent nerve fibers. *Exp Brain Res*, 196, 101-114
- Jänig, W., Kummel, H. (1977): Functional discrimination of postganglionic neurones to the cat's hindpaw with respect to the skin potentials recorded from the hairless skin. *Pflugers Arch*, 371, 217-225
- Jänig, W., McLachlan, E. (1984): On the fate of sympathetic and sensory neurons projecting into a neuroma of the superficial peroneal nerve in the cat. *J Comp Neurol*, 225, 302-311
- Jänig, W., McLachlan, E. M. (1987): Organization of lumbar spinal outflow to distal colon and pelvic organs. *Physiol Rev*, 67, 1332-1404
- Jänig, W., Szulczyk, P. (1980): Functional properties of lumbar preganglionic neurones. *Brain Res*, 186, 115-131

- Jänig, W., Szulczyk, P. (1981): The organization of lumbar preganglionic neurons. *J Auton Nerv Syst*, 3, 177-191
- Jankowski, M. P., Lawson, J. J., McIlwrath, S. L., Rau, K. K., Anderson, C. E., Albers, K. M., Koerber, H. R. (2009): Sensitization of cutaneous nociceptors after nerve transection and regeneration: possible role of target-derived neurotrophic factor signaling. *J Neurosci*, 29, 1636-1647
- Jenq, C. B., Coggeshall, R. E. (1985): Long-term patterns of axon regeneration in the sciatic nerve and its tributaries. *Brain Res*, 345, 34-44
- Johnson, C. D., Gilbey, M. P. (1996): On the dominant rhythm in the discharges of single postganglionic sympathetic neurones innervating the rat tail artery. *J Physiol*, 497 (Pt 1), 241-259
- Jordt, S. E., Bautista, D. M., Chuang, H. H., McKemy, D. D., Zygmunt, P. M., Hogestatt, E. D., Meng, I. D., Julius, D. (2004): Mustard oils and cannabinoids excite sensory nerve fibres through the TRP channel ANKTM1. *Nature*, 427, 260-265
- 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*, 27, 9874-9884
- Karashima, Y., Talavera, K., Everaerts, W., Janssens, A., Kwan, K. Y., Vennekens, R., Nilius, B., Voets, T. (2009): TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106, 1273-1278
- Koltzenburg, M., Stucky, C. L., Lewin, G. R. (1997): Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin. *J Neurophysiol*, 78, 1841-1850
- Koschorke, G. M., Meyer, R. A., Tillman, D. B., Campbell, J. N. (1991): Ectopic excitability of injured nerves in monkey: entrained responses to vibratory stimuli. *J Neurophysiol*, 65, 693-701
- 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
- Kung, C. (2005): A possible unifying principle for mechanosensation. *Nature*, 436, 647-654
- Lawson, J. J., McIlwrath, S. L., Woodbury, C. J., Davis, B. M., Koerber, H. R. (2008): TRPV1 unlike TRPV2 is restricted to a subset of mechanically insensitive cutaneous nociceptors responding to heat. *J Pain*, 9, 298-308
- Lawson, S. N., Waddell, P. J. (1991): Soma neurofilament immunoreactivity is related to cell size and fibre conduction velocity in rat primary sensory neurons. *J Physiol*, 435, 41-63
- Leem, J. W., Willis, W. D., Chung, J. M. (1993): Cutaneous sensory receptors in the rat foot. *J Neurophysiol*, 69, 1684-1699

- Lewin, G. R., Moshourab, R. (2004): Mechanosensation and pain. *J Neurobiol*, 61, 30-44
- Lovén, C. (1866): Ueber die Erweiterung von Arterien in Folge einer Nervenerregung. *Arbeiten aus der physiologischen Anstalt zu Leipzig*, 1-26
- Lumpkin, E. A., Caterina, M. J. (2007): Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature*, 445, 858-865
- Macefield, V. G., Wallin, B. G., Vallbo, A. B. (1994): The discharge behaviour of single vasoconstrictor motoneurons in human muscle nerves. *J Physiol*, 481 (Pt 3), 799-809
- Madrid, R., Donovan-Rodriguez, T., Meseguer, V., Acosta, M. C., Belmonte, C., Viana, F. (2006): Contribution of TRPM8 channels to cold transduction in primary sensory neurons and peripheral nerve terminals. *J Neurosci*, 26, 12512-12525
- McKemy, D. D., Neuhauser, W. M., Julius, D. (2002): Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature*, 416, 52-58
- Michaelis, M., Blenk, K. H., Janig, 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*, 74, 1020-1027
- Michaelis, M., Blenk, K. H., Vogel, C., Janig, W. (1999): Distribution of sensory properties among axotomized cutaneous C-fibres in adult rats. *Neuroscience*, 94, 7-10
- Michaelis, M., Liu, X., Janig, W. (2000): Axotomized and intact muscle afferents but no skin afferents develop ongoing discharges of dorsal root ganglion origin after peripheral nerve lesion. *J Neurosci*, 20, 2742-2748
- Michaelis, M., Vogel, C., Blenk, K. H., Arnarson, A., Janig, W. (1998): Inflammatory mediators sensitize acutely axotomized nerve fibers to mechanical stimulation in the rat. *J Neurosci*, 18, 7581-7587
- Michaelis, M., Vogel, C., Blenk, K. H., Janig, W. (1997): Analgesics excite axotomized afferent nerve fibres within the first hours following nerve transection in rats. *Pain*, 72, 347-354
- Munns, C., AlQatari, M., Koltzenburg, M. (2007): Many cold sensitive peripheral neurons of the mouse do not express TRPM8 or TRPA1. *Cell Calcium*, 41, 331-342
- Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Tokunaga, A., Tominaga, M., Noguchi, K. (2005): TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest*, 115, 2393-2401
- Ohtori, S., Takahashi, K., Moriya, H., Myers, R. R. (2004): TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine (Phila Pa 1976)*, 29, 1082-1088

- Omana-Zapata, I., Khabbaz, M. A., Hunter, J. C., Clarke, D. E., Bley, K. R. (1997): Tetrodotoxin inhibits neuropathic ectopic activity in neuromas, dorsal root ganglia and dorsal horn neurons. *Pain*, 72, 41-49
- Peyronnard, J. M., Charron, L. (1982): Motor and sensory neurons of the rat sural nerve: a horseradish peroxidase study. *Muscle Nerve*, 5, 654-660
- Richardson, J. D., Vasko, M. R. (2002): Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 302, 839-845
- Rivera, L., Gallar, J., Pozo, M. A., Belmonte, C. (2000): Responses of nerve fibres of the rat saphenous nerve neuroma to mechanical and chemical stimulation: an in vitro study. *J Physiol*, 527 Pt 2, 305-313
- Sauer, S. K., Bove, G. M., Averbeck, B., Reeh, P. W. (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
- Schafers, M., Sorkin, L. S., Geis, C., Shubayev, V. I. (2003): Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. *Neurosci Lett*, 347, 179-182
- Schmalbruch, H. (1986): Fiber composition of the rat sciatic nerve. *Anat Rec*, 215, 71-81
- Smith, M. P., Beacham, D., Ensor, E., Koltzenburg, M. (2004): Cold-sensitive, menthol-insensitive neurons in the murine sympathetic nervous system. *Neuroreport*, 15, 1399-1403
- Story, G. M., Peier, A. M., Reeve, A. J., Eid, S. R., Mosbacher, J., Hricik, T. R., Earley, T. J., Hergarden, A. C., Andersson, D. A., Hwang, S. W., McIntyre, P., Jegla, T., Bevan, S., Patapoutian, A. (2003): ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures. *Cell*, 112, 819-829
- Teliban, A., Bartsch, F., Struck, M., Baron, R., Janig, W. (2011): Axonal thermosensitivity and mechanosensitivity of cutaneous afferent neurons. *Eur J Neurosci*, 33, 110-118
- Treede, R. D. (2010a): Das somatosensorische System. Schmidt R. F., Lang F., Heckmann M.,
- Treede, R. D. (2010b): Physiologie des Menschen. 31, Schmidt, R., Lang, F., Heckmann, M., Heidelberg
- Vestergaard, S., Tandrup, T., Jakobsen, J. (1997): Effect of permanent axotomy on number and volume of dorsal root ganglion cell bodies. *J Comp Neurol*, 388, 307-312
- Villiere, V., McLachlan, E. M. (1996): Electrophysiological properties of neurons in intact rat dorsal root ganglia classified by conduction velocity and action potential duration. *J Neurophysiol*, 76, 1924-1941

Watkins, L. R., Maier, S. F. (2002): Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev*, 82, 981-1011

Waxman, S. G., Kocsis, J. D., Black, J. A. (1994): Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol*, 72, 466-470

Wood, J. N., Boorman, J. P., Okuse, K., Baker, M. D. (2004): Voltage-gated sodium channels and pain pathways. *J Neurobiol*, 61, 55-71

7. Wissenschaftliche Beiträge

Artikel/Manuskripte

- [1] *Thermosensitivity of unmyelinated afferent and efferent axons in the sural nerve*
Manuskript in Vorbereitung (2012) **Struck M**, Bartsch F, Baron R, Teliban A, Jänig W
- [2] *Axonal thermosensitivity and mechanosensitivity of cutaneous afferent neurons*
Eur J Neuroscience (2011) Teliban A, Bartsch F, Baron R, **Struck M**, Jänig W
- [3] *Responses of cold- or heat-sensitive cutaneous afferent axons to capsaicin*
Manuskript in Vorbereitung (2012) Bartsch F, Teliban A, Baron R, **Struck M**, Jänig W
- [4] *Responses of intact and injured sural nerve fibers to cooling and menthol*
Eingereicht Eur J Neuroscience (2012) Teliban A, Bartsch F, Baron R, **Struck M**, Jänig W
- [5] *Effect of local and intravenous lidocaine on ongoing activity in injured afferent nerve fibers*
Pain (2011) Kirillova I., Teliban A., Gorodetskaya N., Grossmann L., Bartsch F, Rausch VH, **Struck M**, Tode J, Baron R, Jänig W

Poster

- [6] *Excitability of unmyelinated afferent nerve fibers by physiological stimuli along the sural nerve*
3rd International Congress on Neuropathic Pain, Athen 2010; **Struck M**, Teliban A, Bartsch F, Baron R, Jänig W
- [7] *Thermo- and mechanosensitivity of cutaneous afferent axons*
3rd International Congress on Neuropathic Pain, Athen 2010; Teliban A, Bartsch F, **Struck M**, Baron R, Jänig W

8. Danksagungen

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Wilfrid Jänig für die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Er stand mir stets hilfsbereit mit Rat und Tat zur Seite und hat mir nicht nur fachliche sondern auch menschliche Kompetenzen vermittelt. An dieser Stelle sei auch den Mitarbeitern des Labors Fabian Bartsch, Irina Kirilova, Vanessa Rausch, Alina Teliban und Jan Tode gedankt. Ohne ihr Durchhaltevermögen, wäre es mir sehr viel schwerer gefallen diese Arbeit fertigzustellen, ihre Zielstrebigkeit diente mir immer als Vorbild.

Weiterhin möchte ich den technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des physiologischen Institutes der CAU danken, die die Rahmenbedingungen für meine Arbeit geschaffen haben.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Anatomischen Institutes der CAU möchte ich dafür danken, dass ich diese Dissertation ohne Zeitdruck verfassen konnte. Ihre Durchhalteparolen, konstruktiven Kritiken und Ablenkungen während frustrierender Phasen des Schreibens haben mir sehr geholfen.

Meiner Familie, meinen Freunden und allen lieben Menschen, die mir während dieser Zeit zur Seite standen und denen diese Arbeit gewidmet ist, gilt besonderer Dank.