

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K. V. Toyka**

**Verhalten von C-Fasern der Maus während repetitiver elektrischer Stimulation:
Bedeutung für die Fasererregbarkeit und die Rolle von I_h und $Na_{v1.8}$**

**Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Florian Pracher
aus Würzburg**

Würzburg, Januar 2004

Referent: Prof. Dr. med. M. Koltzenburg

Koreferent: Prof. Dr. med. K. Reiners

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 22.1.2004

Der Promovend ist Arzt

"When a man is tired of London, he is tired of life; for there is in London all that life can afford."

Samuel Johnson, 1777

meiner Familie und Alex

1	EINLEITUNG	1
	Eigenschaften von I_h	5
	Eigenschaften von $Na_{v1.8}$ -Kanälen	10
	Fragestellung	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
	Haut-Nerv-Präparat	13
	Charakterisierung der C-Fasern	16
	Elektrische Stimulation	17
	Cs^+ und ZD 7288	18
	$Na_{v1.8}$ knock-out Mäuse	19
	Datenanalyse	19
	Chemikalien	20
3	ERGEBNISSE	21
3.1	Wildtyp Tiere	21
3.1.1	Charakterisierung der abgeleiteten C-Fasern	21
3.1.2	Abhängigkeit der aktivitätsinduzierten Latenzsprünge von der Zahl der Interstimuli und von der Dauer des Stimulationsintervalls	22
3.1.3	Einfluss von Cs^+ auf die Latenzänderungen in Folge von Aktivität	30
3.1.4	Effekt von ZD 7288 auf die Latenzänderung in Folge von Aktivität	33
3.2	$Na_{v1.8}$ knock-out Mäuse	43
3.2.1	Charakterisierung der abgeleiteten C-Fasern	43
3.2.2	Abhängigkeit der aktivitätsinduzierten Latenzänderung von der Zahl der Interstimuli und von der Dauer des Stimulationsintervalls	43
4	DISKUSSION	48
	Unterschiedliches Verhalten von hitzesensiblen und hitzeunsensiblen Fasern während tetanischer Stimulation	49
	Mechanismen für die Verlangsamung von C-Fasern während repetitiver Stimulation	52

I _h limitiert die Verlangsamung von Neuronen während repetitiver Stimulation ...	52
Möglicher Beitrag der Na ⁺ /K ⁺ -ATPase zur aktivitätsinduzierten Verlangsamung von Neuronen	57
Zeitlicher Ablauf der Latenzerholung nach repetitiver Stimulation und die dabei bestehenden Unterschiede zwischen hitzesensiblen und hitzeunempfindlichen Fasern	58
Unterschiede zwischen C-Fasern von Wildtyp und Na _v 1.8 knock-out Mäusen in Folge tetanischer Stimulation	63
5 AUSBLICK.....	66
6 ZUSAMMENFASSUNG.....	70
7 LITERATURVERZEICHNIS.....	72

1 Einleitung

Damit der Organismus auf potentiell gewebeschädliche Reize rechtzeitig mit einer adäquaten Abwehr- oder Vermeidungsreaktion reagieren kann, besitzt er ein hoch spezialisiertes nozizeptives System. In der Peripherie werden dabei die nozizeptiven Reize von frei in der Haut liegenden Nervenendigungen registriert, spezielle korpuskuläre Rezeptororgane werden im nozizeptiven System nicht angetroffen (Kandel et al. 2000). Die Reize werden nach der Transformation entlang dünner myelinisierter A δ -Fasern oder entlang unmyelinisierter C-Fasern ins zentrale Nervensystem weitergeleitet. Unter Transformation versteht man die Umsetzung des durch die Reizeinwirkung entstandenen Sensorpotentials in eine Aktionspotentialfolge variabler Frequenz, dabei steigt die Aktionspotentialfrequenz mit zunehmender Reizstärke, die Reizstärke wird also frequenzkodiert (Schmidt et al. 2000). In einem sensiblen Nerven überwiegt bei weitem der Anteil der C-Fasern. C-Fasern besitzen von allen Fasern die niedrigste Nervenleitgeschwindigkeit, da sie einerseits nur einen kleinen Faserquerschnitt haben und damit den elektrotonisch weitergeleiteten Aktionspotentialen einen verhältnismäßig großen elektrischen Widerstand entgegensetzen, andererseits fehlt ihnen eine Myelinscheide, weshalb eine saltatorische Erregungsleitung, wie sie bei den schneller leitenden A-Fasern beobachtet wird, bei den C-Fasern nicht erfolgen kann.

Zwar leiten alle C-Fasern Reize mit einer Nervenleitgeschwindigkeit von weniger als 2 m/s ins zentrale Nervensystem, es bestehen jedoch Unterschiede in der Art der jeweils weitergeleiteten Reize. So lassen sich C-Fasern aufgrund ihrer mechanischen Stimulierbarkeit in mechanosensible (MSA = „mechanosensitive afferents“) und mechanounempfindliche C-Fasern (MIA = „mechanoinsensitive afferents“) unterteilen. Die MIAs sind nicht gänzlich mechanounempfindlich, ihre mechanische Erregungsschwelle ist unter physiologischen Bedingungen jedoch so hoch, dass man sie unter experimentellen Bedingungen meist nicht bestimmen kann (Schmidt et al. 1995). Dies ändert sich aber in entzündeten Geweben, da es unter diesen Bedingungen zu einer Sensibilisierung der vormals „unerregbaren“ MIAs und damit einhergehend zu einer Abnahme ihrer Erregungsschwelle kommt (Schmidt et al. 1995). Es resultiert die

Messung eines größeren Inputs in das zentrale Nervensystem, was auch zur Bezeichnung „schlafende Nozizeptoren“ führte.

In der Gruppe der MIAs lassen sich hitzesensible und hitzeunempfindliche Fasern unterscheiden, die entsprechend als CM_iH („mechanoinsensitive heatsensitive c-fibre“) und CM_iH_i („mechano-/heatinsensitive c-fibre“) bezeichnet werden. Bei den MSAs lassen sich aufgrund des Verhaltens während der Applikation von thermischen Stimuli vier Faserklassen unterscheiden. Dies sind neben den CM-Fasern („mechanosensitive c-fibre“), die weder durch Hitze- noch durch Kältestimuli erregt werden können, die CMC-Fasern („mechanosensitive coldsensitive c-fibre“), welche auf Kältestimuli antworten, die CMH-Fasern („mechanosensitive heatsensitive c-fibre“), die durch Hitzestimuli erregt werden können und die CMHC-Fasern („mechanosensitive heat-/coldsensitive c-fibre“), die sowohl auf Hitze- als auch auf Kältestimuli antworten. CMH- und CMHC-Fasern werden häufig als polymodale Nozizeptoren bezeichnet, da ein großer Teil dieser Fasern ebenfalls durch Applikation chemischer Noxen wie etwa Carrageenan oder Senföl stimuliert werden kann. Die Grundlage für das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Fasern während der Applikation von thermischen Stimuli liegt in der Expression von verschiedenen Membrankanälen und Rezeptoren. So konnte kürzlich eine Rolle von TRPV 1 („transient receptor potential vanilloid“; alte Bezeichnung: VR 1 für „vanilloid receptor“) bei der Transduktion von Hitzereizen gezeigt werden (Caterina et al. 2000), aber auch an den Nervenendigungen in der Haut konnte eine direkte Aktivierung von Membrankanälen durch Hitzereize nachgewiesen werden (Adair 1999; Cesare et al. 1999), die Expression dieser Kanäle erfolgt dabei nahezu ausschließlich in der Gruppe der hitzesensiblen C-Fasern. Aber auch für andere Stimuli von C-Fasern konnten mittlerweile spezifische Rezeptoren nachgewiesen werden, so etwa DRASIC („dorsal root ganglia acid sensing ion channel“) bzw. ASIC („acid sensing ion channel“) für Protonen (Olson et al. 1998) und spezielle Rezeptoren für Entzündungsmediatoren wie Eikosanoide, Serotonin und Bradykinin. Die Anzahl der von C-Nozizeptoren exprimierten Ionenkanäle und Rezeptoren ist umfangreich, und wir sind noch Jahre von einem umfassenden Verständnis aller Mechanismen, die bei der Erregung von Nozizeptoren eine Rolle spielen, entfernt. Offensichtlich ist aber, dass das unterschiedliche Expressionsniveau der einzelnen Kanäle und Rezeptoren in Nozizeptoren zu dem unterschiedlichen

rezeptiven Verhalten der Nozizeptoren beiträgt. Abbildung 1 zeigt die Vielzahl der von C-Nozizeptoren exprimierten Ionenkanäle und Rezeptoren (Review: McCleskey und Gold 1999). Es handelt sich bei den C-Fasern in einem sensiblen Nerv damit um eine sehr heterogene Gruppe von Fasern.

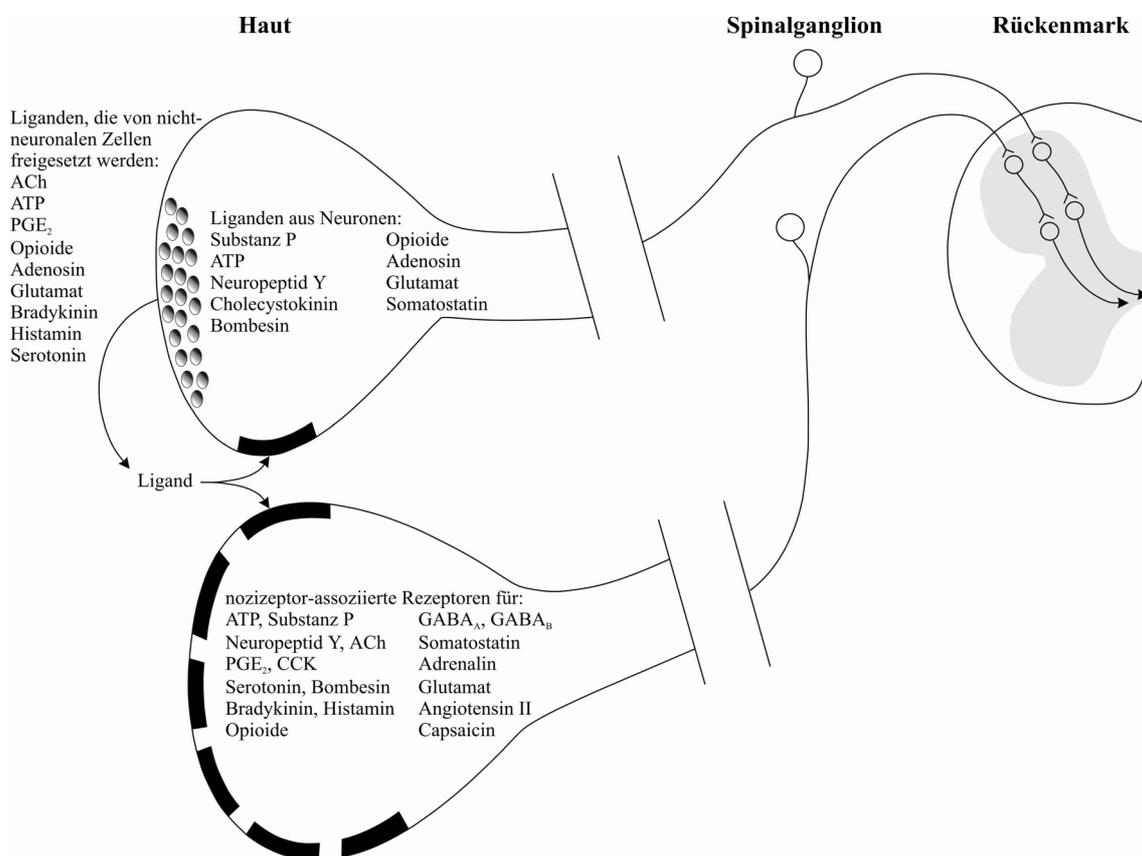


Abbildung 1: Liganden und Rezeptoren in C-Fasern (modifiziert nach Carlton und Coggeshall 1998)

Der Anteil bestimmter funktioneller C-Fasergruppen an einem sensiblen Nerv ist jedoch keineswegs statisch, vielmehr kommt es während der Entwicklung - aber auch unter pathologischen Bedingungen - zur Selektion einzelner und zum Untergang anderer funktioneller Gruppen, auch die Erregbarkeit einzelner Fasern ändert sich durch Sensibilisierungsprozesse.

Mit den neurotrophen Faktoren und ihren Rezeptoren verfügt der Organismus über einen Mechanismus, mit dessen Hilfe er während der Embryogenese selektiv das Überleben einzelner Faserpopulationen steuern und damit gezielt die Zusammensetzung eines sensiblen Nervs bestimmen kann (Koltzenburg 1999). Zu diesem System zählen die neurotrophen Faktoren NGF, BDNF, NT 3 und NT 4, die zum einen über ihre spezifischen Rezeptoren trk A, trk B und trk C (trk steht für Tyrosinkinase-Rezeptor),

zum anderen aber auch über den unspezifischen p75-Rezeptor die Apoptose der Zielzellen verhindern und damit die Zusammensetzung eines sensiblen Nervs beeinflussen (Stucky et al. 1998; Koltzenburg 1999; Stucky et al. 1999). In letzter Zeit häufen sich die Hinweise, dass die neurotrophen Faktoren nicht nur bei der Entwicklung des peripheren Nervensystems eine Rolle spielen, vielmehr kann unter pathologischen Bedingungen das Fehlen oder die Überexpression eines dieser Faktoren zum Untergang oder aber zur Selektion einzelner Fasergruppen führen und damit die Eigenschaften des rezeptiven Apparats verändern (Koltzenburg et al. 1999; Shu und Mendell 1999; Djouhri et al. 2001). Das Fehlen von NGF nach einer kompletten Nervendurchtrennung führt beispielsweise zum Untergang von $\text{Na}_{v1.8}$ (alte Bezeichnung: SNS)-exprimierenden Spinalganglienneuronen (Okuse et al. 1997), da diese auf die Anwesenheit von NGF angewiesen sind, welches unter physiologischen Bedingungen von den peripheren Nervenendigungen aufgenommen und retrograd axonal transportiert wird (Boettger et al. 2002).

Neben der gezielten Faserselektion über die Sekretion von neurotrophen Faktoren kommt es unter pathologischen Bedingungen aber auch zu einer geänderten Expression von Membranmolekülen wie Rezeptoren und Ionenkanälen. Zusätzlich kommt es durch die Bindung von Entzündungsmediatoren an ihre Rezeptoren zu einer Aktivierung von second-messenger Systemen, die u.a. über die Bildung von cAMP zu einer Fasersensibilisierung führen (Taiwo et al. 1989). Es resultiert eine erhöhte Fasererregbarkeit, die Grundlage für die Hyperalgesie und den Spontanschmerz ist, die bei neuropathischen Schmerzformen und in entzündeten Geweben gefunden werden (Koltzenburg 1998; Woolf und Mannion 1999). Schon seit längerem wird deshalb gezielt nach Mechanismen gefahndet, die zu einer Veränderung der Fasererregbarkeit führen können. Da die Empfindung durch die Impulsfrequenz spezifischer Rezeptoren codiert wird, ist das Verständnis von Mechanismen der Impulspropagation wichtig.

Die direkt auf ein Aktionspotential folgende Hyperpolarisation ist Ursache der Faserrefraktärität (Gasser 1935; Bergmans 1968a; Bostock und Grafe 1985), deren Zeitdauer die maximale Frequenz determiniert, mit der eine Faser Aktionspotentiale weiterleiten kann. Über Mechanismen, die in der Lage sind, die Refraktärperiode zu verkürzen, kann die maximal mögliche Entladungsfrequenz gesteigert werden. Es resultiert eine Zunahme der pro Zeiteinheit ins zentrale Nervensystem gelangenden

Aktionspotentiale, eine Grundlage der Hyperalgesie. Ein möglicher Mechanismus, der zu einer Verkürzung der Refraktärperiode beitragen könnte, ist der Kanal I_h . Eine schnellere und sicherere Initiierung von Aktionspotentialen kann ebenfalls zu einer Steigerung der Erregbarkeit beitragen, wichtig in diesem Zusammenhang sind die während der Aufstrichphase eines Aktionspotentials aktiven spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle, zu denen $Na_{v1.8}$ -Kanäle gehören. So konnte gezeigt werden, dass die Inaktivierung von $Na_{v1.8}$ in genetisch modifizierten Mäusen zu einer Zunahme der Leitungsblocks und zu einer niedrigeren Entladungsfrequenz während der Applikation einer depolarisierenden Spannungsklemme führte (Renganathan et al. 2001).

Eigenschaften von I_h

In verschiedenen Geweben wurde bei Analyse der Membranströme während der Hyperpolarisation der Zellmembran ein Einwärtsstrom beobachtet, dessen Grundlage anfangs nicht bekannt war. Seine Eigenschaften unterschieden sich grundlegend von denen der klassischen spannungsabhängigen Na^+ - und K^+ -Kanälen (Hodgkin und Huxley 1952), die für die Generation eines Aktionspotentials verantwortlich sind. In Photorezeptoren konnte der zugrundeliegende Strom erstmals als Cs^+ -sensitiver Einwärtsstrom identifiziert werden, der durch die Hyperpolarisation in Folge von Lichtreizen aktiviert wurde und die Membran depolarisierte (Attwell und Wilson 1980). Aus diesem Grund wurde der Strom I_h getauft (=durch Hyperpolarisation aktivierter Strom). Zu der selben Zeit konnte ein identischer Strom in Sinusknoten- und Purkinje-Zellen des Herzens gemessen werden, der anfangs als I_f („funny“) bezeichnet wurde, da er sowohl von Na^+ - als auch von K^+ -Ionen getragen und während der Membranhyperpolarisation aktiviert wurde, ein Verhalten, welches man sich vorerst nicht erklären konnte (DiFrancesco 1993). Aus eben diesem Grunde schlugen die Erstbeschreiber dieses Stroms in Pyramidenzellen des Hippocampus die Bezeichnung I_q („queer“ = sonderbar) vor (Halliwell und Adams 1982). Die Bezeichnung I_h setzte sich aber durch, da sie die Tatsache zum Ausdruck bringt, dass dieser Strom durch Hyperpolarisation aktiviert wird. In der Folge konnten Ströme mit den Eigenschaften von I_h in den verschiedensten neuronalen Geweben nachgewiesen werden, u.a. auch in Spinalganglienneuronen (Pape 1996; Monteggia et al. 2000; Santoro et al. 2000).

Am besten ist die Funktion von I_h für die Schrittmacherfunktion des Herzens bekannt. In den Schrittmacherzellen des Sinusknoten spielt I_h eine Rolle bei der spontanen Rhythmogenese. Nach einem Aktionspotential kommt es zur Repolarisation der Zellmembran. Unterschreitet das Membranpotential dabei einen Wert von -30 mV, so kommt es zur Aktivierung von I_h und in der Folge zu einer erneuten Depolarisation der Zellmembran (die sogenannte diastolische Depolarisation), die, wenn das Schwellenpotential erreicht wird, zu einem erneuten Aktionspotential führt (DiFrancesco 1993; Clapham 1998).

Da das Herz aber nicht mit einer starren Frequenz schlägt, war die nächste zu klärende Frage, ob eine Beeinflussung der Aktivierungskinetik von I_h zur Frequenzvariabilität beiträgt. Dabei zeigte sich, dass eine über das sympathische Nervensystem verursachte Erhöhung der cytosolischen cAMP-Konzentration zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve von I_h in den depolarisierten Bereich führte. Daraus resultiert, dass I_h schon bei positiveren Potentialen als den ursprünglichen -30 mV aktiviert wird, es kommt zu einer früher beginnenden Depolarisation der Membran und in der Folge kommt es schneller zur Auslösung eines erneuten Aktionspotentials. Daraus resultiert die bei Sympathikusaktivierung beobachtete positive Chronotropie. Aktivierung von muskarinergen Rezeptoren über den Parasympathikus bewirkt über eine Reduzierung des freien cAMP den gegenteiligen Effekt. Eine Rolle von I_h bei der kardialen Rhythmogenese kann damit als gesichert gelten (Clapham 1998).

In Neuronen des Thalamus konnte vor kurzem ebenfalls eine Rolle von I_h -Kanälen bei der Rhythmogenese gezeigt werden (Lüthi und McCormick 1998a; 1999). In diesen Neuronen, aber auch in anderen neuronalen Geweben, kommt es zu einer Beeinflussung der Aktivierungskinetik von I_h -Kanälen, vergleichbar mit der Situation in den kardialen Schrittmacherzellen. Eikosanoide und Serotonin führen ebenso wie andere Entzündungsmediatoren zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve von I_h in den depolarisierten Bereich, es resultiert eine stärkere und schnellere Depolarisation der Nervenzellmembran und damit kommt es über eine Verkürzung der Refraktärperiode schneller zur Auslösung eines Aktionspotentials. Die Wirkung der Entzündungsmediatoren erfolgt hierbei ebenfalls über eine Erhöhung der cAMP-Konzentration (Kiehn und Harris-Warrick 1992; Cardenas et al. 1999; Beaumont und Zucker 2000). Damit scheint I_h ein Faktor zu sein, der neben anderen für die höhere

Entladungsfrequenz von Neuronen in entzündeten Geweben verantwortlich ist. Interessant vor diesem Hintergrund ist, dass Opioide die cAMP-Erhöhung und damit die verstärkte Aktivierung von I_h verhindern können (Ingram und Williams 1994; 1996; Svoboda und Lupica 1998). Ein Teil der analgetischen Wirkung von Opioiden könnte somit auf einer Beeinflussung der Kinetik von I_h -Kanälen beruhen.

Mittlerweile konnte eine weitere Funktion von I_h gezeigt werden. So ist bekannt, dass in Neuronen unter Ruhebedingungen hauptsächlich K^+ -Kanäle geöffnet sind, trotzdem liegt das Ruhemembranpotential von Neuronen im depolarisierten Bereich des K^+ -Gleichgewichtspotentials, also in einem Bereich, in dem Ströme durch I_h -Kanäle fließen. Deshalb wurde diskutiert, ob I_h eine Rolle bei der Festlegung des Ruhemembranpotentials von Neuronen spielt. Und in der Tat konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von I_h -Kanälen durch Cs^+ oder bradykarde Substanzen wie etwa ZD 7288 - welches I_h selektiv und irreversibel blockiert (Harris und Constanti 1995) -, UL-FS 49 oder DK-AH 268 (Janigro et al. 1997; Raes et al. 1998) zu einer Hyperpolarisation der Nervenmembran führte, die in der Größenordnung von etwa 10 mV lag. Damit ist eine der Funktionen von I_h in der Festlegung des Ruhemembranpotentials zu sehen (Doan und Kunze 1999).

In den letzten Jahren wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften von I_h eingehend untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei I_h um einen spannungsabhängigen Kanal handelt, der von Na^+ - und K^+ -Ionen getragen wird und auf die Anwesenheit von Cl^- -Ionen angewiesen ist (Wollmuth 1995). In Patch-clamp Experimenten kann man in I_h -exprimierenden Zellen während hyperpolarisierender Spannungsklemmen einen depolarisierenden Einwärtsstrom nachweisen, der I_h entspricht. Beim Abschalten der extern zugeführten Spannung hält dieser Strom für einen kurzen Moment an (= „tail current“). Durch die Analyse der Größe des Einwärtsstroms während hyperpolarisierender Spannungsklemmen bzw. durch die Analyse der Größe der „tail currents“ kann man die Strom-Spannungskurve (=I-V-Kurve) und damit die Aktivierungskurve von I_h bestimmen (vergleiche Abbildung 2). Dabei ergibt sich eine sigmoidale I-V-Kurve.

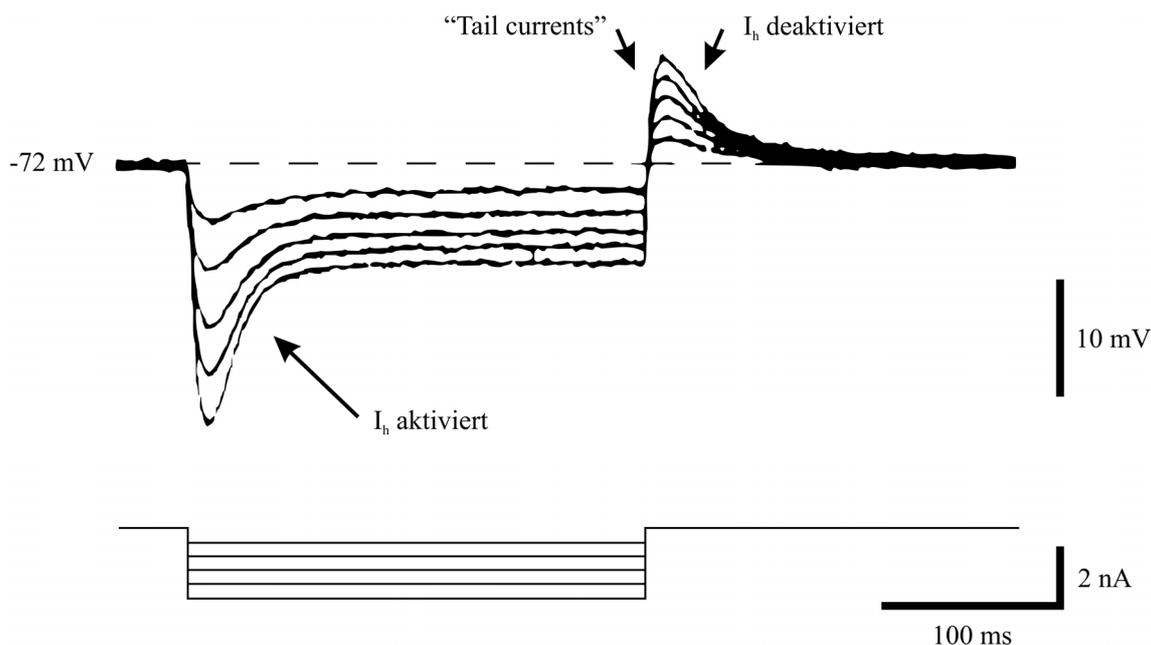


Abbildung 2: Effekt von I_h auf das Membranpotential während hyperpolarisierender Spannungsklemmen (modifiziert nach Pape 1996)

I_h wird bei Membranpotentialen, die negativer als -30 bis -40 mV sind, aktiviert, die halbmaximale Aktivierung (entsprechend $V_{1/2}$) besteht bei Membranpotentialen zwischen -70 und -90 mV, bei negativeren Potentialen als -110 mV ist I_h maximal aktiviert ($=V_{max}$). Die entsprechenden Werte variieren dabei zwischen den verschiedenen neuronalen Geweben (Pape 1996; Altomare et al. 2001).

Kürzlich konnten vier I_h -kodierende Gene sequenziert werden, die als HCN 1 bis HCN 4 bezeichnet werden (Ludwig et al. 1998; Ludwig et al. 1999; Moosmang et al. 2001). Dabei steht HCN für „hyperpolarization-activated cyclic nucleotid-gated“ und umschreibt damit treffend die Hauptcharakteristika von I_h . Die einzelnen Isoformen unterscheiden sich grundlegend in ihren Aktivierungszeitkonstanten (Ishii et al. 2001) und werden in unterschiedlichem Ausmaß in den einzelnen Geweben exprimiert. I_h im Herzen wird von HCN 4 und zu einem Teil von HCN 1 getragen (Moroni et al. 2001), in neuronalen Geweben findet man meist eine Koexpression der einzelnen Isoformen vor (Monteggia et al. 2000). Diese Tatsache erklärt neben der mittlerweile in heterologen Expressionssystemen nachgewiesenen Möglichkeit der Heteromultimerbildung von HCN 1 und HCN 2 (Chen et al. 2001; Ulens und Tytgat 2001) die große Variabilität der Kinetik von I_h in den verschiedenen Geweben. Zusätzlich kommt es

während der Entwicklung zu Veränderungen des HCN-Expressionsmusters, was in Zellen des Hippocampus beobachtet werden konnte (Bender et al. 2001).

Kürzlich konnte auch die Struktur der HCN-Kanäle aufgeklärt werden (Vaca et al. 2000; Shin et al. 2001; Viscomi et al. 2001; Wainger et al. 2001). Sie besitzen sechs Transmembrandomänen und am C-terminalen Ende eine Bindungsstelle für cyclische Nukleotide (= CNBD, cyclic nucleotid-binding domain). Durch Bindung von cAMP kommt es zu einer Konformationsänderung und dadurch zur Aufhebung des Verschlusses der Membranpore (vergleiche Abbildung 3). Die Konzentration von cAMP bestimmt damit den Anteil der „aktivierbaren“ I_h -Kanäle (Wainger et al. 2001). Von großem Interesse ist, wie groß die Bedeutung von I_h bei der Festlegung der Erregbarkeit von Neuronen ist, und ob es Unterschiede zwischen den Faserklassen gibt.

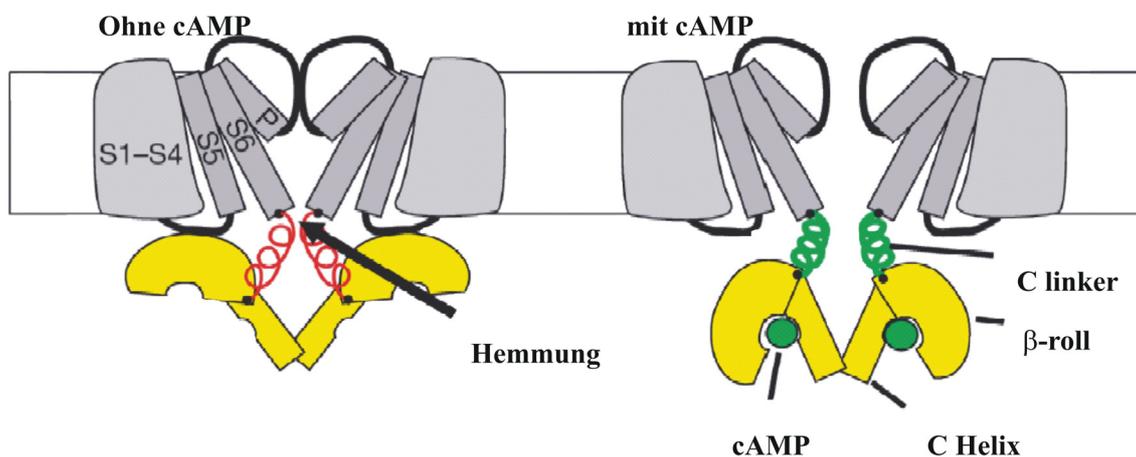


Abbildung 3: Struktur von I_h und die Öffnung der Membranpore nach Bindung von cAMP an die C-terminale CNBD (modifiziert nach Wainger et al. 2001)

Nach einem Aktionspotential kommt es in Neuronen zu einer unterschiedlich langen Refraktärperiode, deren Grundlage unter anderem eine Hyperpolarisation der Nervenzellmembran ist. Während dieser Zeit ist die Erregbarkeit der Faser reduziert, für die Auslösung eines erneuten Aktionspotentials ist eine höhere Energie als unter Ruhebedingungen nötig. Diese unter experimentellen Bedingungen beobachtete „Erhöhung“ der Erregungsschwelle geht mit einer Abnahme der Nervenleitgeschwindigkeit, erkennbar an der Latenzzunahme, einher (Bostock und Grafe 1985). Repetitive Stimulation führt zu einer stetigen Abnahme der Fasererregbarkeit und zu einer zunehmenden Verlangsamung der Faser (deshalb wird dieses Phänomen auf Englisch auch sehr treffend als „activity-dependent slowing“ bezeichnet). Dabei kommt

es jedoch nicht in allen Fasern zur gleichen Reaktion während der wiederholten Stimulation, vielmehr lassen sich die einzelnen C-Faser-Klassen anhand ihrer Verlangsamung eindeutig voneinander unterscheiden (Raymond et al. 1990; Thalhammer et al. 1994; Gee et al. 1996; Weidner et al. 1999).

Für eine Funktion von I_h in diesem Zusammenhang sprechen die Ergebnisse von Grafe et al. (1997) und Takigawa et al. (1998), die in Experimenten an isolierten sensiblen Nerven bei Verwendung von I_h -Blockern eine Zunahme der Latenz des C-Faser Summenaktionspotentials zeigen konnten. Allerdings untersuchten sie nicht den selektiven Effekt von I_h auf unterschiedliche Neurone. Eine größere Dichte von I_h -Kanälen auf den Membranen der hitzeunempfindlichen Fasern könnte die unterschiedlichen Reaktionen von hitzeunempfindlichen und hitzesensiblen Fasern erklären. Die Hyperpolarisation in Folge des Aktionspotentials würde dadurch in der Gruppe der hitzeunempfindlichen Fasern schneller in Richtung des Ruhemembranpotentials zurückgeführt und die Refraktärperiode wäre verkürzt. Unterschiede in den Latenzänderungen der einzelnen Faserklassen könnten aber auch auf der Expression von HCN-Isoformen mit unterschiedlichen Aktivierungskinetiken beruhen. Für beide Annahmen ergeben sich Hinweise aus den Beobachtungen an Spinalganglienneuronen. In der Gruppe der Zellen mit kleinem Durchmesser konnten etwa 80% in in situ Hybridisierungsexperimenten mit Anti-HCN 1-Sequenzen markiert werden, HCN 2 wurde in 60% der kleinen Neurone nachgewiesen (Moosmang et al. 2001). Weiter konnte gezeigt werden, dass in den capsaicin-sensiblen Spinalganglienzellen, für die man eine Rolle bei der Transduktion von Hitzereizen annimmt, das Expressionsniveau der HCN-Isoformen am niedrigsten war (Juerta et al. 2002), was ein Grund für die großen Latenzänderungen der hitzesensiblen Fasern sein könnte.

Eigenschaften von $Na_{v1.8}$ -Kanälen

Ein weiterer Faktor, der bei der Erregbarkeit von C-Fasern eine Rolle spielt, ist der spannungsabhängige Na^+ -Kanal $Na_{v1.8}$ (Akopian et al. 1999; Waxman et al. 1999; Waxman et al. 2000). Die alte Bezeichnung SNS stand für „sensory neuron specific“, da die Expression von $Na_{v1.8}$ hauptsächlich in Neuronen von C-Fasern erfolgt. $Na_{v1.8}$ wird jedoch nicht von allen C-Fasern exprimiert, vielmehr ist die Expression vornehmlich auf hitzesensible Neurone beschränkt. $Na_{v1.8}$ -exprimierende Neurone fallen in Patch-

clamp Experimenten durch die Existenz eines Tetrodotoxin-resistenten Na^+ -Stroms auf, der in diesen Neuronen für die schnelle Aufstrichphase während eines Aktionspotentials verantwortlich ist (Elliott und Elliott 1993). In Experimenten an $\text{Na}_{v1.8}$ knock-out Mäusen konnte kürzlich gezeigt werden, dass C-Fasern von knock-out Tieren während Stimulationen mit höherer Frequenz signifikant mehr Leitungsblocks hatten als diejenigen von Wildtyp-Mäusen. Ferner kam es während einer Spannungsklemme auf depolarisierte Potentiale in den $\text{Na}_{v1.8}$ -defizienten Tieren zu einer niedrigeren Aktionspotentialfrequenz als bei den $\text{Na}_{v1.8}$ -exprimierenden Tieren (Renganathan et al. 2001). In entzündeten Geweben kommt es zu einer Zunahme der TTX-R Na^+ -Ströme und damit verbunden zu einer höheren Aktionspotentialfrequenz (Cardenas et al. 1997; Gold 1999; Cardenas et al. 2001).

Sowohl I_h -Ströme als auch $\text{Na}_{v1.8}$ -Kanäle sind also gute Kandidaten für die Steuerung der Erregbarkeit von Nozizeptoren. Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass für beide Kanäle eine gleichsinnige, zu größerer Erregbarkeit führende, Beeinflussung der Aktivierungskinetik durch Entzündungsmediatoren gezeigt werden konnte. Die bei entzündlichen und neuropathischen Schmerzen beobachtete Hyperalgesie und das auftreten von spontanen, stimulusunabhängigen Schmerzen könnte zu einem Teil durch eine entsprechende Modulation von I_h und $\text{Na}_{v1.8}$ erklärt werden.

Fragestellung

In dieser Arbeit ging es zunächst darum, die Veränderung der Latenz (und damit der Erregbarkeit) von C-Fasern der Maus in Folge von elektrischer Stimulation (=Aktivität) zu analysieren. Zu diesem Zweck wurde das Verhalten von CM-, CMC-, CMH- und CMHC-Fasern in Wildtyp-Mäusen während verschiedener Stimulationsprotokolle untersucht, die verwendeten Stimulationsprotokolle unterschieden sich dabei in der Anzahl der applizierten Stimuli, in der Stimulationsfrequenz und in der Stimulationsdauer. Als nächstes wurde betrachtet, zu welchen Veränderungen es in Folge einer Blockade von I_h -Kanälen mittels Cs^+ bzw. ZD 7288 kam. Schließlich wurde noch das Verhalten der C-Fasern von $\text{Na}_{v1.8}$ knock-out Tieren während repetitiver elektrischer Stimulation untersucht.

2 Material und Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden die Daten in einem Haut-Nerv-Präparat erhoben. Die Messungen wurden an 30 adulten C57BL/6 Mäusen und an 5 aus diesem genetischen Hintergrund generierten adulten $Na_{v1.8}$ knock-out Mäusen (Akopian et al. 1999) vorgenommen. Die $Na_{v1.8}$ knock-out Mäuse wurden mir freundlicherweise von John Wood überlassen (University College of London, London, Großbritannien).

Haut-Nerv-Präparat

Bei diesem Haut-Nerv-Präparat handelt es sich um eine Modifikation des erstmals von Peter Reeh (1986) beschriebenen experimentellen Aufbaus. Er konnte zeigen, dass die Eigenschaften der in diesem In-vitro-Experiment abgeleiteten Afferenzen von Ratten denen von In-vivo-Experimenten entsprachen. Martin Koltzenburg übertrug den experimentellen Aufbau auf Mäuse (Koltzenburg et al. 1997).

Die Mäuse wurden durch CO_2 -Inhalation oder durch zervikale Dislokation getötet. Zunächst wurden die Haare im Präparationsbereich mit einem Haarschneider entfernt. Die Mäuse wurden dann auf einem mit Alufolie ummantelten Styroporblock befestigt, der als Präpariertisch diente. Zunächst wurde ein etwa 2 cm großer Einschnitt in der inguinalen Region vorgenommen, der mit einer Präparierschere vorsichtig erweitert wurde, bis der Nervus saphenus in der Tiefe sichtbar wurde. Daraufhin wurde ein zirkulärer Schnitt im Bereich der Leiste durchgeführt, auf der Vorderseite des Oberschenkels wurde die Haut medial bis einige Millimeter oberhalb des Kniegelenks durchtrennt. Auf dieser Höhe wurde erneut ein zirkulärer Schnitt vorgenommen. Auf diese Weise konnte der Verlauf des Nervus saphenus im Bereich des Oberschenkels eingesehen werden. Nun wurde mit Hilfe von feinen Pinzetten unter einer Präparationslupe (Leica MZ 6, Vergrößerung 25-50x) das Bindegewebe und die Muskulatur oberhalb des Nerven gespalten und der Nerv von den begleitenden Gefäßen gelöst, wobei darauf geachtet wurde, dass der Nerv nicht direkt berührt wurde. Auf diese Weise wurde der Nerv vom Leistenband bis auf Höhe des Kniegelenks freigelegt. Im nächsten Schritt wurde auf der Dorsalseite des Unterschenkels die Haut bis zur

Fußsohle durchtrennt, von diesem Schnitt ausgehend wurden am Fuß die Präparatgrenzen festgelegt. Hierzu wurde seitlich entlang der Grenze von Fußsohle und Fußrücken geschnitten, im Bereich der Zehen wurde ebenso verfahren und schließlich wurde die Haut auf der Oberfläche der Zehen möglichst distal durchtrennt. An den Schnittträgern wurde die Haut mit Hilfe einer Pinzette vorsichtig angehoben, um das Bindegewebe zwischen Haut und der darunterliegenden Muskulatur einsehen zu können. Dieses wurde mit einer feinen Federschere durchtrennt, wobei darauf geachtet wurde, dass keine kleinen Nervenäste durchtrennt wurden. An der Eintrittsstelle des Stamms des Nervus saphenus in die Haut wurde besonderes Augenmerk darauf gerichtet, dass in diesem Bereich keine Muskulatur am Präparat verblieb. Nachdem das vom Nervus saphenus innervierte Hautareal auf diese Weise freipräpariert worden war, wurde als nächstes das Leistenband durchtrennt und der Nerv so weit wie möglich nach proximal verfolgt. Hier erfolgte dann eine Ligatur und der Nervenstamm wurde durchtrennt. Das so erhaltene Haut-Nerv-Präparat wurde in ein Organbad gegeben. Während der gesamten Präparation wurde darauf geachtet, dass das Gewebe feuchtgehalten wurde.

Im Organbad zirkulierte eine modifizierte synthetische interstitielle Flüssigkeit (SIF), die sich wie folgt zusammensetzte: 123 mM NaCl, 3,5 mM KCl, 0,7 mM MgSO₄, 1,7 mM NaH₂PO₄, 2,0 mM CaCl₂, 9,5 mM Na-Glukonat, 5,5 mM Glukose, 7,5 mM Fruktose und 10 mM N-2-2-Hydroxyethyl-1-piperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure (HEPES). Von dieser Lösung wurden 2 Liter hergestellt, sie wurde durch Zugabe von etwa 10 ml einer 1 M NaOH-Lösung auf einen pH-Wert von 7,40 titriert. Die SIF wurde mit Sauerstoff gesättigt, auf 32°C erwärmt und zirkulierte mit einer Flussrate von 16 ml/min durch das Organbad. Im Organbad wurde das Hautstück mit der epidermalen Oberfläche nach unten mit Hilfe von Insektennadeln befestigt. Diese Anordnung wurde gewählt, um die Sauerstoffversorgung durch die Coriumseite zu erleichtern. Durch Zug an der Ligatur wurde der Nerv unter einer Barriere hindurch in die Messkammer geführt und hier auf einem kleinen Spiegel platziert. Nachdem sich der Nerv mittig auf diesem Spiegel befand, wurde die Ligatur entfernt. In die Messkammer wurde nun Paraffinöl gegeben, bis der Spiegel der SIF knapp unterhalb der Spiegeloberfläche lag. Zum einen diente das Paraffinöl dazu, den Nerven in seiner Position zu halten, wichtiger war es aber als elektrischer Isolator während der Messungen. Im nächsten Schritt wurde unter

mikroskopischer Sicht mit Uhrmacherpinzetten das Epineurium entfernt, so dass die einzelnen Nervenfasern frei auf dem Spiegel lagen. Die Fasern wurden in 3 bis 4 größere Stränge separiert, diese wurden dann so lange weiter aufgeteilt, bis bei der späteren Messung nur noch eine einzelne Einheit auf Reizung antwortete. Zur Messung wurden die Fasern an eine Goldelektrode angelegt, die sich im elektrisch isolierenden Paraffinöl befand, die Referenzelektrode befand sich in der SIF der Messkammer. Die über die Messelektrode registrierten Ströme wurden nach Passage durch einen Vorverstärker über eine Hoch-/Tiefpasseinheit von der Hintergrundaktivität separiert und dann verstärkt. Das resultierende Signal wurde auf einem analogen und auf einem digitalen Oszilloskop dargestellt, zusätzlich wurde es über einen Lautsprecher hörbar gemacht. Zur weiteren Analyse wurden die Daten über einen AD-Wandler und eine DAP 1200-Karte auf einen Windows-basierten PC übertragen.

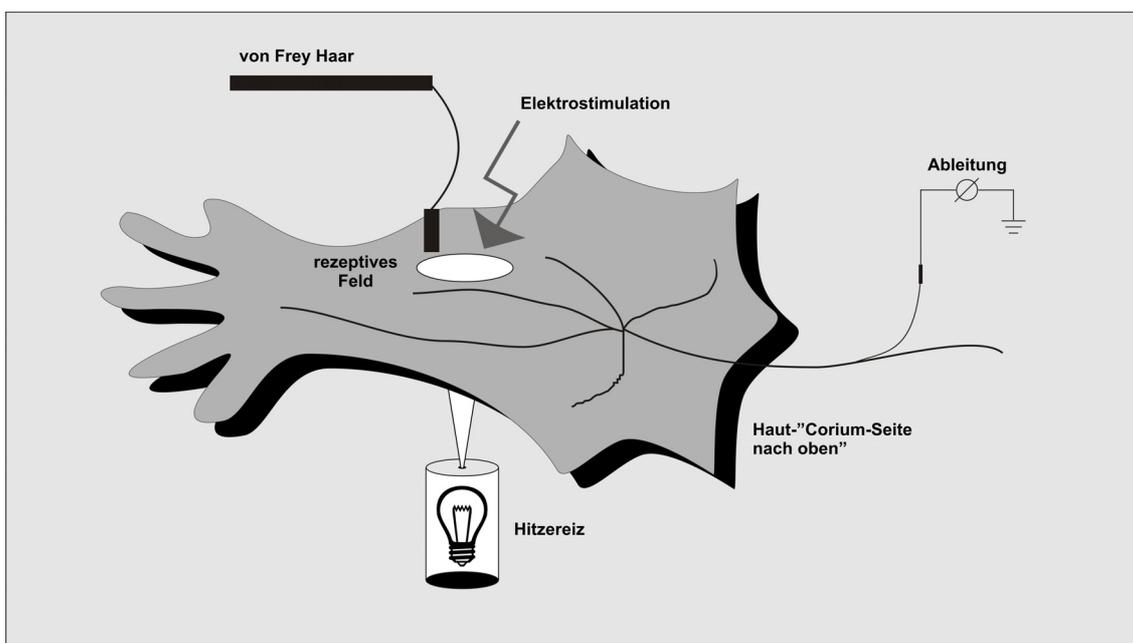


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Haut-Nerv-Präparats

Erschien das Faserbündel klein genug, so wurde es an die Messelektrode angelegt. Dann wurde mit einem Glasspatel das Hautstück nach rezeptiven Feldern durchsucht, durch diese Technik können mehr als 90% der mechanosensiblen Einheiten stimuliert werden (Kress et al. 1992). Wenn mehr als ein rezeptives Feld gefunden wurde, und wenn sich in einem Filament mehrere Einheiten befanden, so wurde das Filament solange weiteraufgeteilt, bis bei der späteren Ableitung nur noch Aktionspotentiale von einer einzelnen Nervenfasern ausgelöst werden konnten. In die Analyse wurden nur

Fasern eingeschlossen, deren Signal mindestens 3-mal größer als das Hintergrundrauschen war (signal-to-noise ratio $\geq 3:1$). Nach genauer Lokalisierung des rezeptiven Felds wurde über einen Mikromanipulator eine Mikroneurographieelektrode in diesem platziert. Die hier verwendete Mikroneurographieelektrode war teflonbeschichtet und die Ströme wurden nur an der unisolierten Spitze (10 μm Durchmesser) abgegeben. Es wurde nun alle 3 Sekunden ein elektrischer Reiz (rechteckförmig, Dauer zwischen 0,1 und 1 ms) im Bereich des rezeptiven Felds appliziert, dabei wurde die Spannung so lange erhöht, bis ein Aktionspotential ausgelöst wurde. Nachdem auf diese Weise die elektrische Reizschwelle der Einheit bestimmt worden war (für die hier untersuchten C-Fasern lag die elektrische Reizschwelle im Bereich von 10 und 20 V), wurde im folgenden mit der doppelten Spannung stimuliert. Dadurch wurde gewährleistet, dass stets genügend Strom zur Auslösung eines Aktionspotentials floss. Um sicherzustellen, dass es sich bei der elektrisch und mechanisch stimulierten Faser um dieselbe handelte, wurde während der elektrischen Stimulation ein kurzer mechanischer Stimulus im Bereich des mechanisch identifizierten rezeptiven Felds appliziert, was im Falle der Identität zu einer kurzen Latenzzunahme führte (Iggo 1958; Kress et al. 1992; Schmelz et al. 1995). Handelte es sich bei der elektrisch stimulierten Faser um die richtige, so wurde im nächsten Schritt die Nervenleitgeschwindigkeit bestimmt. Dazu wurde die Distanz zwischen der Stimulationselektrode und der Messelektrode gemessen. Durch Division mit der Latenz errechnete sich die Nervenleitgeschwindigkeit. Lag diese unter 1,2 m/s, also im C-Faser-Bereich, so wurde die Faser weiter charakterisiert.

Charakterisierung der C-Fasern

Zunächst wurde mit kalibrierten von Frey Haaren die Empfindlichkeit für mechanische Stimuli bestimmt. Dabei lag der von den von Frey Haaren auf das rezeptive Feld ausgeübte Druck zwischen 1 mN und 190 mN, der Durchmesser der Spitze betrug 0,8 mm.

Um das Verhalten der Fasern während thermischer Reizung zu untersuchen, wurde zunächst das rezeptive Feld durch einen selbstabdichtenden Metallring (Durchmesser zwischen 4 und 6 mm) vom Organbad abgetrennt. Dann wurde mit einer Spritze die SIF aus dem Ring entfernt und eine Temperaturmesssonde so in dem Ring platziert, dass sie

das Corium eben gerade berührte, ohne jedoch die Faser mechanisch zu stimulieren. Nun wurde auf 4°C bis 6°C abgekühlte SIF mit einer Spritze in den Ring gegeben, wobei darauf geachtet wurde, dass der Strahl nicht direkt auf das rezeptive Feld traf, was zu einer mechanischen Reizung führen könnte. Nach der passiven Wiedererwärmung wurde die SIF erneut aus dem Ring entfernt, bevor die Hitzesensibilität getestet wurde. Zur Hitzereizung wurde unter dem lichtdurchlässigen Boden des Organbads eine Halogenlampe platziert, die an ein Steuergerät angeschlossen war. Durch die gleichzeitige Messung der Temperatur mit der Temperaturmesssonde regelte das Steuergerät die Lichtintensität der Halogenlampe so, dass während einer Zeitdauer von 15 s die Temperatur linear um 1°C/s anstieg, damit wurde das rezeptive Feld also von 32°C auf 47°C erwärmt. Es konnte gezeigt werden, dass auf der Coriumseite gemessene 47°C einem Hitzereiz von 52°C auf der epidermalen Oberfläche entsprechen (Reeh 1986). Die Fasern wurden als kälteempfindlich angesehen, wenn es während des Abfalls der Temperatur zur Entladung kam, als hitzeempfindlich galten sie, wenn es während der Hitzerampe zur Generation von mindestens 2 Aktionspotentialen kam.

Elektrische Stimulation

Nach der Charakterisierung der Fasern wurde mit der elektrischen Stimulation begonnen. Hierzu wurde die Mikroneurographieelektrode erneut im Bereich des rezeptiven Felds platziert, die Stimulation erfolgte mit einer Spannung, die der doppelten elektrischen Reizschwelle entsprach. Die Stimulationsfrequenz betrug zunächst 0,33 Hz, eine Reizung erfolgte also alle 3 Sekunden. Dabei erreichten alle Fasern nach einigen Sekunden eine stabile Latenz.

Stimulation mit einer unterschiedlichen Anzahl von Interstimuli

Um die Frage zu beantworten, wie eine unterschiedliche Anzahl von Interstimuli als konditionierende Stimuli die Latenz der Fasern beeinflusste, wurden nacheinander zwischen 1 und 10 Interstimuli appliziert. Dabei wurde vor Applikation der nächst höheren Interstimuluszahl stets bis zur Rückkehr der Fasern auf die Ausgangslatenz gewartet. Als optimale Stimulationparameter erwiesen sich hierbei ein zeitlicher Abstand von 500 ms zwischen konditionierenden Stimuli und Hauptstimulus, der Abstand zwischen den einzelnen Interstimuli betrug 100 ms (entsprechend einer

Frequenz von 10 Hz). Analysiert wurde die Latenzänderung des auf die Interstimuli folgenden Hauptstimuluses, ferner wurde die Zeitdauer bis zur 75%-igen Wiederannäherung der Fasern an die Ausgangslatenz nach Applikation von 10 Interstimuli bestimmt.

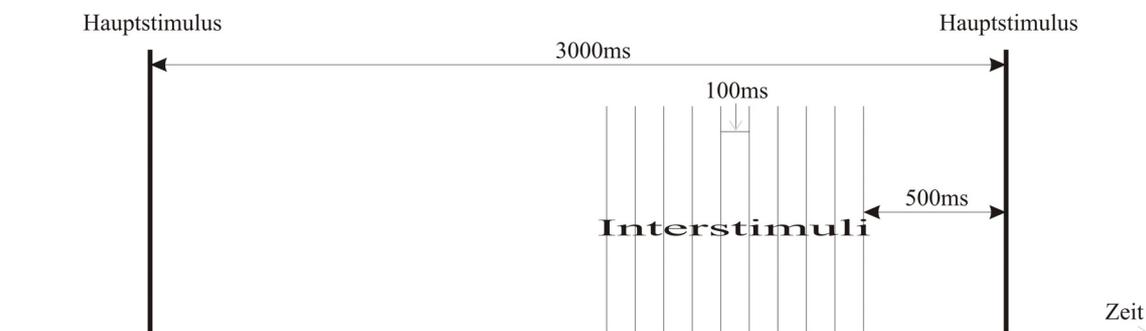


Abbildung 5: Darstellung der Stimulationsparameter am Beispiel von 10 Interstimuli

Stimulation über 30 oder 60 Sekunden mit einer Frequenz von 3 Hz

Der Einfluss der Stimulationsdauer auf die Latenzänderung wurde durch intermittierende Stimulation mit einer Frequenz von 3 Hz während einer Grundstimulation mit 0,33 Hz betrachtet. Dabei betrug die Stimulationsdauer 30 oder 60 Sekunden. Auch hier wurde die maximale Latenzänderung in Folge der Stimulation mit 3 Hz und die Zeit bis zur 75%-igen Erholung der Fasern bestimmt.

Cs⁺ und ZD 7288

Um den Einfluss von I_h-Kanälen auf das Verhalten von C-Fasern während repetitiver elektrischer Stimulation zu untersuchen, wurden die I_h-Kanal-Blocker Cs⁺ und ZD 7288

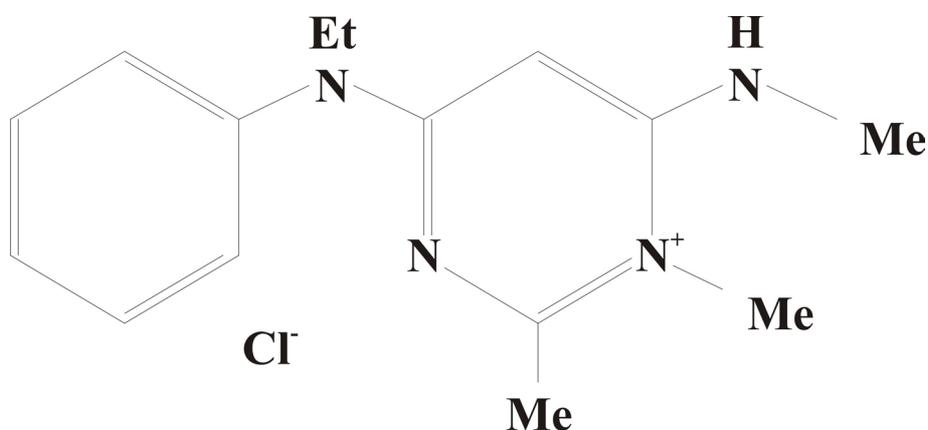


Abbildung 6: Struktur von ZD 7288

verwendet. Salines CsCl wurde mit SIF versetzt, um eine Konzentration von 5 mM zu erhalten. ZD 7288 wurde zunächst in destilliertem Wasser aufgelöst, die Konzentration von ZD 7288 in dieser Lagerlösung betrug 55 mM. Durch Zugabe einer entsprechenden Menge SIF wurden ZD 7288-Lösungen von 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M und 50 μ M hergestellt. Appliziert wurden Cs⁺ bzw. ZD 7288 in einen selbstabdichtenden Metallring im Bereich des rezeptiven Felds der Faser, die Einwirkdauer von Cs⁺ betrug 9 min, ZD 7288 wurde über 9 min und in einem Teil der Experimente über 5 min angewendet. Nach Ablauf der Einwirkzeit wurden entweder 10 Interstimuli appliziert oder über 30 bzw. 60 s mit einer Frequenz von 3 Hz stimuliert. Nach Ablauf von 2,5 min wurde im Fall von ZD 7288 die 1 μ M-Lösung durch die 3 μ M-Lösung ersetzt, nach einer entsprechenden Einwirkdauer wurden erneut 10 Interstimuli appliziert oder über 30 bzw. 60 s mit 3 Hz stimuliert. Danach wurde mit den 10 bis 50 μ M-Lösungen ebenso verfahren, es sei denn, es traten Leitungsblocks auf. Zwischen den einzelnen Stimulationsperioden wurden die Fasern kontinuierlich mit einer Frequenz von 0,33 Hz stimuliert.

Na_{v1.8} knock-out Mäuse

In den Na_{v1.8}-defizienten Tieren wurde ebenfalls der Einfluss der Anzahl der applizierten Interstimuli auf die Latenz der Fasern betrachtet. Das Vorgehen hierbei entsprach dem oben dargestellten.

Wurden die Fasern der knock-out Mäuse über eine Zeitdauer von 1 min mit einer Frequenz von 3 Hz stimuliert, so fiel insbesondere bei den hitzeempfindlichen Fasern eine Häufung von Leitungsblocks auf, weshalb die C-Fasern der knock-out-Tiere zusätzlich mit einer Frequenz von 1 und 2 Hz für 1 min stimuliert wurde. Neben der maximal erzielbaren Latenzänderung und der Erholungszeitdauer wurde deshalb auch die Häufigkeit von Leitungsblocks bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen betrachtet.

Datenanalyse

Die Daten der durchgeführten Experimente wurden auf dem PC in das Spike/Spidi Software Paket (Forster und Handwerker 1990) eingelesen und für die Offline-Analyse gespeichert. Bei dem Spike/Spidi Software Paket handelt es sich um ein Spike-Diskriminations-Programm, mit dessen Hilfe die interessierenden Aktionspotentiale

(=Spikes) gezielt betrachtet werden können. Das Antwortverhalten während mechanischer und thermischer Stimulation wurde mit dem speziell für diese Zwecke geschriebenen Programm Analyse (Indisoft, Würzburg) ausgewertet. Die Bestimmung der Latenzen erfolgte mit einem für diesen Zweck geschriebenen Programm, die Weiterverarbeitung der resultierenden Daten erfolgte in Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA).

Alle Daten dieser Arbeit wurden in Microsoft Excel Tabellen gespeichert, die statistische Auswertung erfolgte mit dem Statistica Software Paket (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Die statistische Testung erfolgte bei Erfüllung der Testkriterien mit ANOVA, dem Student-t-Test oder dem χ^2 -Test. Alle Werte sind als Mittelwert \pm S.E.M. angegeben. Graphen wurden in Origin (Microcal Software, Inc., Northhampton, MA, USA) generiert und mit CorelDraw 10 (Corel Corporation, Ottawa, Ontario, Canada) nachbearbeitet. Einzelne Graphen wurden direkt in CorelDraw gezeichnet. Der Text der Arbeit wurde in Microsoft Word 2000 erstellt (Microsoft Corporation, USA), die Literaturverwaltung erfolgte mit Endnote 6.0 (Thomson ISI ResearchSoft, USA).

Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden über Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) bezogen, mit Ausnahme der Substanz ZD 7288, die über Biotrend (Biotrend Chemikalien GmbH, Köln) bezogen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Wildtyp Tiere

3.1.1 Charakterisierung der abgeleiteten C-Fasern

Insgesamt wurden 46 C-Fasern in Wildtyp-Mäusen abgeleitet, wovon 9 Fasern lediglich mechanosensibel (CM), 3 Fasern sowohl mechano- als auch kältesensibel (CMC) und weitere 26 Fasern mechano- und hitzesensibel waren (CMH). Die verbleibenden 8 Fasern antworteten auf mechanische sowie auf Hitze- und Kältestimuli (CMHC). Abbildung 7 zeigt die Verteilung der einzelnen Faserklassen.

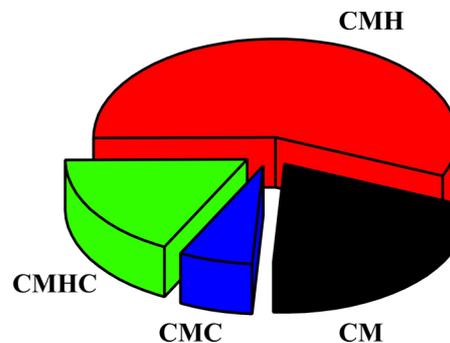


Abbildung 7: Verteilung der C-Fasern (n=46)

Die mittlere Nervenleitgeschwindigkeit betrug bei den CM-Fasern $0,51 \pm 0,07$ m/s, $0,53 \pm 0,09$ m/s bei den CMC-Fasern, $0,45 \pm 0,02$ m/s bei den CMH-Fasern sowie $0,43 \pm 0,02$ m/s in der Gruppe der CMHC-Fasern. Es bestand kein signifikanter Unterschied für die mittleren Nervenleitgeschwindigkeiten der einzelnen Klassen (ANOVA, $F=1,3$, $p>0,25$).

Für die mit von Frey Haaren bestimmten mechanischen Reizschwellen der einzelnen Fasern ergab sich für die CM-Fasern ein Wert von $9,6 \pm 1,9$ mN, für die CMC-Fasern $12,1 \pm 7,0$ mN, für die CMH-Fasern $6,3 \pm 0,8$ mN und schließlich $9,1 \pm 1,2$ mN für die CMHC-Fasern. Auch für die mechanische Reizschwelle ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Faserklassen (ANOVA, $F=1,1$, $p>0,25$).

3.1.2 Abhängigkeit der aktivitätsinduzierten Latenzsprünge von der Zahl der Interstimuli und von der Dauer des Stimulationsintervalls

Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass es in Folge von Aktivität bei C-Fasern zu charakteristischen Änderungen der Latenz kommt. Um dieses Phänomen und die zugrunde liegenden Mechanismen weiter zu untersuchen, wurde nach der Charakterisierung der Fasern zunächst der Einfluss der Anzahl der Interstimuli auf die Größe der Latenzsprünge untersucht. Hierzu wurden zwischen 1 und 10 Interstimuli appliziert und die resultierenden Latenzsprünge analysiert. Insgesamt wurden 37 Fasern nach diesem Protokoll abgeleitet, 7 CM-, 3 CMC-, 5 CMHC- und 22 CMH-Fasern.

Bei den CMH-Fasern kam es zu einer Zunahme der Latenzsprünge von $0,9 \pm 0,2$ ms bei 1 Interstimulus über $5,1 \pm 0,6$ ms bei 6 Interstimuli auf $7,9 \pm 0,9$ ms bei 10 Interstimuli (ANOVA, $F=19,4$, $p < 0,001$). Abbildung 8 zeigt beispielhaft die Originalableitung einer CMH-Faser, in dieser Darstellung kann man deutlich die Zunahme der Latenzsprünge mit zunehmender Interstimuluszahl sehen.

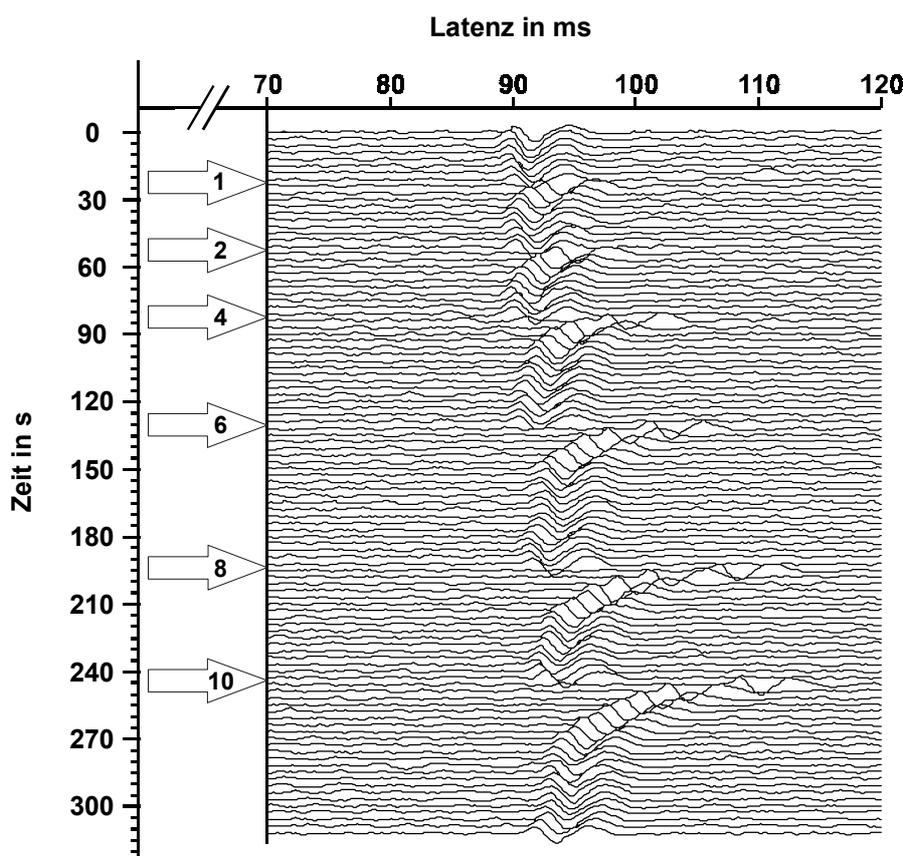


Abbildung 8: Originalableitung einer CMH-Faser. Nach rechts aufgetragen ist die Latenz, nach unten die verstrichene Zeit, die Zeit zwischen den einzelnen Spuren beträgt 3 s. Die Zahlen in den Pfeilen markieren die Anzahl der applizierten Interstimuli.

Die CMHC-Fasern zeigten ein vergleichbares Verhalten, die entsprechenden Werte für die Latenzänderung waren hier $0,8 \pm 0,2$ ms bei 1 Interstimulus, $4,9 \pm 0,8$ ms bei 6 Interstimuli und $7,1 \pm 1,3$ ms bei 10 Interstimuli (ANOVA, $F=9,2$, $p < 0,001$). Bei den CMC-Fasern ergaben sich erheblich geringere Latenzsprünge von $0,2 \pm 0,1$ ms bei 1 Interstimulus, $0,4 \pm 0,2$ ms bei 6 Interstimuli und $1,1 \pm 0,1$ ms bei 10 Interstimuli (ANOVA, $F=9,0$, $p < 0,05$). Dabei fiel auf, dass die Latenzsprünge in der Gruppe der CMC-Fasern erst mit höherer Interstimuluszahl und in geringerem Ausmaß als bei den CMH- und CMHC-Fasern zunahmen. So bestand kein signifikanter Unterschied in der Größe der Latenzsprünge bei 1, 2 und 4 Interstimuli, die Latenzsprünge bei 10 Interstimuli unterschieden sich allerdings signifikant von denen bei 1, 2, 4 und 6 Interstimuli (LSD, $p < 0,05$). Bei den CM-Fasern traten Latenzsprünge von $1,8 \pm 0,8$ ms bei 1 Interstimulus, $2,5 \pm 0,8$ ms bei 6 Interstimuli und $1,9 \pm 1,9$ ms bei 10 Interstimuli auf (ANOVA, $F=0,4$, $p > 0,5$). Diese Gruppe von Fasern zeigte somit keine erkennbare Abhängigkeit der Größe der Latenzänderung von der Anzahl der Interstimuli. Abbildung 9 stellt die Ergebnisse für die einzelnen Faserklassen einander gegenüber. Bei Betrachtung der relativen Werte für die Latenzsprünge ergaben sich dieselben signifikanten Unterschiede wie bei den absoluten Werten, wegen der größeren Aussagekraft wurde deshalb im Folgenden mit den absoluten Werten gerechnet. In Tabelle 1 sind zur Information die relativen Werte angegeben.

Tabelle 1: *Relative Latenzsprünge in den einzelnen Faserklassen in Abhängigkeit von der Interstimulusanzahl (Mittelwert \pm S.E.M.)*

Faserklasse	Interstimulusanzahl					
	1	2	4	6	8	10
CM	2,9 \pm 1,4%	2,2 \pm 0,9%	4,8 \pm 2,1%	5,8 \pm 2,0%	5,1 \pm 2,2%	4,8 \pm 2,7%
CMC	0,3 \pm 0,2%	0,3 \pm 0,2%	0,3 \pm 0,3%	0,7 \pm 0,2%	1,2 \pm 0,1%	2,0 \pm 0,4%
CMHC	1,3 \pm 0,3%	2,8 \pm 0,4%	4,9 \pm 1,1%	7,9 \pm 0,7%	9,4 \pm 1,5%	11,4 \pm 1,7%
CMH	1,5 \pm 0,3%	3,5 \pm 0,6%	4,9 \pm 0,5%	7,6 \pm 0,8%	9,2 \pm 0,9%	11,6 \pm 0,9%

Beim Vergleich der Größe der absoluten Latenzsprünge von den CMH- und CMHC-Fasern ließ sich kein signifikanter Unterschied erkennen (ANOVA, $F=0,05$, $p > 0,5$), beim Vergleich der CM-Fasern mit den CMC-Fasern ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied (ANOVA, $F=0,2$, $p > 0,5$). Somit schien es gerechtfertigt, für die weitere Analyse CMH- und CMHC-Fasern als hitzesensible den CM- und CMC-Fasern als hitzeunempfindliche Fasern gegenüber zu stellen. Die hitzeunempfindlichen

Fasern ließen im Vergleich zu den hitzesensiblen Fasern keine Abhängigkeit der Größe der Latenzsprünge von der Interstimuluszahl erkennen, hier änderte sich die Latenz um $1,1 \pm 0,6$ ms bei 1 Interstimulus, um $1,6 \pm 0,6$ ms bei 6 Interstimuli und um $1,7 \pm 0,6$ ms bei 10 Interstimuli (ANOVA, $F=0,3$, $p>0,5$). Für die hitzesensiblen Fasern zeigte sich dagegen eine Zunahme der mittleren Latenzsprünge von $0,9 \pm 0,2$ ms

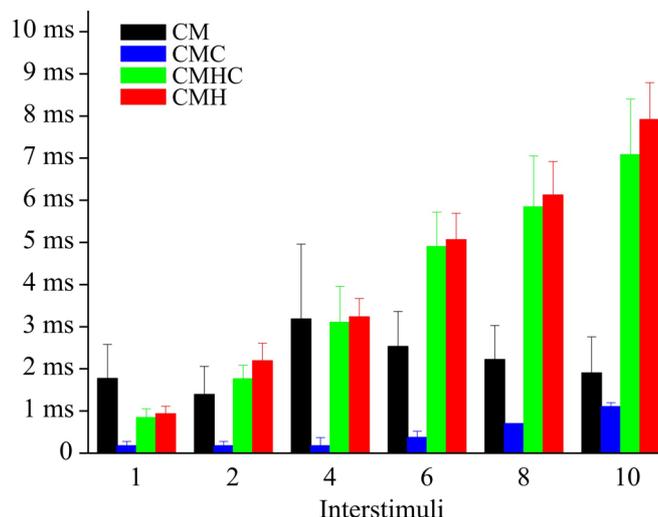


Abbildung 9: Latenzsprünge der einzelnen Faserklassen in Abhängigkeit von der Anzahl der Interstimuli (Mittelwerte \pm S.E.M.) [CM=7, CMC=3, CMHC=5, CMH=22 Fasern]

bei 1 Interstimulus über $5,0 \pm 0,5$ ms bei 6 Interstimuli auf $7,8 \pm 0,4$ ms bei Applikation von 10 Interstimuli (ANOVA, $F=26,5$, $p<<0,001$). Abbildung 10 stellt die mittleren Latenzänderungen der hitzesensiblen und hitzeunempfindlichen Fasern einander gegenüber.

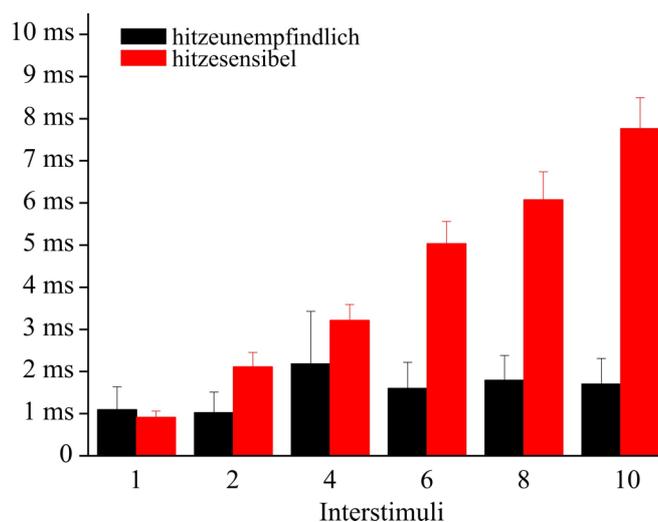


Abbildung 10: Latenzsprünge für hitzesensible ($n=27$) und hitzeunempfindliche Fasern ($n=10$) in Abhängigkeit von der Anzahl der Interstimuli (Mittelwert \pm S.E.M.)

Die Reaktionen der hitzesensiblen und der hitzeunempfindlichen Fasern auf eine zunehmende Anzahl von Interstimuli unterschieden sich signifikant voneinander (ANOVA, $F=5,3$, $p<0,001$), ab 6 Interstimuli ließen sich hitzesensible Fasern anhand der Größe ihrer Latenzsprünge eindeutig von hitzeunempfindlichen Fasern unterscheiden (LSD, $p<0,05$). Noch deutlicher wurde dieser Unterschied der Latenzänderungen zwischen hitzesensiblen und hitzeunempfindlichen Fasern bei direkter Gegenüberstellung der Latenzsprünge bei 1 Interstimulus und bei 10 Interstimuli (Abbildung 11).

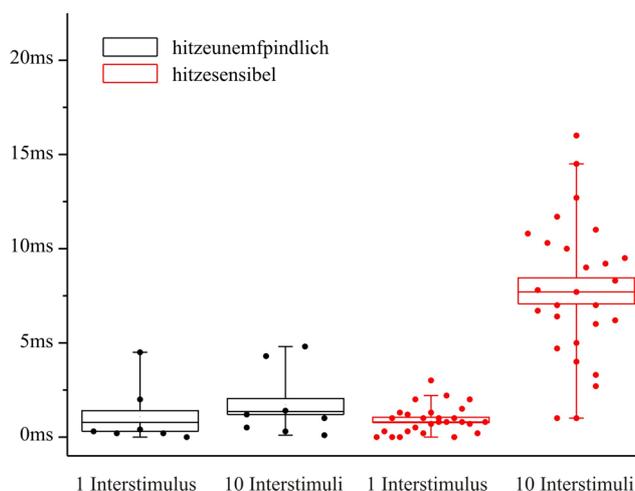


Abbildung 11: Absolute Latenzsprünge für hitzesensible und hitzeunempfindliche Fasern bei 1 Interstimulus und bei 10 Interstimuli (jeder Punkt entspricht einer Faser, die Linien zeigen den Mittelwert, die Boxen den S.E.M. und die Whisker das 5%-95%-Intervall)

Für die hitzeunempfindlichen Fasern bestand hierbei kein signifikanter Unterschied der Latenzsprünge bei 1 Interstimulus und bei 10 Interstimuli (ANOVA, $F=0,5$, $p>0,5$), während sich bei den hitzesensiblen Fasern ein eindeutiger Einfluss der Anzahl der Interstimuli auf die Größe der Latenzsprünge zeigte (ANOVA, $F=85,8$, $p<<0,001$). Aus Abbildung 11 geht ebenfalls hervor, dass bei 10 Interstimuli lediglich eine vernachlässigbare Überlappung der absoluten Latenzsprünge von hitzesensiblen und hitzeunempfindlichen Fasern bestand: Fasern, bei denen sich nach Applikation von 10 Interstimuli die Latenz um mehr als 5 ms änderte, konnten eindeutig den hitzesensiblen Fasern zugeordnet werden.

Als nächstes wurde der Einfluss der Nervenleitgeschwindigkeit auf die aktivitätsinduzierte Latenzänderung betrachtet. Zwischen der Nervenleitgeschwindigkeit und den absoluten Werten für die Latenzsprünge ergab sich bei

10 Interstimuli ein Korrelationskoeffizient von $-0,41$ (Pearson-Produkt-Moment-Korrelation, $p < 0,05$). Wurden nun die absoluten Werte für die Latenzänderungen zu den jeweiligen Ruhelatenzen in Bezug gesetzt und die damit erhaltenen relativen Werte der Latenzänderungen mit den entsprechenden Nervenleitgeschwindigkeiten korreliert, so ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $-0,10$ (Pearson-Produkt-Moment-Korrelation, $p > 0,05$). Hieraus wird ersichtlich, dass die Nervenleitgeschwindigkeit bei Herausrechnung des Einflusses der Ruhelatenz keinen signifikanten Einfluss auf die Größe der Latenzänderung hat.

Um einen möglichen Einfluss der von Frey Haar Schwelle auf die Größe der Latenzsprünge auszuschließen, wurde eine Korrelationsanalyse zwischen diesen beiden Parametern durchgeführt. Es ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $-0,14$ (Pearson-Produkt-Moment-Korrelation, $p > 0,05$), somit konnte auch ein Einfluss der mechanischen Reizschwelle auf die Latenzänderung ausgeschlossen werden.

Dies bedeutet, dass die Hitzesensibilität, aber nicht die Kälteempfindlichkeit, die mechanische Schwelle oder die Nervenleitgeschwindigkeit mit der aktivitätsabhängigen Latenzänderung korreliert.

Als nächstes sollte nun untersucht werden, welche Zeit eine Faser benötigte, um sich nach einem Latenzsprung bei 10 Interstimuli wieder um mindestens 75% der Ausgangslatenz anzunähern. Da bei dem verwendeten Protokoll alle 3 Sekunden stimuliert und die Latenz abgeleitet wurde, sind alle Werte Vielfache von 3. Als jeweilige Zeit für die 75%-ige Erholung wurde der erste Zeitpunkt genommen, bei dem die Latenz sich um 75% oder mehr der Ausgangslatenz angenähert hatte. Die Auswertung ergab bei den hitzeunempfindlichen Fasern Werte zwischen 3 und 12 s ($4,5 \pm 1,2$ s, $n=8$) bei absoluten Latenzsprüngen im Bereich von 0,3 bis 4,8 ms ($1,7 \pm 0,7$ ms). Für die hitzesensiblen Fasern fanden sich Werte zwischen 6 und 36s ($16,0 \pm 1,4$ s, $n=23$), die entsprechenden Latenzsprünge lagen in dieser Gruppe zwischen 1 und 16 ms ($7,4 \pm 0,8$ ms).

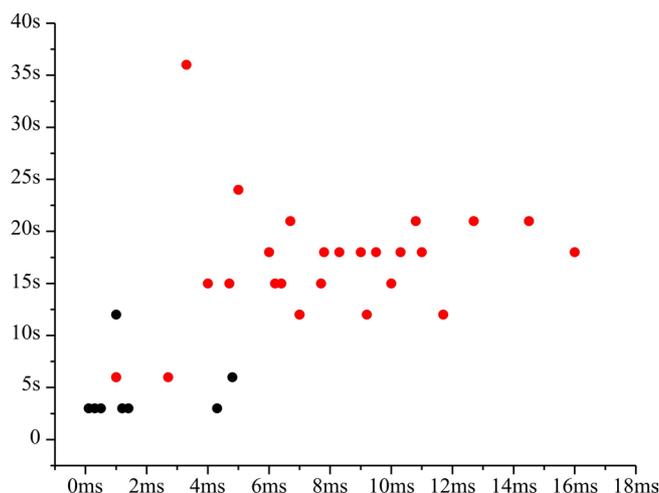


Abbildung 12: Zeitdauer, bis sich die Fasern nach einem Latenzsprung wieder um 75% der Ausgangslatenz angenähert hatten in Abhängigkeit von der Größe des Latenzsprungs bei 10 Interstimuli für hitzeunempfindliche (schwarz, $n=8$) und hitzesensible (rot, $n=23$) Fasern

Die Zeiten bis zur 75%-igen Erholung für die hitzesensiblen und die hitzeunempfindlichen Fasern unterschieden sich hochsignifikant voneinander (ANOVA, $F=22,9$, $p \ll 0,001$). Für die hitzeinsensiblen Fasern ergab sich ein Korrelationskoeffizient von 0,07, für die hitzesensiblen Fasern betrug der Korrelationskoeffizient 0,25 (Pearson-Produkt-Moment-Korrelation). Abbildung 12 zeigt die Abhängigkeit der Zeit bis zur 75%-igen Erholung für alle Fasern in Abhängigkeit von der Größe des Latenzsprungs. Man kann in dieser Abbildung erkennen, dass alle Fasern, die nach einem Latenzsprung bei 10 Interstimuli länger als 15 Sekunden für die 75%-ige Erholung brauchten, eindeutig der Population der hitzesensiblen Fasern zugeordnet werden konnten. In beiden Populationen fällt ebenfalls eine schwache Korrelation zwischen der Größe der Latenzänderung und der Erholungszeit auf, es existieren aber auch Ausreißer. Dies legt nahe, dass unterschiedliche Mechanismen die Erholungszeit einer Faser bestimmen.

Nun wurde untersucht, welchen Einfluss die Stimulationsdauer auf die aktivitätsinduzierte Latenzänderung bei den hitzesensiblen und bei den hitzeunempfindlichen Fasern hat. Hierzu wurden die Fasern bis zur Stabilisierung der Ruhelatenz mit einer Frequenz von 0,33 Hz stimuliert, um dann jeweils für 1 min die Stimulationsfrequenz auf 1, 2 und schließlich 3 Hz zu erhöhen. Eine weitere Stimulationsphase mit 3 Hz über 4 min zeigte, dass bei den hitzesensitiven Fasern nach 1 min die weitere Zunahme der Latenz nur noch langsam erfolgte (Abbildung 14 zeigt

die Originalableitung einer CMH-Faser während dieses Protokolls). Aus diesem Grund wurden die Fasern zur weiteren Analyse für 1 min mit einer Frequenz von 3 Hz stimuliert. Nach diesem Protokoll wurden 6 CMH-Fasern, 3 CMHC-Fasern und 5 CM-Fasern abgeleitet. Die absolute Zunahme der Latenz betrug $35,7 \pm 2,7$ ms, entsprechend $70,2 \pm 8,7\%$ bei den CMH-Fasern, $40,5 \pm 2,8$ ms ($61,1 \pm 10,1\%$) bei den CMHC-Fasern und lediglich $11,0 \pm 6,1$ ms ($18,5 \pm 10,2\%$) bei den CM-Fasern (nach diesem Protokoll wurden keine CMC-Fasern abgeleitet). Es zeigte sich wiederum kein signifikanter Unterschied der Latenzänderungen zwischen den CMH-Fasern und den CMHC-Fasern (ANOVA, $F=1,5$, $p>0,5$), somit wurden diese erneut als hitzesensible Fasern den CM-Fasern als hitzeunempfindliche Fasern gegenübergestellt. Für die hitzesensiblen Fasern ergab sich eine absolute Zunahme der Latenz von $37,3 \pm 2,0$ ms ($67,2 \pm 6,2\%$). Die absoluten Latenzsprünge nach einminütiger Stimulation mit 3 Hz waren bei den hitzesensiblen Fasern deutlich größer als bei den hitzeunempfindlichen Fasern (ANOVA, $F=31,3$, $p<<0,001$). Abbildung 13 stellt die für die hitzesensiblen und die hitzeunempfindlichen Fasern ermittelten Werte einander gegenüber.

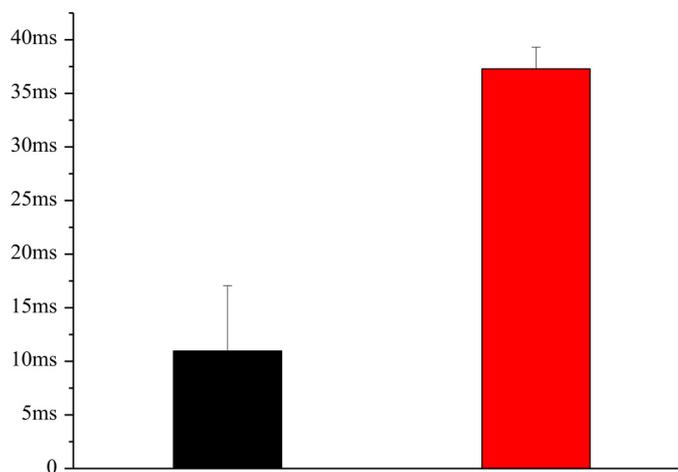


Abbildung 13: Größe der absoluten Latenzänderung nach einminütiger Stimulation mit 3 Hz für hitzesensible (rot, $n=9$) und hitzeunempfindliche (schwarz, $n=5$) Fasern

Ein weiterer Unterschied zwischen beiden Faserpopulationen fiel auf: bei den hitzesensiblen Fasern kam es während der Stimulation mit 3 Hz zu einer stetigen Vergrößerung der Latenz, wohingegen die hitzeunempfindlichen Fasern schnell ein Plateau erreichten und dann bis zur Beendigung der Stimulation relativ stabil auf diesem verharrten.

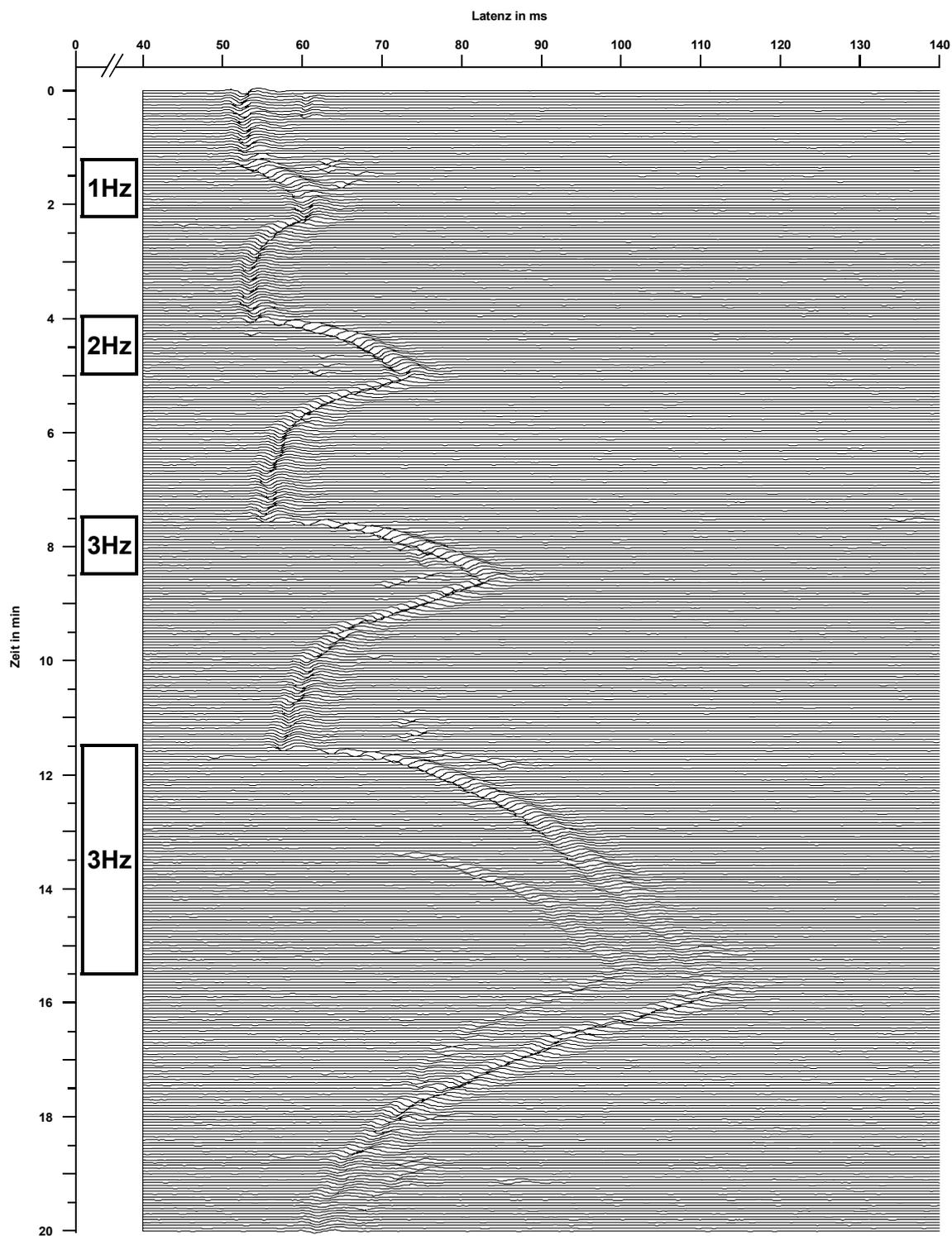


Abbildung 14: Einfluss von Stimulationsfrequenz und -dauer auf die Latenzänderung einer CMH-Faser. In den Boxen ist die jeweilige Stimulationsfrequenz angegeben, zwischen den einzelnen Stimulationsperioden betrug die Frequenz 0,33 Hz.

Während des Erholungsprozesses nach einminütiger Stimulation ließen sich zwei Phasen voneinander abgrenzen, deren Ausprägung offenbar faserspezifisch ist. Die Zeit,

welche bis zur 50%-igen Wiederannäherung der Fasern an ihre Ausgangslatenz verging, betrug bei den hitzesensiblen Fasern $40,9 \pm 2,2$ s, bei den hitzeunempfindlichen Fasern vergingen $28,5 \pm 4,4$ s, der Unterschied war signifikant (ANOVA, $F=8,8$, $p<0,05$). Um sich um mindestens 75% der Ausgangslatenz anzunähern, benötigten die hitzesensiblen Fasern $68,3 \pm 3,9$ s, die hitzeunempfindlichen Fasern $67,2 \pm 11$ s. Hier bestand kein Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen (ANOVA, $F=0,02$, $p>0,5$). Somit erfolgte die Erholung anfangs bei den hitzeunempfindlichen Fasern schneller als bei den hitzeempfindlichen, im weiteren Verlauf bestand dieser Unterschied aber nicht mehr fort.

3.1.3 Einfluss von Cs^+ auf die Latenzänderungen in Folge von Aktivität

Als nächstes sollte nun die Rolle von I_h -Kanälen bei den aktivitätsinduzierten Latenzänderungen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde Cs^+ in einer Konzentration von 5 mM zur Blockade von I_h in einen selbstabdichtenden Metallring im Bereich des rezeptiven Felds der Faser gegeben. Nach einer 9-minütigen Einwirkdauer wurden 10 Interstimuli appliziert und die Reaktion der Faser aufgezeichnet. Verglichen wurden die Latenzsprünge nach 10 Interstimuli unter Kontrollbedingungen und unter Cs^+ , ferner die Änderung der Ruhelatenz unter 5 mM Cs^+ , die Häufigkeit von Leitungsblocks und die Zeit bis zur 75%-igen Erholung der Fasern in Anwesenheit von 5 mM Cs^+ . Insgesamt wurden 14 Fasern nach diesem Protokoll abgeleitet, 2 davon wurden als CMC-Fasern charakterisiert, 4 als CMHC-Fasern und 8 als CMH-Fasern (CMHC- und CMH-Fasern wurden als hitzesensible Fasern zusammengefasst).

Bei den 2 CMC-Fasern erfuhr eine Faser eine Zunahme der Latenzänderung von 1,2 ms unter Kontrollbedingungen auf 1,6 ms nach Anwendung von 5 mM Cs^+ , die andere CMC-Faser änderte ihre Latenz unter Kontrollbedingungen nicht und antwortete nach 10 Interstimuli in Anwesenheit von 5 mM Cs^+ nicht auf den Hauptstimulus. Auch in der Gruppe der hitzesensiblen Fasern antwortete eine Faser unter Einwirkung von 5 mM Cs^+ nicht auf den Hauptstimulus. Die Latenzänderungen der übrigen hitzesensiblen Fasern waren nach Applikation von 5 mM Cs^+ tendenziell größer als unter Kontrollbedingungen, allerdings war der beobachtete Unterschied nicht signifikant ($7,6 \pm 1,1$ ms nach Applikation von Cs^+ gegenüber $5,9 \pm 1,0$ ms unter Kontrollbedingungen; ANOVA, $F=1,5$, $p>0,05$).

Vor dem Hintergrund der Annahme, dass I_h nicht in allen Fasern gleich stark exprimiert wird (siehe Diskussion), fielen bei einer Post-hoc Analyse allerdings 8 Fasern auf, die größere Latenzsprünge unter Einwirkung von 5 mM Cs^+ zeigten als unter Kontrollbedingungen ($5,39 \pm 1,22$ ms vs. $8,06 \pm 1,27$ ms; t-Test, $p < 0,05$), und weitere 6 Fasern, bei denen dies nicht der Fall war ($6,51 \pm 2,24$ ms vs. $5,23 \pm 2,07$ ms; t-Test, $p > 0,05$). Bei der kleinen Stichprobe bestand jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Latenzsprünge dieser beiden Gruppen nach Anwendung von 5 mM Cs^+ (ANOVA, $F=1,5$, $p > 0,05$; vergleiche Abbildung 15).

Die Ruhelatenz beeinflusste 5 mM Cs^+ bei 6 Fasern, diese nahm hier während der Applikation allmählich um bis zu 31,6% zu ($11,4 \pm 4,6\%$). Bei den verbleibenden 8 Fasern blieb die Ruhelatenz in Anwesenheit von Cs^+ unverändert. Schließlich fiel in Anwesenheit von 5 mM Cs^+ eine Zunahme der während der Grundstimulation mit 0,33 Hz intermittierend auftretenden Leitungsblocks auf. Während unter Kontrollbedingungen 2 Fasern intermittierend auftretende Leitungsblocks zeigten, waren es in Anwesenheit von 5 mM Cs^+ 9 Fasern (Chi²-Test, $p < 0,05$).

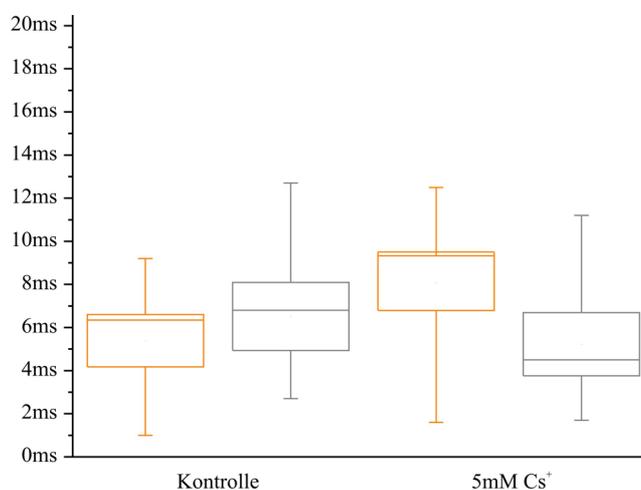


Abbildung 15: Latenzsprünge nach 10 Interstimuli unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 5mM Cs^+ . In orange sind die Fasern dargestellt, bei denen es unter Cs^+ zu größeren Latenzsprüngen kam ($n=8$), grau zeigt die Fasern, bei denen dies nicht der Fall war ($n=6$). Horizontale Linien entsprechen dem Mittelwert, die Boxen stellen den S.E.M. dar und die Whisker zeigen das 5-95%-Intervall.

Zusätzlich kam es zu einer Zunahme der relativen Häufigkeit der Leitungsblocks während der Stimulation mit 0,33 Hz von $0,6 \pm 0,4\%$ unter Kontrollbedingungen auf $8,1 \pm 4,4\%$ nach Applikation von Cs^+ (vergleiche Abbildung 16), allerdings war dieser

Unterschied nicht signifikant (t-Test, $p > 0,05$). Eine mögliche Ursache für diese Beobachtungen könnte die Blockade von I_h -Kanälen durch Cs^+ sein, aus der eine geringere Leitungssicherheit der C-Fasern resultieren würde.

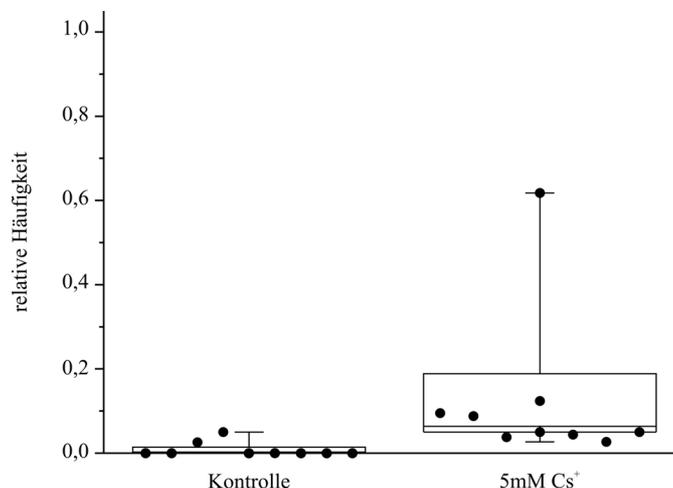


Abbildung 16: Relative Häufigkeit des Auftretens von Leitungsblocks unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von 5 mM Cs^+ . Die horizontale Linie entspricht dem Mittelwert, die Boxen dem S.E.M. und die Whisker dem 5-95%-Intervall.

Bei Betrachtung der Zeit, welche die Fasern benötigten, um sich nach einem Latenzsprung wieder um mindestens 75% der Ruhelatenz anzunähern, war kein Einfluss von Cs^+ erkennbar. Unter Kontrollbedingungen benötigten sie hierfür $12,4 \pm 2,5$ s, in Anwesenheit von Cs^+ 5 mM $11,4 \pm 1,6$ s ($n=12$; t-Test, $p > 0,5$). Zwei hitzesensible Fasern zeigten jedoch eine Zunahme der Erholungszeiten von 9 auf 228 s bzw. von 18 auf 156 s. Sie wurden deshalb nicht in dieser Analyse berücksichtigt, da es sich hier wahrscheinlich um Artefakte handelte, etwa durch Verschlechterung der Stimulationsbedingungen.

Orientierend wurde schließlich das Verhalten von 2 Fasern bei 0,5-minütiger Stimulation mit 3 Hz in Anwesenheit von Cs^+ in Konzentrationen von 1 mM und 5 mM betrachtet. Eine Faser zeigte eine Zunahme der Latenz nach einer 0,5-minütigen Stimulation mit 3 Hz von 21,2 ms unter Kontrollbedingungen auf 24,3 ms unter 1 mM Cs^+ und auf 23,8 ms nach Applikation von 5 mM Cs^+ , für die andere Faser betrug die Latenzänderung 23,5 ms unter Kontrollbedingungen, 23,5 ms nach Anwendung von 1 mM Cs^+ und 22,7 ms nach Anwendung von 5 mM Cs^+ . Für die Wiederannäherung um 75% an die Ausgangslatenz nach der Stimulation mit 3 Hz benötigte die erste Faser 36, 45 und 42 s, die zweite brauchte hierfür 51, 57 und 42 s (Werte für Kontrolle, 1 mM Cs^+

und 5 mM Cs⁺). Zwar ließ sich ein Einfluss von Cs⁺ auf die beiden betrachteten Größen erkennen, um diesen analysieren zu können wäre aber die Ableitung zusätzlicher Fasern nach diesem Protokoll notwendig. Hierauf wurde verzichtet, da mit ZD 7288 ein potenterer und selektiverer Blocker von I_h-Kanälen zur Verfügung stand, der im Folgenden Verwendung fand.

3.1.4 Effekt von ZD 7288 auf die Latenzänderung in Folge von Aktivität

Um den möglichen Einfluss von I_h auf die aktivitätsinduzierten Latenzänderungen weiter zu untersuchen, wurden im Folgenden Fasern nach Einwirkung von ZD 7288, einem selektiven Blocker von I_h, elektrisch stimuliert und die erhaltenen Ableitungen auf Veränderungen im Vergleich zu Kontrollbedingungen hin analysiert.

Zunächst wurde ZD 7288 in einer Konzentration von 1 µM in einen selbstabdichtenden Metallring in den Bereich des rezeptiven Felds gegeben. Nach einer 9-minütigen Einwirkzeit unter fortdauernder Stimulation mit 0,33 Hz wurden 10 Interstimuli appliziert, nach Erholung der Faser wurde in gleicher Weise mit ZD 7288 in Konzentrationen von 3, 10, 30 und 50 µM verfahren.

Es wurden 8 Fasern auf diese Weise untersucht, 6 hitzesensible (1 CMHC-Faser, 5 CMH-Fasern) und 2 hitzeunempfindliche Fasern (2 CMC-Fasern).

Die Größe der Latenzsprünge nach 10 Interstimuli nahm bei den hitzesensiblen Fasern von $5,5 \pm 2,0$ ms unter Kontrollbedingungen auf $8,5 \pm 1,8$ ms bei Anwendung von ZD 7288 in einer Konzentration von 1 µM zu (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$). Bei höheren Konzentrationen von ZD 7288 kam es dann zu einer Abnahme der Größe der Latenzsprünge, da hier der Anteil der Leitungsfehler zunahm (siehe unten), es bestanden keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollwerten. Nach Applikation von ZD 7288 in einer Konzentration von 50 µM kam es beispielsweise nur noch zu Latenzsprüngen von $2,8 \pm 1,6$ ms. Bei einer der beiden hitzeunempfindlichen Fasern kam es nach Applikation von 1 µM und 3 µM ZD 7288 während der 10 Interstimuli zu keiner messbaren Antwort, bei Zugabe von 10 µM ZD 7288 trat ein kompletter Leitungsblock auf. Bei der zweiten hitzeunempfindlichen Faser wurden die Latenzsprünge nach den 10 Interstimuli in Anwesenheit von ZD 7288 größer, allerdings kam es ab einer Konzentration von 30 µM zum Auftreten von Leitungsblocks und damit

einhergehend zu geringeren Latenzänderungen als unter Kontrollbedingungen (vergleiche Abbildung 17).

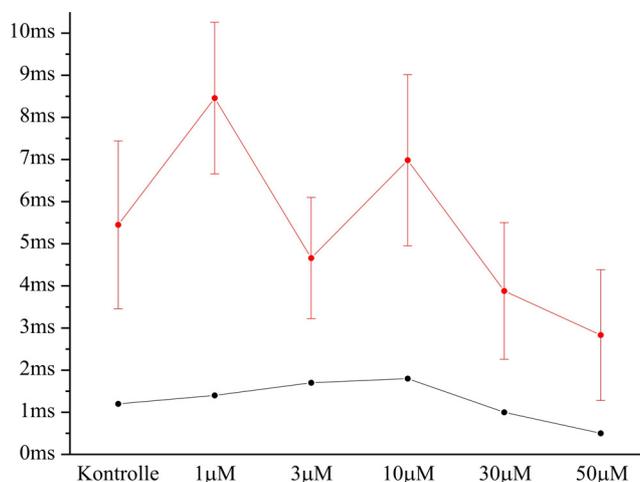


Abbildung 17: Größe der Latenzsprünge nach 10 Interstimuli unter Kontrollbedingungen und nach Anwendung von ZD 7288. Dargestellt sind die Mittelwerte und der S.E.M. für 6 hitzeempfindliche Fasern unter Kontrollbedingungen, 6 bei 1 μM , 5 bei 3 μM , 6 bei 10 μM , 5 bei 30 μM und 3 bei 50 μM (rot). In schwarz ist das Verhalten einer hitzeunempfindlichen Faser dargestellt.

Ebenso wie bei Verwendung von Cs^+ kam es auch nach Applikation von ZD 7288 zu einer Zunahme der Ruhelatenz einiger Fasern, diese war aber schwächer ausgeprägt. Bei Konzentrationen von 1 μM und 3 μM erfuhren 3 von 8 untersuchten Fasern eine Zunahme der Ruhelatenz um Werte zwischen 0,5% und 3,5% bzw. 1,2% und 2,7%. Bei 10 μM waren es 4 von 7 Fasern (Änderung zwischen 0,4% und 7,8%), bei 30 μM änderten 3 von 6 Fasern ihre Ruhelatenz (0,1 bis 5,6%) und bei 50 μM zeigten 3 von 4

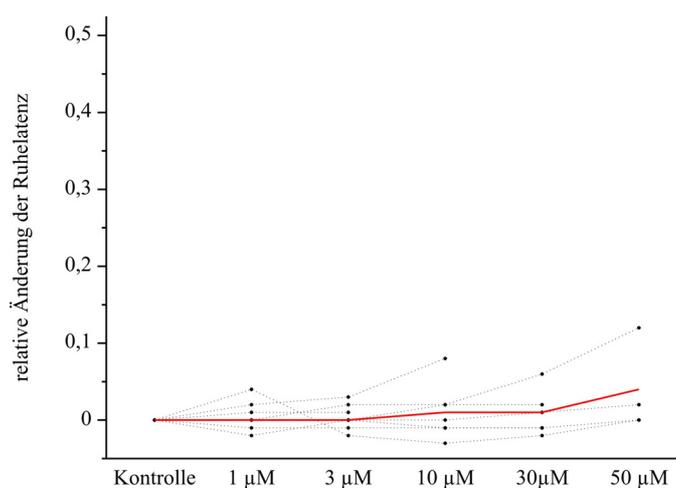


Abbildung 18: Relative Änderung der Ruhelatenz unter ZD 7288 in Konzentrationen von 1 μM ($n=8$), 3 μM ($n=8$), 10 μM ($n=7$), 30 μM ($n=6$) und 50 μM ($n=4$). Dargestellt sind die einzelnen Fasern (gestrichelte Linien) und der resultierende Mittelwert (rote Linie).

abgeleiteten Fasern eine Zunahme der Ruhelatenz (0,4 bis 12,4%). Zu einer erkennbaren Zunahme der mittleren Ruhelatenzänderung kam es ab einer Konzentration von 10 μM ($0,3 \pm 0,6\%$), bei einer Konzentration von 50 μM bestand ein signifikanter Unterschied zu Kontrollbedingungen ($3,8 \pm 3,4\%$, LSD, $p < 0,05$; vergleiche Abbildung 18).

Nun sollte die Stimulierbarkeit der Fasern unter Einwirkung von ZD 7288 betrachtet werden. Hierfür wurden die Fasern, bei denen intermittierend Leitungsblocks auftraten und jene, welche komplett geblockt waren zur Gesamtzahl der untersuchten Fasern in Bezug gesetzt. Unter Kontrollbedingungen waren dies 2 von 8 Fasern, in Anwesenheit von ZD 7288 in einer Konzentration von 1 μM erhöhte sich der Anteil auf 4 von 8 Fasern, bei 3 μM und bei 10 μM waren es 3 von 8 Fasern, bei 30 μM kam es bei 5 von 8 Fasern zu intermittierenden Leitungsblocks und bei einer Konzentration von 50 μM schließlich traten bei allen Fasern Leitungsblocks auf (Abbildung 19). Zwischen dem Anteil der Fasern mit Leitungsblocks unter Kontrollbedingungen und unter ZD 7288 in einer Konzentration von 50 μM bestand ein signifikanter Unterschied (Chi²-Test, $p < 0,05$).

Zusätzlich nahm die relative Häufigkeit der während der Grundstimulation auftretenden Leitungsblocks bei Applikation von ZD 7288 zu. Unter Kontrollbedingungen betrug die Häufigkeit der Leitungsblocks $1,0 \pm 0,7\%$, unter ZD 7288 in einer Konzentration von 1 μM nahm sie auf $2,4 \pm 1,5\%$ zu, um sich über $4,2 \pm 3,7\%$ bei 3 μM , $11,2 \pm 8,9\%$ bei 10 μM und $26,5 \pm 17,2\%$ bei 30 μM weiter auf $45,3 \pm 17,3\%$ bei 50 μM zu erhöhen. Die bei einer Konzentration von 50 μM beobachtete relative Häufigkeit intermittierend

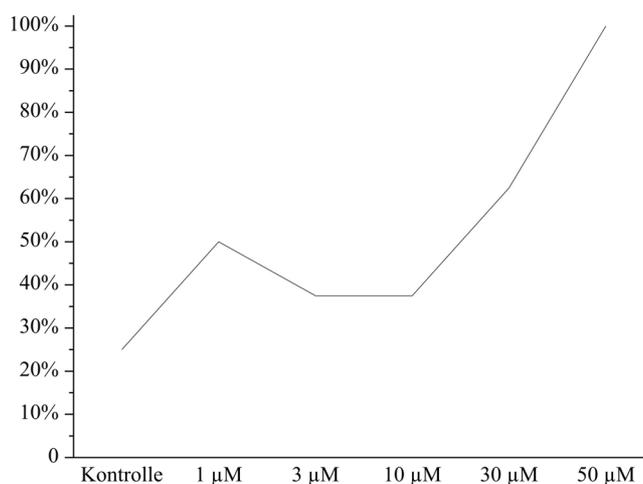


Abbildung 19: Anteil der Fasern mit intermittierend auftretenden Leitungsblocks unter Kontrollbedingungen und unter verschiedenen Konzentrationen von ZD 7288 ($n=8$)

auftretender Leitungsblocks war signifikant größer als diejenige unter Kontrollbedingungen (vergleiche Abbildung 20; t-Test, $t=-2,8$, $p<0,05$).

Um sich nach dem Latenzsprung bei 10 Interstimuli wieder um mindestens 75% der Ruhelatenz anzunähern, benötigten die mit diesem Protokoll abgeleiteten Fasern unter Kontrollbedingungen $7,5 \pm 2,5$ s (aufgrund der geringen Faserzahl wurde auf eine Differenzierung zwischen hitzesensiblen und hitzeunsensiblen Fasern verzichtet). Bei Konzentrationen von $1 \mu\text{M}$ und $3 \mu\text{M}$ ergaben sich mit $14,0 \pm 6,4$ s bzw. $10,2 \pm 4,8$ s längere Erholungszeiten als unter Kontrollbedingungen, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant (t-Test, $p>0,05$ für $1 \mu\text{M}$ und für $3 \mu\text{M}$). Die Erholungszeit verlängerte sich unter Einwirkung von ZD 7288 in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ auf $12,0 \pm 3,4$ s (t-Test, $p<0,05$). Bei höheren Konzentrationen von ZD 7288 benötigten die Fasern zur 75%-igen Erholung $7,8 \pm 3,1$ s bei $30 \mu\text{M}$ und $3,8 \pm 0,9$ s bei $50 \mu\text{M}$ (t-Test, $p>0,25$ bzw. $p>0,5$). Zu berücksichtigen ist, dass bei diesen Konzentrationen die Anzahl der abgeleiteten Fasern gering war. Zusätzlich waren insbesondere die Fasern, welche schon unter Kontrollbedingungen relativ lange zur Erholung benötigten bei $30 \mu\text{M}$ und bei $50 \mu\text{M}$ nicht mehr stimulierbar. Dies erklärt die scheinbar kürzeren Erholungszeiten bei $30 \mu\text{M}$ und $50 \mu\text{M}$.

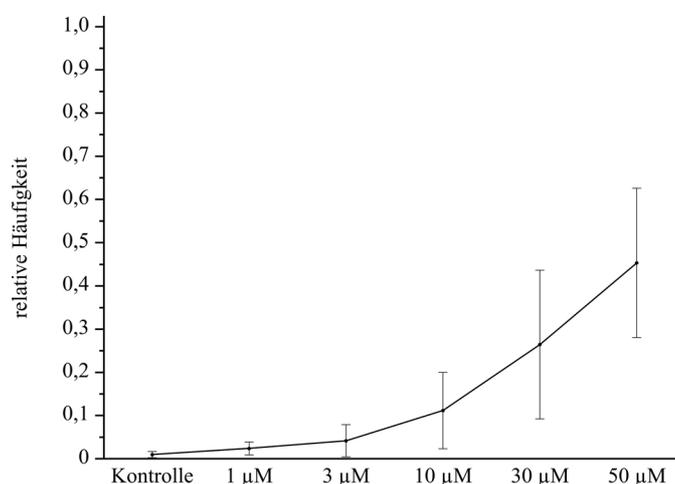


Abbildung 20: Relative Häufigkeit von intermittierend auftretenden Leitungsblocks während der Stimulation mit $0,33$ Hz unter Kontrollbedingungen und bei Anwendung von ZD 7288 in verschiedenen Konzentrationen (Mittelwert \pm S.E.M.)

Der Vergleich des Verhaltens der C-Fasern unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von Cs^+ bzw. ZD 7288 war nicht unproblematisch, da zwei sich gegenseitig überlagernde Effekte auftraten: einerseits kam es bei einigen Fasern durch

die Blockade eines Teils der I_h -Kanäle zu einer Zunahme der Latenzänderung, andererseits kam es insbesondere bei den höheren Konzentrationen von ZD 7288 zum gehäuften Auftreten von Leitungsblocks während der Applikation der 10 Interstimuli, möglicherweise durch die komplette Blockade der Ströme durch I_h -Kanäle. Dadurch war die tatsächlich induzierte Aktivität in diesen Fasern niedriger als unter Kontrollbedingungen und in Folge dessen nahm die Größe der Latenzänderung ab. Aus diesem Grund wurde zur Erhöhung der Leitungssicherheit im Folgenden dazu übergegangen, die Fasern über eine längere Zeitdauer (60 s oder 30 s) mit einer niedrigeren Frequenz (3 Hz) zu stimulieren. Verglichen wurde dabei das Verhalten der Fasern unter Kontrollbedingungen und nach Anwendung von ZD 7288 in Konzentrationen von 1, 3, 10, 30 und 50 μM . Hierzu wurde ZD 7288 in einen selbstabdichtenden Metallring im Bereich des rezeptiven Felds der Faser gegeben, die Einwirkzeit betrug 5 min. Auf diese Weise wurden 12 Fasern abgeleitet, es handelte es sich um 5 CM-Fasern, 3 CMHC-Fasern und 4 CMH-Fasern.

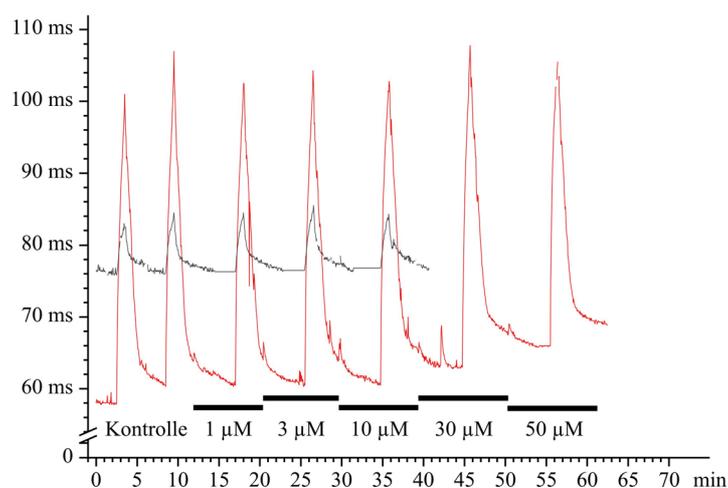


Abbildung 21: Gegenüberstellung der Latenzänderung einer hitzesensiblen (rot) und einer hitzeunempfindlichen (schwarz) Faser bei einminütiger Stimulation mit 3 Hz unter Kontrollbedingungen und bei Anwendung von ZD 7288

Bei 7 Fasern wurde für das Stimulationsintervall eine Dauer von einer Minute gewählt, da die Latenzzunahme nach dieser Zeit nur noch langsam erfolgte (vergleiche Abbildung 14), bei weiteren 5 Fasern wurde das Stimulationsintervall auf 30 Sekunden verkürzt. Das kürzere Stimulationsintervall wurde gewählt, um sicherzugehen, dass nicht die langsamere Vergrößerung der Latenz nach Stimulationsdauern von mehr als 60 Sekunden (vergleiche Abbildung 14) einen möglichen Effekt von ZD 7288 verdeckt. Um auszuschließen, dass es sich bei den beiden Gruppen um zwei verschiedene

Faserpopulationen handelte, wurden auch die Fasern, für die das kürzere Stimulationsintervall vorgesehen war, zunächst eine Minute lang mit 3 Hz stimuliert, die dabei erhaltenen Werte für beide Gruppen wurden miteinander verglichen. Dabei fiel kein grundlegender Unterschied auf (Tabelle 2 zeigt die Werte für die absoluten Latenzänderungen aller Fasern). Alle Fasern konnten bis zu einer Konzentration von 3 μM abgeleitet werden, bei 10 μM konnte eine hitzeunempfindliche Faser nicht mehr abgeleitet werden, bei 30 μM waren zusätzlich vier hitzesensible Fasern geblockt und bei 50 μM waren bis auf zwei hitzesensible Fasern alle Fasern nicht mehr stimulierbar. Abbildung 21 zeigt das unterschiedliche Verhalten einer hitzesensiblen und einer hitzeunempfindlichen Faser bei diesem Protokoll. Um die Fasern, die für eine Minute stimuliert wurden, mit den Fasern zu vergleichen, bei denen die Dauer der Stimulation 30 Sekunden betrug, wurden im Folgenden die relativen Änderungen der Latenzzunahmen unter Einwirkung von ZD 7288 im Vergleich zu denjenigen unter Kontrollbedingungen betrachtet. Hierbei zeigte sich bei den hitzesensiblen Fasern eine leichte Vergrößerung der Latenzänderung nach Stimulation mit 3 Hz um $5,7 \pm 3,7\%$ bei Applikation von ZD 7288 in einer Konzentration von 30 μM , die allerdings nicht signifikant war (Chi^2 -Test, $p > 0,5$).

Tabelle 2: Absolute Latenzänderungen nach Stimulation mit 3 Hz über 30 s oder 1 min für hitzesensible und hitzeunempfindliche Fasern unter Kontrollbedingungen und nach Applikation von ZD 7288 in Konzentrationen von 1 bis 50 μM (Mittelwerte \pm S.E.M.)

	Kontrolle		ZD 7288			
		1 μM	3 μM	10 μM	30 μM	50 μM
Stimulationsdauer 30 s						
<u>hitzesensibel</u>	25,4 \pm 0,3 ms (n=4)	26,0 \pm 0,5 ms (n=4)	26,1 \pm 0,5 ms (n=4)	26,0 \pm 0,5 ms (n=4)	27,9 \pm 0,8 ms (n=2)	27 ms (n=1)
<u>hitzeunempfindlich</u>	23,8 ms (n=1)	25 ms (n=1)	22,7 ms (n=1)	24,5 ms (n=1)	36,8 ms (n=1)	
Stimulationsdauer 1 min						
<u>hitzesensibel</u>	38,8 \pm 3,7 ms (n=3)	39,8 \pm 3,1 ms (n=3)	38,8 \pm 2,7 ms (n=3)	39,3 \pm 2,7 ms (n=3)	44,8 ms (n=1)	39,5 ms (n=1)
<u>hitzeunempfindlich</u>	5,6 \pm 1,7 ms (n=4)	6,1 \pm 1,7 ms (n=4)	6,7 \pm 1,8 ms (n=4)	5,8 \pm 1,4 ms (n=3)	4,5 ms (n=1)	

Bei allen anderen Konzentrationen zeigten sich im Vergleich zu den Kontrollwerten noch geringere Änderungen, bei ZD 7288 in einer Konzentration von 50 μM kam es zu geringeren Latenzänderungen als unter Kontrollbedingungen ($-3,0 \pm 12,6\%$, Chi^2 -Test, $p > 0,05$), Grund hierfür war das gehäufte Auftreten von Leitungsblocks. Bei den hitzeunempfindlichen Fasern fiel eine deutliche Zunahme der Latenzänderung bei Anwendung von ZD 7288 in Konzentrationen von 3 μM und mehr auf.

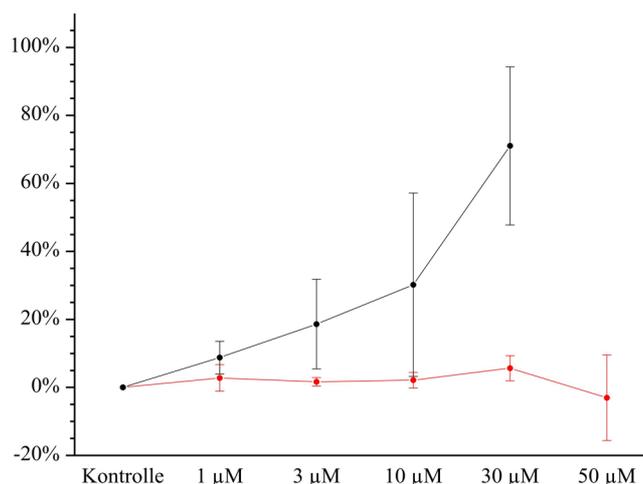


Abbildung 22: Einfluss von ZD 7288 auf die Größe der Latenzänderung nach Stimulation mit 3 Hz im Vergleich zu Kontrollbedingungen (hitzeunempfindliche Fasern in rot, hitzesensible Fasern in schwarz)

Die Veränderungen gegenüber den Kontrollwerten waren signifikant (Chi^2 -Test, $p < 0,001$). In Abbildung 22 kann man deutlich den Effekt von ZD 7288 auf die Latenzänderung der hitzeunempfindlichen Fasern erkennen, während ZD 7288 bei den hier abgeleiteten hitzesensiblen Fasern keinen Einfluss auf die Latenzänderung hatte.

Nun wurde der Einfluss von ZD 7288 auf den Erholungszyklus der Fasern betrachtet. Bestimmt wurde hierzu die Zeit, die bis zur 50%-igen bzw. 75%-igen Wiederannäherung der Fasern an die Ausgangslatenz verging. Es wurden die unter Kontrollbedingungen ermittelten Zeitdauern mit denjenigen nach Einwirkung von ZD 7288 verglichen, analysiert wurden die jeweiligen relativen Veränderungen. Mit einer Ausnahme (Zeit bis zur 50%-igen Erholung der hitzeunempfindlichen Fasern nach Anwendung von ZD 7288 in einer Konzentration von 10 μM) zeigten sich bei allen ermittelten Zeitdauern signifikante Einflüsse von ZD 7288 auf die Erholungszeiten.

Tabelle 3: Relative Veränderung der Erholungszeiten der einzelnen Fasergruppen nach Anwendung von ZD 7288 (χ^2 -Test; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,001$, ***: $p < 0,001$)

	ZD 7288				
	1 μ M	3 μ M	10 μ M	30 μ M	50 μ M
hitzesensibel					
Zeit bis zur					
50%-igen Erholung	7,2 \pm 7,0%	9,3 \pm 5,3%	13,7 \pm 5,5%	23,4 \pm 15,3%	22,9 \pm 28,2%
75%-igen Erholung	20,7 \pm 10,0%	11,7 \pm 5,3%	20,3 \pm 6,4%	51,8 \pm 24,9%	42,3 \pm 38,1%
	(**)			(**)	(*)
hitzeunempfindlich					
Zeit bis zur					
50%-igen Erholung	-4,3 \pm 10,7%	3,3 \pm 11,0%	5,8 \pm 4,5%	-37,8 \pm 25,1%	
75%-igen Erholung	21,9 \pm 16,7%	31,7 \pm 21,9%	95,5 \pm 42,6%	-28,6%	
	(***)	(***)	(***)		

Dabei kam es in der Gruppe der hitzesensiblen Fasern zu einem vergleichbaren Effekt von ZD 7288 auf die 50%-ige und die 75%-ige Erholungszeit. Lediglich nach Anwendung von ZD 7288 in einer Konzentration von 1 μ M war die Verlängerung der Zeit bis zur 50%-igen Fasererholung geringer ausgeprägt als diejenige auf die Zeit bis zur 75%-igen Fasererholung (ein ähnlicher Unterschied bestand zwar auch bei Konzentrationen von 30 μ M und 50 μ M, bei diesen Konzentrationen konnten jedoch zu wenige Fasern abgeleitet werden, um verlässliche Aussagen zu treffen). Im Vergleich zu den Beobachtungen in der Gruppe der hitzesensiblen Fasern zeichnete sich bei den hitzeunempfindlichen Fasern eine andere Wirkungsweise von ZD 7288 ab. Zwar kam es auch bei dieser Faserpopulation gleichermaßen zu einer Verlängerungen der Zeiten bis zur 50%-igen und 75%-igen Wiederannäherung an die Ausgangslatenz. Allerdings war die Verlängerung der 75%-igen Erholungszeit nach Applikation von ZD 7288 viel stärker ausgeprägt, es bestand ein hochsignifikanter Unterschied. Die Werte für die relativen Veränderungen der Erholungszeiten nach Applikation von ZD 7288 können Tabelle 3 entnommen werden, Abbildung 23 stellt den Einfluss von ZD 7288 auf die Zeiten bis zur 50- bzw. 75%-Erholung der Fasern einander gegenüber. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anwendung von ZD 7288 bei den hitzesensiblen Fasern auf beide

Erholungsparameter einen vergleichbaren Einfluss hatte. In der Gruppe der hitzeunempfindlichen Fasern dagegen kam es zu einer ausgeprägten Beeinflussung der Zeit bis zur 75%-igen Erholung, die Zeit bis zur 50%-igen Erholung wurde dagegen nur minimal verlängert.

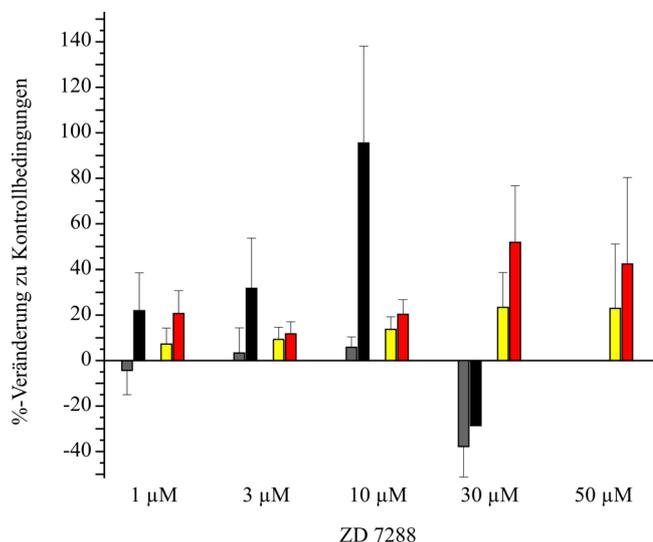


Abbildung 23: Effekt von ZD 7288 auf die Zeiten bis zur 50- bzw. 75%-igen Erholung der Fasern nach Stimulation mit 3 Hz (grau = Zeit bis zur 50%-igen Erholung der hitzeunempfindlichen Fasern, schwarz = Zeit bis zur 75%-igen Erholung der hitzeunempfindlichen Fasern, gelb und rot = entsprechende Zeiten der hitzesensiblen Fasern)

Insgesamt war der Effekt von ZD 7288 auf die Erholungszeiten bei den hitzesensiblen und bei den hitzeunempfindlichen Fasern unterschiedlich stark ausgeprägt. Die relative Verlängerung der Erholungszeiten war bei den hitzeunempfindlichen Fasern ausgeprägter als bei den hitzesensiblen Fasern. Um dies zu veranschaulichen, wurden in Abbildung 24 die Zeiten bis zur 75%-igen Erholung der hitzesensiblen und hitzeunempfindlichen Fasern einander gegenübergestellt. Die Erholungszyklen der hitzesensiblen und der hitzeunempfindlichen Fasern wurden also in unterschiedlichem Maße von ZD 7288 beeinflusst, zudem war die Verlängerung der Erholungszeiten in der Gruppe der hitzeunempfindlichen Fasern stärker ausgeprägt als bei den hitzesensiblen Fasern. Bei dieser Stichprobe war jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied zu erkennen.

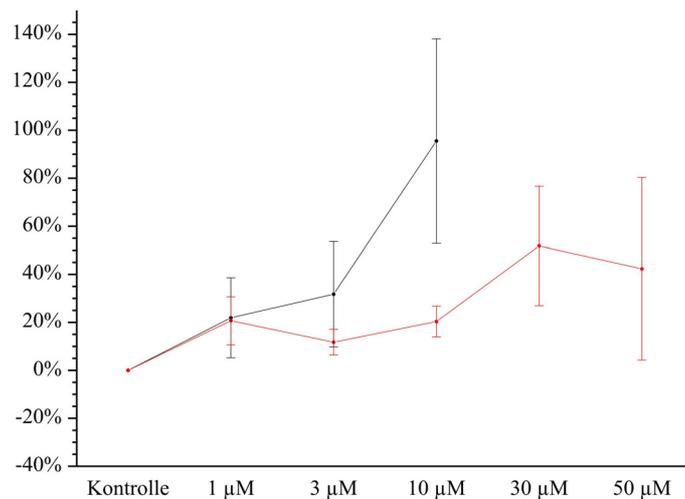


Abbildung 24: Relative Veränderung der Zeit bis zur 75%-igen Erholung der hitzesensiblen (rot) und hitzeunempfindlichen (schwarz) Fasern nach Stimulation mit 3 Hz bei Anwendung von ZD 7288 in Konzentrationen von 1 bis 50 μM

3.2 $Na_{v1.8}$ knock-out Mäuse

3.2.1 Charakterisierung der abgeleiteten C-Fasern

Um zu untersuchen, ob $Na_{v1.8}$ einen Einfluss auf die Erregbarkeit von C-Fasern hat, wurden 16 Fasern in $Na_{v1.8}$ knock-out Mäusen abgeleitet. Eine der Fasern wurde als CMC-Faser charakterisiert, 3 als CM-Fasern, 11 als CMH-Fasern und bei einer weiteren Faser handelte es sich um eine CMHC-Faser.

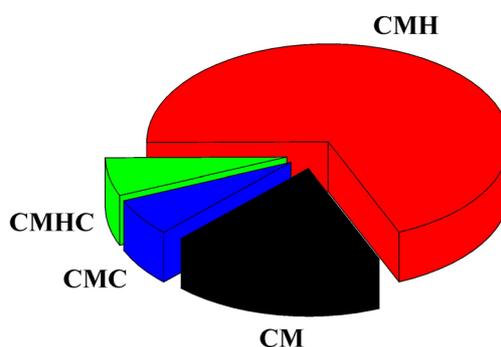


Abbildung 25: Verteilung der 16 in $Na_{v1.8}$ knock-out Mäusen abgeleiteten Fasern auf die einzelnen Faserklassen

Die Bestimmung der Nervenleitgeschwindigkeit ergab 0,44 m/s für die CMC-Faser, für die CM-Fasern ergab sich ein Wert von $0,72 \pm 0,16$ m/s, bei den CMH-Fasern betrug die Nervenleitgeschwindigkeit $0,58 \pm 0,03$ m/s, die CMHC-Faser hatte eine Nervenleitgeschwindigkeit von 0,58 m/s. Die CMC-Faser hatte eine mechanische Reizschwelle von 8,0 mN, bei den CM-Fasern betrug diese $6,0 \pm 3,2$ mN, bei den CMH-Fasern waren es $14,3 \pm 1,9$ mN und die CMHC-Faser hatte eine mechanische Reizschwelle von 22,4 mN.

3.2.2 Abhängigkeit der aktivitätsinduzierten Latenzänderung von der Zahl der Interstimuli und von der Dauer des Stimulationsintervalls

Zunächst wurde die Abhängigkeit der Latenzänderungen von der Anzahl der applizierten Interstimuli betrachtet. Während einer Grundstimulation mit 0,33 Hz wurden nacheinander 1, 2, 4, 6, 8 und 10 Interstimuli appliziert, die resultierenden Latenzsprünge wurden registriert. Zur Analyse wurden die nach diesem Protokoll abgeleiteten Fasern in hitzesensible und hitzeunempfindliche Fasern gruppiert. In der Gruppe der hitzesensiblen Fasern befanden sich 12 (11 CMH-Fasern und 1 CMHC-Faser), in der Gruppe der hitzeunempfindlichen 4 Fasern (3 CM-Fasern und 1 CMC-

Faser). Bei den hitzeunempfindlichen Fasern zeigte sich eine leichte Zunahme der Latenzänderungen von $0,3 \pm 0,1$ ms nach 1 Interstimulus über $0,5 \pm 0,2$ ms nach 6 Interstimuli auf $0,8 \pm 0,8$ ms nach 10 Interstimuli. Bei den hitzesensiblen Fasern kam es zu einer deutlichen Vergrößerung der Latenzänderungen von $0,6 \pm 0,1$ ms nach 1 Interstimulus über $3,1 \pm 0,6$ ms nach 6 Interstimuli auf $4,5 \pm 0,8$ ms nach 10 Interstimuli (Abbildung 26). Tabelle 4 zeigt die Werte für die relativen Latenzänderungen der hitzesensiblen und hitzeunempfindlichen Fasern. Die Fasern der knock-out Tiere zeigten qualitativ dasselbe Verhalten wie die Fasern der Wildtyp-Mäuse.

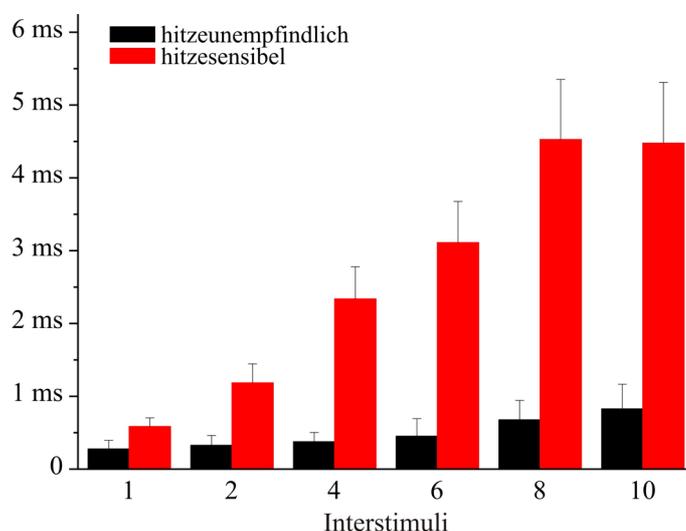


Abbildung 26: Latenzsprünge für hitzesensible ($n=12$) und hitzeunempfindliche Fasern ($n=4$) in Abhängigkeit von der Anzahl der Interstimuli (Mittelwert \pm S.E.M.)

Bei den hitzeunempfindlichen Fasern bestand kein Unterschied zwischen den Latenzänderungen bei 1 bis 10 Interstimuli (ANOVA, $F=1,3$, $p>0,25$). In der Gruppe der hitzesensiblen Fasern war die Interstimulusanzahl-abhängige Zunahme der Latenzänderung signifikant (ANOVA, $F=8,6$, $p<0,001$), im einzelnen unterschieden sich die Latenzänderungen bei 8 und 10 Interstimuli signifikant von denen bei 1 bis 4 Interstimuli (LSD, $p<0,05$). Zusätzlich bestand bei Applikation von mehr als 4 Interstimuli ein signifikanter Unterschied der Latenzänderungen zwischen hitzesensiblen und hitzeunempfindlichen Fasern (ANOVA, $F=6,5$, $p<0,05$).

Tabelle 4: *Relative Latenzsprünge in Abhängigkeit von der Interstimulusanzahl für hitzeunempfindliche und hitzesensible Fasern (Mittelwert \pm S.E.M.)*

Faserklasse	Interstimulusanzahl					
	1	2	4	6	8	10
hitzeunempfindlich	0,6 \pm 0,3%	0,8 \pm 0,3%	0,9 \pm 0,3%	1,0 \pm 0,5%	1,5 \pm 0,6%	1,8 \pm 0,8%
hitzesensibel	1,4 \pm 0,3%	2,6 \pm 0,6%	4,9 \pm 0,9%	7,2 \pm 2,3%	8,1 \pm 1,6%	8,1 \pm 1,7%

Wurden die absoluten Latenzänderungen nach 10 Interstimuli von Wildtyp- und knock-out-Fasern verglichen, so ergab sich bei den hitzeunempfindlichen Fasern kein signifikanter Unterschied, in dieser Gruppe kam es zu Latenzänderungen von $1,7 \pm 0,6$ ms bei den Wildtyp-Fasern und von $0,8 \pm 0,8$ ms bei den knock-out-Fasern (ANOVA, $F=0,8$, $p>0,25$). Die Latenzänderungen in der Gruppe der hitzesensiblen Fasern waren dagegen mit $4,5 \pm 0,8$ ms bei den Fasern von knock-out Mäusen signifikant kleiner als die entsprechenden Latenzänderungen bei den Fasern von Wildtyp Tieren, hier betrug die Latenzänderung nach 10 Interstimuli $7,8 \pm 0,4$ ms (ANOVA, $F=5,2$, $p<0,05$). Ein Grund für die geringeren Latenzänderungen der hitzesensiblen Fasern in den knock-out-Tieren war die höhere Prävalenz von Leitungsblocks während der Applikation der Interstimuli. Dies konnte unter anderem an der Tatsache gesehen werden, dass bei den knock-out-Tieren 4 Fasern nicht auf den Hauptstimulus antworteten, der den 10 Interstimuli folgte, während in Wildtyp-Mäusen alle 27 hitzesensiblen Fasern auf den Hauptstimulus nach Applikation von 10 Interstimuli antworteten (Chi²-Test, $p<0,05$). Jedoch kam es auch bei den Fasern zu geringeren Latenzänderungen, die keine Leitungsblocks hatten.

Als nächstes wurde nun auch für die Fasern in den knock-out-Tieren die Zeit bestimmt, welche benötigt wurde, um sich nach Applikation von 10 Interstimuli wieder um mindestens 75% der Ausgangslatenz anzunähern. Die hitzeunempfindlichen Fasern benötigten hierfür $5,0 \pm 1,0$ s, die hitzesensiblen Fasern $19,0 \pm 2,6$ s (ANOVA, $F=4,2$, $p>0,05$). Bei der kleinen Stichprobe war der Unterschied nicht signifikant. Bei den in Wildtyp-Mäusen abgeleiteten Fasern betrug die entsprechenden Werte $4,5 \pm 1,2$ s bzw. $16,0 \pm 1,4$ s (ANOVA, $F=0,06$, $p>0,5$ bzw. $F=0,05$, $p>0,5$), somit bestand hier kein signifikanter Unterschied. Abbildung 27 zeigt die Zeiten bis zur 75%-igen Erholung der in den Na_v1,8 knock-out Mäusen abgeleiteten Fasern in Abhängigkeit von den absoluten Latenzänderungen nach 10 Interstimuli (für die in Wildtyp-Mäusen abgeleiteten Fasern vergleiche Abbildung 12).

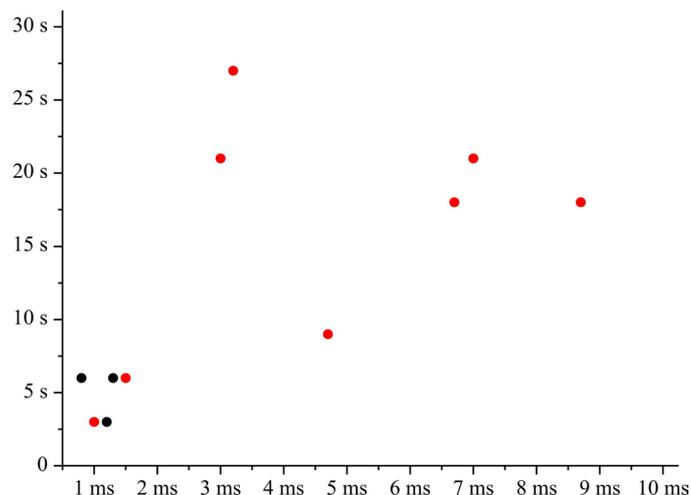


Abbildung 27: Zeit, bis sich die Fasern nach einem Latenzsprung wieder um 75% der Ausgangslatenz angenähert hatten in Abhängigkeit von der Größe des Latenzsprungs bei 10 Interstimuli für hitzeunempfindliche (schwarz, $n=3$) und hitzesensible (rot, $n=8$) Fasern

Um das Verhalten der Fasern der knock-out-Tiere während längerer Stimulationsperioden weiter zu untersuchen, wurden 4 hitzeunempfindliche (3 CM-Fasern und 1 CMC-Faser) und 10 hitzesensible Fasern (9 CMH-Fasern und 1 CMHC-Faser) nach Stabilisierung der Latenz bei 0,33 Hz nacheinander mit 1, 2 und 3 Hz für jeweils eine Minute stimuliert. Bei der Analyse der Latenzänderungen wurden nur die Fasern berücksichtigt, bei denen der Anteil der Leitungsblocks während der Stimulation mit 1, 2 oder 3 Hz weniger als 50% betrug. Die 4 hitzeunempfindlichen Fasern hatten keine Leitungsblocks bei Stimulation mit 1 Hz, die Latenz änderte sich um $0,9 \pm 0,5$ ms. Bei Stimulation mit 2 Hz kam es bei 1 Faser vermehrt zu Leitungsblocks, die Latenz änderte sich um $2,5 \pm 1,5$ ms. Mit einer Frequenz von 3 Hz konnten nur noch 2 der 4 hitzeunempfindlichen Fasern stimuliert werden, die übrigen Fasern antworteten bei dieser Frequenz nicht auf die Stimuli, die entsprechende Latenzänderung betrug $4,8 \pm 3,2$ ms. Die hitzesensiblen Fasern änderten nach einminütiger Stimulation mit 1 Hz ihre Latenz um $6,0 \pm 1,4$ ms, hier kam es bei einer Faser zu Leitungsblocks. Bei Stimulation mit einer Frequenz von 2 Hz erhöhte sich die Zahl der Fasern mit Leitungsblocks auf 4, die Latenzänderung betrug hier $13,8 \pm 4,0$ ms. 5 Fasern hatten bei einer Stimulationsfrequenz von 3 Hz Leitungsblocks, die Latenz änderte sich um $19,0 \pm 4,2$ ms. Die Latenzänderungen nach einminütiger Stimulation mit 1 bzw. 2 Hz waren bei den hitzesensiblen Fasern signifikant größer als bei den hitzeunempfindlichen Fasern (ANOVA, $F=5,3$, $p<0,05$ bzw. $F=5,5$, $p<0,05$). Der Unterschied zwischen hitzeunempfindlichen und hitzesensiblen Fasern bei 3 Hz war aufgrund der geringen

Faserzahl nicht signifikant (ANOVA, $F=2,3$, $p>0,05$). Die Latenzänderung der hitzeunempfindlichen Fasern nach einminütiger Stimulation mit 3 Hz unterschied sich nicht von der in Wildtyp-Mäusen beobachteten ($4,8 \pm 3,2$ ms vs. $11,0 \pm 6,1$ ms, ANOVA, $F=0,5$, $p>0,5$).

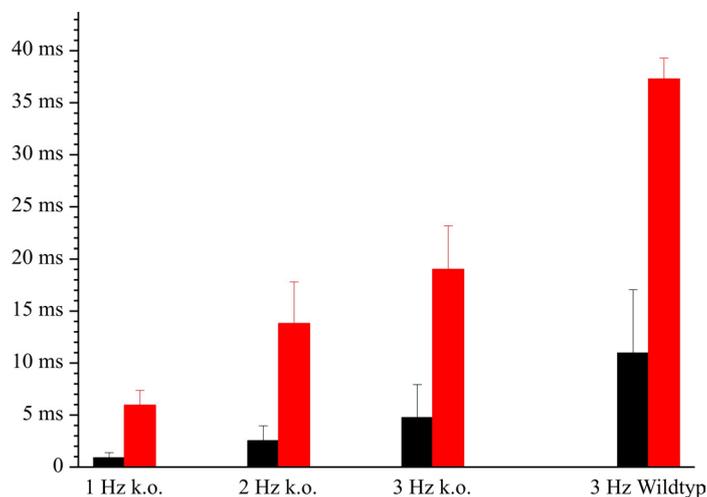


Abbildung 28: Absolute Latenzänderung nach einminütiger Stimulation für hitzeunempfindliche (schwarz) und hitzesensible Fasern (rot) bei unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen, zum Vergleich sind die Werte für Wildtyp-Fasern abgebildet.

Dagegen war diese bei den hitzesensiblen Fasern deutlich niedriger als bei den hitzeunempfindlichen Fasern der Wildtyp-Mäuse ($19,0 \pm 4,2$ ms vs. $37,3 \pm 2,0$ ms, ANOVA, $F=27,0$, $p<<0,001$; vergleiche Abbildung 28). Ein möglicher Grund für die geringeren Latenzänderungen in knock-out Mäusen war die größere Prävalenz von Leitungsblocks bei den in knock-out-Tieren abgeleiteten Fasern. Während bei einminütiger Stimulation mit 3 Hz von den 15 Wildtyp-Fasern 1 Faser Leitungsblocks hatte waren es bei den in knock-out Mäusen abgeleiteten Fasern 7 von 14 (Chi^2 -Test, $p<0,01$).

Sowohl bei Applikation einer unterschiedlichen Anzahl von Interstimuli als auch bei Stimulation über eine Minute mit 1, 2 und 3 Hz fielen signifikante Unterschiede zwischen knock-out- und Wildtyp-Fasern auf, insbesondere in der Gruppe der hitzesensiblen Fasern. Grund dafür war unter anderem eine höhere Prävalenz von Leitungsblocks bei den knock-out-Fasern, weitere mögliche Ursachen werden in der Diskussion besprochen. Die Zeit bis zur 75%-igen Erholung wurde hier nicht bestimmt, da zu wenige Fasern mit einer Frequenz von 3 Hz stimuliert werden konnten.

4 Diskussion

Es konnte gezeigt werden, dass hitzeunempfindliche Fasern von Wildtyp-Mäusen bei allen verwendeten Stimulationsprotokollen signifikant niedrigere Latenzänderungen als hitzeempfindliche Fasern erfuhren, die Erholung erfolgte bei den hitzeunempfindlichen Fasern ebenfalls schneller. Die Blockade von I_h mit Cs^+ bzw. ZD 7288 führte bei den hitzeunempfindlichen Fasern zu einer Veränderung ihres Verhaltens während repetitiver Stimulation, indem es zu größeren Latenzänderungen als unter Kontrollbedingungen kam, zusätzlich war die Erholungsperiode verlängert. In $Na_{v1.8}$ -defizienten Mäusen kam es in der Gruppe der hitzesensiblen Fasern zum vermehrten Auftreten von Leitungsblocks, zusätzlich waren die Latenzsprünge signifikant niedriger als in den korrespondierenden Fasern von Wildtyp-Tieren.

Ausgelöst durch ein Aktionspotential kommt es in Neuronen zu charakteristischen Veränderungen der Membranerregbarkeit. Direkt auf das Aktionspotential folgt die absolute Refraktärperiode, dieser schließt sich die relative Refraktärperiode an. Der Refraktärperiode folgt eine kurze Periode gesteigerter elektrischer und mechanischer Erregbarkeit (=supernormale Periode) und eine längere Periode verminderter Erregbarkeit (=subnormale Periode). Es konnte gezeigt werden, dass die verminderte Erregbarkeit auf einer Hyperpolarisation der Nervenzellmembran beruht. So zeigten Bostock und Grafe (1985), dass es während intermittierender Stimulationsperioden mit hoher Frequenz in A-Fasern von Ratten zu einer Hyperpolarisation der Nervenzellmembran und dadurch zu höheren elektrischen Reizschwellen kam. Gleichzeitig konnten sie zeigen, dass sich mit Erhöhung der elektrischen Reizschwelle die Nervenleitgeschwindigkeit verringerte. Da die Nervenleitgeschwindigkeit einer experimentellen Bestimmung leichter zugänglich ist als die direkte Bestimmung der elektrischen Reizschwelle, bietet sich deren Bestimmung zur Analyse aktivitätsinduzierter Veränderungen an Nervenzellmembran an. Deshalb wurden auch in dieser Arbeit Latenzänderungen als Maß für die Veränderungen der Erregbarkeit einer Faser betrachtet.

Zunächst wurde die Abhängigkeit der Latenzänderungen von der Anzahl der Stimuli und von der Stimulationsdauer untersucht, eine mögliche Rolle von I_h -Kanälen und

von TTX-R (=Tetrodotoxin resistent) Na^+ -Kanälen bei den aktivitätsinduzierten Veränderungen der Membraneigenschaften wurde mit spezifischen Blockern von I_h und in $\text{Na}_{v1.8}$ knock-out Mäusen untersucht.

Die hier untersuchten C-Fasern wurden aufgrund ihres Antwortverhaltens auf thermische Stimulation als mechanosensible (CM), mechanokältesensible (CMC), mechanohitzesensible (CMH) und mechanohitzekältesensible C-Fasern charakterisiert. Die hierbei gefundenen rezeptiven Eigenschaften der C-Fasern stimmten qualitativ weitgehend mit den Beobachtungen anderer Autoren überein (Koltzenburg et al. 1997; Cain et al. 2001).

Unterschiedliches Verhalten von hitzesensiblen und hitzeunsensiblen Fasern während tetanischer Stimulation

Die untersuchten hitzesensiblen (CMH und CMHC) Fasern unterschieden sich grundlegend in ihrer Reaktion auf die durch elektrische Stimulation induzierte Aktivität von den hitzeunsensiblen (CM und CMC) Fasern. Während die hitzesensiblen CMH- und CMHC-Fasern mit steigender Interstimuluszahl eine annähernd lineare Zunahme der Latenzsprünge zeigten kam es bei den CMC-Fasern erst bei 6 und mehr applizierten Interstimuli zu einer signifikanten Vergrößerung der Latenzänderungen. In der Gruppe der CM-Fasern zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Zahl der Interstimuli und der resultierenden Latenzänderung. Das Ausmaß der Latenzänderung war bei den CMH- und CMHC-Fasern am größten, CMC-Fasern zeigten die geringsten Latenzänderungen, die CM-Fasern lagen dazwischen. Hitzesensible Fasern konnten aufgrund ihrer Latenzänderungen nach 10 Interstimuli eindeutig von hitzeunsensiblen Fasern unterschieden werden, wenn man als Grenze eine Latenzänderung von 5 ms wählte. Auch bei längerer Stimulation bestanden Unterschiede zwischen hitzesensiblen und hitzeunsensiblen Fasern. Während einminütiger Stimulation mit 3 Hz kam es bei den hitzesensiblen Fasern über die gesamte Stimulationsdauer zu einer kontinuierlichen Zunahme der Latenz bis zu einem Maximum von $37,3 \pm 2,0$ ms. Die hitzeunsensiblen Fasern zeigten initial eine Zunahme der Latenz, die sich während der weiteren Stimulation nur noch minimal änderte. Das Ausmaß der Latenzänderung nach einer Minute war bei den hitzeunsensiblen Fasern mit $11,0 \pm 6,1$ ms signifikant niedriger als bei den hitzesensiblen Fasern. Es konnte gezeigt werden, dass weder die mechanische Reizschwelle noch die Ruhenervenleitgeschwindigkeit einen Einfluss auf

die aktivitätsinduzierten Latenzänderungen haben. Allein die rezeptiven Eigenschaften waren ein Prädiktor für das Ausmaß der Latenzsprünge.

Auch andere Autoren machten vergleichbare Beobachtungen. Raymond et al. (1990) untersuchten die durch Aktivität induzierten Veränderungen der Membraneigenschaften von C-Fasern in Ratten. Sie konnten zeigen, dass die Latenz von Nozizeptoren (die in dieser Arbeit nicht weiter differenziert wurden) während repetitiver Stimulation stetig zunahm, Kaltfasern dagegen erreichten nach einer geringen initialen Latenzzunahme ein Plateau. Das Ausmaß der Latenzänderungen nahm mit steigender Stimulationsfrequenz zu und war für alle untersuchten Stimulationsfrequenzen in der Gruppe der Nozizeptoren signifikant größer als in der Gruppe der Kaltfasern. Die gleichen Beobachtungen machten Thalhammer et al. (1994). In mikroneurographischen Untersuchungen an Menschen konnte ebenfalls eine lineare Abhängigkeit der Latenzänderungen von der Anzahl der applizierten Interstimuli in C-Fasern gezeigt werden (Schmelz et al. 1995). Die Autoren dieser Arbeit fanden in Übereinstimmung mit den hier gemachten Beobachtungen keinen signifikanten Einfluss der Distanz zwischen Stimulations- und Ableitungselektrode auf das Ausmaß der Latenzänderung. In der Arbeit von Schmelz et al. (1995) wurden die mechanosensiblen C-Fasern allerdings nicht weiter auf ihr Verhalten während Applikation von thermischen Reizen untersucht, so dass hier lediglich eine allgemeine Beschreibung des Phänomens der aktivitätsinduzierten Latenzänderungen in C-Fasern erfolgte, ungeachtet deren rezeptiven Eigenschaften. Ebenfalls in mikroneurographischen Experimenten an Menschen fanden Weidner et al. (1999) eine inverse Korrelation zwischen der Ruhenervenleitgeschwindigkeit und dem Grad der Latenzsprünge. Eine ähnliche Korrelation konnte ich auch hier beobachten, wenn wie bei Weidner et al. (1999) die Ruhenervenleitgeschwindigkeit mit den absoluten Werten für die Latenzsprünge korreliert wurde. Diese Korrelation bestand allerdings nicht mehr, wenn anstelle der absoluten Werte der Latenzänderungen die relativen betrachtet wurden. Somit wird klar, dass es sich hier nur um einen scheinbaren Einfluss der Nervenleitgeschwindigkeit auf das Ausmaß der Latenzänderung handelt.

Gee et al. (1996) unterschieden bei Experimenten an C-Fasern aus dem N. saphenus von Ratten zwischen polymodalen Nozizeptoren (entsprechend den CMH- und CMHC-Fasern dieser Arbeit), Mechanorezeptoren (CM-Fasern) und Kaltfasern (CMC-Fasern).

Sie konnten zeigen, dass nach 20-sekündiger Stimulation mit 20 Hz die Latenzänderungen der Nozizeptoren mit $29,2 \pm 0,7\%$ signifikant größer waren als die der Mechanorezeptoren und der Kalfasern ($14,9 \pm 0,8$ bzw. $10,8 \pm 0,6\%$). Serra et al. (1999) leiteten 88 C-Fasern in mikroneurographischen Untersuchungen an Menschen ab. Aufgrund des Verhaltens während repetitiver Stimulation unterschieden sie 3 Fasertypen. Das Ausmaß der Latenzänderung von Typ I Fasern war signifikant größer als das der Typ II Fasern, die Typ III Fasern änderten ihre Latenz nur minimal. Die Hälfte der Typ I Fasern konnten Serra et. al (1999) als polymodale Nozizeptoren klassifizieren, die Hälfte der Typ II Fasern waren Kalfasern. Sowohl die verbleibenden Fasern als auch die Typ III Fasern konnten keiner Funktion zugeordnet werden. Bei den Typ I und den Typ II Fasern dürfte es sich tatsächlich um polymodale Nozizeptoren bzw. um Kalfasern handeln, da das Verhalten dieser Fasern während repetitiver Stimulation mit den Beobachtungen der anderen Autoren und mit den hier gemachten Beobachtungen übereinstimmt. Problematisch bei der Arbeit von Serra et al. ist aber die Tatsache, dass über die Hälfte der abgeleiteten Fasern nicht näher charakterisiert werden konnten. Dies gilt insbesondere für die Gruppe der Typ III Fasern. Es handelt sich keinesfalls um sympathische Efferenzen, da die Fasern durch sympathische Stimuli nicht erregt werden konnten. Serra et al. (1999) diskutieren, ob es sich bei diesen Fasern um mechanounsensible Fasern, sogenannte „schlafende Nozizeptoren“, handeln könnte, doch ist auch diese Möglichkeit wenig wahrscheinlich, da u.a. Weidner et al. (1999) zeigten, dass es in der Gruppe der mechanounsensiblen Fasern nach repetitiver Stimulation zu den größten Latenzänderungen kommt. Aufgrund des niedrigen „signal to noise ratio“ bei den Typ III Fasern von Serra et al. (1999) erscheint es möglich, dass diese durch technische Probleme wie fehlende Antworten auf die Testreize nur geringe Latenzänderungen erfuhren. Allen diesen Arbeiten gemeinsam ist die Beobachtung, dass es bei hitzesensiblen C-Fasern nach repetitiver Stimulation zu ausgeprägteren Zunahmen der Latenz kam als bei Kalfasern, Mechanorezeptoren lagen zwischen diesen beiden Gruppen (Gee et al. 1996).

Die in dieser Arbeit erstmals an der Maus gewonnenen Daten stimmen damit gut mit den in der Literatur beschriebenen Daten beim Menschen und der Ratte überein.

Mit Hilfe dieser Erkenntnisse ist es nun möglich, Afferenzen in Experimenten aufgrund ihrer Reaktion auf Aktivität eindeutig zu charakterisieren, ohne zusätzlich thermische

Stimuli anwenden zu müssen. Da die Verwendung von thermischen Stimuli im rezeptiven Feld stets das Risiko einer Beschädigung des selbigen birgt, ist dies zweifelsohne von großem Vorteil. Zusätzlich ist es möglich Fasern zu charakterisieren, ohne auf die Unversehrtheit des rezeptiven Felds angewiesen zu sein. Dies ist zum Beispiel in Experimenten an isolierten Nerven sehr hilfreich.

Mechanismen für die Verlangsamung von C-Fasern während repetitiver Stimulation

Im Folgenden sollen die möglichen Mechanismen diskutiert werden, aufgrund derer es während neuronaler Aktivität zur Verlangsamung der Fasern kommt, und warum das Ausmaß dieser Verlangsamung in den einzelnen Faserklassen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Von Bedeutung in diesem Zusammenhang sind neben Strömen durch I_h -Kanäle auch die Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase (sogenannte Natrium-Kalium-Pumpe) und TTX-R Na^+ -Kanäle.

I_h limitiert die Verlangsamung von Neuronen während repetitiver Stimulation

Ein Mechanismus, welcher die Membranhyperpolarisierung und Verlangsamung von Nervenfasern nach tetanischen Stimuli limitiert scheint der Kanal I_h zu sein. Bei I_h handelt es sich um einen von Na^+ - und K^+ -Ionen getragenen, durch Cäsium-Ionen blockierbaren Strom (Wollmuth 1995), dessen Existenz und Bedeutung in verschiedenen Organen bereits nachgewiesen werden konnte. Im Herzen ist die Dichte von I_h -Kanälen in den Zellen des Sinusknotens besonders groß, I_h spielt dort eine Rolle bei der Generation von Schrittmacherpotentialen durch Depolarisation der Zellmembran in Richtung des Schwellenpotentials (DiFrancesco 1993). Bei der Generation der rhythmischen „spindle wave“-Komplexe im Thalamus und damit bei der Kontrolle der Vigilanz spielt I_h ebenfalls eine entscheidende Rolle (McCormick und Pape 1990; Lüthi et al. 1998; Lüthi und McCormick 1998b). Seit der ersten Charakterisierung konnten I_h -Kanäle auch in verschiedenen anderen neuronalen Geweben nachgewiesen werden, dazu zählen unter anderem Neurone des Ganglion nodosum (Ingram und Williams 1994; 1996; Doan und Kunze 1999), Neurone der Substantia nigra pars compacta (Cathala und Paupardin-Tritsch 1997; 1999), Motorneurone (Kiehn und Harris-Warrick 1992; Beaumont und Zucker 2000), Pyramidenzellen (Berger et al. 2001), hippocampale Moosfasern (Mellor et al. 2002), aber auch Spinalganglienneurone (Cardenas et al. 1999) und periphere Nerven (Jafri und Weinreich 1998;

Dalle et al. 2001). Über I_h -Kanäle und deren Verteilung im zentralen und peripheren Nervensystem gibt Pape (1996) und Monteggia et al. (2000) eine Übersicht. Grafe et al. (1997) untersuchten das Summenaktionspotential von C-Fasern sowohl in Ratten als auch in Biopsien menschlicher Nerven und dessen Verhalten während repetitiver elektrischer Stimulation. Wechselten sie die Stimulationsfrequenz von 0,33 Hz auf 3 Hz, so kam es zu einer Verlangsamung der C-Fasern, die an einer Zunahme der Zeit bis zum Erreichen der 50%-igen Amplitude des sogenannten C-volleys erkennbar war. Bei Applikation von Cs^+ -Ionen in Konzentrationen von 1 bis 3 mM kam es zu einer Verlängerung dieser Zeit, also zu einer größeren Verlangsamung der Fasern als unter Kontrollbedingungen. Zu den gleichen Ergebnissen kamen Takigawa et al. (1998) bei Verwendung von ZD 7288, einem spezifischen, irreversiblen Blocker von I_h -Kanälen (Harris und Constanti 1995). Beide Arbeiten zeigen, dass I_h -Kanäle einen limitierenden Effekt auf die aktivitätsinduzierte Latenzänderung haben, da ihre Blockade zu einer Zunahme der Latenzänderungen führte.

In der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine Rolle von I_h -Kanälen bei den aktivitätsinduzierten Latenzänderungen von C-Fasern gezeigt werden. Bei Applikation von 10 Interstimuli während einer Grundstimulationsfrequenz von 0,33 Hz kam es in Anwesenheit von Cs^+ in einer Konzentration von 5 mM zu tendenziell größeren Latenzsprüngen als unter Kontrollbedingungen, ein statistisch signifikanter Unterschied bestand hierbei allerdings nicht. Auch bei Anwendung von ZD 7288 kam es zu Veränderungen bei den Latenzsprüngen. Wurde ZD 7288 in einer Konzentration von 1 μ M verwendet, so kam es zu größeren Latenzsprüngen als unter Kontrollbedingungen, bei Konzentrationen von 3 bis 50 μ M dagegen nahm die Größe der Latenzänderung kontinuierlich ab und lag bei 50 μ M mit $2,8 \pm 1,6$ ms deutlich niedriger als die unter Kontrollbedingungen beobachtete ($5,5 \pm 2,0$ ms). Der Grund hierfür ist in der größeren Häufigkeit von Leitungsblocks bei den höheren Konzentrationen von ZD 7288 zu sehen. Während unter Kontrollbedingungen 2 von 8 Fasern Leitungsblocks in einer relativen Häufigkeit von $1,0 \pm 0,7\%$ hatten waren es alle 8 Fasern nach Anwendung von ZD 7288 in einer Konzentration von 50 μ M, die relative Häufigkeit der Leitungsblocks betrug hier $45,3 \pm 17,3\%$. Das gehäufte Auftreten von Leitungsblocks während der Anwendung von ZD 7288 zeigte sich auch daran, dass einzelne Fasern komplett geblockt wurden und nicht mehr durch elektrische oder natürliche Stimuli erregt werden

konnten. Auch nach einem wash-out von ZD 7288 änderte sich an der Unerregbarkeit dieser Fasern nichts, da der durch diese Substanz bedingte Block von I_h irreversibel ist, wie Harris und Constanti (1995) zeigen konnten. Bei Verwendung von Cs^+ war der Anteil der Fasern mit intermittierend auftretenden Leitungsblocks ebenfalls größer als unter Kontrollbedingungen (9 von 14 vs. 2 von 14 Fasern). Alle Werte beziehen sich auf die während der Grundstimulation mit 0,33 Hz aufgetretenen Leitungsblocks.

Zusätzlich zeigte sich ein Effekt von Cs^+ und ZD 7288 auf die Ruhelatenz während der hier verwendeten langen Einwirkdauer von 9 min. Während der Applikation von Cs^+ kam es bei 8 von 14 Fasern zu einer allmählichen Zunahme der Ruhelatenz um $11,4 \pm 4,6\%$, bei ZD 7288 in einer Konzentration von $50 \mu M$ betrug diese Zunahme bei 3 von 4 Fasern im Mittel $3,8 \pm 3,4\%$, war also nicht so stark ausgeprägt wie diejenige während der Anwendung von Cs^+ . Der Grund für die Zunahme der Ruhelatenz ist möglicherweise in der stärkeren Hyperpolarisation der Nervenzellmembran zu sehen, die Doan und Kunze (1999) in Neuronen des Vagus bei Verwendung von Blockern von I_h nachweisen konnten. Zugabe von CsCl führte in ihren Experimenten zu einer Membranhypolarisation der C-Fasern von -62 ± 2 mV auf -71 ± 3 mV. Wie bereits ausgeführt wurde führt eine Hyperpolarisation zur Erhöhung der Erregungsschwelle und damit zu einer Zunahme der Latenz (Bostock und Grafe 1985). Insbesondere in Bezug auf die Latenzänderungen unter Kontrollbedingungen und in Anwesenheit von Cs^+ bzw. ZD 7288 ergab sich bei der Analyse der hier gewonnen Daten das Problem, dass sich eine Zunahme der Latenzänderung nach 10 Interstimuli in Anwesenheit von Blockern von I_h mit dem Effekt der gehäuft auftretenden Leitungsblocks überlagerte und sich die gegenläufigen Einflüsse auf die Latenzsprünge gegenseitig aufhoben. Dies geschah, da ein maximaler Block von I_h , wie er offensichtlich insbesondere bei den höheren Konzentrationen von ZD 7288 auftrat, über Leitungsblocks zu einer Abnahme der induzierten Aktivität und damit zu einer verminderten Latenzänderung führte. Aus diesem Grund wurde auf die Ableitung einer größeren Anzahl von Fasern nach diesem Protokoll verzichtet, stattdessen wurde zur Beantwortung der Frage, in welcher Faserklasse der größte Effekt von ZD 7288 auftritt, im Weiteren ein längeres Stimulationsintervall (30 oder 60 s anstelle von 1 s) mit einer niedrigeren Frequenz (3 Hz anstelle von 10 Hz) gewählt, da unter diesen Stimulationsbedingungen die Leitungssicherheit von C-Fasern größer ist. So konnten mehrere Gruppen zeigen, dass

insbesondere in der Population der polymodalen Nozizeptoren der Anteil der Fasern, die nicht mehr auf jeden Impuls mit der Generation eines Aktionspotentials antworteten, bei Stimulationsfrequenzen von mehr als 3 Hz sprunghaft zunahm (Raymond et al. 1990; Thalhammer et al. 1994; Gee et al. 1996; Serra et al. 1999). Zusätzlich wurde mit 5 Minuten eine kürzere Einwirkzeit von ZD 7288 bzw. von Cs^+ gewählt, um einen kompletten Block von I_h und damit das Auftreten von Leitungsblocks zu verhindern. Bei den Experimenten von Takigawa et al. (1998) fiel bereits nach etwa 2 bis 3 Minuten ein klar erkennbarer –wenn auch nicht maximal ausgeprägter- Effekt von ZD 7288 auf. Somit erschien es hier legitim, mit 5 Minuten eine zur Produktion eines kompletten Blocks von I_h zu kurze Einwirkdauer zu wählen, da es lediglich um den qualitativen Nachweis eines möglichen Einflusses von I_h auf die aktivitätsinduzierten Latenzänderungen ging, nicht aber um eine Quantifizierung dieses Effekts. Auch bei diesem Protokoll konnten nicht alle Fasern bei Verwendung von ZD 7288 in Konzentrationen von mehr als 3 μM abgeleitet werden, so waren etwa bei 50 μM von 12 Fasern 10 komplett geblockt. Es zeigte sich bei den hitzeempfindlichen Fasern ein geringerer Effekt von ZD 7288 als bei den hitzeunempfindlichen Fasern. So kam es bei den hitzesensiblen Fasern bei Applikation von ZD 7288 in einer Konzentration von 3 μM zu im Vergleich zu Kontrollbedingungen um $5,7 \pm 3,7\%$ größeren Latenzänderungen während der Stimulation mit 3 Hz, für alle anderen verwendeten Konzentrationen ergaben sich noch geringere Veränderungen, bei 50 μM kam es aufgrund von Leitungsblocks während der Stimulationsperiode zu geringeren Latenzänderungen als unter Kontrollbedingungen, für keine Konzentration zeigte sich bei den hitzesensiblen Fasern ein signifikanter Einfluss von ZD 7288. Bei den hitzeunempfindlichen Fasern ergab sich dagegen ein anderes Bild. Hier zeigte sich ein starker Effekt von ZD 7288 auf das Ausmaß der erzielten Latenzänderung. Bei einer Konzentration von 3 μM war die Latenzänderung im Mittel um $18,6 \pm 13,2\%$ größer als unter Kontrollbedingungen, bei 10 μM waren es $30,2 \pm 27,0\%$ und bei 30 μM betrug der Unterschied $71,1 \pm 23,2\%$.

Dies ist mit der Hypothese vereinbar, dass eine signifikante Blockade nur in den Neuronen möglich war, die im Ruhezustand über ausreichend große Ströme durch I_h – Kanäle verfügten. Durch Applikation von ZD 7288 konnte gezeigt werden, dass der Effekt von I_h auf die aktivitätsinduzierte Verlangsamung bei den hitzesensiblen Fasern

gering ausgeprägt ist, bei den hitzeunempfindlichen Fasern dagegen führte die Blockade von I_h zu einer sehr deutlichen Zunahme der Latenzänderung nach repetitiver Stimulation. Wie bereits gezeigt werden konnte, erfahren die hitzeunempfindlichen Fasern während repetitiver Stimulation sehr viel geringere Latenzänderungen als hitzeempfindliche Fasern. Die Tatsache, dass die Blockade von I_h -Kanälen eben bei diesen hitzeunempfindlichen Fasern zu einer ausgeprägten Zunahme der durch Aktivität induzierten Verlangsamung führte, spricht eindeutig für eine limitierende Rolle von I_h bei der Hyperpolarisation und damit bei der Verlangsamung von hitzeunempfindlichen Fasern. Da auch bei einigen hitzeempfindlichen Fasern ein, wenn auch gering ausgeprägter, Einfluss von ZD 7288 auf die Verlangsamung nachgewiesen werden konnte, scheint auch in dieser Faserpopulation eine Expression von I_h stattzufinden, wenn auch in geringerem Ausmaß als bei den hitzeunempfindlichen Fasern. Die Tatsache, dass nicht alle Fasern in der Gruppe der hitzeunempfindlichen Fasern einen Effekt von ZD 7288 erkennen ließen, ist nicht verwunderlich. Mittlerweile konnten 4 verschiedene Gene charakterisiert werden, die für I_h -Kanäle kodieren, bezeichnet werden sie mit HCN 1 bis 4 (Ludwig et al. 1998; Santoro und Tibbs 1999). Moosmang et al. (2001) zeigten, dass in Spinalganglienneuronen der Maus lediglich eine Expression von HCN 1 und 2 erfolgt, wobei in der Gruppe der Zellen mit kleinem Durchmesser (zu der die C-Fasern gehören) HCN 1 von etwa 80% der Zellen exprimiert wurde, HCN 2 dagegen nur von etwa 60%. Eine genauere Untersuchung über die Verteilung von HCN-Kanälen in den verschiedenen Populationen von Spinalganglienneuronen der Maus führten Huerta und Koltzenburg (2002) durch. Auch sie fanden HCN 1 und HCN 2 in allen Populationen, allerdings war das Expressionsniveau in den Capsaicin-positiven Neuronen, von denen die überwiegende Zahl auch hitzesensibel ist (Caterina et al. 2000), niedriger als in der übrigen Population. Höher war die Expression von HCN 2 in der Gruppe der IB 4-positiven Neurone, für die Stucky und Lewin (1999) eine untergeordnete Rolle bei der Hitzesensibilität zeigen konnten. Eine eindeutige Zuordnung der einzelnen Klassen von Spinalganglienneuronen zu den unterschiedlichen peripheren Axonmodalitäten ist bis heute leider noch nicht für alle Fasertypen eindeutig möglich. Bekannt ist aber, dass Neurofilament-positive Neurone myelinisierte Axone haben, zusätzlich kommt es in der Gruppe der A-Fasern nur zu geringen Latenzänderungen durch tetanische Stimuli

(Raymond et al. 1990). Vor diesem Hintergrund ist es nicht verwunderlich, dass Huerta und Koltzenburg (2002) in der Gruppe der NF-positiven Neurone die höchste Expression von HCN 1 und HCN 2 fanden. Aufgrund der geringen Expression der HCN-Isoformen in Capsaicin-positiven Neuronen scheint es möglich, dass ihre Axone in der Gruppe der CMH- und CMHC-Fasern zu finden sind, da es in dieser Gruppe zu den ausgeprägtesten Latenzänderungen in Folge von Aktivität kommt, wofür eine geringe I_h -Aktivität ein Grund ist, wie gezeigt werden konnte. Umgekehrt wäre es denkbar, dass hitzeunempfindliche Fasern in IB 4-positive Neurone projizieren. Es bleibt abzuwarten, ob in zukünftigen Experimenten eine Zuordnung der peripheren C-Faserklassen zu distinkten Gruppen von Spinalganglienzellen möglich wird. Eine weitere Rolle scheint HCN 3 zu spielen. Im Gegensatz zu Ludwig et al. (1998) fanden Huerta und Koltzenburg (2002) mit PCR für HCN 3 eine hohe Expression von Transkripten, was in späteren immunhistochemischen Untersuchungen bestätigt wurde (Huerta, persönliche Mitteilung).

Möglicher Beitrag der Na^+/K^+ -ATPase zur aktivitätsinduzierten Verlangsamung von Neuronen

Eine Rolle bei der aktivitätsinduzierten Verlangsamung von Neuronen könnte die Na^+/K^+ -ATPase spielen. Die Na^+ -Ionen, die während eines Aktionspotentials in die Nervenzelle strömen werden in der Folge durch die Na^+/K^+ -ATPase gegen K^+ -Ionen ausgetauscht. Bei diesem Tausch kommt es während eines Zyklus zur Extrusion von 3 Na^+ -Ionen, während nur 2 K^+ -Ionen in die Zelle gelangen, somit könnte dieser Mechanismus zur Hyperpolarisation der Nervenzellmembran beitragen. Ritchie und Straub (1957) und Rang und Ritchie (1968) untersuchten die Membranhyperpolarisation in Folge von Aktivität. Sie konnten in verschiedenen Experimenten nachweisen, dass sowohl Na^+ - als auch K^+ -Ionen eine Rolle bei der Membranhyperpolarisation spielen, zusätzlich konnten sie zeigen, dass diese auf einem aktiven Transportprozess beruht. So verhinderten metabolische Inhibitoren wie beispielsweise 2,4-Dinitrophenol die Membranhyperpolarisation, die normalerweise auf eine Serie tetanischer Stimuli folgt ebenso wie das Glykosid Digitalis, das über eine Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase wirkt. Den gleichen Effekt hatte die Substitution von Na^+ -Ionen durch Lithium. Nach temporärer Entfernung von Kalium aus der extrazellulären Lösung kam es nicht mehr zu einer Hyperpolarisation in der Folge von mehreren Stimuli, bei Wiedergabe von

Kalium trat eine prompte Hyperpolarisation auf. Diese Ergebnisse zeigen klar, dass die Na^+/K^+ -ATPase eine Rolle bei der Membranhyperpolarisation in Folge von Aktivität spielt (Zusammenfassung der Ergebnisse in Ritchie 1973). Van Essen (1973) beobachtete ebenfalls eine starke Verringerung der durch Stimulusfolgen normalerweise induzierten Hyperpolarisation bei Zugabe des Glykosids Strophantidin zum rezeptiven Feld von sensiblen Neuronen von Blutegeln. Auch kam es in Anwesenheit von Strophantidin selbst bei hohen Stimulationsfrequenzen nicht mehr zum Auftreten von Leitungsblöcken, die unter Kontrollbedingungen regelmäßig beobachtet wurden. Die gleichen Beobachtungen machten Jansen und Nicholls (1973), zusätzlich konnten sie zeigen, dass es über eine Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration zu einer Zunahme der Membranleitfähigkeit für K^+ -Ionen und damit zu einer Hyperpolarisation der Nervenzellmembran kam. Die Frage, ob Ca^{2+} -Ionen hierbei extrazellulär oder aber erst nach Aufnahme in die Zelle wirken, konnten sie nicht beantworten. Mit dieser Frage befassten sich Higashi et al. (1984). In intrazellulären Ableitungen von Ganglienzellen des Kaninchens kam es nach Injektion von Ca^{2+} -Ionen in die Zelle zu einer längeren Dauer und zu einer größeren Amplitude der Hyperpolarisation aufgrund einer größeren K^+ -Leitfähigkeit der Nervenzellmembran. EGTA, ein Ca^{2+} -Komplexbildner dagegen bewirkte das Gegenteil. Somit kann es als gesichert gelten, dass es über eine intrazelluläre Erhöhung der freien Ca^{2+} -Konzentration – wie sie während des Aktionspotentials auftritt - zu einer Zunahme der Membranleitfähigkeit für K^+ -Ionen und damit verbunden zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran kommt. Aus dieser wiederum resultiert wie bereits ausgeführt eine Erhöhung der Reizschwelle, erkennbar an einer Zunahme der Latenz (Bostock und Grafe 1985).

Zeitlicher Ablauf der Latenzerholung nach repetitiver Stimulation und die dabei bestehenden Unterschiede zwischen hitzesensiblen und hitzeunempfindlichen Fasern

Hitzesensible und hitzeunsensible Fasern unterschieden sich aber nicht nur im Ausmaß ihrer Latenzänderung auf repetitive Stimulation, sondern auch im Zeitverlauf des Erholungsprozesses, der seinerseits wiederum die Latenzänderung beeinflusst. Nach einer relativ kurzen Stimulationsperiode über 1 s mit 10 Interstimuli benötigten die hitzeunsensiblen Fasern lediglich $4,5 \pm 1,2$ s, um sich wieder um 75% ihrer

Ausgangslatenz anzunähern, während bei den hitzesensiblen Fasern für die gleiche Erholung $16,0 \pm 1,4$ s vergingen. Nach längerer Stimulation (30 oder 60 s) kam es zu einer überraschenden Beobachtung: während bei den Zeiten bis zur 50%-igen Erholung einer Faser weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen hitzesensiblen und hitzeunsensiblen Fasern bestand ($40,9 \pm 2,1$ s vs. $28,5 \pm 4,4$ s), war dies bei den Zeiten bis zur 75%-igen Erholung nicht mehr der Fall, die Zeiten waren hier für beide Faserpopulationen identisch (hitzesensible Fasern $68,3 \pm 3,9$ s, hitzeunsensible Fasern $67,2 \pm 11$ s). Bei Applikation von ZD 7288 zur Untersuchung der Frage, auf welche Weise I_h -Kanäle die Erholungsprozesse von C-Fasern beeinflussen, zeigte sich bei den hitzesensiblen Fasern eine Zunahme sowohl der Zeiten bis zur 50%-igen als auch derjenigen bis zur 75%-igen Erholung, dabei war der Effekt von ZD 7288 zu beiden Zeitpunkten vergleichbar. Bei den hitzeunempfindlichen Fasern kam es in Anwesenheit von ZD 7288 zu einer viel ausgeprägteren Verlängerung der für die 75%-ige Erholung benötigten Zeit als bei den hitzesensiblen Fasern, der Unterschied zu den entsprechenden Werten unter Kontrollbedingungen war signifikant. Hingegen zeigte sich auf die Zeit, welche bis zur 50%-igen Wiederannäherung an die Ausgangslatenz verging, bei den hitzeunsensiblen Fasern kein Effekt von ZD 7288.

Um diese Ergebnisse verstehen zu können, ist die Kenntnis der Abläufe in Neuronen in Folge eines Aktionspotentials essentiell (Burke et al. 2001). Schon Gasser (1935) und Grundfest und Gasser (1938) untersuchten C-Fasern und deren Verhalten nach repetitiver Stimulation in Fröschen und in Katzen und konnten einige der grundlegenden Eigenschaften herausarbeiten. Sie fanden 3 verschiedene Phasen nach einem Aktionspotential: zunächst kam es zu einem kurzen Nachpotential im depolarisierten Bereich (hier „negatives“ Nachpotential genannt, N), dieses ging in eine kurze (1 - 2 Sekunden) Periode über, in der die Membran hyperpolarisiert war („positives“ Nachpotential, P 1), auf diese wiederum folgte eine längere (0,5 - 2 Minuten) Periode der Membranhyperpolarisation (P2). N war dabei mit einer Übererregbarkeit („supernormality“) der Faser verbunden, P dagegen mit einer herabgesetzten Erregbarkeit („subnormality“). In beiden Arbeiten zeigte sich ein Einfluss der Stimulationsfrequenz und der Anzahl der applizierten Stimuli auf P 1 und P 2: die Amplitude von P 1 nahm mit zunehmender Frequenz und mit zunehmender Stimuluszahl bis zu einem Maximum zu, die Dauer von P 1 wurde jedoch von keinem

der beiden Parameter beeinflusst. Bei P 2 hingegen kam es sowohl zu einer Vergrößerung der Amplitude als auch der Dauer bei Erhöhung der Frequenz oder der Anzahl der applizierten Stimuli. Sie postulierten daher zwei unterschiedliche Mechanismen als Grundlage für P 1 und P 2. Bergmans (1968a; 1968b) fand in Experimenten am *N. medianus* von gesunden menschlichen Probanden ebenfalls zwei Perioden verminderter Erregbarkeit, die er H 1 und H 2 nannte (entsprechend P 1 und P 2 bei Grundfest und Gasser 1938). Während der Stimulation unter ischämischen Bedingungen fand er eine Reduktion der Ausprägung von H 2 und postulierte für H 2 deshalb einen aktiven, sauerstoffabhängigen Mechanismus, wohingegen Ischämie keinen Einfluss auf H 1 hatte, weshalb er für H 1 einen passiven Mechanismus annahm. In verschiedenen Arbeiten wurden mögliche Mechanismen für H 1 und H 2 untersucht. Als gesicherter Mechanismus für H 2 gilt eine gesteigerte Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase aufgrund der intrazellulären Na^+ -Akkumulation durch das Aktionspotential, repetitive Stimulation führt über stetige Zunahme von $[\text{Na}^+]_i$ zu einer länger dauernden Aktivität der Na^+/K^+ -ATPase und damit zu einer mit steigender Stimuluszahl stetigen Vergrößerung von H 2 (Stöhr 1981; Bostock und Grafe 1985; Shin und Raymond 1991; Morita et al. 1993). Ritchie und Straub (1957) und Rang und Ritchie (1968) konnten ebenfalls eine Rolle der Na^+/K^+ -ATPase bei der Membranhyperpolarisation zeigen (vergleiche weiter oben), ordneten diese aber zeitlich nicht näher ein. Die Ursache von H 1 scheint ein langsamer K^+ -Strom durch Ca^{2+} -sensitive K^+ -Kanäle zu sein (siehe oben), der durch die intrazelluläre Ca^{2+} -Akkumulation während des Aktionspotentials ebenso wie durch Membrandepolarisation aktiviert wird (Shin und Raymond 1991; Vergara et al. 1998; Kiernan und Bostock 2000). Baker et al. (1987) konnten zwei K^+ -Kanäle mit unterschiedlichen Kinetiken in Spinalganglienneuronen von Ratten nachweisen, einer wurde durch TEA und Ba^+ , der andere durch 4-AP blockiert. Ihre Blockade führte stets zu einer verminderten Membranhyperpolarisation, diese lag zeitlich im Bereich von H 1. Die zugrunde liegenden Kanäle wurden als SK 1- und IK 1-Kanäle charakterisiert (Vergara et al. 1998). Zusätzlich konnten Baker et al. (1987) einen Cs^+ -sensitiven Einwärtsstrom messen, der die Membranhyperpolarisation limitierte (I_h). Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Unterschiede der Fasererholung dürften ihren Grund in der unterschiedlichen Ausprägung der eben beschriebenen Mechanismen haben. Carley und Raymond (1987) beobachteten große

Unterschiede in H 1 und H 2 zwischen verschiedenen myelinisierten Fasern, die Ausprägung von H 1 und H 2 war aber für einzelne Fasern entlang ihrer gesamten Membran gleich. Bei Experimenten an C-Fasern von Ratten fanden Shin und Raymond (1991) ebenfalls zwei Perioden verminderter Erregbarkeit in Folge eines Aktionspotentials. H 1 fanden sie allerdings nur in 5 von 11 Fasern, bis zu einer Stimuluszahl von 20-30 kam es zu einer Zunahme der elektrischen und mechanischen Reizschwelle. Die spätere Periode (H 2) fanden sie in 7 von 8 Fasern, während dieser Periode kam es zu einer stetigen Zunahme der elektrischen und mechanischen Reizschwellen und im Gegensatz zu H 1 wurde kein Plateau erreicht. Die Normalisierung der Reizschwellen erfolgte für H 1 schneller als für H 2, die Interfaservariabilität war für H 2 ausgeprägter als für H 1, hier bestand zwischen minimaler und maximaler Ausprägung ein 35-facher Unterschied. Hieraus wird ersichtlich, dass in der Tat sehr ausgeprägte Unterschiede zwischen den einzelnen Faserklassen in Bezug auf Vorhandensein und Ausprägung von H 1 und H 2 bestehen. Als Zeitdauern von H 1 und H 2 werden von den verschiedenen Autoren unterschiedliche Werte angegeben. Am ehesten vergleichbar zu den hier vorgenommenen Messungen im N. saphenus von Mäusen erscheinen die Experimente von Carley und Raymond (1987) und von Shin und Raymond (1991), vorgenommen an Fasern aus dem N. ischiadicus von Ratten, die für H 1 eine Dauer von ca. 10 s bzw. 0,24 s und für H 2 eine Zeitdauer zwischen 1 und 6 min fanden, es fällt aber auch hier die große Variabilität auf. Morita et al. (1993) unterschieden in ihrer Arbeit zwar nicht zwischen H 1 und H 2, sie konnten jedoch nach kurzen Stimulationsdauern die Rückkehr der Erregungsschwelle zum Ausgangsniveau durch eine einfach exponentielle Funktion mit einer Zeitkonstante zwischen 10 und 13 s annähern (entsprechend H 1), nach längerer Stimulation trat eine zusätzliche langsame Komponente hinzu, durch die eine komplette Normalisierung der Erregungsschwelle erst nach mehr als 100 s eintrat (entsprechend H 2).

Die in dieser Arbeit gefundenen Unterschiede zwischen hitzesensiblen und hitzeunsensiblen Fasern nach kurzer Stimulation (10 Interstimuli) und nach längerer Stimulation (bis zu einer Minute) in der Anfangsphase der Erholung, also unter Bedingungen, in denen H 1 eine große Rolle spielt, sprechen für eine größere Amplitude von H 1 bei den hitzesensiblen Fasern. Dass H 1 nicht in allen Fasern

gleichermaßen auftritt zeigen die Ergebnisse von Shin und Raymond (1991), die H 1 nur in etwa der Hälfte der Fasern nachweisen konnten. Zusätzlich fanden Boettger et al. (2002) die wahrscheinlich zu Grunde liegenden SK 1-Kanäle nur in 42% und IK 1-Kanäle nur in 71% der kleinen Spinalganglienneurone. Leider erfolgte weder bei Shin und Raymond (1991) noch bei Boettger et al. (2002) eine genauere Charakterisierung der rezeptiven Eigenschaften der Fasern bzw. Neurone. Im Zusammenhang mit den hier gemachten Beobachtungen ergeben sich aber starke Hinweise auf eine größere Dichte von SK 1-Kanälen in hitzesensiblen Fasern im Vergleich zu den hitzeunsensiblen Fasern. Die schneller deaktivierenden IK 1-Kanäle dagegen könnten in hitzeunsensiblen Fasern eine Rolle spielen (möglich ist aber auch die Expression anderer K^+ -Kanäle (Reid et al. 1999)). Bei stärkerer Expression von K^+ -Kanälen mit langsamer Deaktivierung wie SK 1 wäre die Hyperpolarisation zu Beginn der Erholungsphase in hitzesensiblen Fasern stärker ausgeprägt, dies würde die großen Unterschiede zwischen hitzesensiblen und hitzeunsensiblen Fasern nach Applikation von 10 Interstimuli und in der Zeit bis zur 50%-igen Erholung nach längeren Stimulationsdauern erklären. Im weiteren Zeitverlauf überwiegt der limitierende Effekt der Na^+/K^+ -ATPase auf die Fasererholung (H 2), deren Aktivität in hitzesensiblen und hitzeunsensiblen Fasern gleichermaßen ausgeprägt zu sein scheint, erkennbar an den gleichen Zeitdauern bis zur 75%-igen Erholung nach längerer Stimulation von beiden Faserpopulationen.

Ein weiterer möglicher Mechanismus für die zu Beginn der Erholungsphase bestehenden Unterschiede zwischen hitzesensiblen und hitzeunsensiblen Fasern könnte ein größerer Na^+ -Einstrom sein. Dies könnte in der Folge zu einer gesteigerten und möglicherweise schnelleren Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase und somit zu einer langsameren Erholung führen. Serra et al. (1999) fanden in der Tat unterschiedlich lange Aktionspotentiale bei Nozizeptoren und Kaltfasern, Gee et al. (1999) wiederum fanden für die Aktionspotentiale von nozizeptiven Fasern längere Zeitdauern als für diejenigen von mechanosensiblen Fasern. Die längere Dauer der Aktionspotentiale bei den Nozizeptoren führten Serra et al. (1999) auf eine stärkere Expression von langsam inaktivierenden TTX-R Na^+ -Kanälen zurück, was mit einer größeren Na^+ -Akkumulation während des Aktionspotentials und in der Folge mit einer gesteigerten Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität verbunden wäre. Diesen Mechanismus machten sie für die stärkere Verlangsamung der Nozizeptoren in Folge von Aktivität verantwortlich. Ein

Hinweis für die Richtigkeit dieser Hypothese ist die hier gemachte Beobachtung, dass es nach 10 Interstimuli in $\text{Na}_{v1.8}$ knock-out Mäusen bei den hitzesensiblen Fasern zu signifikant kleineren Latenzsprüngen als in Wildtyp-Mäusen kam.

Die Funktion von I_h bei der Fasererholung scheint hauptsächlich darin zu bestehen, die Hyperpolarisation durch die Na^+/K^+ -ATPase zu limitieren. ZD 7288 hatte bei den hitzesensiblen Fasern sowohl auf die Zeit bis zur 50%-igen Erholung als auch auf die bis zur 75%-igen Erholung einen Einfluss, bei den hitzeunsensiblen Fasern zeigte sich dagegen erst bei der Zeit bis zur 75%-igen Erholung ein Einfluss, dieser war jedoch viel stärker ausgeprägt als bei den hitzesensiblen Fasern. Diese Beobachtung spricht indirekt für eine früher einsetzende Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität in hitzesensiblen Fasern.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei den hitzesensiblen Fasern die anfangs langsamere Erholung auf einer Expression von SK 1-Kanälen und auf einer frühen Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase aufgrund eines größeren Na^+ -Einstroms während des Aktionspotentials beruhen dürfte. Dagegen scheinen hitzeunempfindliche Fasern eine geringere Dichte von SK 1-Kanälen aufzuweisen (möglich wäre auch die Expression von schneller deaktivierenden IK 1-Kanälen anstelle von SK 1-Kanälen), die auf der gesteigerten Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität beruhende Hyperpolarisation scheint später als bei den hitzesensiblen Fasern zum Tragen zu kommen. Inwieweit diese Behauptungen zutreffen muss zweifelsohne in weiteren Experimenten näher untersucht werden.

Unterschiede zwischen C-Fasern von Wildtyp und $\text{Na}_{v1.8}$ knock-out Mäusen in Folge tetanischer Stimulation

Um die Rolle von $\text{Na}_{v1.8}$ bei aktivitätsinduzierten Latenzänderungen zu untersuchen, wurden C-Fasern in $\text{Na}_{v1.8}$ knock-out Mäusen untersucht. $\text{Na}_{v1.8}$, früher als SNS („sensory neuron specific“) bezeichnet, ist verantwortlich für einen Tetrodotoxin resistenten Na^+ -Strom, der spezifisch für sensible Neurone ist (Elliott und Elliott 1993; Quasthoff et al. 1995; Akopian et al. 1999). Die in den knock-out Mäusen abgeleiteten C-Fasern unterschieden sich weder in der mechanischen Reizschwelle noch in der Nervenleitgeschwindigkeit von Fasern in Wildtyp-Tieren. Auch die Verteilung der C-Fasern auf die einzelnen Faserklassen entsprach der in Wildtyp-Mäusen. Dies entspricht den Beobachtungen von Akopian et al. (1999) und von Michaelis et al. (2000), die bei der Analyse von C-Fasern in $\text{Na}_{v1.8}$ knock-out Mäusen abgesehen von einer reduzierten Sensibilität auf überschwellige mechanische Reize keinen Unterschied zu C-Fasern von

Wildtyp-Mäusen fanden, insbesondere in den Antworten auf Hitzereize zeigte sich kein Unterschied zwischen knock-out- und Wildtyp-Mäusen. Somit wurde hier davon ausgegangen, dass Unterschiede im Verhalten nach repetitiver Stimulation auf das Fehlen von $\text{Na}_{v1.8}$ zurückzuführen sind.

Auch in den knock-out Mäusen zeigten hitzesensible Fasern sowohl nach Applikation von 10 Interstimuli als auch nach längeren Stimulationsintervallen eine signifikant größere Verlangsamung als die hitzeunempfindlichen Fasern. Die Reaktion der hitzeunempfindlichen Fasern auf repetitive Stimulation war vergleichbar mit den in Wildtyp-Mäusen gemachten Beobachtungen, bei den hitzesensiblen $\text{Na}_{v1.8}$ -defizienten Fasern kam es aber zu signifikant geringeren Latenzänderungen als in den entsprechenden Wildtyp-Fasern, und zwar sowohl in Folge kurzer als auch in Folge langer Stimulation. Die Ursache für die geringeren Latenzänderungen der hitzesensiblen Fasern der knock-out-Tiere könnte einerseits die höhere Prävalenz von Leitungsblocks sein. Andererseits kam es aber auch in den Fasern zu geringeren Latenzänderungen, bei denen keine Leitungsblocks auftraten. Als Grund hierfür kommt ein geringerer Na^+ -Einstrom während des Aktionspotentials aufgrund des Fehlens von einem Teil der TTX-R-Kanäle in Betracht, damit verbunden wäre eine geringere Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase und somit eine geringere Hyperpolarisation. Diese wiederum würde zu einer geringeren Faserverlangsamung in Folge von Aktivität führen. Diesen Zusammenhang nehmen auch Serra et al. (1999) an (vergleiche Ausführung weiter oben).

Ein weiteres Phänomen, das bei der Ableitung von C-Fasern in $\text{Na}_{v1.8}$ knock-out Mäusen auffiel war die bereits erwähnte höhere Prävalenz von Leitungsblocks. Bei Stimulation der Fasern mit Frequenzen von 1, 2 und 3 Hz im Wechsel mit 0,33 Hz nahm insbesondere bei den hitzesensiblen Fasern der Anteil der Fasern mit Leitungsblocks genauso wie die Häufigkeit von Leitungsblocks in einer individuellen Faser deutlich zu. $\text{Na}_{v1.8}$ bestimmte also besonders in den hitzesensiblen Fasern die Fähigkeit, Stimulationen mit höherer Frequenz zu folgen, und damit die Erregbarkeit. Diese Beobachtung ist in Einklang mit den Beobachtungen anderer Autoren (Elliott und Elliott 1993; Scholz et al. 1998; Renganathan et al. 2001). Elliott und Elliott (1993) zeigten, dass Neurone, in denen TTX-R Na^+ -Ströme gemessen wurden, Stimulationen mit höherer Frequenz besser folgen konnten als Fasern, in denen lediglich TTX-S (=Tetrodotoxin empfindlich) Na^+ -Ströme nachweisbar waren. In Patch-clamp-

Ableitungen von DRG-Neuronen fanden Renganathan et al. (2001) bei Analyse der Aktionspotentiale von $\text{Na}_{v1.8}$ knock-out Mäusen geringere Amplituden und eine langsamere Depolarisation als in Wildtyp-Mäusen. Dadurch kam es bei höheren Frequenzen seltener zur Auslösung von Aktionspotentialen als in den Fasern von Wildtyp-Mäusen. Zusätzlich fanden sie eine Abnahme der Ströme durch SK-Kanäle. Damit konnten sie eine weitere Ursache für die kleineren Latenzänderungen bei den hitzesensiblen Fasern der knock-out-Tiere zeigen. $\text{Na}_{v1.8}$ -Kanäle scheinen also einerseits eine wichtige Rolle für die Stimulierbarkeit von C-Fasern zu spielen, andererseits tragen sie sowohl über einen erhöhten Na^+ -Einstrom während des Aktionspotentials, und damit verbunden einer gesteigerten Na^+/K^+ -ATPase-Aktivität, als auch über eine stärkere SK-Kanal-Aktivierung zur Hyperpolarisation der Membran in Folge eines Aktionspotentials und damit zur Verlangsamung der Faser bei, limitieren also die maximale Aktionspotentialfrequenz.

5 Ausblick

Zusammen mit den hier untersuchten I_h - und $Na_{v1.8}$ -Kanälen spielen bei den durch Aktivität induzierten Latenzveränderungen wahrscheinlich noch andere Mechanismen eine Rolle, wie Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle und die Na^+/K^+ -ATPase. Das Zusammenspiel aller dieser Faktoren bestimmt das Verhalten der einzelnen Fasertypen während repetitiver Stimulation, und damit direkt die Fähigkeit einer Faser, mit hoher Frequenz zu entladen oder nicht. Fasern, die eine ausgeprägte Verlangsamung während tetanischer Stimulation erfahren, leiten weniger Impulse pro Zeiteinheit ins ZNS und tendieren eher zu Leitungsblocks als Fasern, bei denen es in Folge von Aktivität nur zu geringen Latenzänderungen kommt. Zusätzlich konnte vor kurzem in mikroneurographischen Untersuchungen an Menschen gezeigt werden, dass es in mechanounempfindlichen, in geringerem Ausmaß aber auch in mechanoempfindlichen Fasern, bei genügend kurzen Interstimulusintervallen zu einer Zunahme der Entladungsfrequenz kam (Weidner et al. 2000; 2002). Dies führten die Autoren auf die Stimulation während der „supernormalen“ Periode zurück. Über das Zusammenwirken und die Ausprägung beider Mechanismen kann auf Ebene der Nervenfaser gezielt der Input in das zentrale Nervensystem gesteuert werden.

Eine Störung des Gleichgewichts der Mechanismen, die das Verhalten einer Faser während repetitiver Stimulation determinieren, könnte zu verschiedenen pathologischen Zuständen über eine Veränderung der Erregbarkeit führen. So kommt es beispielsweise bei neuropathischen Schmerzen neben einer Schwellenerniedrigung und damit verbundener Spontanaktivität auch zu einer Zunahme der Entladungsfrequenz von Nozizeptoren. Der erste Mechanismus führt zum Auftreten von reizunabhängigen Spontanschmerzen, der zweite Mechanismus ist Grundlage der bei neuropathischen Schmerzen stets zu beobachtenden Hyperalgesie (Koltzenburg 1998; Woolf und Mannion 1999). In einem Modell einer diabetischen Polyneuropathie konnte eine Übererregbarkeit einzelner C-Fasern nachgewiesen werden, ebenso in regenerierten Nozizeptoren nach Nervenläsionen und in einem Modell einer Vincristin-induzierten Polyneuropathie (Tanner et al. 1998; Andrew und Greenspan 1999; Chen und Levine 2001).

Eine erhöhte I_h -Aktivität, sei es durch stärkere Expression oder durch Verschiebung der Aktivierungskurve in den depolarisierten Bereich, kann zur Übererregbarkeit und zur Spontanaktivität von Nozizeptoren beitragen. Dass eine solche Modulation tatsächlich stattfindet, konnte in den letzten Jahren durch mehrere Arbeiten belegt werden. Taiwo et al. (1989) konnten zeigen, dass eine Erhöhung des cytoplasmatischen cAMP in Folge einer Applikation von PGE_2 bzw. PGI_2 zu einer Schwellenerniedrigung von Nozizeptoren in Ratten führte, damit einhergehend kam es zu einer Hyperalgesie. Es konnte in der Folge gezeigt werden, dass die durch cAMP induzierte Hyperalgesie auf einer verstärkten Aktivierung von I_h beruht (Raes et al. 1997). Zusätzlich konnten Raes et al. einen Einfluss von ATP auf I_h zeigen, der über PKA vermittelt wurde. Verschiedene Gruppen konnten zudem zeigen, dass eine Aktivierung von 5-HT-Rezeptoren ebenfalls über eine Erhöhung des cytoplasmatischen cAMP zu einer größeren Amplitude der I_h -Ströme und zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve in den depolarisierten Bereich führte (Kiehn und Harris-Warrick 1992; Cardenas et al. 1999; Beaumont und Zucker 2000). Cardenas et al. identifizierten den involvierten 5-HT-Rezeptor als 5-HT₇-Rezeptor. Eine gesteigerte Aktivität von I_h kann aber auch zu einer Depolarisation der Nervenzellmembran beitragen (Doan und Kunze 1999), und die Faser somit näher an das Schwellenpotential bringen, bei entsprechender Ausprägung dieses Effekts käme es zu spontanen Entladungen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Opioide den Effekt von PGE_2 und Forsoklin auf I_h verhindern können (Ingram und Williams 1994; 1996). Clonidin entfaltet seine antinozizeptive Wirkung in peripheren Nerven ebenfalls über eine Inhibition von I_h -Kanälen (Dalle et al. 2001). Zwei weitere Substanzen, die zu einer Amplitudenreduktion von I_h führen sind Substanz P und Neurotensin (Cathala und Paupardin-Tritsch 1997; Jafri und Weinreich 1998). Verschiedene Entzündungsmediatoren können demzufolge über eine Erhöhung der cytoplasmatischen cAMP-Konzentration zu einer Aktivierung von I_h und damit zu einer gesteigerten Erregbarkeit von Nervenfasern beitragen, Opiate entfalten einen Teil ihrer antinozizeptiven Wirkung über eine Inhibition der Mechanismen, die I_h aktivieren können.

$Na_{v1.8}$ -Kanäle spielen ebenfalls eine Rolle bei der Sensibilisierung von Nozizeptoren. Die Entzündungsmediatoren PGE_2 , 5-HT und Adenosin senken die Aktivierungsschwelle von TTX-R Na^+ -Strömen, zusätzlich ist deren Amplitude vergrößert. Durch

eine gleichzeitige Beschleunigung der Aktivierung und Inaktivierung kommt es während einer Depolarisation zu höheren Entladungsfrequenzen als unter Kontrollbedingungen. Der μ -Opioid-Rezeptor Agonist DAMGO kann diese Sensitivierung wirkungsvoll verhindern (Gold und Levine 1996; Gold et al. 1996; Gold 1999). Über die Bedeutung von $\text{Na}_{v1.8}$ -Kanälen bei neuropathischen Schmerzen gibt es noch keine einheitliche Meinung. Decosterd et al. fanden in verschiedenen Nervenläsionsmodellen keine vermehrte Expression von $\text{Na}_{v1.8}$ oder $\text{Na}_{v1.9}$ (alte Bezeichnung: NaN) in den Neuronen der unverletzten Fasern. Zusätzlich kam es zu einer deutlichen Reduktion von $\text{Na}_{v1.8}$ und $\text{Na}_{v1.9}$ in den Neuronen der verletzten Fasern aufgrund des niedrigeren NGF-Gehalts. Aus diesen Beobachtungen schließen sie, dass eine Überexpression von $\text{Na}_{v1.8}/\text{Na}_{v1.9}$ kein entscheidender Mechanismus bei der Entstehung von neuropathischen Schmerzen ist (Decosterd et al. 2002). Die Gruppe um Michael Gold konnte dagegen eine Reduktion von neuropathischen Schmerzen durch intrathekale Applikation von antisense Oligodesoxynukleotiden (ODN) gegen $\text{Na}_{v1.8}$ beobachten. Die Wirkung der ODN beruhte auf einer selektiven Bindung an $\text{Na}_{v1.8}$ in Spinalganglienneuronen (Lai et al. 2002). Es bleibt abzuwarten, ob zukünftige Experimente die Rolle von $\text{Na}_{v1.8}$ bei der Entstehung von neuropathischen Schmerzen endgültig klären oder wenigstens etwas Licht ins Dunkle bringen können.

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Mechanismen entfalten Entzündungsmediatoren wie PGD_2 und PGE_2 ihre Wirkung auch über eine Herunterregulierung von Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Kanälen. Dadurch kommt es nach einem Aktionspotential zu einer geringeren Hyperpolarisation, die Fasern können mit höheren Frequenzen entladen. Die Vermittlung dieses Effekts erfolgt ebenfalls über eine gesteigerte cAMP-Konzentration (Weinreich und Wonderlin 1987).

Alle Mechanismen zusammen können zu einer Übererregbarkeit von Nervenfasern führen, zusätzlich wird das Auftreten von Spontanaktivität wahrscheinlicher. Der dadurch gesteigerte Input in das Rückenmark könnte ein entscheidender Faktor bei der Entstehung von neuropathischen Schmerzen sein.

Von großem Interesse vor diesem Hintergrund sind auch die sogenannten „schlafenden Nozizeptoren“. Hierbei handelt es sich um C-Fasern, die unter physiologischen Bedingungen nicht durch mechanische Stimuli erregt werden können. Während

experimenteller Entzündung, die zum Beispiel durch Carrageenan oder Senföl ausgelöst wird, können diese „schlafenden Nozizeptoren“ aber sensibilisiert werden und antworten dann auf mechanische Stimuli mit hohen Entladungsfrequenzen, zusätzlich zeigen sie nach ihrer Sensibilisierung eine hohe Rate von Spontanaktivität. Zur gleichen Sensibilisierung kommt es in entzündlich veränderten Geweben. Es wird angenommen, dass der „Extra“-Input in das ZNS zur Entstehung von Schmerzen beiträgt (McMahon und Koltzenburg 1990). Vor einigen Jahren konnte in mikroneurographischen Experimenten die Existenz von „schlafenden Nozizeptoren“ in Menschen nachgewiesen werden (Schmelz et al. 1994). Während repetitiver Stimulation zeigten diese Fasern die ausgeprägtesten Latenzsprünge von allen Gruppen, selbst die Latenzänderungen der hitzesensiblen Fasern waren geringer (Weidner et al. 1999). Es stellt sich deshalb die interessante Frage, ob die Sensibilisierung der mechanounempfindlichen Fasern mit einer Änderung des Verhaltens während repetitiver Stimulation einhergeht, etwa durch eine gesteigerte Expression von I_h oder $Na_{v1.8}$. Damit verbunden wäre eine gesteigerte Erregbarkeit vormals mechanisch nicht erregbarer Fasern, die in den sensibilisierten „schlafenden Nozizeptoren“ beobachtete Spontanaktivität könnte hierdurch ebenfalls erklärt werden.

Es müssen zweifelsohne weitere Experimente zur Beantwortung der hier aufgeworfenen Fragen durchgeführt werden. Ein umfassendes Verständnis der Mechanismen, die bei der aktivitätsinduzierten Verlangsamung eine Rolle spielen, einschließlich der zugrundeliegenden Mechanismen und der Verteilung dieser auf die einzelnen Fasermodalitäten, wird in Zukunft möglicherweise dazu beitragen, die Ergebnisse von Experimenten an peripheren Nerven mit denjenigen von Experimenten an Spinalganglienneuronen zu verknüpfen. Resultieren würde ein genauerer Einblick in die Funktionsweise des nozizeptiven Systems, verbunden mit der Entwicklung potenterer und selektiverer Analgetika.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde das Verhalten von C-Fasern der Maus während und nach repetitiver elektrischer Stimulation in einem Haut-Nerv-Präparat untersucht. Die dabei gefunden Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

1. Während repetitiver Stimulation kommt es in hitzesensiblen Fasern zu sehr viel ausgeprägteren Latenzänderungen als in hitzeunsensiblen Fasern. Dabei bestand in der Gruppe der hitzeunsensiblen Fasern zusätzlich noch ein Unterschied zwischen nur mechanosensiblen CM-Fasern und mechano- und kältesensiblen CMC-Fasern, bei denen der Einfluss von tetanischer Stimulation auf die Latenzänderung am geringsten ausgeprägt war.
2. Die Wiederannäherung an die Ruhelatenz nach Beendigung der repetitiven Stimulation erfolgte bei den hitzeunsensiblen Fasern bedeutend schneller als bei den hitzesensiblen Fasern. Dieser Unterschied bestand sowohl nach kurzen Stimulationsperioden als auch in der H 1 Phase (Zeit bis zur 50%-igen Erholung) nach längeren Stimulationen, wohingegen in der H 2 Phase (Zeit bis zur 75%-igen Erholung) dieser Unterschied nicht mehr fortbestand. Dies deutet auf eine unterschiedliche Ausprägung der H 1 und H 2 zugrunde liegenden Mechanismen in den beiden Faserpopulationen hin.
3. Sowohl Applikation von Cs^+ als auch die Applikation von ZD 7288, beides Inhibitoren von I_h -Strömen, hatte einen Einfluss auf die Latenzänderung und den Erholungszyklus der Fasern, indem die Latenzänderungen und die hier bestimmten Erholungszeiten zunahmen. Dies weist auf eine Rolle von I_h bei der Limitierung der Hyperpolarisation und der damit verbundenen Latenzzunahme während repetitiver Stimulation mit hohen Frequenzen hin. Hierbei war der erzielbare Effekt in der Gruppe der hitzeunsensiblen Fasern deutlich ausgeprägter als in der Gruppe der hitzesensiblen Fasern. Dies ist in Einklang mit der Annahme, dass hitzeunsensible Fasern aufgrund einer höheren I_h -Dichte

- unter physiologischen Bedingungen geringere Latenzänderungen während repetitiver Stimulation erfahren als hitzesensible Fasern.
4. Die Fähigkeit, während Stimulation mit höheren Frequenzen auf jeden Stimulus mit der Generation eines Aktionspotentials zu reagieren, war besonders bei den hitzesensiblen Fasern in $\text{Na}_{v1.8}$ knock-out Mäusen aufgehoben, $\text{Na}_{v1.8}$ -Kanäle tragen also zur Erregbarkeit der Fasern bei. Zusätzlich war die durch repetitive elektrische Stimulation erzielbare Latenzänderung bei den hitzesensiblen Fasern in den knock-out Tieren signifikant niedriger als bei den Wildtyp-Tieren. Mögliche Ursache hierfür ist ein fehlender Na^+ -Einstrom durch $\text{Na}_{v1.8}$ -Kanäle während des Aktionspotentials, der in Wildtyp-Mäusen über eine gesteigerte Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase zu einer Zunahme der Hyperpolarisation in Folge des Aktionspotentials führt. Auch eine vermehrte Aktivierung von SK-Kanälen während der depolarisierten Phase des Aktionspotentials scheint hierbei eine Rolle zu spielen.
 5. I_h und $\text{Na}_{v1.8}$ -Kanäle, aber auch weitere in dieser Arbeit diskutierte Mechanismen wie die Aktivierung der Na^+/K^+ -ATPase und Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanäle bestimmen das Verhalten von C-Fasern während und nach repetitiver Stimulation, wobei Unterschiede zwischen den einzelnen Faserpopulationen bestehen. Insgesamt sind die hier beschriebenen Mechanismen in der Lage, die Erregbarkeit einer Faser und die maximal mögliche Entladungsfrequenz zu beeinflussen.
 6. Da verschiedene Entzündungsmediatoren eine stärkere I_h - und $\text{Na}_{v1.8}$ -Aktivierung auslösen, resultiert eine höheren Erregbarkeit der Nervenfasern, die im Extremfall über eine Membrandepolarisation zu Spontanaktivität führen könnte. Beide Mechanismen sind somit gute Kandidaten für Mechanismen bei der Entstehung von chronischen Schmerzen, wie sie bei Entzündungen oder Nervenläsionen auftreten können. Möglicherweise sind sie auch an einer Sensibilisierung von „schlafenden Nozizeptoren“ beteiligt. Eine gezielte Beeinflussung der zugrundeliegenden Mechanismen könnte deshalb ein erfolgsversprechender Ansatz in der Therapie von neuropathischen und anderen Schmerzformen sein.

7 Literaturverzeichnis

Adair RK (1999). "A model of the detection of warmth and cold by cutaneous sensors through effects on voltage-gated membrane channels." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 11825-11829.

Akopian AN, Souslova V, England S, Okuse K, Ogata N, Ure J, Smith A, Kerr BJ, McMahon SB, Boyce S, Hill R, Stanfa LC, Dickenson AH, Wood JN (1999). "The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways." Nat. Neurosci. **2**(6): 541-548.

Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Viscomi C, Moroni A, DiFrancesco D (2001). "Integrated allosteric model of voltage gating of HCN channels." J Gen Physiol **117**(6): 519-532.

Andrew D, Greenspan JD (1999). "Modality-specific hyper-responsivity of regenerated cat cutaneous nociceptors." J. Physiol **516**: 897-906.

Attwell D, Wilson M (1980). "Behaviour of the rod network in the tiger salamander retina mediated by membrane properties of individual rods." J Physiol **309**: 287-315.

Baker M, Bostock H, Grafe P, Martius P (1987). "Function and distribution of three types of rectifying channel in rat spinal root myelinated axons." J Physiol **383**: 45-67.

Beaumont V, Zucker RS (2000). "Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic I_h channels." Nat Neurosci **3**(2): 133-141.

Bender RA, Brewster A, Santoro B, Ludwig A, Hofmann F, Biel M, Baram TZ (2001). "Differential and age-dependent expression of hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated cation channel isoforms 1-4 suggests evolving roles in the developing rat hippocampus." Neuroscience **106**(4): 689-698.

Berger T, Larkum ME, Luscher HR (2001). "High I_h channel density in the distal apical dendrite of layer V pyramidal cells increases bidirectional attenuation of EPSPs." J. Neurophysiol. **85**(2): 855-868.

Bergmans J (1968a). "Active and passive mechanisms in the recovery of single human motor axons from activity." Arch Int Physiol Biochim **76**(1): 135-138.

Bergmans J (1968b). "Post-tetanic hyperpolarization in single human motor axons." Arch Int Physiol Biochim **76**(1): 160-161.

Boettger MK, Till S, Chen MX, Anand U, Otto WR, Plumpton C, Trezise DJ, Tate SN, Bountra C, Coward K, Birch R, Anand P (2002). "Calcium-activated potassium channel SK1- and IK1-like immunoreactivity in injured human sensory neurones and its regulation by neurotrophic factors." Brain **125**(Pt 2): 252-263.

Bostock H, Grafe P (1985). "Activity-dependent excitability changes in normal and demyelinated rat spinal root axons." J.Physiol **365**: 239-257.

Burke D, Kiernan MC, Bostock H (2001). "Excitability of human axons." Clin Neurophysiol **112**(9): 1575-1585.

Cain DM, Khasabov SG, Simone DA (2001). "Response properties of mechanoreceptors and nociceptors in mouse glabrous skin: an in vivo study." J.Neurophysiol. **85**(4): 1561-1574.

Cardenas CG, Del Mar LP, Cooper BY, Scroggs RS (1997). "5HT4 receptors couple positively to tetrodotoxin-insensitive sodium channels in a subpopulation of capsaicin-sensitive rat sensory neurons." J Neurosci **17**(19): 7181-7189.

Cardenas CG, Mar LP, Vysokanov AV, Arnold PB, Cardenas LM, Surmeier DJ, Scroggs RS (1999). "Serotonergic modulation of hyperpolarization-activated current in acutely isolated rat dorsal root ganglion neurons." J Physiol **518** (Pt 2): 507-523.

Cardenas LM, Cardenas CG, Scroggs RS (2001). "5HT increases excitability of nociceptor-like rat dorsal root ganglion neurons via cAMP-coupled TTX-resistant Na(+) channels." J Neurophysiol **86**(1): 241-248.

Carley LR, Raymond SA (1987). "Comparison of the after-effects of impulse conduction on threshold at nodes of Ranvier along single frog sciatic axons." J.Physiol **386**: 503-527.

Carlton SM, Coggeshall RE (1998). "Nociceptive integration: does it have a peripheral component?" Pain Forum **7**: 71-78.

Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitze KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000). "Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor." Science **288**(5464): 306-313.

Cathala L, Paupardin-Tritsch D (1997). "Neurotensin inhibition of the hyperpolarization-activated cation current (I_h) in the rat substantia nigra pars compacta implicates the protein kinase C pathway." J.Physiol **503** (Pt 1): 87-97.

Cathala L, Paupardin-Tritsch D (1999). "Effect of catecholamines on the hyperpolarization-activated cationic I_h and the inwardly rectifying potassium I(K_{ir}) currents in the rat substantia nigra pars compacta." Eur.J.Neurosci. **11**(2): 398-406.

Cesare P, Moriondo A, Vellani V, McNaughton PA (1999). "Ion channels gated by heat." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7658-7663.

Chen S, Wang J, Siegelbaum SA (2001). "Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide." J Gen Physiol **117**(5): 491-504.

Chen X, Levine JD (2001). "Hyper-responsivity in a subset of C-fiber nociceptors in a model of painful diabetic neuropathy in the rat." Neuroscience **102**(1): 185-192.

Clapham DE (1998). "Not so funny anymore: pacing channels are cloned." Neuron **21**(1): 5-7.

Dalle C, Schneider M, Clergue F, Bretton C, Jirounek P (2001). "Inhibition of the I(h) current in isolated peripheral nerve: a novel mode of peripheral antinociception?" Muscle Nerve **24**(2): 254-261.

Decosterd I, Ji RR, Abdi S, Tate S, Woolf CJ (2002). "The pattern of expression of the voltage-gated sodium channels Na(v)1.8 and Na(v)1.9 does not change in uninjured primary sensory neurons in experimental neuropathic pain models." Pain **96**(3): 269-277.

DiFrancesco D (1993). "Pacemaker mechanisms in cardiac tissue." Annu Rev Physiol **55**: 455-472.

Djoughri L, Dawbarn D, Robertson A, Newton R, Lawson SN (2001). "Time course and nerve growth factor dependence of inflammation-induced alterations in electrophysiological membrane properties in nociceptive primary afferent neurons." J Neurosci **21**(22): 8722-8733.

Doan TN, Kunze DL (1999). "Contribution of the hyperpolarization-activated current to the resting membrane potential of rat nodose sensory neurons." J Physiol **514** (Pt 1): 125-138.

Elliott AA, Elliott JR (1993). "Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia." J Physiol **463**: 39-56.

Forster C, Handwerker HO (1990). "Automatic classification and analysis of microneurographic spike data using a PC/AT." J Neurosci Methods **31**(2): 109-118.

Gasser H (1935). "Changes in nerve-potentials produced by rapidly repeated stimuli and their relation to the responsiveness of nerve to stimulation." American Journal of Physiology **111**: 35-50.

Gee MD, Lynn B, Basile S, Pierau FK, Cotsell B (1999). "The relationship between axonal spike shape and functional modality in cutaneous C-fibres in the pig and rat." Neuroscience **90**(2): 509-518.

Gee MD, Lynn B, Cotsell B (1996). "Activity-dependent slowing of conduction velocity provides a method for identifying different functional classes of C-fibre in the rat saphenous nerve." Neuroscience **73**(3): 667-675.

Gold MS (1999). "Tetrodotoxin-resistant Na⁺ currents and inflammatory hyperalgesia." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7645-7649.

Gold MS, Levine JD (1996). "DAMGO inhibits prostaglandin E₂-induced potentiation of a TTX-resistant Na⁺ current in rat sensory neurons in vitro." Neurosci Lett **212**(2): 83-86.

Gold MS, Reichling DB, Shuster MJ, Levine JD (1996). "Hyperalgesic agents increase a tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors." Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **93**(3): 1108-1112.

Grafe P, Quasthoff S, Grosskreutz J, Alzheimer C (1997). "Function of the hyperpolarization-activated inward rectification in nonmyelinated peripheral rat and human axons." J Neurophysiol **77**(1): 421-426.

Grundfest H, Gasser H (1938). "Properties of mammalian nerve fibres of slowest conduction." American Journal of Physiology **123**: 307-318.

Halliwel JV, Adams PR (1982). "Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons." Brain Res **250**(1): 71-92.

Harris NC, Constanti A (1995). "Mechanism of block by ZD 7288 of the hyperpolarization-activated inward rectifying current in guinea pig substantia nigra neurons in vitro." J Neurophysiol **74**(6): 2366-2378.

Higashi H, Morita K, North RA (1984). "Calcium-dependent after-potentials in visceral afferent neurones of the rabbit." J.Physiol **355**: 479-492.

Hodgkin A, Huxley A (1952). "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve." J Physiol **117**: 500-544.

Huerta J, Koltzenburg M (2002). HCN channel distribution in mouse DRG sensory neurons (485-P119). 10th World Congress on Pain, San Diego, USA.

Iggo A (1958). "The electrophysiological identification of single nerve fibres, with particular reference to the slowest-conducting vagal afferent fibres in the cat." J Physiol **142**: 110-126.

Ingram SL, Williams JT (1994). "Opioid inhibition of Ih via adenylyl cyclase." Neuron **13**(1): 179-186.

Ingram SL, Williams JT (1996). "Modulation of the hyperpolarization-activated current (Ih) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons." J.Physiol **492 (Pt 1)**: 97-106.

Ishii TM, Takano M, Ohmori H (2001). "Determinants of activation kinetics in mammalian hyperpolarization-activated cation channels." J Physiol **537**(Pt 1): 93-100.

Jafri MS, Weinreich D (1998). "Substance P regulates Ih via a NK-1 receptor in vagal sensory neurons of the ferret." J.Neurophysiol. **79**(2): 769-777.

Janigro D, Martenson ME, Baumann TK (1997). "Preferential inhibition of Ih in rat trigeminal ganglion neurons by an organic blocker." J Membr Biol **160**(2): 101-109.

Jansen JK, Nicholls JG (1973). "Conductance changes, an electrogenic pump and the hyperpolarization of leech neurones following impulses." The Journal of Physiology **229**(3): 635-655.

Juerta J, Payne-Smith M, Koltzenburg M (2002). HCN channel distribution in mouse DRG sensory neurons (485-P119). 10th World Congress on Pain, San Diego, USA.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds.) (2000). Principles of neural science, 4th edn. McGraw-Hill, New York.

Kiehn O, Harris-Warrick RM (1992). "5-HT modulation of hyperpolarization-activated inward current and calcium-dependent outward current in a crustacean motor neuron." J.Neurophysiol. **68**(2): 496-508.

Kiernan MC, Bostock H (2000). "Effects of membrane polarization and ischaemia on the excitability properties of human motor axons." Brain **123 Pt 12**: 2542-2551.

Koltzenburg M (1998). "Painful neuropathies." Curr Opin Neurol **11**(5): 515-521.

Koltzenburg M (1999). "The changing sensitivity in the life of the nociceptor." Pain Suppl 6: S93-102.

Koltzenburg M, Bennett DL, Shelton DL, McMahon SB (1999). "Neutralization of endogenous NGF prevents the sensitization of nociceptors supplying inflamed skin." Eur J Neurosci **11**(5): 1698-1704.

Koltzenburg M, Stucky CL, Lewin GR (1997). "Receptive properties of mouse sensory neurons innervating hairy skin." J.Neurophysiol. **78**(4): 1841-1850.

Kress M, Koltzenburg M, Reeh PW, Handwerker HO (1992). "Responsiveness and functional attributes of electrically localized terminals of cutaneous C-fibers in vivo and in vitro." J.Neurophysiol. **68**(2): 581-595.

Lai J, Gold MS, Kim CS, Bian D, Ossipov MH, Hunter JC, Porreca F (2002). "Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8." Pain **95**(1-2): 143-152.

Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M (1998). "A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels." Nature **393**(6685): 587-591.

Ludwig A, Zong X, Stieber J, Hullin R, Hofmann F, Biel M (1999). "Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics." EMBO J. **18**(9): 2323-2329.

Lüthi A, Bal T, McCormick DA (1998). "Periodicity of thalamic spindle waves is abolished by ZD7288, a blocker of I_h ." J.Neurophysiol. **79**(6): 3284-3289.

Lüthi A, McCormick DA (1998a). "H-current: properties of a neuronal and network pacemaker." Neuron **21**(1): 9-12.

Lüthi A, McCormick DA (1998b). "Periodicity of thalamic synchronized oscillations: the role of Ca^{2+} - mediated upregulation of I_h ." Neuron **20**(3): 553-563.

Lüthi A, McCormick DA (1999). "Modulation of a pacemaker current through Ca^{2+} -induced stimulation of cAMP production." Nat.Neurosci. **2**(7): 634-641.

McCleskey EW, Gold MS (1999). "Ion channels of nociception." Annu Rev Physiol **61**: 835-856.

McCormick DA, Pape HC (1990). "Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones." J.Physiol **431**: 291-318.

McMahon SB, Koltzenburg M (1990). "Novel classes of nociceptors: beyond Sherrington." Trends Neurosci. **13**(6): 199-201.

Mellor J, Nicoll RA, Schmitz D (2002). "Mediation of hippocampal mossy fiber long-term potentiation by presynaptic Ih channels." Science **295**(5552): 143-147.

Michaelis M, Akopian AN, Souslova V, Wood JN, Koltzenburg M (2000). Analysis of primary afferent neurons innervating the hairy skin of mice lacking the TTX-resistant sodium channel SNS (352.3). Society for Neuroscience Annual Meeting, New Orleans, USA.

Monteggia LM, Eisch AJ, Tang MD, Kaczmarek LK, Nestler EJ (2000). "Cloning and localization of the hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel family in rat brain." Brain Res.Mol.Brain Res. **81**(1-2): 129-139.

Moosmang S, Stieber J, Zong X, Biel M, Hofmann F, Ludwig A (2001). "Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues." Eur.J.Biochem. **268**(6): 1646-1652.

Morita K, David G, Barrett JN, Barrett EF (1993). "Posttetanic hyperpolarization produced by electrogenic Na(+)-K+ pump in lizard axons impaled near their motor terminals." J.Neurophysiol. **70**(5): 1874-1884.

Moroni A, Gorza L, Beltrame M, Gravante B, Vaccari T, Bianchi ME, Altomare C, Longhi R, Heurteaux C, Vitadello M, Malgaroli A, DiFrancesco D (2001). "Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current I(f)." J Biol Chem **276**(31): 29233-29241.

Okuse K, Chaplan SR, McMahon SB, Luo ZD, Calcutt NA, Scott BP, Akopian AN, Wood JN (1997). "Regulation of Expression of the Sensory Neuron-Specific Sodium Channel SNS in Inflammatory and Neuropathic Pain." Mol Cell Neurosci **10**(3/4): 196-207.

Olson TH, Riedl MS, Vulchanova L, Ortiz-Gonzalez XR, Elde R (1998). "An acid sensing ion channel (ASIC) localizes to small primary afferent neurons in rats." Neuroreport **9**(6): 1109-1113.

Pape HC (1996). "Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons." Annu.Rev.Physiol **58**: 299-327.

Quasthoff S, Grosskreutz J, Schroder JM, Schneider U, Grafe P (1995). "Calcium potentials and tetrodotoxin-resistant sodium potentials in unmyelinated C fibres of biopsied human sural nerve." Neuroscience **69**(3): 955-965.

Raes A, Van de Vijver G, Goethals M, van Bogaert PP (1998). "Use-dependent block of Ih in mouse dorsal root ganglion neurons by sinus node inhibitors." Br J Pharmacol **125**(4): 741-750.

Raes A, Wang Z, van den Berg RJ, Goethals M, Van de Vijver G, van Bogaert PP (1997). "Effect of cAMP and ATP on the hyperpolarization-activated current in mouse dorsal root ganglion neurons." Pflugers Arch **434**(5): 543-550.

Rang HP, Ritchie JM (1968). "On the electrogenic sodium pump in mammalian non-myelinated nerve fibres and its activation by various external cations." The Journal of Physiology **196**(1): 183-221.

Raymond SA, Thalhammer JG, Popitz-Bergez F, Strichartz GR (1990). "Changes in axonal impulse conduction correlate with sensory modality in primary afferent fibers in the rat." Brain Res. **526**(2): 318-321.

Reeh PW (1986). "Sensory receptors in mammalian skin in an in vitro preparation." Neurosci Lett **66**(2): 141-146.

Reid G, Scholz A, Bostock H, Vogel W (1999). "Human axons contain at least five types of voltage-dependent potassium channel." J Physiol **518 (Pt 3)**: 681-696.

Renganathan M, Cummins TR, Waxman SG (2001). "Contribution of Na(v)1.8 sodium channels to action potential electrogenesis in DRG neurons." J Neurophysiol **86**(2): 629-640.

Ritchie JM (1973). "Energetic aspects of nerve conduction: the relationships between heat production, electrical activity and metabolism." Prog Biophys Mol Biol **26**: 147-187.

Ritchie JM, Straub RW (1957). "The hyperpolarization which follows activity in mammalian non-medulated fibres." J Physiol **136**: 80-97.

Santoro B, Chen S, Luthi A, Pavlidis P, Shumyatsky GP, Tibbs GR, Siegelbaum SA (2000). "Molecular and functional heterogeneity of hyperpolarization-activated pacemaker channels in the mouse CNS." J.Neurosci. **20**(14): 5264-5275.

Santoro B, Tibbs GR (1999). "The HCN gene family: molecular basis of the hyperpolarization-activated pacemaker channels." Ann.N.Y.Acad.Sci. **868**: 741-764.

Schmelz M, Forster C, Schmidt R, Ringkamp M, Handwerker HO, Torebjork HE (1995). "Delayed responses to electrical stimuli reflect C-fiber responsiveness in human microneurography." Exp.Brain Res. **104**(2): 331-336.

Schmelz M, Schmidt R, Ringkamp M, Handwerker HO, Torebjork HE (1994). "Sensitization of insensitive branches of C nociceptors in human skin." J Physiol **480** (Pt 2): 389-394.

Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, Handwerker H (1995). "Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin." J Neurosci **15**(1 Pt 1): 333-341.

Schmidt R, Thews G, Lang F (Hrsg.) (2000). Physiologie des Menschen, 28. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York.

Scholz A, Kuboyama N, Hempelmann G, Vogel W (1998). "Complex blockade of TTX-resistant Na⁺ currents by lidocaine and bupivacaine reduce firing frequency in DRG neurons." J Neurophysiol **79**(4): 1746-1754.

Serra J, Campero M, Ochoa J, Bostock H (1999). "Activity-dependent slowing of conduction differentiates functional subtypes of C fibres innervating human skin." J Physiol **515** (Pt 3): 799-811.

Shin HC, Raymond SA (1991). "Excitability changes in C fibers of rat sciatic nerve following impulse activity." Neurosci.Lett. **129**(2): 242-246.

Shin KS, Rothberg BS, Yellen G (2001). "Blocker state dependence and trapping in hyperpolarization-activated cation channels: evidence for an intracellular activation gate." J.Gen.Physiol **117**(2): 91-101.

Shu XQ, Mendell LM (1999). "Neurotrophins and hyperalgesia." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7693-7696.

Stöhr M (1981). "Activity-dependent variations in threshold and conduction velocity of human sensory fibers." J.Neurol.Sci. **49**(1): 47-54.

Stucky CL, DeChiara T, Lindsay RM, Yancopoulos GD, Koltzenburg M (1998). "Neurotrophin 4 is required for the survival of a subclass of hair follicle receptors." J Neurosci **18**(17): 7040-7046.

Stucky CL, Koltzenburg M, Schneider M, Engle MG, Albers KM, Davis BM (1999). "Overexpression of nerve growth factor in skin selectively affects the survival and functional properties of nociceptors." J Neurosci **19**(19): 8509-8516.

Stucky CL, Lewin GR (1999). "Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct." J.Neurosci. **19**(15): 6497-6505.

Svoboda KR, Lupica CR (1998). "Opioid inhibition of hippocampal interneurons via modulation of potassium and hyperpolarization-activated cation (I_h) currents." J Neurosci **18**(18): 7084-7098.

Taiwo YO, Bjerknes LK, Goetzl EJ, Levine JD (1989). "Mediation of primary afferent peripheral hyperalgesia by the cAMP second messenger system." Neuroscience **32**(3): 577-580.

Takigawa T, Alzheimer C, Quasthoff S, Grafe P (1998). "A special blocker reveals the presence and function of the hyperpolarization-activated cation current I_h in peripheral mammalian nerve fibres." Neuroscience **82**(3): 631-634.

Tanner KD, Reichling DB, Levine JD (1998). "Nociceptor hyper-responsiveness during vincristine-induced painful peripheral neuropathy in the rat." J Neurosci **18**(16): 6480-6491.

Thalhammer JG, Raymond SA, Popitz-Bergez FA, Strichartz GR (1994). "Modality-dependent modulation of conduction by impulse activity in functionally characterized single cutaneous afferents in the rat." Somatosens.Mot.Res. **11**(3): 243-257.

Ulens C, Tytgat J (2001). "Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels." J Biol Chem **276**(9): 6069-6072.

Vaca L, Stieber J, Zong X, Ludwig A, Hofmann F, Biel M (2000). "Mutations in the S4 domain of a pacemaker channel alter its voltage dependence." FEBS Lett **479**(1-2): 35-40.

Van Essen DC (1973). "The contribution of membrane hyperpolarization to adaptation and conduction block in sensory neurones of the leech." The Journal of Physiology **230**(3): 509-534.

Vergara C, Latorre R, Marrion NV, Adelman JP (1998). "Calcium-activated potassium channels." Curr Opin Neurobiol **8**(3): 321-329.

Viscomi C, Altomare C, Bucchi A, Camatini E, Baruscotti M, Moroni A, DiFrancesco D (2001). "C terminus-mediated control of voltage and cAMP gating of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels." J Biol Chem **276**(32): 29930-29934.

Wainger BJ, DeGennaro M, Santoro B, Siegelbaum SA, Tibbs GR (2001). "Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels." Nature **411**(6839): 805-810.

Waxman SG, Cummins TR, Dib-Hajj S, Fjell J, Black JA (1999). "Sodium channels, excitability of primary sensory neurons, and the molecular basis of pain." Muscle Nerve **22**(9): 1177-1187.

Waxman SG, Cummins TR, Dib-Hajj SD, Black JA (2000). "Voltage-gated sodium channels and the molecular pathogenesis of pain: a review." J Rehabil Res Dev **37**(5): 517-528.

Weidner C, Schmelz M, Schmidt R, Hammarberg B, Orstavik K, Hilliges M, Torebjork HE, Handwerker HO (2002). "Neural signal processing: the underestimated contribution of peripheral human C-fibers." J Neurosci **22**(15): 6704-6712.

Weidner C, Schmelz M, Schmidt R, Hansson B, Handwerker HO, Torebjork HE (1999). "Functional attributes discriminating mechano-insensitive and mechano-responsive C nociceptors in human skin." J. Neurosci. **19**(22): 10184-10190.

Weidner C, Schmidt R, Schmelz M, Hilliges M, Handwerker HO, Torebjork HE (2000). "Time course of post-excitatory effects separates afferent human C fibre classes." J. Physiol **527 Pt 1**: 185-191.

Weinreich D, Wonderlin WF (1987). "Inhibition of calcium-dependent spike after-hyperpolarization increases excitability of rabbit visceral sensory neurones." J. Physiol **394**: 415-427.

Wollmuth LP (1995). "Multiple ion binding sites in Ih channels of rod photoreceptors from tiger salamanders." Pflugers Arch **430**(1): 34-43.

Woolf CJ, Mannion RJ (1999). "Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management." Lancet **353**(9168): 1959-1964.

Danksagung

Besonderer Dank gilt den folgenden Personen, die alle mehr oder weniger unter dieser Arbeit zu „leiden“ hatten:

- Prof. Martin Koltzenburg für die perfekte Betreuung meiner Arbeit, die Freiheit, die er mir bei der Fragestellung ließ und die zahlreichen Ratschläge und Diskussionen, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Und dann natürlich für die fantastische Zeit in London!
- Prof. K. Reiners für die Bereitschaft, sich als Koreferent eingehend mit dieser Arbeit zu befassen und die damit verbundene Opferung seiner ohnehin knapp bemessenen Freizeit!
- Penny Lynn für die Einführung in das Haut-Nerv-Präparat!
- allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Koltzenburg für die nette Unterstützung!
- Juan Huerta, Simon Beggs und Dan Beacham für interessante Diskussionen und schöne Abende im „Office“!
- Veronica Souslova und John Wood für die Überlassung der Na_{v1.8} knock-outs!
- meiner Familie, meiner Freundin Alex und allen meinen Freunden für ihre Geduld!
- und allen, die ich vergessen habe!

Lebenslauf

Florian Pracher

- Persönliche Angaben
- geboren am: 10.11.1975
 - Geburtsort: Würzburg
 - Familienstand: ledig

Ausbildung	1982-1986	Grund- und Teilhauptschule Würzburg-Lengfeld
	1986-1995	Deutschhausgymnasium Würzburg
	1995-1996	Zivildienst im OP der Theresienklinik in Würzburg
	1996-2003	Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg
	4/01-8/01	Institute of Child Health des University College London
	Herbst 1998	Ärztliche Vorprüfung
	Herbst 1999	1. Staatsexamen
	Frühjahr 2002	2. Staatsexamen
	Frühjahr 2003	3. Staatsexamen
	seit 2.5.2003	AIP an der Neurologischen Klinik Würzburg

Würzburg, 22.1.2004