

Caroline Marthe Scheifer  
Dr.med.

## **Anormale Entladungen spinaler Hinterhornneurone als mögliche Ursache chronischer Schmerzen bei Querschnittpatienten, Vergleich NADPH-Diaphorase, GFAP, Substanz P und c-Fos zwischen Querschnitttieren und unbehandelten Tieren**

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie  
Doktorvater: Prof. Dr. med. S. Mense

Viele Patienten mit einer kompletten Querschnittslähmung entwickeln ein chronisches Schmerzsyndrom, wobei die Schmerzen in den Segmenten der Rückenmarksläsion und/oder im anästhetischen Körperbereich caudal der Verletzung empfunden werden. Da diese Schmerzen auf herkömmliche Analgetika und auch auf Morphin kaum ansprechen, ist die Therapie und Rehabilitation dieser Patienten ein Problem. Als Ort der Entstehung der Schmerzen in den Segmenten nahe der Läsion werden nozizeptive Hinterhornneurone cranial der Durchtrennung vermutet. Ziel der vorliegenden Studie war es, durch Registrierung der neuronalen Aktivität im Tiermodell solche Neuronenpopulationen zu identifizieren, die als Folge der Läsion pathologische Veränderungen in der Impulsaktivität zeigen.

In narkotisierten Ratten wurde die Impulsaktivität einzelner Hinterhornneurone direkt rostral einer Rückenmarksläsion registriert. Bei den Tieren war unter Narkose 3 bis 6 Wochen vor den Ableitungen ein vollständiger Querschnitt des thorakalen (Th9-11) bzw. lumbalen Rückenmarks (L4-6) gesetzt worden. Die Läsion erfolgte durch Kontusion mit der weight-drop-Methode und anschließender vollständiger Durchtrennung des Rückenmarks. Als Kontrollpopulationen dienten scheinoperierte Tiere ohne Querschnittläsion sowie unbehandelte Tiere.

Bei den Querschnitttieren stieg in dem Rückenmarksegment, das cranial an die Läsion angrenzte, die mittlere Ruhe-Entladungsfrequenz aller Hinterhornneurone signifikant an (Querschnitt: 89,67 Impulse/min  $\pm$  36,9 Standardfehler, n = 68; Scheinoperation: 1,87 Impulse/min  $\pm$  0,9 Standardfehler, n = 53; unbehandelt: 2,9 Impulse/min  $\pm$  2,2 Standardfehler, n = 59; p < 0,05). Nahezu alle Neurone mit gesteigerter Aktivität hatten kein rezeptives Feld. Das Impulsmuster der Ruheaktivität wies kurzdauernde hochfrequente Entladungen in unregelmäßigen Intervallen auf wie sie bei Kontrolltieren nie auftraten. Alle Veränderungen waren unabhängig vom Ort der Läsion (lumbal oder thorakal).

Die Ergebnisse stützen die Annahme, daß die Spontanschmerzen von Patienten mit Querschnittläsion auf eine pathologische Aktivität von Hinterhornneuronen cranial der Läsion zurückgehen. Da die Neurone mit der anormalen Aktivität meist keine rezeptiven Felder besaßen, käme als Mechanismus für die pathologisch erhöhte Aktivität eine Enthemmung durch Deafferentierung in Frage. Im histologischen Teil der Arbeit wurden histochemische und immunhistochemische Auswertungen an Rückenmarksquerschnitten durchgeführt. Die Schnittdicke betrug 25  $\mu$ m, die Auswertungen wurden jeweils im linken Hinterhorn in unmittelbar angrenzenden Segmenten eines Querschnitts durchgeführt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Tiere.

Es erfolgte

1. Der histochemische Nachweis von NOS durch NADPH-Diaphorase. Die markierte Fläche, die NADPH-Diaphorase enthält, war bei den Querschnitttieren signifikant kleiner als diejenige der Kontrolltiere (Querschnitt: n = 20 Schnitte, Fläche/Schnitt = 30944,4  $\mu$ m<sup>2</sup>  $\pm$  7124,23  $\mu$ m<sup>2</sup>  $\pm$  Standardfehler; Kontrolle: n = 25 Schnitte, Fläche/Schnitt = 72895  $\mu$ m<sup>2</sup>  $\pm$  8149,76  $\mu$ m<sup>2</sup>  $\pm$  Standardfehler; p < 0,002). Aus der Literatur geht hervor, dass NO die

Hintergrundaktivität von Hinterhornneuronen beeinflusst. Dies korreliert mit den Resultaten der elektrophysiologischen Untersuchungen und kann somit ursächlich für die pathologischen Entladungsmuster der Hinterhornneurone der Querschnitttiere sein.

2. Der immunhistochemische Nachweis von GFAP als spezifischer Marker für Astrozyten. Die GFAP-immunreaktiven Flächen pro Rückenmarksquerschnitt waren bei den Querschnitttieren signifikant kleiner als bei den Kontrolltieren (Querschnitt:  $n = 15$  Schnitte, Fläche/Schnitt =  $13275,5 \mu^2 \pm 616,86 \mu^2 \pm \text{Standardfehler}$ ; Kontrolle:  $n = 15$  Schnitte, Fläche/Schnitt =  $54110,7 \mu^2 \pm 7157,24 \mu^2 \pm \text{Standardfehler}$ ;  $p < 0,002$ ). Eine mögliche Erklärung für die Verminderung der GFAP immunreaktiven Fläche kann sein, dass bei einem chronischen Querschnitt Narbenbildung im Rückenmark stattgefunden hat und die initiale Aktivierung der Astrozyten wieder auf basale Aktivität zurückgegangen ist. Die Astrozyten könnten ihre Morphologie verändert haben indem sie plumper geworden sind und ihre Fortsätze eingezogen haben.

3. Der immunhistochemische Nachweis von Substanz P. Die Substanz P-immunreaktiven Flächen pro Rückenmarksquerschnitt waren bei den Querschnitttieren signifikant kleiner als bei den Kontrolltieren (Querschnitt:  $n = 25$  Schnitte, Fläche/Schnitt =  $38078,77 \mu^2 \pm 5065,77 \mu^2 \pm \text{Standardfehler}$ ; Kontrolle:  $n = 26$  Schnitte, Fläche/Schnitt =  $73079,3 \mu^2 \pm 10349 \mu^2 \pm \text{Standardfehler}$ ;  $p < 0,05$ ). Die kleinere Fläche von SP kann durch eine vermehrte Ausschüttung von SP aus den primär afferenten nozizeptiven Neuronen bedingt sein was für eine verstärkte neuronale Erregbarkeit und eine zentrale Sensibilisierung spricht. Eine andere Möglichkeit ist, dass der Transport von SP innerhalb der Axone dadurch unterbrochen wurde, dass die Nervenwurzeln beim Kontusionstrauma verletzt oder ausgerissen wurden. Es kann sich jedoch auch um eine Umverteilung der SP produzierenden Zellen handeln und die Synthese von SP in den Neuronen die bei dieser hier vorliegenden Arbeit untersucht worden sind vermindert ist.

4. Der immunhistochemische Nachweis von c-Fos. Hier wurden immunreaktive c-Fos Zellkerne ausgezählt. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen der c-Fos immunreaktiven Zellkernzahl der Querschnitttiere und der Kontrolltiere (Querschnitt:  $n = 22$  Schnitte, Partikelzahl =  $32,91 \pm 3,24 \pm \text{Standardfehler}$ ; Kontrolle:  $n = 23$  Schnitte, Partikelzahl =  $37,48 \pm 4,74 \pm \text{Standardfehler}$ ). Dies lässt sich möglicherweise dadurch erklären, daß die c-Fos Expression ein Maximum 2-4 Stunden nach einem nozizeptiven Reiz erreicht und danach wieder herunterreguliert wird. Die vorliegende Arbeit zeigt eine Bestandsaufnahme 6 Wochen nach Querschnittsetzung, ein Zeitpunkt an dem keine Veränderungen der nozizeptiven Neurone mehr stattfinden, die Veränderungen sind bereits manifest.