

Aus dem Institut für experimentelle Schmerzforschung
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktor: Prof. Dr. med. Martin Schmelz)

**Nozizeptorklassen-spezifische axonale Sensibilisierung durch
Nervenwachstumsfaktor NGF beim Menschen**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Mark Michael Schnakenberg

Aus
Natal
2022

Dekan: Herr Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent(in): Herr Prof. Dr. med. Martin Schmelz

Für Roseane und Claus Schnakenberg
-
In Erinnerung an Karl Adolf Schnakenberg

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	2
1.1 Neuronale Strukturen	3
1.2 Wachstumsfaktor NGF	4
1.3 Pathologie und Therapieansätze	4
1.4 NGF als experimentelles Schmerzmodell am Menschen	7
1.4.1 Thermische Sensitivierung nach NGF-Injektion.....	7
1.4.2 Mechanische Sensitivierung nach NGF-Injektion	7
1.4.3 Neuronale Sensitivierung nach NGF-Injektion.....	8
1.5 Elektrische Aktivierung von C-Nozizeptoren.....	9
1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit	10
2 MATERIAL UND METHODEN.....	11
2.1 Studiendesign.....	11
2.2 Versuchsablauf.....	12
2.3 Vorbereitung.....	14
2.4 Versuchsprotokoll	14
2.5 Quantitative sensorische Testung	15
2.5.1 Elektrische Stimulierung	15
2.5.2 Laser-Doppler-Imaging	17
2.5.3 Mechanische Stimulierung.....	20
2.5.4 Thermische Stimulierung.....	20
2.6 Selektive Nervenblockade	21
2.6.1 Versuchsvorbereitung.....	21
2.6.2 Kontrollierte Ischämie	22
2.6.3 Stimulationsprotokolle unter der selektiven Nervenblockade	23
2.7 Statistik.....	24

3	ERGEBNISSE.....	25
3.1	Langsam depolarisierende elektrische Stimulation der sensibilisierten Haut .	25
3.1.1	Durch Sinuswellen verursachte Schmerzen und Axonreflex-Erythem...	25
3.1.2	Halbsinuswellen induzierte Schmerzen	26
3.1.3	Schmerzen während der kontinuierlichen Sinuswellenstimulation.....	27
3.2	Hochfrequente elektrische Stimulation der NGF-sensibilisierten Haut	29
3.3	Dynamisch-mechanischer Schmerz	30
3.4	CO ₂ -Laser-Hitzeschmerz bei NGF-sensibilisierter Haut	30
3.5	Evozierte Schmerzen während der A-Faser-Leitungsblockade	31
3.5.1	Funktionelle Überprüfung einer A-Faser Blockade	31
3.5.2	Schmerzen bei elektrischer Stimulation mit Sinus- und Halbsinuswellen	32
3.5.3	Dynamisch-mechanisch induzierte Schmerzen	33
4	DISKUSSION	35
4.1	Langsam depolarisierende elektrische Stimulation der sensibilisierten Haut .	36
4.1.1	Durch Sinuswellen verursachte Schmerzen und Axonreflex-Erythem...	36
4.1.2	Halbsinuswellen induzierte Schmerzen	36
4.2	Erleichterung der Erzeugung von Aktionspotenzialen in C-Nozizeptoren durch NGF.....	37
4.2.1	Schmerzen während der Sinuswellenstimulation	37
4.2.2	Hochfrequente elektrische Stimulation der NGF-sensibilisierten Haut ..	40
4.2.3	Dynamisch-mechanischer Schmerz	42
4.3	Sensibilisierte Signaltransduktion.....	43
4.3.1	CO ₂ -Laser-Hitzeschmerz bei NGF.sensibilisierter Haut	43
4.4	Evozierte Schmerzen während der A-Faser-Leitungsblockade.....	44
4.4.1	A Faser Leitungsblock	44
4.4.2	Schmerzen bei elektrischer Stimulation mit Sinus- und Halbsinuswelle	46
4.4.3	Dynamisch-mechanische Aufprallstimulation	47
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	49
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	51

7 VORVERÖFFENTLICHUNGEN	57
8 LEBENSLAUF	58
9 DANKSAGUNG	59

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ANKTM1	Transient receptor potential cation channel, sub A, member 1
ANOVA	Varianzanalyse („Analysis of variance“)
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
EGF	Epidermal growth factor
ERK1	Extracellular Signal-regulated Kinase 1
ERK2	Extracellular Signal-regulated Kinase 2
FDA	Food and drug Administration
IVRA	Intravenöse Regionalanästhesie
KGF	Keratinocyte growth factor
LDI	Laser-Doppler Imaging
LTM	Low-threshold mechano-sensitive
LTMC	Low-threshold mechano-sensitive C-Fiber
NaCl	Natriumchlorid
NaV1.x	Spezifische Natriumkanal Untereinheit
NGF	Nerve growth factor
NRS	Numerische Ratingskala
NSAR	Nicht steroidale Antirheumatika
P2X3	P2X purinoceptor 3
PIEZO1	Mechanosensitives Ionenkanalprotein 1
PIEZO2	Mechanosensitives Ionenkanalprotein 2
PNS	Peripheres Nervensystem
QST	Quantitative sensorische Testung
SEM	Standard error of the mean
TRPA1	Transient receptor potential Ankyrin subtype 1
TRPM8	Transient receptor potential Melastanin subtype 8
TRPV1	Transient receptor potential Vanilloid subtype 1
TTX	Tetrodotoxin
TTX-R	Tetrodotoxin resistant
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 EINLEITUNG

Die Nervenzellen aller Wirbeltiere weisen trotz unterschiedlicher komplexer Organisation ihrer Nervensysteme erstaunliche Gemeinsamkeiten auf. Dabei liegen die fundamentalen Unterschiede nicht zwingend in ihren prinzipiellen Bausteinen, den Neuronen und Gliazellen, sondern viel mehr in ihrer neuronalen Vernetzung untereinander. Einige fundamentale Übereinstimmungen lieferten Ergebnisse von *in-vivo* Studien zur Identifizierung von sympathischen Bahnen bei Menschen und Tieren. Die neurophysiologischen Entladungsmuster und die Aktivität postganglionärer Neurone wurden mittels elektrophysiologischer Ableitung einzelner Nervenfasern (Mikroneurographie) bestimmt, und zeigten beinahe identische Aufzeichnungsmuster zwischen der verschiedenen Spezies¹. Mit dem Verfahren der Mikroneurographie wird durch das Einführen einer Nadelelektrode in den peripheren Nerv eine gezielte Nervenfaserableitung ermöglicht und erlaubt genaue Rückschlüsse zur Identifizierung der Nervenfaseraktivität und Einordnung in ihre Funktionsklasse². Die Einteilung von menschlichen afferenten und efferenten Nervenfaserklassen wurde bereits vor beinahe 100 Jahren von Erlanger und Gasser strukturell und funktionell klassifiziert (s. Tab. 1).

Fasergruppe	Durchmesser	Leitungsgeschw.	Funktion
Myelinisiert			
A α	15 μ m	50-90 m/s	<i>efferent</i> : extrafusale Muskulatur <i>afferent</i> : Muskelspindel
A β	8 μ m	30-70 m/s	<i>afferent</i> : Hautsensoren
A γ	5 μ m	15-30 m/s	<i>efferent</i> : Intrafusale Muskulatur
A δ	< 3 μ m	12-30 m/s	Temperatur, „schneller Schmerz“
B	3 μ m	3-15 m/s	Sympathisch präganglionär
Nicht myelinisiert			
C	1 μ m	0,5-2 m/s	<i>efferent</i> : Sympathisch postganglionär <i>afferent</i> : Nozizeption, „langsamer Schmerz“

Tabelle 1: Klassifizierung von Nervenfasern nach J. Erlanger und H.S. Gasser

Für diese Pionierleistung in medizinischer Physiologie wurden sie 1944 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet. Eine vereinfachte Darstellung dieser Klassifizierung unterteilt demnach die sensorischen Afferenzen hierarchisch gegliedert in schnell leitende (dick myelinisierte) A-beta Fasern für Berührungsempfindung, langsamer leitenden (wenig myelinisierte) A-delta Fasern (empfindlich u.a. für schmerzhafte Nadelstich-Reize, verantwortlich für schnell einschließenden Schmerz) und sehr langsam leitenden nicht myelinisierten C-Fasern (verantwortlich für einen langanhaltenden verzögerten oder spät einsetzenden Schmerz) ³. Da Schmerzreize potentiell gewebeschädigend sind werden A-delta und C-Fasern auch allgemein „Nozizeptor“ bezeichnet (lateinisch nocere -- „schädigen“). Weiterhin stellt die Komplexität der Vernetzung dieser neuronalen Strukturen die Medizin und Forschung vor enorme Herausforderungen und bedarf zur Behandlung neurologischer Pathologien ein besseres Verständnis ihrer physiologischen Funktionen und Interaktionen.

1.1 Neuronale Strukturen

Eine Schlüsselfrage der Entwicklungsneurobiologie ist, wie sich bestimmte Neuralzellen bereits im Embryonalstadium weiterentwickeln und dabei zielgerichtet an ihren Bestimmungsort migrieren. Wie infolgedessen das Auswachsen der Axone zu bestimmten Zielorten gesteuert wird, um dort mit den jeweiligen Zielzellen Synapsen auszubilden, wird über molekulare Wegweiser gesteuert. Demnach überwinden Axone in ihrer Ausprägung nicht nur Strecken von wenigen Mikrometern, sondern sind im menschlichen Organismus sogar in der Lage, über einen Meter hinauszuwachsen (Beispielsweise vom menschlichen Rückenmark in den Fuß). Mithilfe von Signalmolekülen wird das Auswachsen der Axone zu ihrem Bestimmungsort gesteuert. An der Spitze des Axons befindet sich der Wachstumskegel (growth cone), welcher eine auf äußere Signale empfindliche Region der Nervenendigung darstellt ⁴. Ausgehend von der Quelle des Signals wird beim Axon das Auswachsen in die jeweilige Richtung durch das Ausschütten von Signalmolekülen über die Zielzellen bewirkt. Nicht-neuronale Zellen, wie z.B. Keratinozyten des peripheren Gewebes oder Astrocyten im zentralen Nervensystem (ZNS), geben dabei Wachstumsfaktoren, wie KGF (Keratinocyte growth factor) an die Neurone ab ⁵ und erzeugen so einen Gradienten. Gleichzeitig wird von den Neuronen das Ausschütten von spezifischen Botenstoffen (z.B. Neuropeptide) angeregt, die für die nicht-neuronalen Zellen wiederum ebenfalls wachstumsfördernd sind. Dieser hochkomplexe Mechanismus der Interaktion und molekularen Signalauslösung unterstützt und fördert das

Auswachsen der Axone und deren Zielzellen. Dabei spielen Zelladhäsionsmoleküle, aber insbesondere auch der Nervenwachstumsfaktor NGF (nerve growth factor) eine zentrale Rolle.

1.2 Wachstumsfaktor NGF

NGF gehört zur Gruppe der Neurotrophine, welche körpereigene Signalstoffe sind, die zielgerichtete Verbindungen zwischen Nervenzellen bewirken. Sie sichern den Fortbestand neuronaler Verbindungen und erhalten diese am Leben. Die Entdeckung des Neurotrophins NGF erfolgte in den 1950ern durch die Medizinerin und Neurobiologin Rita Levi-Montalcini in Zusammenarbeit mit dem Biologen Viktor Hamburger. Während ihrer aktiven Forschung untersuchten sie die zellulären Nachrichtenübertragungswege sowie die molekularen Steuerungsmechanismen des Zell- und Gewebewachstums. Dabei entdeckten sie unter anderem auch den epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF). Als Levi-Montalcini die Isolierung und Charakterisierung des Polypeptids von NGF gelungen war, erhielt sie dafür 1986 den Nobelpreis für Medizin und Physiologie ⁶.

1.3 Pathologie und Therapieansätze

Durch Unfall oder Krankheit entstandener neuronaler Zelluntergang im ZNS und PNS werden im menschlichen Körper nicht ohne weiteres behoben. Das menschliche Gehirn ist jedoch generell in der Lage, neue Verbindungen zwischen überlebenden Neuronen zu formen und damit einige Ausfälle auszugleichen. Demnach konnten, wie beispielsweise bei Patienten nach einem apoplektischen Insult, trotz ausgeprägter Ausfälle und Untergang großer zerebraler Areale im Nachgang erstaunliche Heilungsprozesse beobachtet werden. Dennoch sind die nach zerebralem Insult verbliebenen Schäden oft irreversibel und in ihrer Ausprägung, als auch neurophysiologischer Erscheinung mit erheblichen Beeinträchtigung und Behinderungen über die Lebenszeit verbunden ⁷. Anders als bei einem Apoplex, bei dem durch raschen stoffwechselbedingten Untergang von Nervengewebe große Nervenschäden entstehen, kann die Ursache für die Ausbildung peripherer Nervenschädigungen ein schleichender Prozess sein. Periphere Neuropathien beruhen auf Schädigungen der Neurone des PNS, welche mitunter Spinal- und Kranialnerven, den Nervenwurzeln mit ihren zahlreichen Unterteilungen, als auch das

autonome Nervensystem beinhalten ⁸. Die periphere Neuropathie wird in Mononeuropathie, multifokale Neuropathie und Polyneuropathie gegliedert. Die häufigsten Ursachen zur Entstehung einer peripheren Neuropathie beruht auf äußeren Einwirkungen und Noxen, welche die Nerven langfristig schädigen. Dies kann innerhalb von wenigen Tagen, oder im Verlauf mehrerer Jahre infolge kontinuierlicher Belastung durch neurotoxische Substanzen erfolgen (z.B. durch chemische Noxen, sei es Alkohol-induziert oder auf dem Boden einer Chemotherapie). Häufiger noch wird diese auch durch Stoffwechsellentgleisungen wie bei Diabetes Mellitus induziert, oder auch durch eine virale Infektion wie bei Gürtelrose mit der Ausprägung einer Post-Zoster Neuralgie provoziert. Sehr selten, aber dennoch relevant als Ursache, können Neuropathien durch hereditäre genetische Veränderungen bedingt sein. Auch wenn die Zeit je nach Krankheitsbild variiert, in der es zur peripheren Nervenschädigung und gänzlich zur symptomatischen Erscheinung kommt, manifestiert sich meist im zeitlichen Verlauf das Krankheitsbild einer Neuropathie. Allein die Prävalenz der Polyneuropathie liegt bei 1% und für ältere Populationen über 65 Jahre sogar bei 7% ⁹. Dabei zeigen sich die ersten Störungen sensibler Nerven meist durch Missempfindungen. Diese variieren je nach Erscheinungsbild oftmals und werden von den Betroffenen unterschiedlich wahrgenommen. Die mitunter häufigsten und charakteristischsten Symptome einer Polyneuropathie werden von den Patienten mit Kribbelparästhesien, stechenden oder brennenden Schmerzen, bis hin zu Taubheitsgefühlen von Hypästhesie, oder gänzlicher Anästhesie der betroffenen Areale angegeben ¹⁰. Die Sensibilitätsveränderungen kann sich bei den Betroffenen auch auf alltägliche, für den Gesunden als nicht schmerzhaft empfundene Reize, einer „Allodynie“ beim beispielsweise Kämmen der Haare oder das Tragen von Socken und Schuhen, manifestieren. Oft sind zuerst in den Extremitäten die Zehen und oder die Hände betroffen. Durch die chronischen und stark ausgeprägten Schmerzzustände, welche mit teils erheblichen Einschränkungen im Alltag verbunden sind, entsteht bei den Betroffenen durch Verminderung der Lebensqualität ein enormer Leidensdruck. Bei völliger Anästhesie der betroffenen Regionen werden Verletzungen und nachfolgende Infektionen oftmals nicht wahrgenommen, bis diese einen fulminanten Verlauf mit teils lebensgefährlichen Folgen nehmen oder sogar eine Amputation der betroffenen Region fordern ¹¹.

In durchgeführten Hautbiopsien von betroffenen Patienten konnte eine Reduktion der Nervenfasern-Dichte in der Epidermis beobachtet werden. Es wird angenommen, dass

unter anderem die Reduktion der Nerven zu einer Dysbalance der Signalübertragung führt. Um das Defizit der Nerven auszugleichen, wurde nach Heilungsansätzen und einer Methode geforscht, um das Auswachsen neuer Nervenendigungen zu fördern. Nach wie vor stellt die Behandlung, als auch die Suche nach möglichen Therapieoptionen einer Neuropathie die medizinische Forschung vor großen Herausforderungen. Ansätze möglicher analgetischer, aber auch insbesondere kurativer Therapieformen wurden nach der Entdeckung von neurotrophen Stoffen forciert untersucht. Dabei wurde das mögliche Potential zur Heilung von geschädigten Nervenzellen bzw. Förderung des Aussprossens neuer, gesunder Nervenfasern mit der Behandlung von Neurotrophinen - insbesondere NGF - in mehreren Studien erprobt. In einer klinischen Studie konnte bei intramuskulärer Gabe von NGF in Patienten mit diabetischer Polyneuropathie der Effekt beobachtet werden, dass sich sensorisch-neurologische Parameter verbesserten und die Patienten eine Linderung ihrer neuropathischen Symptome berichteten ¹². Leider konnten in einer darauffolgenden klinischen Phase 3 Studie diese Resultate nicht wiederholt werden. Somit musste die Fortführung der Behandlung mit NGF wegen dosisabhängiger Schmerzinduktion (insbesondere Hyperalgesie an der Injektionsstelle bei subkutaner Applikation oder diffuser generalisierter Myalgien bei intravenöser Applikation) beendet werden ¹³. Interessanterweise kam es in Bezug auf NGF Jahrzehnte später zu einer entgegengesetzten Wende der Behandlung von diabetischer Neuropathie. Therapeutische Ansätze mit einem monoklonalen Antikörper gegen NGF (anti-NGF, Tanezumab®) konnte in einer Studie zur Behandlung der diabetischen Polyneuropathie vielversprechende Ergebnisse liefern. Es wurde außerdem gezeigt, dass der Nervenwachstumsfaktor auch eine zentrale Rolle bei chronisch entzündlichen Schmerzen spielt. Diese Erkenntnis lieferten Studien mit Antikörper gegen NGF gerichtete Proteine bei Osteoarthritis-Patienten ¹⁴. Durch diese gezielte Inhibierung von NGF konnte ein nachweislich analgetischer Effekt erwiesen werden, ohne dass die Entzündung des Gelenks maßgeblich beeinflusst wurde. Der schmerzlindernde Effekt unter der anti-NGF Therapie war jedoch so stark ausgeprägt, insbesondere in Kombination mit entzündungshemmenden NSAR (Nichtsteroidale Antirheumatika), das infolge einer Überbelastung der Extremität, oder in Ausnahmefällen durch Nekrosen Bildung, eine Kniegelenkersatzoperation der betroffenen Patienten erforderlich wurde ¹⁵. Unter diesem Aspekt und der somit erfolgten schweren Nebenwirkungen wurde deshalb von der FDA (Food and Drug

Administration) das Projekt *bis dato* pausiert. Dennoch stellt die anti-NGF Therapie eine vielversprechende Option zur Behandlung chronischer Schmerzen dar und veranlasste mehrere Firmen zu der Entwicklung monoklonaler NGF-Antikörper, wie z.B. Fulranumab® oder Fasinumab®^{16, 17}.

1.4 NGF als experimentelles Schmerzmodell am Menschen

In Anlehnung an die klinischen Befunde nach NGF-Applikation (s.o.) konnte NGF als experimentelles Humanmodell für Hyperalgesie und Allodynie etabliert werden. Die intradermale Injektion des Nervenwachstumsfaktors NGF löst beim Menschen eine Überempfindlichkeit gegenüber thermischer (Hitze und Kälte), mechanischer (tonischer Druck, Nadelstich) und elektrischer Reize aus¹⁸. Bemerkenswerterweise wurde eine maximale mechanische Überempfindlichkeit erst 2-3 Wochen nach Injektion von NGF registriert. Dabei ähnelt insbesondere die Überempfindlichkeit auf tonischen Druck den pathologischen Beschwerden von z.B. neuropathischer Schmerzpatienten¹⁸. Diese Hyperalgesien sind in Gegenwart einer experimentell induzierten lokalen Entzündung supra-additiv verstärkt^{19, 20}, was die hohe Effektivität einer kombinierten Therapie mit anti-NGF und NSAR (s.o.) erklären könnte.

1.4.1 Thermische Sensitivierung nach NGF-Injektion

Mechanistisch führt die Applikation von NGF zu einer akut (innerhalb von Minuten) eintretenden Sensibilisierung (Phosphorylierung) und Membraneinbau („trafficking“) von TRPV1 ("Transient Receptor Potential cation channel subfamily V member 1“). Dieser Ionenkanal wird in den sensorischen Nervenzellen des zentralen und peripheren Nervensystems von Wirbeltieren exprimiert und durch eine Reihe potenziell gewebeschädigender Reize, z.B. durch Hitze, säurehaltigen Lösungen, oder Inhaltsstoffen der Chili-Schote aktiviert²¹. Andere Ionenkanäle aus der TRP-Familie sind speziell bei der Signaltransduktion von Kältereizen involviert²². Nicht-schmerzhaftes Kaltempfinden (auch durch topische Applikation von Eukalyptusöl oder Menthol induzierbar) ist über TRPM8 vermittelt²³, wohingegen schmerzhaftes Kaltreize (auch durch Applikation von Zimtöl oder Ingwer induzierbar) die Aktivierung von TRPA1 (vormals ANKTM1) bewirkt.

1.4.2 Mechanische Sensitivierung nach NGF-Injektion

Sowohl die intrakutane als auch die intramuskuläre Injektion von NGF ²⁴⁻²⁷ führt zu einer mechanischen Sensitivierung, welche erst verzögert (mehrere Tage bis Wochen nach Injektion) einsetzt. Welcher Mechanismus sich hinter dieser zeitlichen Verzögerung verbirgt ist weiterhin ungeklärt. Ein axonaler Transport von NGF zum Zellkern mit anschließender Hochregulation von Transkriptionsfaktoren (z.B. ERK1/2) ²⁸ zur Modulation der Expression von Ionenkanälen und Neuropeptiden wird hierunter vermutet ²⁹. Ein weiterer Erklärungsansatz könnte die Modulation der PIEZO1 und 2 Kationenkanäle liefern (griechisch πιέζω „Druck ausüben“), für deren Entdeckungen Ardem Patapoutian kürzlich den Nobelpreis verliehen bekam. Es konnte nachgewiesen werden das PIEZO2 in Merkel-Zellen ³⁰ aber auch in einer Untergruppe von sensorischen Neuronen exprimiert wird. Diese neuronale Untergruppe besteht aus mechanisch-insensitiven C-Fasern, deren Empfindlichkeit auf mechanische Reize durch NGF sensibilisiert und über PIEZO2 reguliert werden kann ³¹.

1.4.3 Neuronale Sensitivierung nach NGF-Injektion

Durch Untersuchungen von Einzelfaserableitungen am Hausschwein ³² und Menschen ³³ konnte gezeigt werden, dass 1-3 Wochen nach Injektion von NGF die axonale Erregbarkeit spezifischer C-Nozizeptoren erhöht ist. Es zeigte sich durch elektrophysiologische Aufzeichnungen, dass mechano-insensitive C-Fasern nach NGF ebenfalls durch mechanische Stimulation aktiviert werden können. Interessanterweise konnten spontane Entladungen dieser C-Fasern auch ohne äußere Einflüsse registriert werden ^{32, 33}. Eine Spontanaktivität von Nozizeptoren wurde mittels Mikroneurographie auch bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen nachgewiesen ^{34, 35}. Da diese elektrophysiologische Untersuchungsmöglichkeit (Mikroneurographie) jedoch nur sehr wenigen Laboren weltweit zur Verfügung steht, wird das Verfahren daher für Routineuntersuchungen in der Klinik nicht angewendet. Durch psycho-physische Untersuchungen an gesunden Probanden wurde indirekt gezeigt, dass die axonale elektrische Erregbarkeit von C-Nozizeptoren nach NGF-Injektion erhöht ist ^{20, 36}. Die bei diesen Experimenten angewendeten elektrischen Stimulationsprotokolle mit rechteckförmigen Pulsen konnten jedoch leider nicht zwischen der Aktivierung von mechano-insensitiven und mechano-sensitiven C-Fasern unterscheiden.

1.5 Elektrische Aktivierung von C-Nozizeptoren

Für die direkte neuronale Stimulation der Nerven durch elektrische Reize werden traditionell rechteckförmige Pulse von 0.5 - 1 ms Pulsdauer appliziert. Die eingangs unter 1.1.1. erwähnten Klassen sensorischer Afferenzen variieren nicht nur hinsichtlich ihres Grades an Myelinisierung, sondern auch in Bezug auf ihre elektrische Erregbarkeit. Unmyelinisierte C-Nozizeptoren haben gegenüber myelinisierter A-delta und A-beta Fasern eine höhere elektrische Erregbarkeitsschwelle, mit der Folge, dass bei elektrischer Stimulation von C-Fasern mittels Rechteckpulsen die dafür erforderlichen starken Ströme unweigerlich auch A-Fasern aktivieren. Zur weiteren Identifizierung der Nervenfaserklassen-Aktivierung konnte kürzlich ein Verfahren entwickelt werden, das mittels transkutaner Applikation geringer Stromintensitäten auch unmyelinisierte Nervenfasern zu erregen vermag³⁷. Durch Veränderung der Elektrodenkonfiguration für die elektrische Stimulation³⁸ und der Applizierten elektrischen Pulse (Dauer, Frequenz und Pulsweite^{37, 39, 40}) konnte ein Stimulationsprotokoll etabliert werden, das eine spezifische Klassifizierung und Aktivierung von C-Faserklassen-Untergruppen erlaubt. Eine grobe Einteilung der Untergruppen von C-Nozizeptoren basiert auf deren mechanischer und thermischer Erregbarkeit. C-Nozizeptoren, die auf beide (mechanische und thermische) Reizmodalitäten ansprechen werden als „polymodale“ oder mechano-sensitive C-Fasern bezeichnet. C-Nozizeptoren, die durch mechanische Reize nicht aktiviert werden können, sind damit mechano-insensitive C-Fasern und werden auch als „stumme“ C-Nozizeptoren bezeichnet. Bei Etablierung der elektrischen Stimulationsmodelle hat sich dabei erwiesen, dass langsam depolarisierende Halbsinuspulse von 500 ms Dauer³⁷ und wiederholte 4 Hz Sinuspulse³⁹ besonders geeignet sind, diese Untergruppen unmyelinisierter Nozizeptoren zu erregen. Diese Untersuchungen konnten zeigen, dass halbsinusförmige Pulse (500 ms) eine Salve von Aktionspotentialen mechano-sensitiver (polymodaler) C-Fasern induziert. Für die Aktivierung mechano-insensitiver („stummer“) Nozizeptoren werden 10-fach höhere Halbsinus-Ströme benötigt³⁷. Demgegenüber verursachen 4 Hz Sinuspulse in beiden (mechano-sensitiven und mechano-insensitiven) C-Nozizeptoren jeweils 1 Aktionspotential je Sinuszyklus³⁹. Bezeichnenderweise führt eine kontinuierliche für die Dauer von einer Minute applizierte sinusförmige Stimulation bei 4 Hz bei gesunden Probanden zu einer erheblichen Schmerzreduzierung über die Zeit, welche durch die Nozizeptor-Akkommodation zu erklären ist. Demgegenüber wurde jedoch in der

symptomatischen Haut von Patienten mit neuropathischen Schmerzen eine Zunahme der Schmerzempfindung gefunden³⁹. Interessanterweise konnten wir kürzlich zeigen, dass auch in juckend-entzündlichen Dermatosen, dem Atopischen Ekzem, dieses Stimulationsmuster bei etwa 50% der Patienten einen zunehmenden Juckreiz auslöste⁴¹.

1.6 Fragestellung und Ziel dieser Arbeit

Eine zentrale Fragestellung, welche nozizeptiven Nervenfasern in menschlicher Haut maßgeblich zu der Übererregbarkeit nach NGF-Sensibilisierung und der zeitlich verzögert auftretenden mechanischen Hyperalgesie beitragen, ist bislang ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit sollte daher bei gesunden Probanden durch Anwendung spezifischer Stimulationsmuster in zeitlich definierten Abständen nach NGF-Sensibilisierung die selektive nozizeptive und von unmyelinisierten (C-Nozizeptoren) und dünn myelinisierten (A-delta Nozizeptoren) Nervenfasern vermittelte mechanische, thermische und elektrische Erregbarkeit untersucht werden. Dazu wurden insbesondere mechanische Prellreize, CO₂-Laser-Hitzepulse, langsam depolarisierende elektrische Halbsinus- und Sinuswellen-Stimulationsmuster sowie A-Faser-Leitungsblöcke verwendet. Mit diesen Untersuchungsmodalitäten sollte differenziell die Rolle nicht-myelinisierter Nozizeptoren bei NGF-induzierter Sensibilisierung geklärt werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

Bei der vorliegenden Arbeit handelt sich um eine experimentelle monozentrische einfach verblindete Studie, die von der Ethikkommission II der Medizinischen Fakultät Mannheim der Ruprecht-Karls Universität Heidelberg nach den Vorgaben der Deklaration von Helsinki geprüft und genehmigt wurde (Aktenzeichen 2014-579N-MA). Wir untersuchten bei gesunden Probanden auf NGF-sensibilisierter Haut die Intensität der Empfindung nach elektrischer, mechanischer und thermischer Stimulation. Eine spezifische Untersuchung der bei NGF-induzierter Überempfindlichkeit involvierten schmerzreizvermittelnden unmyelinisierten (C-Nozizeptoren) und dünn myelinisierten (A-delta Nozizeptoren) Nervenfasern sollte durch drei experimentelle Modelle bzw. Stimulationsverfahren ermöglicht werden:

I) durch elektrische Stimulation, II) durch Laser-induzierte Hitzereize und III) durch mechanische und elektrische Nozizeptor-stimulation unter Kompressions-Nervenblockade myelinisierter Afferenzen. Mit Hilfe des bei diesen 3 Verfahren evozierten Reiz-Wahrnehmungsmusters kann die Rolle von unmyelinisierten oder dünn myelinisierten Nervenfasern bei NGF-induzierter Überempfindlichkeit differenziell beurteilt werden.

Zu diesem Zweck wurden die Versuche in zwei Studien-Blöcke aufgeteilt. An zwei ausgewählten Tagen (Siehe 2.1) wurde zusätzlich zum Routine Protokoll (I u. II) eine separate Messreihe unter der Einwirkung der Kompressions-Nervenblockade (III) an freiwilligen und für diese Versuchsreihe geeigneten Probanden (siehe 2.6.) durchgeführt.

2.1 Studiendesign

An der Studie nahmen insgesamt 15 gesunde Probanden (8 Frauen und 6 Männer; durchschnittliches Alter 29 ± 2 Jahre) teil. Die Probanden wurden vor Beginn der Studie über das Vorgehen und den Inhalt der Untersuchungen gründlich aufgeklärt und willigten der Teilnahme an der Studie ein. Nach der Einwilligung wurde eine medizinische Anamnese erhoben und eine körperliche Untersuchung durchgeführt, um die Eignung der Probanden entsprechend der Ausschlusskriterien zu überprüfen. Zu diesen Ausschlusskriterien zählten Krankheiten, die mit chronischen Schmerzzuständen einhergehen, hereditäre oder angeborene Gerinnungsstörungen, Allergien auf Lokalanästhetika, atopische Ekzeme oder Psoriasis der Haut, Drogenmissbrauch, oder akute Einnahme schmerzhemmender Medikamente.

2.2 Versuchsablauf

Als Instrument der subjektiven Schmerzerfassung auf die Provokationstests diente uns die Numerische Ratingskala (NRS), mit deren Hilfe die Schmerzintensität anhand einer Zahlenfolge von 0 (keine Schmerzen) bis 10 (stärkster vorstellbarer Schmerz) beurteilt werden kann. Die Testpersonen sollten Schmerzintensitäten nach jedem Stimulus unter Verwendung dieser numerischen Bewertungsskala (NRS 0-10) angeben.

Ein Trainingstag zur besseren Selbsteinschätzung der Numerischen Ratingskala (NRS 0-10) und zum Kennenlernen des Versuchsprotokolls inklusive des Versuchsablaufs erfolgte an einem separaten Termin nach Probandenaufklärung (Tabelle 2). Für die Induktion der lokalen Überempfindlichkeitsreaktionen der Probanden wurde eine intradermale Injektion (100 µl) von 1 µg Nervenwachstumsfaktor (humanes NGF-β, Miltenyi Biotec GmbH, aseptisch hergestellte Aliquote) verwendet. Die Injektion erfolgte am volaren Unterarm in etwa 10-15 cm Entfernung zum Handgelenk. Als Referenz zur NGF-Injektion wurde das Lösungsmittel (sterile Kochsalzlösung NaCl 0.9%, 100 µl) am gleichen Unterarm, etwa 3-4 cm lateral zur NGF-Applikationsstelle injiziert. Den Probanden wurde nicht mitgeteilt, welche dieser Injektionsstellen den Wirkstoff NGF oder NaCl erhielten. Sie wurden angehalten, während der Injektion die Augen zu schließen, um einen möglichen Placebo-Effekt zu verhindern. Der Injektionsschmerz wurde nicht unterschiedlich stark zwischen der NGF- und NaCl-Lösung empfunden (NRS 1-2). Nach Applikation wurden die Injektionsstellen mit Hilfe einer Klarsichtfolie zur späteren Wiedererkennung der Applikationsorte von NGF und NaCl markiert (siehe unten, Abschnitt 2.3.).

Elektro-, Laser-induzierte Hitze- und mechanische Stimulationsprotokolle wurden verwendet, um die induzierte Überempfindlichkeit mit Hilfe der NRS psychophysisch zu beurteilen. Mehrere Besuche für die im Abschnitt (2) beschriebenen Stimulationsprotokolle zur selektiven Untersuchung myelinisierter und wenig myelinisierter Nervenfaserklassen wurden für die Studientage 1 – 3 – 7 – 10 – 14 nach der NGF-Injektion vorgesehen (Übersicht siehe Tabelle 2). Um den organisatorischen Aufwand gering zu halten und um mögliche Überschneidungen von Terminen zu verhindern, wurden speziell diese 5 Termine ausgewählt. In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass NGF eine gewisse Zeit benötigt, um seinen vollen sensibilisierenden Effekt zu erreichen (siehe oben, Abschnitt 1.4). Die differenzielle Nervenblockade (siehe Abschnitt 2.6.2) wurde daher an den Tagen 3 und

7 nach NGF-Injektion untersucht (n = 13). Wir erwarteten das Maximum der NGF-Sensibilisierung innerhalb dieser beiden Versuchstage. Um die sensibilisierende Wirkung von NGF sicher verfolgen zu können, wählten wir einen Untersuchungszeitraum von insgesamt 14 Tagen nach NGF Injektion.

Besuch	Aufklärung und Einwilligung	Trainingstag und NGF Injektion	Testreihe mit spezifischem Reizprotokoll	Testreihe mit Nervenblockade
1 (Tag -1)	X			
2 (Tag 0)		X		
3 (Tag 1)			X	
4 (Tag 3)			X	X
5 (Tag 7)			X	X
6 (Tag 10)			X	
7 (Tag 14)			X	

Studienprotokoll

1. Laser-Doppler Imaging (LDI): Aufnahme der Ruhedurchblutung vor Beginn der Messungen
2. Messung der Sensitivität gegenüber elektrischer Sinusreizen (10 Pulse 4 Hz, 2.5 Sekunden)
3. Aufnahme von LDI-Bildern nach der Stimulation mit Sinusreizen
4. Messung der Sensitivität gegenüber Halbsinusreizen (1 Puls, 0.5 Sekunden)
5. Messung der Sensitivität gegenüber Sinusreizen (60 Sekunden)
6. Messung der Sensitivität gegenüber Rechteckpulsen
7. Messung der Sensitivität gegenüber statisch mechanischen Reizen
8. Messung der Sensitivität gegenüber thermischen Reizen
9. Selektive Nervenblockade

Tabelle 2 zeigt das Studienprotokoll. Eine Testreihe mit spezifischen Reizprotokollen zum Zeitpunkt 1 – 3 – 7 – 10 – 14 Tage nach NGF-Injektion bestand aus den Punkten 1-8. An den Versuchstagen 3 und 7 wurde eine gesonderte Messreihe während der selektiven Nervenblockade (Punkt 9) durchgeführt, welche in Kapitel 2.9 beschrieben ist.

2.3 Vorbereitung

Bevor an den jeweiligen Versuchstagen mit der Stimulation begonnen wurde, mussten die Injektionsstellen von NGF bzw. NaCl lokalisiert werden. Da die Injektionsstellen schnell abheilten und unter optimalen Bedingungen keine Entzündung erkennbar war, konnten diese rein optisch und ohne Hilfsmittel nicht zuverlässig wiedergefunden werden. Deshalb benötigten wir zur sicheren Wiedererkennung der Hautareale die von uns nach Injektion präparierten Klarsichtfolien jedes Probanden. Auf diesen Folien wurde eingetragen, welcher Arm die Injektionen erhielt. Zur weiteren Orientierung wurde medial und lateral, sowie proximal und distal zum Arm nicht nur die NGF und NaCl Injektionsstellen markiert, sondern auch Muttermale, Narben, große Venen oder andere prominente Hautveränderungen erfasst, um die Lokalisation der NGF- und NaCl-Applikationsstelle sicher ausfindig zu machen und eine Verwechslung auszuschließen. Die auf der Klarsichtfolie markierten Injektionsstellen wurden so ausgestanzt, dass eine Markierung derselben auf der Haut der Probanden bei aufgelegter Klarsichtfolie ermöglicht wurde. Zur Bestätigung des identifizierten NGF-sensibilisierten Areals wurde eine Testung der mechanischen Empfindlichkeit auf Nadelstiche durchgeführt. Dabei wurde das vermutete Hautareal von distal bis proximal in kleinen Abständen von ca. 5 mm und einem Zeitintervall von ca. 1 Sekunde mit einem PinPrick 128 mN (PinPrick Stimulator-Set, MRC Systems GmbH, Heidelberg) stimuliert. Hierbei hielt die Testperson die Augen geschlossen und gab den Verlauf der Schmerzintensität an. Die Hautstelle welche uns von den Probanden mit einer erhöhten Empfindung signalisierte wurde, konnte mittels der Markierung der Klarsichtfolie zusätzlich zur sicheren Identifizierung der NGF-Stelle verifiziert werden.

2.4 Versuchsprotokoll

Das Versuchsprotokoll beinhaltete transkutan applizierte elektrische, thermische und mechanische Stimulationen. Die elektrischen Stimulationsprotokolle können anhand ihrer Reizmuster weiter unterteilt werden.

Die Reihenfolge aller Untersuchungen wurde stets wie folgt durchgeführt:

- 1.) Elektrische Sinuswellenstimulation (4 Hz, 2,5 s, 0,05 - 0,4 mA), kombiniert mit Aufzeichnung der Axonreflex-Flare-Entwicklung (Laser-Doppler Imaging, LDI)
- 2.) Elektrische Halbsinuswellenstimulation (1 Impuls 500 ms, 0,2 - 1 mA)
- 3.) Kontinuierliche elektrische Sinuswellenstimulation (4 Hz, 0,2 mA, 1 min)

4.) Elektrische Rechteckimpulsstimulation (Pulsdauer 1 ms, Frequenz 4 - 20 - 100 Hz bei 1 s Stimulationsdauer)

5.) Mechanische Aufprallstimulation (Geschwindigkeit 4 m/s und 8 m/s)

6.) CO₂-Laser-Hitzestimulation (60° C, 20 - 100 ms Laser-Pulsdauer)

Alle Testverfahren wurden an beiden vorbehandelten Hautstellen doppelt durchgeführt und in randomisierter Reihenfolge hinsichtlich der Intensitäten bzw. Frequenzen der applizierten Stromreize.

2.5 Psychophysik und Laser-Doppler Imaging nach NGF-Sensibilisierung

2.5.1 Elektrische Stimulierung

Zur elektrischen Aktivierung von C-Nozizeptoren wurden langsam depolarisierende Reize als Einzelpuls (halbsinusförmig) oder oszillierend mit 4 Hz (sinusförmig) mittels einer bipolaren abgerundeten Platin-Elektrode (Stift-Elektroden Durchmesser 400 µm, Abstand zueinander 2 mm) appliziert. Ein mittels 3D-Druck angefertigter Applikator diente der Aufnahme der Elektroden, die Kontaktfläche der Elektrode auf der Haut der Probanden betrug 4 mm².



Abbildung 1 zeigt die bipolare Elektrode für die elektrische Stimulierung

Für die Applikation der elektrischen Stimulationsmuster wurde die Elektrode an einen Gleichstromgenerator (DS 5 Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, U.K.) angeschlossen. Die elektrischen Pulse wurden über einen externen Trigger (National Instruments, NIB-USB 6221, Ungarn) von einem speziell entwickelten Computerprogramm gesteuert (Dapsys8.0, © Brian Turnquist, Bethel University, USA). Mit diesem Programm konnten Anstiegssteilheit und Amplitude der Strompulse definiert werden. Die Stiftelektrode wurde sanft auf das zu untersuchende Hautareal aufgelegt und mit einem Magnet-Fuß gehalten. Hierbei sollte möglichst wenig Druck auf die Haut ausgeübt werden, um die Wahrnehmungsfähigkeit der Probanden insbesondere im NGF-sensibilisierten Areal nicht zu beeinträchtigen, jedoch ohne dabei den applizierten aber geringen Stromfluss über die Haut einzuschränken.

Für die *sinusförmigen Reize* wurden randomisierte Stromintensitäten von 0.05 – 0.1 – 0.2 – 0.4 mA bei einer Frequenz von 4 Hz und mit einer Stimulationsdauer von 2.5

Sekunden (insgesamt 10 Zyklen sinusförmiger Reize) verabreicht. Die Stimulation erfolgte randomisiert an der NaCl und NGF Hautstelle mit Erfragen der jeweils empfundenen Schmerzintensität (NRS 0-10) nach Stimulation und wurde abwechselnd an jeder Hautstelle zweimal wiederholt. Ferner wurde protokolliert, welche Stromintensität vonnöten war, um einen individuellen Schmerzwert von NRS 3 zu erreichen. Diese Stromintensität zur Induktion von NRS 3 wurde erfasst um die Schmerzentwicklung während einer 60 Sekunden anhaltenden und kontinuierlichen Sinuswellen Stimulation zwischen den mit NaCl und NGF behandelten Hautstellen kontrolliert vergleichen zu können. Ausgehend von einer festgelegten Empfindungsintensität von NRS 3 kann eine Veränderung der Wahrnehmung (eine Zunahme oder Abnahme der Empfindung) zuverlässig und unabhängig einer möglicherweise veränderten stromintensitätsabhängigen Schmerzschwelle erfasst werden. Aus den Untersuchungen resultierend wurden Stromamplituden der 4-Hz-Sinuswellenimpulse für die Stimulation der NaCl-Hautstelle auf 0.4 mA und für die Stimulation der mit NGF behandelten Haut auf 0.2 mA festgelegt. Ausgehend von dieser Stromintensität wurde der Sinusreiz über 60 Sekunden (insgesamt 240 Stromimpulsen) appliziert. Dabei wurden die Probanden 5 Sekunden nach Beginn und anschließend alle 10 Sekunden während der Stimulation nach der Intensität ihrer Schmerzempfindung gefragt (NRS, 0 – 10). Sie sollten ebenfalls die Qualität des Schmerzes beurteilen. Dabei wurde zwischen einem pulsierenden, stechenden Empfinden und einem dumpfen, bohrend-brennendem Gefühl unterschieden.

Zur weiteren Aktivierung von primär polymodalen C-Fasern wurden *halbsinusförmige Einzelpulse* appliziert. Hierbei wurden Intensitäten von 0.2 – 0.6 – 1 mA untersucht. Die halbsinusförmig verlaufenden Ströme hatten eine Gesamtdauer von jeweils 500 ms mit Peak der zu applizierenden Stromstärke bei 250 ms. Diese Verlaufsform der transkutanen elektrischen Nervenstimulation induzierte in Abhängigkeit der Stromstärke eine Empfindung von Berührung bis hin zu leichtem Brennen bzw. Stechen, deren Intensität mittels NRS (0 – 10) erfasst wurde.

Die transkutane *elektrische Stimulation mit rechteckförmigen Strompulsen* wurde mit Impulsen von 0.5 ms Dauer durchgeführt, einem Reizprofil das insbesondere myelinisierte A-Fasern aktiviert. Die generierten Strompulse (Digitimer Gleichstromgenerator DS 7A, UK) wurden auf eine Frequenz von 2 Hz (Pulsgeber PG1, Rimkus Medizintechnik, Parsdorf, Deutschland) voreingestellt und zunächst die Stromintensitäten für die Empfindungs- und anschließend die Schmerzschwelle bei

den Probanden erfasst. Dazu wurde manuell die Stromintensität der 0.5 ms andauernden rechteckförmigen Pulse langsam, von 0 mA ausgehend um zirka 0.1 - 0.2 mA pro Sekunde erhöht. Die Probanden sollten währenddessen signalisieren, wann eine Empfindung und wann ein Schmerz wahrgenommen wurde. Nach Erfassen der elektrischen Empfindungs- und Schmerzschwellen wurde die Intensität der Strompulse weiter erhöht (0.5 mA pro Sekunde) mit Aufforderung der Probanden, zu signalisieren wann nun ein individuelles Schmerzniveau von NRS 3 erreicht wurde. Die hierfür notwendige Stromstärke diente als Wert für eine überschwellige Stimulierung mit Rechteckpulsen, die im Anschluss jeweils mit der Dauer von 1 Sekunde und randomisierten Frequenzen von 4; 20; 100 Hz transkutan appliziert wurden. Um möglichst unvoreingenommene Ergebnisse zu erzielen, wurde auch hier randomisiert NGF- und NaCl Kontroll-Haut stimuliert und die Intensität der Schmerzwahrnehmung nach Stimulation mit 4, 20, 100 Hz mittels NRS (0 – 10) erfasst.

2.5.2 Laser-Doppler Imaging

Die Aktivierung der Untergruppe unmyelinisierter C-Nozizeptoren, die mechanisch unerregbar sind (mechano-insensitive „stumme“ Nozizeptoren), ist für die Ausbildung der Hautrötung in der Umgebung der gereizten Stelle, wie sie z.B. bei Mückenstichen zu beobachten ist („Erythem“), verantwortlich. Durch die Erregung dünner, kutaner Axone durch einen mechanischen, chemischen oder wie in unserem Versuch genutzten elektrischen 4 Hz Sinusreiz, kommt es zu einer Vasodilatation der Gefäße durch Ausschüttung von Neuropeptiden über die retrograde Stimulation der Axonkollateralen im gereizten Hautareal („Axon-Reflex“ Erythem). Die elektrisch erfolgte Rekrutierung der „stummen“ unmyelinisierten Nozizeptorklasse nach 2.5 Sekunden Sinus-Stimulation mit randomisierter Messreihe von 0.05 – 0.1 – 0.2 – 0.4 mA, wurde mittels Laser-Doppler Imaging (Moor LDI, Axminster, UK) objektiv quantifiziert. Hierzu wurde vor Beginn der Stimulationen die Ruhedurchblutung des zu untersuchenden Hautareals als Ausgangswert (Baseline) durch die Aufnahme von 2 Bildern vor der Stimulation erfasst. In einem der beiden Bilder der Ruhedurchblutung wurde eine Pappschablone von 4 cm² für die spätere Quantifizierung der Hautrötung mittig auf die zu scannende Fläche zur Skalierung aufgelegt. Anschließend wurde das Scannen der Hautareale angehalten und mit dem Stimulationsprotokoll (Siehe 2.5.1) der transkutanen elektrischen Halbsinuswellen begonnen. Nach Beenden des

Protokolls erfolgte die Fortsetzung der Laser-Doppler-Bildgebungssequenz zur Ermittlung der Ausdehnung der Hautrötung für 2 Minuten. Die jeweiligen Aufnahmen der Bilderserie wurden separat für die Injektionsstellen der NGF- und NaCl-Hautareale wiederholt. Jeder Scan in einer Bildserie dauerte 30 Sekunden und umfasste eine Fläche von 12 cm² (4000 Pixel). Die Abtastgeschwindigkeit betrug 4 ms je Bildpixel. Bei diesem Verfahren tastete ein Infrarot-Laser (Wellenlänge 780nm, maximale Energie 2.5mW) die Haut berührungslos und schmerzfrei ab. Die Eindringtiefe des Lasers in die Haut beträgt etwa 1 mm. Trifft der Laserstrahl dabei auf sich bewegende Strukturen (z.B. Erythrozyten), wird die Wellenlänge des Laserstrahles abgelenkt und verändert sich („Doppler-Shift“). Diese Wellenlängenänderung wird über Sensoren detektiert und entsprechend der Änderungen ein farbcodiertes Bild der Hautdurchblutung erstellt, welches nach der Untersuchung ausgewertet wurde. Auch für das menschliche Auge nur unzureichend wahrnehmbare Veränderungen der Hautrötung bzw. der Grunddurchblutung der Haut können mit diesem Verfahren zuverlässig erfasst werden. Anschließend erfolgte die objektive Quantifizierung der flächigen Ausdehnung der Hautdurchblutungszunahme. Hierfür wurde im Baseline-Bild der mittlere Fluss der Grunddurchblutung plus der 2-fachen Standardabweichung bestimmt. Alle Bildpunkte mit Durchblutungswerten oberhalb dieses Wertes wurden als signifikante Durchblutungszunahme interpretiert und danach die LDI-Bilder der Aufnahmesequenz durch Subtraktion von diesem Wert analysiert und farbcodiert dargestellt. Das zentrale Areal aller zusammenhängenden signifikant erhöhten Durchblutungsbildpunkte wurde definiert als die Fläche der stimulationsbedingten Durchblutungszunahme, welche sich aus der Summe der Bildpunkte, mit anschließender Kalibrierung anhand der Anzahl der Bildpunkte aus der 4 cm² Schablone errechnet. Durch diese Methode konnten wir eine objektive Bewertung der Ausbreitung des Erythems und damit eine indirekte Aussage über die elektrisch provozierte Aktivierung „stummer“ Nozizeptoren erheben.

A: LDI Scan

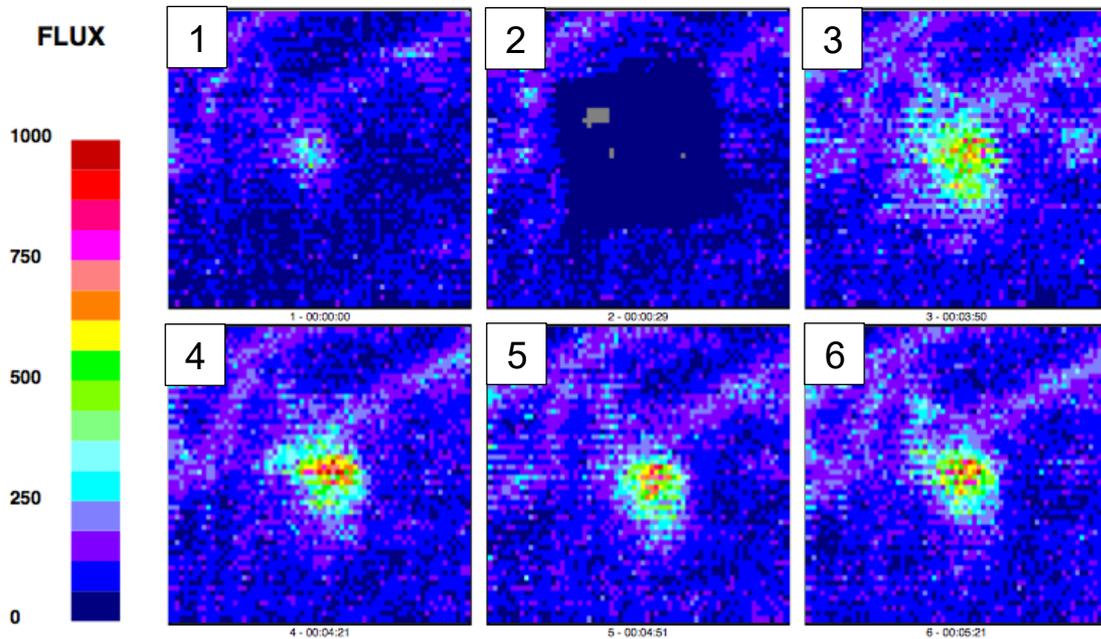


Abbildung 2.A zeigt ein Beispiel der Aufzeichnung vom LDI gescannten Hautareale nach elektrischer Sinus Stimulation. Das Bild Nr. 1 zeigt die Haut vor Beginn der Stimulation in Ruhedurchblutung. Im Bild Nr. 2 stellt sich die auf der Haut aufliegende Schablone zur Kalibrierung dar. Die nachfolgenden Bilder Nr. 3-6 zeigen die Zunahme des Erythems nach Stimulation. Diese Zunahme wurde im Anschluss quantifiziert.

B: LDI Scan

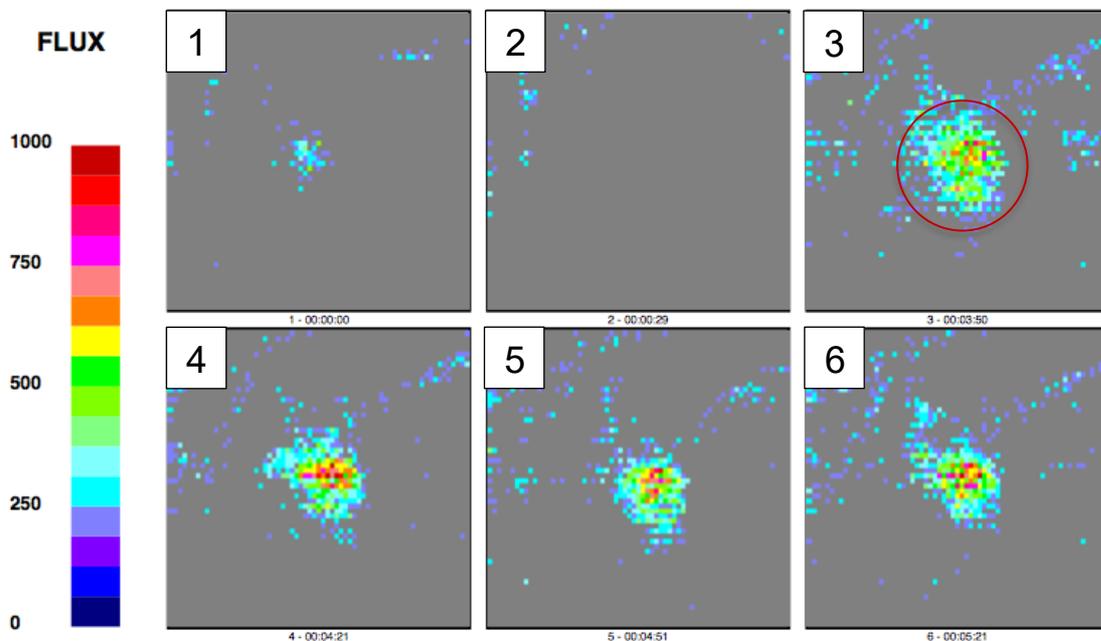


Abbildung 2.B entsteht nach Bearbeitung durch Subtraktion signifikant erhöhter Durchblutungsbildpunkte von Baseline Bild Nr. 1. Rot umrandet in Bild 3 ist beispielhaft das objektiv quantifizierte Erythem, was durch die Stimulation entstanden ist und für die quantitative Analyse berechnet wurde.

2.5.3 Mechanische Stimulierung

Die Messung der dynamisch-mechanischen Sensitivität der Probanden wurde mittels kontrollierter Prellreize auf die Injektionsstellen erfasst ⁴². Für die Applikation der Prellreize wurde ein Plastikzylinder (Durchmesser 5 mm, Gewicht 0.5 g) mithilfe von Druckluft über ein 8 cm langes Plexiglasröhrchen beschleunigt (DoKoh Impact-Stimulator, Deutschland). Die Intensität des Prellreizes wird durch die Geschwindigkeit des orthogonal auf die Haut auftreffenden Projektils bestimmt. Diese Geschwindigkeit wurde mittels zweier Lichtschranken, die im Plexiglasröhrchen angebracht waren gemessen. Zwei definierte Geschwindigkeit von 4 und 8 m/s wurden appliziert, von denen 4 m/s einer sanften Berührung entspricht und die Geschwindigkeit von 8 m/s einen leicht schmerzhaften Prellreiz verursacht, in etwa vergleichbar mit einem Fingerschnalzen. Jede Reizintensität wurde dreimal im Abstand von 10 Sekunden wiederholt. Der Proband sollte die Schmerzintensitäten nach jedem Reiz mit Hilfe der numerischen Skala angeben (NRS 0-10).



Abbildung 3 zeigt den Prellreiz-Stimulator. Die Lichtschranken für die kontrollierte Geschwindigkeitsbestimmung des Projektils (rot) sind im Würfel (grün) untergebracht.

2.5.4 Thermische Stimulierung

Die Aktivierung Hitze empfindlicher A-delta und C Nozizeptoren erfolgte mittels CO₂-Laser (Wellenlänge von 10600 nm, Energie 27 Watt, 6 mm Durchmesser, Hersteller SIFEC s.a., Ferrières, Belgien). Die Temperaturen der applizierten Hitze-Pulse wurden online durch computergesteuerte Oberflächentemperaturmessungen kontrolliert („Feedback“-Kontrolle) und die CO₂-Laser Temperatur auf 60° C voreingestellt. Ausgehend von 20 ms wurde die Stimulationsdauer der applizierten 60° C Hitzepulse in 10 Sekunden Intervallen um 20 ms auf bis maximal 100 ms erhöht. Mit zunehmender Stimulationsdauer erhöht sich auch gleichzeitig der Hitzegradient, dadurch erreichte die Hitze eine größere Eindringtiefe in die Haut und damit eine von der Lokalisation der Nervenfasern in unterschiedlichen Hautschichttiefen abhängige Nozizeptor-Aktivierung. Für jede Pulsdauer (20 – 100 ms) wurde die empfundene Schmerzintensität abgefragt. Die Schmerzintensitäten wurden nach NGF-

Sensibilisierung und in NaCl-behandelter Haut unter Verwendung der numerischen Bewertungsskala (NRS 0-10) angegeben.

2.6 Psychophysik nach NGF Sensibilisierung unter selektiver Nervenblockade

Zusätzlich zu den Versuchsprotokollen 2.5 wurde an den Versuchstagen 3 bei n = 13 Probanden (ein Proband litt an Morbus Raynaud und wurde von diesem Teil des Versuchsprotokolls ausgeschlossen) und Tag 7 bei n = 5 Probanden mittels differenzieller Nervenblockade die funktionelle Rolle von A-delta und C-Nozizeptoren nach NGF-Sensibilisierung untersucht. Ein A-Faser-Leitungsblock wurde durch ischämische Kompression des Oberarms wie zuvor beschrieben induziert^{43,44}. Dabei wurde während und nach der selektiven Nervenblockade des Oberarmes verschiedene Untersuchungen und Stimulationsprotokolle auf NGF-sensibilisierter und benachbarter NaCl-behandelter Haut durchgeführt.

2.6.1 Versuchsvorbereitung

Noch bevor die Blockade der Nervenfasern durchgeführt wurde, testeten wir die Empfindung normaler Haut auf multimodale Reize die zur selektiven Stimulation primär sensorischer Afferenzen angewendet wurde. Die A-beta Faser Funktion wurde durch Bestreichen der Haut mit einem Pinsel (Somedic Brush 05, Schweden) getestet. Kaltempfinden (A-delta Faser Funktion) wurde durch Aufsetzen eines auf 18°C abgekühlten Metallrollers (Thermo-Roll, Somedic, Schweden) auf die Haut überprüft. Zusätzlich wurde das Vorhandensein des Wärmempfindens (C-Faser Funktion) mittels eines auf 40°C erwärmten Metallrollers (Thermo-Roll, Somedic, Schweden) kontrolliert. Die mechanische Sensitivität auf Nadelstich-Schmerz (überwiegend A-delta Faser vermittelter Schmerz) wurde durch „Pinprick“-Stimulation mittels definierter Nadelreiz-Stimulatoren (MRC Systems, Deutschland; 256 mN, Durchmesser der Nadelspitze 0.25 mm) getestet. Um den während des Kompressionsblockes eintretenden Ausfall der A-Fasern (insbesondere der A-delta Fasern) noch präziser zu bestimmen, diente eine zusätzliche transkutane elektrische Stimulation mit rechteckförmigen überschwelligem und daher als deutlich schmerzhaft empfundenen Strompulsen. Hierzu wurde der Gleichstromgenerator (Digitimer Gleichstromgenerator DS 7A, UK) mit einer Frequenz von 2 Hz getriggert (Pulsgeber PG1, Rimkus Medizintechnik, Parsdorf, Deutschland) und die Strompulse über unsere bipolare

Platin-Elektrode mit ansteigender Intensität transdermal applizierten. Nach Erfassung der elektrischen Empfindungs- und Schmerzschwelle, sowie nach Erreichen eines individuellen Schmerzwertes von NRS 3, erfolgte im Anschluss die überschwellige Stimulation mit der ermittelten Stromstärke (NRS 3) für die Dauer von 1 s und mit einer Pulsfrequenz von 20 Hz bei einer Pulsdauer von jeweils 1 ms. Wird dabei die Stimulation als eindeutig pulsierend wahrgenommen ist dies aufgrund des Stimulationsmusters von 1 ms Rechteckpulse mit 20 Hz appliziert ein Indiz für eine noch vorhandene Leitfähigkeit dünn-myelinisierter Afferenzen.

2.6.2 Kontrollierte Ischämie

Um die Leitfähigkeit von dick-myelinisierten A-beta und wenig myelinisierten A-delta Nervenfasern möglichst schonend, temporär und reversibel zu unterbinden, wurde eine Blutleere und Nervenkompression des Oberarmes erzeugt. Hierfür wurde der Arm, in dem das NGF injiziert wurde, senkrecht angehoben und durch das Auswickeln mit einer elastischen Binde (Esmarch-Binde, VBM MEdTech) eine Blutleere erzeugt. Nach Unterfütterung mit Watte und Anlegen einer Zweikammer-Blutdruckmanschette (VBM Medizintechnik, Deutschland) am Oberarm wurde der Arm bequem auf ein Vakuumkissen (HEK Medical GmbH, Ascheberg, Deutschland) gebettet. Durch Insufflation der Blutdruckmanschette auf 250-300 mm/Hg wurde eine ausreichende Kompression erzeugt, die den arteriellen und venösen Blutfluss vollständig unterbrach. Der Ausfall der Arteria Radialis- und Arteria Ulnaris Pulse wurde palpatorisch erfasst und in regelmäßigen Abständen untersucht, um die Effektivität des Blocks zu bestätigen. Der Manschettendruck wurde regelmäßig kontrolliert und über den gesamten Zeitraum auf 250-300 mm/Hg beibehalten. Unter diesen Voraussetzungen ist trotz einer andauernden Ischämie einer peripheren Extremität kaum mit Komplikationen für den Probanden zu rechnen. Irreversible hypoxische Schäden an den Extremitäten treten erst nach ca.5-6 Stunden auf ⁴⁵. Die gesamte Dauer der Ischämie wurde per Stoppuhr gemessen und für das Protokoll festgehalten.

Um einen differentiellen Leitungsblock zu bestimmen, wurden die unter 2.6.1 aufgeführten sensorischen Tests für die Aktivierung primärer Afferenzen in der Nähe der mit NGF und NaCl behandelten Hautstellen engmaschig in Intervallen von 2 Minuten während der ischämischen Kompression durchgeführt. Die enge zeitliche aufeinanderfolge der Tests diene insbesondere zur Überprüfung und Vorbeugung vor ungewünschten Ausfällen der C-Fasern. Zuerst fallen dick myelinisierte Nervenfasern

aus, anschließend folgt der Ausfall von A-delta Fasern und zuletzt ist mit einem Ausfall unmyelinisierter C-Fasern zu rechnen. Die anfänglich beschriebenen sensorischen Tests (siehe 2.6.1) wurden in derselben Reihenfolge durchgeführt und regelmäßig wiederholt. Ein A-Faser-Kompressionsblock wurde erreicht, wenn das Bestreichen der Haut mit dem Pinsel keine Empfindung auslöste, das Gefühl der Kälte entweder fehlte oder als brennend heiß empfunden wurde. Das Wahrnehmen der Wärme sollte noch vorhanden sein, was die intakte Funktion der C-Fasern bestätigt. Der charakteristische scharfe und stechende Schmerz der Nadelstichstimulation sollte bei Erreichen der A-Faser Blockierung nicht mehr wahrgenommen werden. Darüber hinaus sollte insbesondere der pulsierende Charakter der elektrisch induzierten überschwelliger Schmerzreize von 20 Hz nicht mehr gefühlt werden. Dieses letztgenannte Kriterium diente als Kardinalzeichen für eine erfolgreiche A-delta Nozizeptor Blockade und sobald durch die sensorischen Untersuchungen die A-Faser Blockade bestätigt wurde, begannen wir unverzüglich mit dem selektiven Stimulationsprotokoll.

2.6.3 Stimulationsprotokolle unter der selektiven Nervenblockade

Die Stimulationsprotokolle während des A-Faser Blocks zur differenziellen Nervenfasernblockade nach NGF-Injektion bestanden aus elektrischer und mechanischer Stimulation. Die Probanden wurden angehalten, währenddessen die Augen zu schließen um nicht auf den Stimulationsort zu schauen. Zur elektrischen Stimulation dienten unsere sinusförmigen repetitiven oszillierende Reize, sowie halbsinusförmige Einzelpulse. Dazu verwendeten wir ebenfalls wie im Versuchsprotokoll zu Kapitel 2.5.1 erwähnt für Sinusreize Ströme von 0.05 – 0.1 – 0.2 – 0.4 mA, die mit einer Frequenz von 4 Hz und mit einer Stimulationsdauer von 2.5 Sekunden (insgesamt 10 Reize) appliziert wurden. Bei der Applikation von halbsinusförmigen Einzelpulsen wurden Intensitäten von ausschließlich 1 mA untersucht. Jeder Einzelpuls hatte eine Gesamtdauer von 500 ms mit Peak der zu applizierenden Stromstärke bei 250 ms. Zwischen NGF- und NaCl-Kontrollhaut wurde die Stimulation der jeweiligen Stromreize randomisiert durchgeführt. Anschließend erfolgte die Testung der mechanischen Sensibilität auf kontrollierten Prell-Schmerz. Hierfür wurde ein Plastikzylinder mittels Druckluft auf 4 bzw. 8 m/s beschleunigt und orthogonal auf die Haut geschossen (DoKoh Impact-Stimulator, Deutschland). Insgesamt wurde 6-mal auf Prellreize (3 x 4 m/s und 3 x 8 m/s) an der NGF- und NaCl-Hautstelle getestet. Für jede Stimulationsmodalität erfolgte nach jedem Reiz die

Schmerzeinschätzung mittels numerischer Rating Skala (NRS 0-10). Nachdem die Versuchsprotokolle 1-mal durchlaufen waren, erfolgte zur Doppelbestimmung unmittelbar eine zweite Messung hinterher. Nach Beenden der zweiten Messreihe wurde die Blutdruckmanschette geöffnet, die betroffene Extremität auf ihre Durchblutung, Motorik und Sensibilität hin geprüft. Die Probanden wurden abschließend auf neuronale Schäden untersucht und über 30 Minuten einbehalten, um eine Gefährdung durch Komplikationen sicher auszuschließen.

Versuchstag	Sensorische Testung vor Ischämie	Ischämie Einleitung	Sensorische Testung während Ischämie	Erste Testreihe während Ischämie	Zweite Testreihe während Ischämie	Kontrolle der pDMS
3	X	X	X	X	X	X
7	X	X	X	X	X	X

1. Messung der Sensitivität gegenüber Sinusreizen (4 x 0.4 mA / 2.5 Sekunden)
2. Messung der Sensitivität gegenüber Halbsinusreizen (4 x 1 mA / 0.5 Sekunden)
3. Messung der Sensitivität gegenüber statisch mechanischen Reizen (3 x 4 m/s und 3 x 8 m/s)

Tabelle 3 Zeigt das gesonderte Studienprotokoll an den Versuchstagen 3 und 7. Eine Testreihe beinhaltete die Messung von den Punkten 1-3 unter ischämischen Bedingungen während der selektiven Nervenblockade.

2.7 Statistik

Die Daten wurden mittels Microsoft Office Excel 2010 zusammengestellt. Die statistischen Berechnungen aller Daten wurden mit STATISTICA 7.1 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) durchgeführt. Sowohl für elektrische, mechanische als auch thermische Stimulation wurde durch Varianzanalyse (ANOVA) ein möglicher signifikanter Unterschied zwischen den gruppierenden Variablen „NGF“ - „Tag“ - „Stimulation“ für Schmerz- und Axonreflex-Erythem-Aufzeichnungen berechnet und mit Fisher`s LSD, Bonferroni- und Scheffé-Post-Hoc-Test validiert. Alle Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler der Mittelwerte (SEM) dargestellt. Für signifikante Unterschiede wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p < 0.05$) festgelegt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Langsam depolarisierende elektrische Stimulation der NGF sensibilisierten Haut

3.1.1 Durch Sinuswellen verursachte Schmerzen und Axonreflex-Erythem

4-Hz-Sinuswellenimpulse, die für 2,5 Sekunden abgegeben wurden, induzierten einen stromintensitätsabhängigen Schmerz, der an der NGF-Hautstelle signifikant gegenüber der NaCl-Hautstelle erhöht war ($p < 0,0005$, ANOVA). Die ausgeprägtesten Wirkungen von NGF wurden für 0,2 mA Sinuswellenamplituden am Tag 1 nach Injektion ($p < 0,005$, Bonferroni-Post-Hoc-Test) und für 0,4 mA am Tag 1 und Tag 10 ($p < 0,002$, Bonferroni-Post-Hoc-Test) beobachtet. Bei 0,2 mA wurde am Tag 1 ein maximales Schmerzempfinden von NRS $2,3 \pm 0,3$ an der NGF-Stelle aufgezeichnet (Bewertung an der NaCl-Stelle NRS $1,5 \pm 0,2$). Der durch die Sinuswelle 0,4 mA induzierte Schmerz war an der NGF-Stelle am Tag 1 NRS $3,2 \pm 0,3$ und am Tag 10 mit NRS $2,7 \pm 0,3$ gegenüber der NaCl-injizierten Hautstelle signifikant höher ($p < 0,005$, Bonferroni-Post-Hoc-Test). Interessanterweise nahm das Schmerzempfinden an der mit NaCl behandelten Hautstelle von Tag 1 bis 14 allmählich, jedoch nicht signifikant (n.s.) ab (durchschnittliches NRS $2,4 \pm 0,3$ am Tag 1 und NRS $1,8 \pm 0,3$ am Tag 14). Auch an der NGF-Stelle konnte über 14 Tage eine Schmerzabnahme mit der Zeit registriert werden, war jedoch am Tag 10 im Vergleich zu Tag 7 tendenziell leicht erhöht (NRS $2,4 \pm 0,2$, n.s., Abbildung 4).

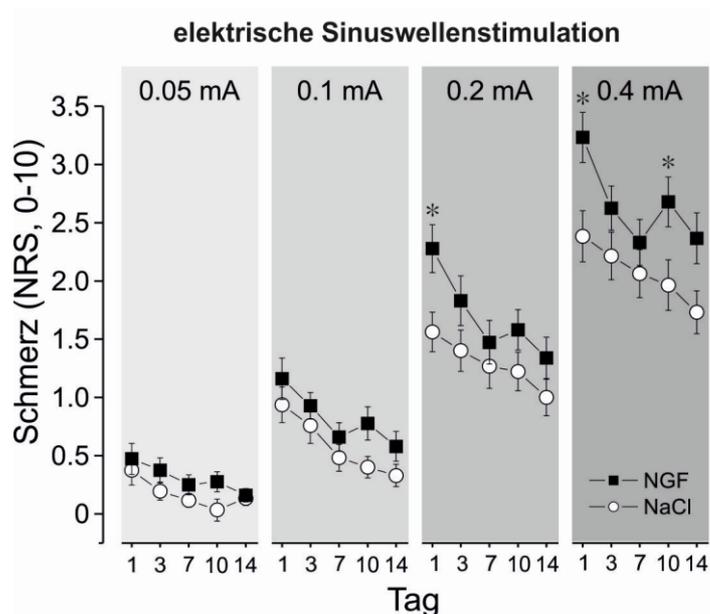


Abbildung 4 zeigt die Schmerzaufzeichnungen (NRS, 0-10) nach 10 Impulsen mit 4 Hz Sinuswellenstimulation (Dauer des Reizes 2.5 Sekunden) mit Stromstärken von 0,05 mA (linkes Feld)

bis 4 mA (rechtes Feld), die jeweils an den Tagen 1 - 14 nach Injektion an der NGF Stelle (ausgefüllte schwarze Quadrate) und der NaCl-Kontrollhaut (offene weiße Kreise) abgegeben wurden. Der stromintensitätsabhängige Schmerz war nach NGF-Injektion signifikant erhöht ($p < 0,0005$, ANOVA), insbesondere am Tag 1 für 0,2 mA und 0,4 mA ($p < 0,005$, Bonferroni-Post-hoc-Test, markiert mit Sternchen).

Durch die Erregung dünner kutaner Axone durch die elektrische Reizung mithilfe von Sinuswellen kommt es zu einer Vasodilatation der Gefäße in der Umgebung des gereizten Hautareals (Erythem oder Axonreflex-Flare). Die Fläche der sich rasch und innerhalb 1 Minute ausbildenden Axonreflex-Flare-Reaktion unterschieden sich nach bereits 2,5 Sekunden Sinuswellenstimulation (0,05 - 0,4 mA) signifikant zwischen der "Behandlung" (NGF vs. NaCl) und dem "Untersuchungstag" (Tag 1 – 14) (Interaktion $p < 0,02$, ANOVA) und zeigten im Durchschnitt ein maximales Flare von $3,1 \pm 0,5 \text{ cm}^2$ an den Tagen 7 bis 14 nach der NGF-Behandlung gegenüber einer maximalen Reaktion von etwa $2,5 \pm 0,5 \text{ cm}^2$ an der mit NaCl behandelten Stelle (Abbildung 5).

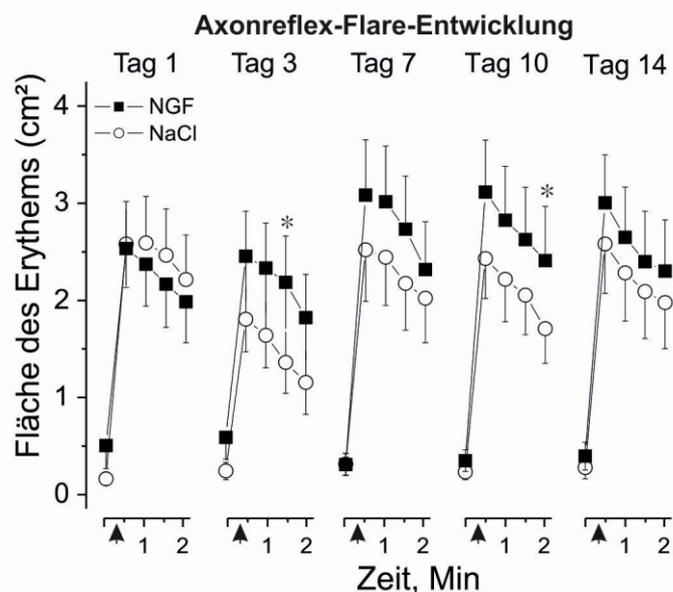


Abbildung 5 zeigt die Axonreflex-Flare-Entwicklung (Erythem-Fläche, cm^2), aufgezeichnet per Laser-Doppler-Bildgebung über einen Zeitraum von 2 Minuten (Aufnahmesequenz 30 s je Bild) nach 10 Pulsen sinusförmiger Stimulation (0,05 - 0,4 mA, Zeitpunkt der Reizapplikation markiert durch Pfeile) an NGF (ausgefüllte Quadrate) und NaCl-behandelter Haut (offene Kreise) am Tag 1 - 14 (von links nach rechts) nach der Injektion. Eine signifikante Wechselwirkung zwischen der Faktorgruppen "NGF" - "Entwicklung über die Zeit" - "Tag der Untersuchung" wurde für die Fläche der Erythem Ausdehnung identifiziert ($p < 0,02$, ANOVA, Sternchen markieren $p < 0,005$ Bonferroni-Post-hoc-Test zwischen NGF und NaCl).

3.1.2 Halbsinuswellen induzierte Schmerzen

Stimuli eines einzelnen 500 ms andauernden Halbsinuswellen Impulses verursachten abhängig von der applizierten Stromintensität des Reizes mehr Schmerzen an der mit

NGF behandelten Stelle ($p < 0,005$, ANOVA). Der wahrgenommene Schmerz war besonders stark für den höchsten Strom (1 mA Amplitude) am Tag 1 nach NGF (NRS $2,2 \pm 0,3$) gegenüber NRS $1,6 \pm 0,2$ nach NaCl Injektion ($p < 0,001$, Bonferroni-Test). Zum Tag 7 nahm der Schmerz an der NGF Stelle auf NRS $1,6 \pm 0,2$ ab, während am Tag 10 (NRS $1,8 \pm 0,3$, $p < 0,002$, Bonferroni-Test) und am Tag 14 (NRS $1,6 \pm 0,3$, $p < 0,01$, Bonferroni-Test) die induzierten Schmerzen an den NGF-Stellen im Vergleich zu NaCl behandelter Haut (NRS $1,2 \pm 0,2$ und NRS $1 \pm 0,2$) signifikant erhöht blieben (Abbildung 6).

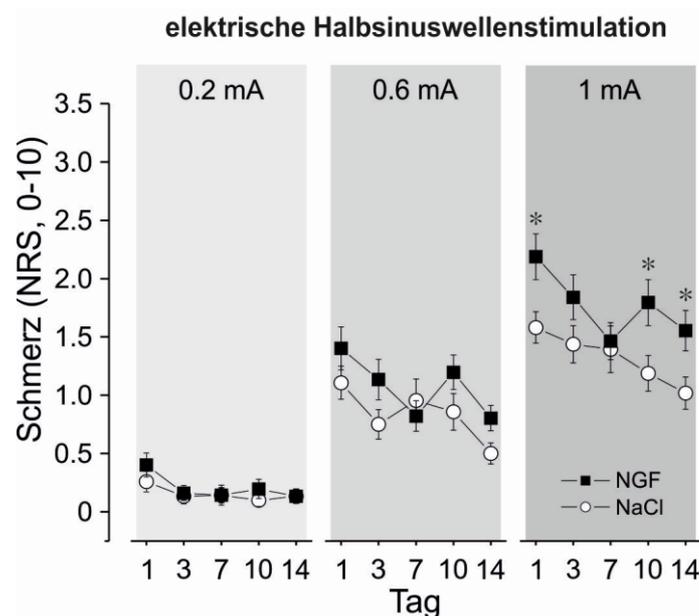


Abbildung 6 zeigt die Schmerzempfindungen (NRS) nach Stimulation mit einem einzelnen Halbsinuswellenpuls (Pulsdauer 500 ms, Stromintensität 0,2 (links) – 0,6 (mitte) - 1 mA (rechts)) von NGF- (ausgefüllte Quadrate) und NaCl-injizierter Haut (offene Kreise) am Tag 1 - 14 nach der Injektion. Die Empfindungen für 0,6- und 1-mA-Halbsinuswellenimpulse wurden nach NGF-Behandlung signifikant stärker wahrgenommen ($p < 0,005$, ANOVA und $p < 0,002$ Bonferroni-Post-hoc-Test, markiert mit Sternchen).

3.1.3 Schmerzen während einer kontinuierlichen Sinuswellenstimulation

Um eine Zunahme oder Abnahme der Schmerzentwicklung während einer kontinuierlichen 1-minütigen anhaltenden Sinuswellenstimulation zwischen NaCl und NGF behandelter Hautstellen besser vergleichen zu können, haben wir die Stromamplituden der 4-Hz-Sinuswellenimpulse an die durchschnittlichen individuellen Schmerz einschätzungen von NRS 2-3 angepasst, welche zuvor von den 2.5 Sekunden Sinuswellenstimuli an beiden Hautstellen ermittelt wurden (siehe oben, 3.1.1.). Wichtig dabei ist zu beachten, dass die Sinuswellenstromamplituden für die Stimulation der NaCl-Hautstelle auf 0,4 mA eingestellt werden musste, wohingegen

für die Stimulation der mit NGF behandelten Haut Stromamplituden von nur 0,2 mA benötigt wurden, um eine vergleichbare Schmerzintensität zu erreichen.

Im Allgemeinen war der Schmerz während der laufenden Sinuswellenstimulation nach etwa 10 Sekunden am stärksten und nahm danach über die 1-minütige Stimulationsperiode signifikant ab ($p < 0,0001$, ANOVA). Trotz der an der NGF-Stelle applizierten geringeren Stromintensität (s.o.) waren die Schmerzaufzeichnungen zwischen NGF- und NaCl-behandelten Hautstellen über 1 Minute signifikant unterschiedlich ($p < 0,05$, ANOVA). Insbesondere berichteten die Probanden über signifikant mehr Schmerzen während der ersten 20-sekündigen Stimulationsperiode an der NGF-Stelle (0,2 mA, NRS $2,8 \pm 0,2$) im Vergleich zu NaCl behandelter Haut (0,4 mA, NRS $2,1 \pm 0,3$, $p < 0,02$, Bonferroni-Test) am Tag 3 und noch deutlicher an Tag 7, obwohl die Reizintensität an der NGF-Stelle nur halb so hoch war. An den Tagen 1, 10 und 14 wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messorten festgestellt (Abbildung 7).

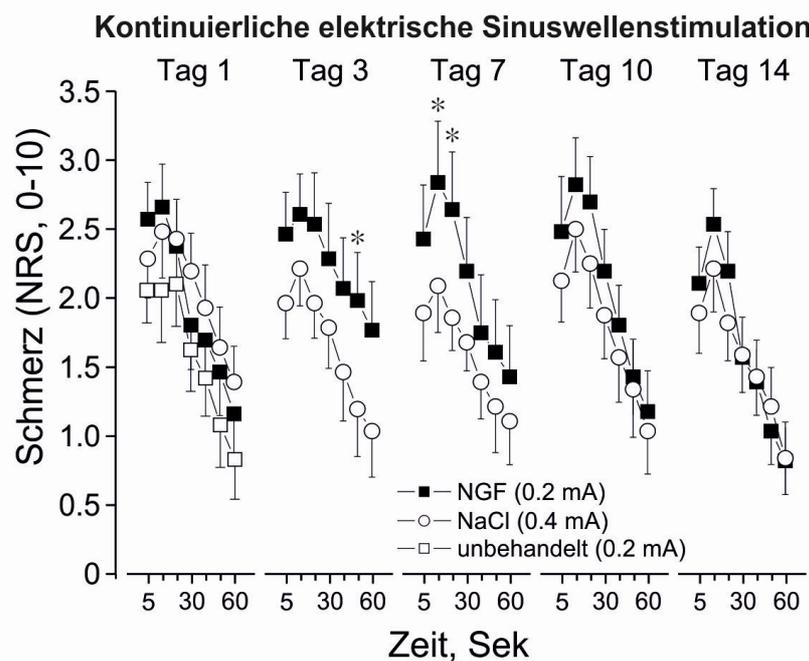


Abbildung 7 zeigt die Aufzeichnung der Schmerzen während einer kontinuierlichen sinusförmigen 4-Hz-Stimulation (60 Sekunden) der NGF-Stelle (ausgefüllte Quadrate) und der NaCl-Stelle (offene Kreise) an den Tagen 1 - 14 (von links nach rechts). Es ist zu beachten, dass die Stromamplituden für die Sinuswellenstimulation auf einen Schmerz-NRS-Wert von 2-3 eingestellt wurden (identifiziert während der zuvor applizierten Stimulation durch 10-Sinusimpulse (siehe Abbildung 4)). Dementsprechend wurden Stromintensitäten von 0,2 mA an die NGF-Stelle abgegeben, hingegen erhielt die NaCl-Stellen eine Stimulation von 0,4 mA. Die Schmerzintensität war zwischen den Behandlungsstellen (NGF vs. NaCl) während der 60-sekündigen Stimulationsperiode ($p < 0,05$, ANOVA) signifikant unterschiedlich, insbesondere während der 10-20-sekündigen Stimulation am Tag 7 nach der Behandlung (markiert durch Sternchen, $p < 0,02$, Bonferroni-Post-Hoc-Test). Für eine Beurteilung der NRS Angabe zwischen NGF- und NaCl-Haut bei unterschiedlichen Stromintensitäten sind die Schmerzbewertungen, die bei 0,2 mA von unbehandelter Haut aufgezeichnet wurden, zum Vergleich im linken Feld (Tag 1) dargestellt (offene Quadrate) und wurden während der Trainingseinheit aufgezeichnet.

3.2 Hochfrequente Stimulation mit elektrischen Rechteckpulsen

Transkutane elektrische Reize mit Rechteckimpulsen mit einer Pulsbreite von 0,5 ms wurden mit einer Frequenz von 4, 20 und 100 Hz für die Dauer von 1 s an die mit NGF und NaCl behandelten Hautstellen abgegeben. Die angelegte Stromstärke wurde auf Amplituden eingestellt, die bei 2 Hz einen Schmerz in Höhe von NRS 3 verursachten (siehe Methoden 2.5.1.) und betrug durchschnittlich $3 \pm 0,2$ mA an der NGF und $3,6 \pm 0,2$ mA an der NaCl behandelten Hautstelle. Der Schmerz war in Abhängigkeit der Reizfrequenz erhöht ($p < 0,0001$, ANOVA). Das Ausmaß der von den Probanden aufgezeichneten Schmerzempfindung war zwischen den NGF- und NaCl-Stellen signifikant unterschiedlich ($p < 0,0005$, ANOVA). Eine Bonferroni-Post-Hoc Test Analyse in Abhängigkeit der Tage der Messung konnte jedoch keine signifikante Interaktion zwischen NGF- und NaCl-Haut zu den Stimulationsfrequenzen identifizieren (n.s., ANOVA, Abbildung 8).

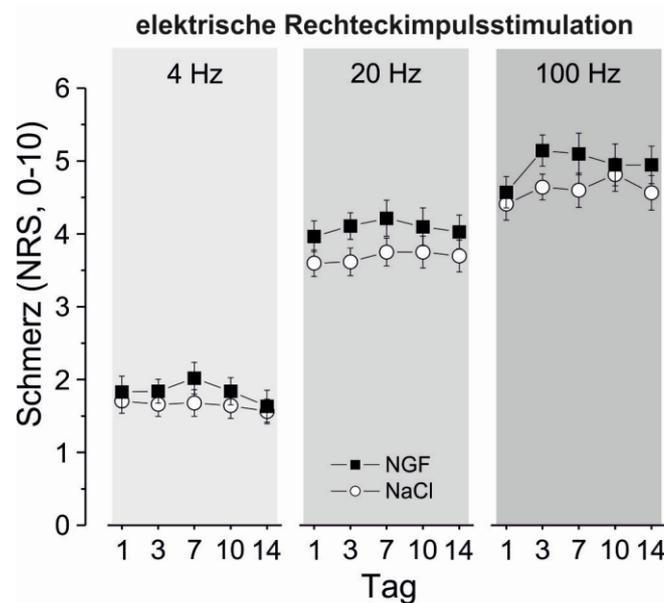


Abbildung 8 zeigt die von den Probanden empfundenen Schmerzen bei rechteckigen elektrischen Impulsen (0,5 ms Breite), die 1 Sekunde lang mit einer Frequenz von 4 - 20 - 100 Hz an NGF behandelte Haut (ausgefüllte Quadrate) und an NaCl-Stellen (offene Kreise) am Tag 1 - 14 nach der Behandlung abgegeben wurden. Die Schmerzbewertungen waren beim NGF, im Vergleich zur NaCl-Kontrollhaut, signifikant höher ($p < 0,0005$, ANOVA). Dennoch konnten die Unterschiede durch einen Bonferroni-Post-hoc-Tests (n.s.) nicht festgestellt werden.

3.3 Dynamisch-mechanisch induzierter Schmerz in NGF sensibilisierter Haut

Die mechanische Sensibilisierung wurde durch dynamische Prellreize bewertet, indem ein Projektil mit einer Geschwindigkeiten von 4 m / s und 8 m / s auf die mit NGF bzw. NaCl behandelten Hautstellen geschossen und die dabei empfundene Schmerzintensität erfasst wurde. Mechanisch hervorgerufene Schmerzen erhöhten sich mit zunehmender Geschwindigkeit des Projektils ($p < 0,0005$, ANOVA) und waren an der NGF-Stelle signifikant größer ($p < 0,0004$, ANOVA). Es zeigten sich ferner signifikante Unterschiede zwischen den Faktorgruppen "Geschwindigkeit" - "NGF" ($p < 0,00005$, ANOVA) und "Tag der Untersuchung" - "NGF" ($p < 0,03$, ANOVA, Abbildung 9).

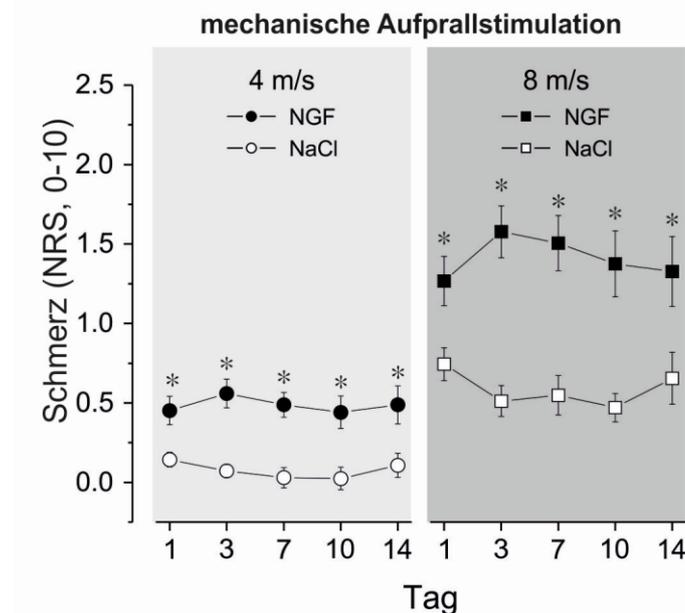


Abbildung 9 zeigt die Schmerzbewertungen (NRS, 0-10) nach dynamisch-mechanischen Prellreizen, die mit Geschwindigkeiten von 4 m / s (linkes Feld) und 8 m / s (rechtes Feld) angewendet wurden. Die Schmerzempfindungen waren an der NGF-Stelle (ausgefüllte Quadrate) im Vergleich zur NaCl-Haut (offene Kreise) an allen Tagen (1 – 14) der Bewertung signifikant erhöht (kombinierter Effekt (Interaktion) $p < 0,03$, ANOVA und $p < 0,02$ Scheffé-Post-hoc-Test, markiert mit Sternchen).

3.4 CO₂-Laser Hitzeschmerz bei NGF-sensibilisierter Haut

CO₂-Laserpulse von 60°C wurden in Intervallen von 20 ms bis einer Maximaldauer von 100 ms abgegeben. Die Hitzepulse lösten Schmerz mit stechendem Charakter aus. Die Schmerzintensität nahm signifikant mit längerer Pulsdauer zu ($p < 0,00001$, ANOVA). Der Schmerz war auch innerhalb der Faktorgruppen „NGF“ - „Tag der Bewertung“ ($p < 0,04$, ANOVA) und „NGF“ - „Pulsdauer“ ($p < 0,00005$, ANOVA) signifikant unterschiedlich. Die stärksten Schmerzreaktionen wurden an den NGF-Stellen am Tag 1 und am Tag 3 aufgezeichnet (durchschnittliches NRS $2,2 \pm 0,2$ für

80-100 ms) und blieben bis zum Tag 14 (durchschnittliches NRS $1,2 \pm 0,3$) im Vergleich zur NaCl-Stelle (durchschnittliches NRS $0,8 \pm 0,2$) signifikant erhöht ($p < 0,02$, Bonferroni-Post-hoc-Tests, Abbildung 10).

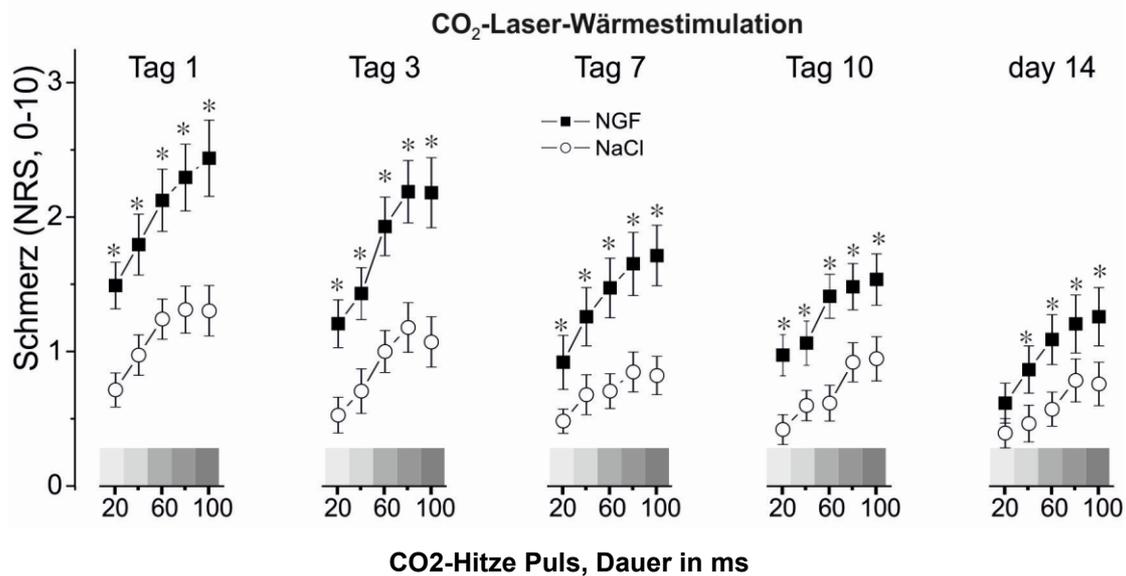


Abbildung 10 zeigt die Intensität empfundener Schmerzen (NRS, 0-10) bei CO₂-Laser Hitzestimulation von 60°C, die für eine Dauer von 20 bis 100 ms abgegeben wurden. Die Reize verursachten nach einer NGF-Behandlung (ausgefüllte Quadrate) signifikant mehr Schmerzen (NRS, 0 bis 10) gegenüber der NaCl behandelten Haut (offene Kreise) an den Tagen 1 bis 14 der Untersuchung (kombinierter Effekt $p < 0,04$, ANOVA).

3.5 Evozierte Schmerzen während der A-Faser-Leitungsblockade

In einer zweiten Untersuchungsreihe wurde unter Blutleere und Nervenkompression mittels Tourniquet-Abbindung des Oberarms die Beteiligung der Leitfähigkeit von dickmyelinisierten A-beta und wenig myelinisierten A-delta Nervenfasern bei NGF-Sensibilisierung untersucht.

3.5.1. Funktionelle Überprüfung einer A-Faser Blockade

Ein A-Faser-Leitungsblock wurde nach $29,5 \pm 4$ Minuten Ischämie erreicht. Zu diesem Zeitpunkt betrug die Hautoberflächentemperatur durchschnittlich 19 ± 2 °C (mit einem Infrarot-Thermometer (STProPlus, Raytek, Santa Cruz, USA) berührungslos erfasst). Die Wärmewahrnehmung (40°C) war bei allen Probanden noch vorhanden, jedoch war das Kältegefühl (18°C) aufgehoben. Der Schmerz bei elektrischen Rechteckimpulsen von 20 Hz mit Intensitäten oberhalb der Schmerz-Schwelle betrug zu Beginn der Ischämie $NRS 4 \pm 0,4$ und war nach 30 Minuten fast vollständig erloschen ($NRS 1 \pm 0,3$). Die Probanden berichteten eine dauerhafte Empfindung während der

elektrischen Pulse, die den pulsierenden Charakter vollständig verloren hatten. Dies wies auf einen erfolgreichen A-delta Faser Block hin, die hochfrequente Rechteckimpulse 1:1 auflösen können und dadurch über diese Faserklasse ihren pulsierenden Schmerzcharakter leiten. Diese Art der Testung erwies sich ideal geeignet, um die differentielle Nervenfasernblockade zu ermitteln.

3.5.2. Schmerzen bei elektrischer Stimulation mit Sinus- und Halb-Sinuswellen

Transkutane elektrische Sinuswellenstimuli mit 4 Hz, 0,4 mA Amplitude und 2,5 Sekunden Dauer verursachten im Vergleich zur NaCl-Behandlung während des A-Faserkompressionsblocks ($p < 0,05$, ANOVA) verstärkte Schmerzen an den NGF-Stellen. Insbesondere wurde der Schmerz an der NGF-Stelle im Vergleich zu NaCl behandelte Haut am Tag 3 ($p < 0,005$, Bonferroni-Test) und am Tag 7 ($p < 0,03$, Bonferroni-Test) signifikant stärker wahrgenommen. Im Vergleich zu normaler Haut ohne Ischämie (Kontrolle) reduzierte der A-Faser-Kompressionsblock die durch Sinuswellen verursachten Schmerzen signifikant an den NaCl-Stellen am Tag 7 ($p < 0,002$, Bonferroni-Test), jedoch nicht in der mit NGF behandelten Haut ($p > 0,1$, Bonferroni-Test) (Abbildung 11 A).

In ähnlicher Weise war der durch einzelne 500 ms Halbsinuswellenpulse induzierte Schmerz zwischen den Faktorgruppen "NGF-Behandlung" -- "Nervenfasernkompression" am Tag 3 ($p < 0,05$, ANOVA) und am Tag 7 ($p < 0,04$, ANOVA) signifikant unterschiedlich. Im Vergleich zur Kontrolle ohne Ischämie reduzierte auch hier der A-Faser-Kompressionsblock die durch Halb-Sinuswellen verursachten Schmerzen an der NGF-Hautstelle nicht signifikant (Nr., Bonferroni-Test, Abbildung 11 B).

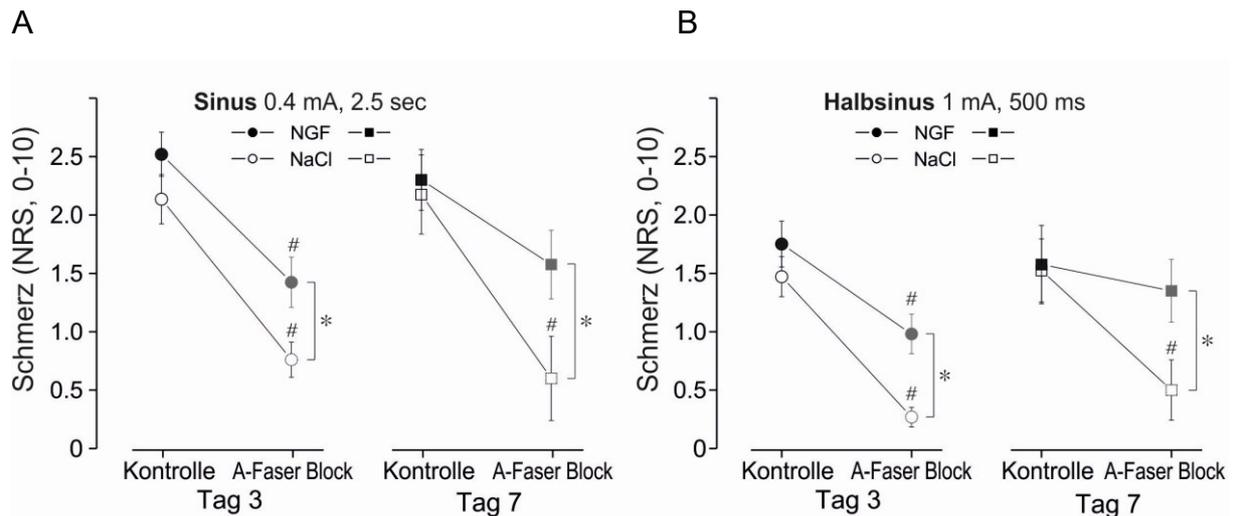


Abbildung 11 A zeigt die induzierten Schmerzen nach (A) Sinusströmen (4 Hz, 0,4 mA, 2,5 s) am Tag 3 (linkes Feld, n = 13) und am Tag 7 (rechtes Feld, n = 5) vor (Kontrollbedingung) und während der Blockierung der A-Fasern bei der mit NGF behandelten Haut (schwarze und graue Symbole) und der NaCl-Injektionsstellen (offene Symbole). Die Schmerzen waren an beiden Stellen während des Leitungsblocks am Tag 3 um etwa 50% reduziert (markiert durch Rautezeichen, $p < 0,0001$, ANOVA), dennoch war die Empfindung an der NGF-Stelle im Vergleich zur NaCl-Haut (markiert durch ein Sternchen, $p < 0,005$, Bonferroni-Test). In ähnlicher Weise unterschieden sich die Schmerzbewertungen signifikant zwischen der NGF- und der NaCl-Stelle in Abhängigkeit vom A-Faserleitungsblock am Tag 7 (kombinierter Effekt „Leitungsblock“ - „NGF“ $p < 0,05$, ANOVA), wobei stärkere Reaktionen an der NGF-Stelle während der Ischämie aufgezeichnet wurden (markiert mit einem Sternchen, $p < 0,03$, Bonferroni-Test).

Abbildung 11 B zeigt die Schmerzentwicklung bei halbförmigen Sinuswellenstimulationen (1 Puls über 500 ms, 1 mA), aufgezeichnet vor (unter Kontrollbedingung) und während des A-Faser-Leitungsblocks (signifikante Unterschiede, gekennzeichnet durch das Rautezeichen, $p < 0,005$, ANOVA). An die NGF-Stellen abgegebene Stimuli (schwarze und graue Symbole) wurden am Tag 3 (linkes Feld, n = 13) und am Tag 7 (rechtes Feld, n = 5) als schmerzhafter empfunden als an der NaCl-Injektionsstelle (offene Symbole) während des A-Faser-Leitungsblocks (markiert durch Sternchen, Tag 3 $p < 0,0005$ und Tag 7 $p < 0,03$, Bonferroni-Test).

3.5.3. Dynamisch-mechanisch induzierter Schmerz

Während des A-Faserkompressionsblocks waren die mechanischen Prellschmerzen an keinem der Versuchstage (Tag 3 $p > 0,05$, ANOVA, Tag 7 $p > 0,1$, ANOVA) verringert, jedoch berichteten die Probanden über signifikant mehr Schmerzen an der mit NGF behandelten Hautstelle im Vergleich zur NaCl behandelten Hautstelle (Tag 3 $p < 0,002$, Tag 7 $p < 0,05$, ANOVA). Mit 8 m/s abgegebene Stimuli wurden an den NGF-Stellen mit NRS $1,2 \pm 0,3$ und $1,7 \pm 0,6$ (Tag 3 und Tag 7) im Vergleich zu mit NaCl behandelte Haut (NRS $0,3 \pm 0,1$ und NRS $0,4 \pm 0,1$, Tag 3 $p < 0,0001$) schmerzhafter wahrgenommen (Bonferroni-Test, Tag 7 n.s.). Es wurden praktisch keine Schmerzen und somit keine signifikanten Unterschiede zwischen den NGF- und NaCl-Stellen bei einer Geschwindigkeit von 4 m/s während des A-Faser-Blocks registriert (Abbildung 12).

4 DISKUSSION

Die Hypothese, dass der Nervenwachstumsfaktor NGF eine entscheidende Rolle bei der Entstehung und Unterhaltung von chronisch entzündlichen Schmerzsyndromen spielen kann, wie z.B. bei Entzündung der Bauchspeicheldrüse ⁴⁶, bildete die Grundlage, in einer randomisierten klinischen Studie den schmerzlindernden Effekt von NGF-Antikörpern zu untersuchen. Nach systemischer Applikation von Tanezumab, einem monoklonalen Antikörper gegen NGF, konnte bei rheumatoider Arthritis eine deutliche Schmerzreduktion unter der Therapie aufgezeigt werden. Folglich wirkte sich die Hemmung der Signalübertragung von NGF schmerzlindernd bei chronisch entzündlichen Gelenkschmerzen aus ^{14, 47} und konnte auch bei chronischem Rückenschmerzen gezeigt werden ⁴⁸. In einer 2006 erschienenen Übersichtsarbeit beschreiben Pezet & McMahon ⁴⁹ die möglichen Auswirkungen einer neuronalen NGF-Applikation *in vitro* und *in vivo* auf die Schmerzmodulation. Die Autoren streichen dabei heraus, dass NGF zu einer Hochregulation der Expression von Neuropeptiden (z.B. Substanz P und CGRP), Rezeptoren (z.B. TRPV1 und P2X3) und Ionenkanälen (z.B. TTX-sensitive und TTX-resistente Natrium-Kanäle) führt und damit auch zu einer veränderten peripheren wie zentralen Schmerzverarbeitung beitragen kann ⁴⁹. Die Klärung der Frage der beteiligten spezifischen Nervenfaserklassen bei NGF-induzierter Nozizeptor-Sensibilisierung blieb jedoch in der Vergangenheit unbeantwortet. Daher untersuchten wir unter der Verwendung von elektrischen Sinus-Stimulationsprotokollen ^{39, 50} gezielt die Sensibilisierung von spezifischen C-Nozizeptorklassen nach intrakutaner NGF Applikation. Dabei erweiterten wir zu den langsam depolarisierenden elektrischen Sinus- und Halbsinus-Stimulationsmustern für die C-Nervenfaserklassen Stimulation unsere Untersuchungsmethoden mit hochfrequenten elektrischen Rechteckpulsen, mechanischen Prellreizen und CO₂-Laser-Hitzestimulation, die eine zusätzliche Aktivierung von A-Fasern und TRPV1-positiven Nervenfasern verursachen. Darüber hinaus verwendeten wir elektrisch und mechanisch induzierte C-Faser-Stimulationen unter A-Faserblockade (cuff Block). Bewertung und Analyse der von uns untersuchten Erregbarkeiten der C-Nozizeptoren nach NGF erlaubte uns eine Beurteilung von NGF als experimentelles Human-Modell zur Induktion einer Überempfindlichkeit bestimmter Nozizeptorklassen, mit Perspektive der mechanistischen Beteiligung dieses Sensibilisierungsprozesses bei chronischen Schmerzpatienten.

4.1 Langsam depolarisierende elektrische Stimulation der sensibilisierten Haut

4.1.1 Durch Sinuswellen verursachte Schmerzen und Axonreflex-Erythem

Eine Sinuswellenstimulation mit 4 Hz aktiviert „polymodale“ und „stumme“ Nozizeptoren³⁹. Bereits bekannt war, dass die Entwicklung des Axonreflex-Erythems von der Aktivierung "stummer" C-Nozizeptoren abhängt⁵¹ und eine erleichterte axonale Erregung dieser Fasern in Schweine- und Menschenhaut nach NGF Injektion beobachtet werden konnte^{32, 33}. Interessanterweise konnten wir in Gegenwart der NGF-Sensibilisierung bei der Verwendung von überschwelligen Rechteckimpulsen kein verändertes Axonreflex-Erythem vermessen. Dies ist in Einklang zu unseren früheren NGF-Studien^{20, 52}, aber dennoch erstaunlich; denn trotz massiver NGF-Sensibilisierung war anscheinend keine spezifische C-Faser Sensibilisierung durch Rechteckpulse experimentell nachweisbar. Im Gegensatz dazu sahen wir jedoch eine signifikante Zunahme der Erythemreaktion nach Sinus-Stimulation auf der NGF sensibilisierten Haut und im Vergleich zur Kontrollhaut. Die Stimulation durch Sinuswellen rief eine größere Erythemfläche an den NGF-Stellen hervor, was offenbar auf eine vermehrte Aktivierung von "stummen" C-Nozizeptoren zurückzuführen ist. Dieser Befund ist insbesondere erstaunlich, da somit erstmals gezeigt werden konnte, dass der langsame depolarisierende Stimulus bei 4 Hz offenbar besser geeignet ist, um NGF-induzierte axonale Erregbarkeitsveränderungen in "stummen" C-Nozizeptoren zu identifizieren. Ein für uns bemerkenswertes Ergebnis, da es in der Vergangenheit bisher nicht gelungen war, einen Sensibilisierungs-Effekt „stummer“ Nozizeptoren gezielt und mit sehr geringen Stimulus-Intensitäten nachzuweisen.

4.1.2 Halbsinuswellen induzierte Schmerzen

Es ist bereits bekannt, dass die intradermale Injektion von NGF die Erzeugung von Aktionspotenzialen als auch ihre Leitfähigkeit in Axonen erleichtert^{20, 33, 53}. Um jedoch gezielt die Aktionspotenzialentladung bevorzugt in Nozizeptoren zu induzieren, entwickelten wir in Anlehnung an Landmann et al.³⁸ eigens eine spezielle Elektrode (siehe Abb. 1) und ein „Halbsinus“-Stimulationsprofil, das spezifisch mechano-sensitive („polymodale“) C-Nozizeptoren depolarisiert. Wir fanden dabei heraus, dass ein einzelner halbsinusförmiger Stromreiz von 500 ms Dauer, einen „burst“ von Aktionspotenzialen provoziert³⁷. Die Anzahl an Aktionspotenzialen pro Halbsinus-Puls

nimmt mit der Stromstärke zu. Mehr Schmerz deutet somit auf eine höhere Entladungsfrequenz hin, wodurch im Habsinus-Protokoll eine evozierte und sozusagen „intrinsische“ Entladungsfrequenz erreicht wird. Unter NGF Einwirkung ist die maximal induzierte Aktionspotential-Frequenz in unserem Versuch deutlich erhöht, was als Zeichen einer axonalen Sensibilisierung zu deuten ist.

4.2 Erleichterung der Erzeugung von Aktionspotenzialen in C-Nozizeptoren durch NGF

4.2.1 Schmerzen während der Sinuswellenstimulation

Zuvor untersuchten wir im Versuch mittels Halbsinuswellen-Stimulation (siehe Kapitel 4.1.2) den Effekt von generierten Salven an Aktionspotenzialen in NGF-sensibilisierter Haut³⁷. In einem weiteren Versuch sollte der Effekt von Sinuswellen bestimmt werden, da bei einer 4 Hz Sinusstimulation jeweils nur 1 Aktionspotential pro Zyklus generiert und keine Salve von Aktionspotenzialen ausgelöst wird. Mittels sinuswelliger Stromreize wurde eine Schmerzzunahme mit Zunahme der applizierten Stromstärke generiert. Der Effekt unterschied sich jedoch zwischen NGF- und Kontrollhaut kaum. In einem zweiten Versuchsprotokoll untersuchten wir mittels kontinuierlicher 4-Hz-Sinuswellenstimulation die Entladung von Aktionspotenzialen über einen Zeitraum von einer Minute. Bei gesunden Probanden zeigte diese Untersuchungsmethode eine deutliche Schmerzhabituation über den Verlauf der gemessenen Minute³⁹. In NGF vorbehandelter Haut sollte jedoch untersucht werden, inwieweit mechano-sensitive und mechano-insensitive ("stumme") Nozizeptoren die Aufrechterhaltung und Weiterleitung von Aktionspotenzialen bei Dauerstimulation bewirken können. Eine Sinuswellenstimulation mit 4 Hz für die Dauer von 1 Minute wurde an den NGF-Stellen als deutlich schmerzhafter empfunden, insbesondere war dies an Tag 3 und Tag 7 nach erfolgter NGF-Injektion am deutlichsten von den Probanden vernommen worden. Hervorzuheben ist dabei ebenfalls, dass hierbei die Stromstärke vom Sinusprotokoll auf NRS 3 jeder Hautseite (NGF / NaCl) eingestellt wurde. Hierfür waren an den NGF-behandelten Hautstellen bereits 50% niedrigere Stromstärken erforderlich um die gleiche Schmerzintensität gegenüber der Kontrollhautstelle hervorzurufen. Dies liegt darin begründet, dass nach NGF Gabe eine niedrigere Entladungsschwelle für die Generierung von Aktionspotenzialen vorhanden ist. Bemerkenswerterweise konnte bei 1-minütiger Dauerstimulation eine deutlichere Schmerzzunahme an der NGF

behandelten Hautstelle, trotz angepasster Stimulus-Intensität, provoziert werden. Somit wurde trotz niedrigerer Reizstärke eine vermehrte Schmerzwahrnehmung auf der NGF-Seite beschrieben.

Ein signifikantes Merkmal der 1-minütigen 4-Hz-Sinus-Stimulation ist das deutliche Nachlassen der Schmerzempfindung bei anhaltender Stimulation bei gesunden Probanden. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zum gemessenen Zeitprofil von Patienten mit neuropathischen Schmerz³⁹ als auch Patienten mit chronischem Juckreiz⁴¹. Denn anders als beim Gesunden, welche durch Dauerstimulation eine Habituation der durch Sinuswellen induzierten Schmerzen vernehmen, führt bei anhaltender Stimulation von 1 Minute bei Patienten mit Neuropathie zu einer deutlichen Schmerzzunahme. Ein ähnlicher Effekt konnte bei Patienten mit atopischer Dermatitis gefunden werden⁴¹. In dieser Untersuchung an chronischen Juckreizpatienten sollte gezeigt werden, ob durch elektrische sinuswellenartige Reizmuster und der Aktivierung von C-Fasern ein Juckreiz generiert werden könnte. Klassischerweise wird Jucken durch Applikation von Histamin ausgelöst und experimentell untersucht⁵⁴. Da Juckreiz vermittelnde Nervenfasern, sogenannte Prurizeptoren, zu der Klasse der unmyelinisierten C-Fasern gehören, erhofften wir uns durch langanhaltende elektrische Sinusreize ein gezieltes Aktivieren von Prurizeptoren generieren zu können, das in der Vergangenheit nur wenige Arbeitsgruppen zeigen konnten^{55, 56}. Im Versuch an Patienten mit chronischem Juckreiz konnten wir nachweisen, dass etwa 50% der untersuchten Teilnehmer unter einer Dauerstimulation von Sinusreizen über 1 Minute in der Haut mit atopischem Ekzem mit einem Juckreiz reagierten. Die Habituation von Juckreiz blieb in der Untersuchten Hautstelle bei den Patienten ähnlich wie die Habituation von Schmerz bei neuropathischen Schmerzpatienten gleichermaßen aus⁴¹. Unsere vorliegenden Ergebnisse bekräftigen somit die Annahme, dass intradermale NGF-Injektionen als experimentelles menschliches Modell für chronisch-entzündliche Schmerzen abbilden lässt, hingegen aber die schmerzhafteste Neuropathie nicht gänzlich abdeckt. Das Bild einer schmerzhaften Neuropathie zeichnet sich unter anderem durch eine langanhaltende Übererregbarkeit der Nozizeptoren aus, welche zwar durch die Implikation unseres Modells ansatzweise induzierbar ist, jedoch ein Spontanschmerz allein durch eine NGF-Applikation im Versuch nicht reproduziert werden konnte. Mitunter konnten zwar spontane Entladungen bei Einzelfaserableitungen von Menschen in NGF behandelte Haut nach mechanischer Stimulation gemessen

werden⁵³, aber diese reichten nicht aus, um einen klaren Spontanschmerz zu induzieren. Um spontane Entladungen und dadurch subjektiv wahrnehmbare Schmerzen induzieren zu können, wurde in einem Versuch die Verwendung von NGF mit einer lokalen Entzündung durch Bestrahlung der Haut mittels UVB-Licht („Sonnenbrand“-Modell) kombiniert und untersucht²⁰. In diesem Experiment konnte dadurch ein supra-additiver Effekt auf nozizeptive Reize als auch ein Spontanschmerz bei den Probanden generiert werden. Die Kombination aus NGF-Sensibilisierung und UVB-induzierter Entzündung lieferten bei der Untersuchung der Schmerzmodalitäten Ergebnisse, welche dem Muster der Entstehung von Schmerz bei Patienten mit einer Arthritis ähnlich sind. Die experimentellen Befunde bekräftigten unsere Annahme, dass zur Entstehung und langandauernden Unterhaltung von chronisch entzündlichen Schmerzen eine Kombination aus Entzündungsreaktion und axonaler Sensibilisierung erforderlich ist. Damit einhergehend konnten klinische Studien mit alleiniger Therapie mittels monoklonaler Antikörper gegen NGF (anti-NGF) keine deutliche Besserung der Symptomatik neuropathischen Schmerzen bewirken⁵⁷, wohingegen dieselbe Therapie jedoch bei Patienten mit chronisch-entzündlichen Schmerzen eine deutliche Verbesserung auslöste¹⁴. Dabei wurden in einer randomisierten Studie 450 Patienten, die unter den Folgen einer Osteoarthritis litten, mit dem monoklonalen Antikörper Tanezumab® behandelt, welches die Bindung von NGF am Rezeptor (Tyrosinkinase A, trk A) hemmt. Die Studie belegte eine deutliche Schmerzreduktion bei den Patienten, wohingegen die Behandlung mit Fasenumab®, ebenfalls ein gegen NGF gerichteter monoklonaler Antikörper, bei Patienten mit Ischialgie keinen Effekt erzielen konnte¹⁶. Ein alleiniger therapeutischer Ansatz mittels anti-NGF-Antikörpern bei nicht-entzündlichen neuropathischen Schmerzen konnte bisher keine vielversprechenden Ergebnisse liefern. Diese klinischen Studien weisen darauf hin, dass NGF bei chronisch entzündlichen Prozessen eine zentrale Rolle bei der Sensibilisierung von Nervenfasern spielen könnte, und es wird von Interesse sein zu verfolgen, welche therapeutische Option bei der Behandlung von chronisch-entzündlichen Schmerzen in Zukunft anti-NGF einnimmt.

4.2.2 Hochfrequente elektrische Stimulation der NGF-sensibilisierten Haut

Die Schmerzempfindung ist frequenzkodiert, was bedeutet, dass höhere Frequenzen der Aktionspotenziale mehr Schmerz verursachen. Dies konnte in unserem Versuch mit Rechteckpulsen demonstriert werden. Je höher die Frequenzen bei der Applikation von Rechteckpulsen am Probanden eingestellt wurden, desto größer wurde der Schmerz vernommen. Dies galt gleichermaßen für die Kontrollhaut, als auch für die mit NGF behandelte Hautstelle. Wir erwarteten, dass die hochfrequente Aktionspotentialweiterleitung unter NGF Einwirkung verbessert und dadurch die Schmerzwahrnehmung deutlich höher ausfallen würde, jedoch lieferten unsere Ergebnisse keinen signifikanten Unterschied zwischen den NaCl- und NGF-Hautstellen. Dies ist wider Erwartung ein erstaunlicher Befund, da wir auf Grund der axonalen Sensibilisierung auch unter Applikation von hochfrequenten Rechteckpulsen deutlich mehr Schmerzen erwartet hätten. Durchgeführte Versuche in Somata der neuronalen Spinalganglien (DRG) demonstrierten, dass die maximale Frequenz der evozierten Entladungen unter depolarisierenden Spannungsschritten zwischen den verschiedenen Klassen von primär afferenten nozizeptiver Neuronen erheblich variiert⁵⁸. Somit konnte beispielsweise ein Strom mit einer Applikationsdauer von 500 ms und einer Frequenz von etwa 10 Hz in nicht-peptidergen Nozizeptoren eine Depolarisation induzieren. Demgegenüber konnte eine Depolarisation von mechano-sensitiven C-Fasern bei etwa 25 Hz mit niedriger Stromschwelle erzeugt werden⁵⁸. Die Autoren identifizierten in verschiedenen Populationen von sensorischen Afferenzen eine bestimmte Konstellation von spannungsabhängigen Ionenkanälen, die den einzigartigen Entladungseigenschaften, die bei der Depolarisation aufgezeichnet wurden, zugrunde liegen könnten⁵⁸. Die Resultate der Studie von Zheng et al. erlaubten die Rückschlüsse das langsame (500 ms) depolarisierende Spannungsänderungen eine Salve von Aktionspotenzialen zur Folge haben kann. Diese werden mit einer höheren Instantanfrequenz entladen als im Gegensatz zur Stimulation mit Rechteckpulsen und derselben Dauer von 500 ms. Nach NGF-Behandlung entstand subjektiv wesentlich mehr Schmerz bei hochfrequenter Stimulation mit Rechteckpulsen, was unter anderem durch eine erhöhte Aktionspotential-Frequenz durch die axonale Sensibilisierung zu erklären ist. Dies würde folglich eine bessere Generierung und effizientere Weiterleitung von Aktionspotenzialen erlauben, was unter Verwendung von hochfrequenten Rechteckpulsen eine deutliche Schmerzzunahme unter NGF Einwirkung generieren

und unsere Hypothese bestätigen würde. Wir fanden unter anderem heraus, dass auf eine Stimulation mit 1 Hz (500 ms Halbsinus) die Probanden vermehrt Schmerz an der NGF-Hautstelle berichteten und schließen daraus auf eine erhöhte Erregbarkeit von mechano-sensitiven (polymodalen) C-Nozizeptoren. Wie bereits in 4.2.1 erwähnt löst ein einzelner überschwelliger 500ms Halbsinus-Reiz eine Salve von Aktionspotenzialen in mechano-sensitiven Nozizeptoren aus ³⁷. Nach NGF-Injektion wurde nicht nur in polymodalen mechano-sensitiven Nozizeptoren (CM) sondern auch in mechano-unempfindlichen C-Nozizeptoren (CMI) eine erhöhte Fähigkeit zur Aufrechterhaltung der Erregungsleitung induziert. Dies konnte mit einer 4 Hz-Sinus-Stimulation im Versuch demonstriert werden, die sowohl CM als auch mechano-insensitive Nozizeptoren („stumme“, CMI) aktiviert (siehe 4.2.1., ³⁹) und nach NGF-Injektion vermehrt schmerzhaft empfunden wurde. Ebenso wurden auf der NGF behandelten Hautstelle eine größere Axonreflex vermittelte Flare-Reaktionen, ein Kardinalsymptom für die Aktivierung „stummer“ Nozizeptoren, gemessen. Dieser Befund ist insbesondere bemerkenswert, da bislang kein Unterschied in der Flare-Reaktion zwischen NGF- und Kontrollhaut nach überschwelliger schmerzhafter elektrischer Stimulation mittels Rechteckpuls (5-100 Hz) demonstriert werden konnte ²⁰. Die vorliegenden Ergebnisse liefern somit erstmals das Indiz für eine verstärkte Rekrutierung von mechanisch unempfindlichen („stummen“) C-Nozizeptoren nach NGF Sensibilisierung durch das hier angewendete Reizprofil der Sinuswellen-Stimulation. Welche Natriumkanäle jedoch spezifisch auf die Sensibilisierung durch NGF reagieren wird noch diskutiert. Besonderes Augenmerk liegt dabei auf dem TTX-sensitiven spannungsabhängigen Natriumkanal NaV1.7. Die Kinetik von NaV1.7 Kanälen zeichnet sich durch eine langsame Reaktivierung und langsames Eintreten in den geschlossen-inaktiven Zustand nach Depolarisation aus ⁵⁹. Dadurch können Nav1.7 Kanäle auf langsame Depolarisation mit langsam ansteigende Rampenströmen antworten ⁶⁰. Der Einfluss von NGF ist allerdings auch auf TTX-R (NaV1.8 und 1.9) Kanälen nachweisbar ⁶¹. Welche unterschiedlichen Natriumkanäle letztendlich bei Stimulationen von Sinus- und oder Halbsinusstimulation unter NGF-Sensibilisierung spezifisch reagieren, sollte in der Zukunft durch ergänzende Experimente noch näher untersucht werden. Bemerkenswert ist, dass elektrische Halbsinuswellen von niedriger Intensität auch niedrigschwellige mechano-sensitive (LTM) C-Fasern stimulierten ³⁷. LTM-Fasern spielen eine zentrale Rolle bei sozialen, interaktiven Berührungen und Wohlempfinden ⁶². Eine Beteiligung dieser LTM-Fasern

bei nozizeptiver Übererregbarkeit ist bisher noch unklar und wir nehmen an, dass C-LTM-Fasern weniger wahrscheinlich zu den verstärkten Schmerzreaktionen nach NGF beitragen. Es bleibt zu erwähnen, dass eine C-LTM Stimulation durch Halbsinusreize, auch bei nur gering-schmerzhaften Reizintensitäten, die mit LTM-Aktivierung assoziierten Empfindungen jedoch nicht auslöst³⁷. Bei neurologisch intakten Individuen erfolgt die Aktivierung von LTM durch leichte mechanische Stimulation immer zusammen mit der Rekrutierung von A-beta Fasern. Für die Grundlagenforschung könnte möglicherweise die LTM-Stimulation mittels Halbsinus bei niedriger Intensität geeignet sein, um selektiv diese nicht-nozizeptiven CLTM-Fasern ohne Beteiligung von A-beta-Fasern zu aktivieren. Dies könnte aufbauend zu unseren bereits gewonnen Erkenntnissen in der Zukunft auf kortikaler Ebene durch beispielsweise funktionelle Magnet-Resonanz-Bildgebung (fMRI) noch weiter differenziert untersucht werden.

4.2.3 Dynamisch-mechanischer Schmerz

Wir lieferten bisher durch unsere elektrische Halbsinus-Stimulation indirekt Hinweise darauf, dass NGF mechano-sensitive C-Nozizeptoren sensibilisiert und die Entladung höherer Aktionspotentialfrequenzen erleichtert. Ein direkter Nachweis ist gegebenenfalls durch einen mechanischen Prellreiz möglich. Dieser einzelne mechanische Impuls löst eine Salve von Aktionspotenzialen in Nozizeptoren aus^{18, 63}. Je stärker der Impuls, desto höher die Frequenz der Aktionspotenziale in Nozizeptoren. Dadurch entsteht subjektiv mehr Empfindungsschmerz, somit ist die Schmerzhaftigkeit direkt abhängig von der Entladungsrate der elektrischen Impulse. Ein durch Aufprall induzierter Schmerz ist bei lokaler Entzündung verstärkt. Nach intrakutaner Injektion von NGF entsteht eine stark ausgeprägte Sensitivierung gegenüber Prellreize, ähnlich wie bei einer kutanen Entzündungsreaktion. In Versuchen, bei der durch temporäre Kompression des N. radialis eine Nervenblockade erzeugt wurde, konnte gezeigt werden, dass hyperalgetischer Prellschmerz von C-Fasern vermittelt wird⁶³. Die in der vorliegenden Studie von den Probanden signifikant höher angegebenen NRS-Werte auf Prellreize in der mit NGF behandelten Hautstelle belegen eine durch das Neurotrophin vermittelte C-Fasersensibilisierung. Die höher frequente Aktionspotentialgenerierung steht dabei für eine erleichterte axonale Erregbarkeit unter NGF Einwirkung. Neben dieser „axonalen Sensibilisierung“ liefert

ein alternativer Erklärungsansatz zur vermehrten Sensibilisierung auf Prellreize der Signalweg über PIEZO2, ein mechanisch aktivierbarer Ionen-Kanal der mit trkA positiven Neuronen eine Co-expression aufweist⁶⁴. Es konnte gezeigt werden, dass ein knock-down von PIEZO2 bei Ratten zu einer signifikanten Reduzierung der NGF induzierten Sensibilisierung von A-delta Knochenafferenzen führt⁶⁴. Interessanterweise konnte zuletzt, nach der Identifizierung von „stummen“ Nozizeptoren in tief-somatishem Gewebe, welche PIEZO2 Kanäle exprimieren, nachgewiesen werden, dass diese nach einer NGF Behandlung vehement auf mechanische Reize reagieren³¹. Somit scheint die mechanische Übererregbarkeit auf Prellreize unter der Einwirkung von NGF auf ein Zusammenwirken axonaler Sensibilisierung „polymodaler“ Fasern als auch auf der Ebene sensorischer Endigungen durch Sensibilisierung von Transduktionskanälen (z.B. PIEZO2) und einer zusätzlichen Rekrutierung „stummer“ C-Fasern zu sein. Einzelfaser Ableitungen am Schwein demonstrierten, dass eine gesteigerte Erregbarkeit stummer Nozizeptoren unter NGF-Einwirkung verzeichnet werden konnte und zu einer mechanischen Sensibilisierung der C-Fasern führte. Die hierdurch erfolgte axonale Sensibilisierung führte ebenfalls zu Spontanaktivitäten der Fasern⁵³. Ferner konnte verzeichnet werden, dass eine Ausdehnung der rezeptiven Felder mechanisch empfindlicher Fasern zur Hyperalgesie beitragen. Eine Zunahme der Nervenfaserdichte wurde hier jedoch nicht verzeichnet, so dass vielmehr sowohl die zusätzliche Rekrutierung stummer Nozizeptoren³², als auch die maximale Steigerung der Aktionspotential-Entladungsfrequenz unter NGF-Einwirkung⁴⁰ die erhöhte Schmerz Wahrnehmung begünstigt. Unter Verwendung von Mikroneurographie an menschlichen Nervenfasern konnte gezeigt werden, dass stumme Nozizeptoren mechanisch erregbar werden und unter der Einwirkung von NGF zu spontanen Entladungen fähig sind³³.

4.3 Sensibilisierte Signaltransduktion

4.3.1 CO₂-Laser-Hitzeschmerz bei NGF-sensibilisierter Haut

Sehr oberflächliche Hitzereize wurden mit einem rückkopplungsgesteuerten CO₂-Laser mit einer Temperatur von 60°C und für eine Dauer von 20 - 100 ms appliziert. Je länger die Hitze-Pulse einwirken, desto tiefer wird das Eindringen der Wärme in die Haut ermöglicht⁶⁵. Sowohl A-Delta- als auch C-Nozizeptoren reagieren auf die Stimuli von Laser induzierter Hitze^{66, 67} mit Aktivierungsschwellen von etwa 47°C (A-delta

Fasern) bzw. 40°C (C-Fasern) bei Wärmeimpulsen von 50 ms Dauer und mit einer ansteigenden Hitze-Rampe von 10 ms appliziert ⁶⁸. Wie aus vorangegangenen Untersuchungen an Einzelfaserableitungen anzunehmen ist, hat in unserem Versuchsetting der CO₂-Laser Hitze-Stimulus beide Nozizeptor-Klassen aktiviert. Experimente an Affen haben gezeigt, dass die schnelle Erwärmung durch einen Laserpuls Salven von etwa 70 Hz in C-Nozizeptoren hervorruft ⁶⁷. In NGF behandelte Haut beobachteten wir einen signifikant stärkeren Reizdauer-Reaktions-Effekt bei den Probanden im Vergleich zur NaCl behandelten Haut über die gesamten 14 Tage Untersuchungsdauer. Die akute Hitzesensibilisierung durch NGF wird verursacht durch eine verstärkte Expression und Phosphorylierung des Hitze- (und Säure-) empfindlichen Ionenkanals TRPV1 ⁶⁹⁻⁷¹, einem Kanal der für die Entstehung und Aufrechterhaltung einer Hitzehyperalgesie wesentlich ist ⁷². Zusätzlich zu den verstärkten Mechanismen einer Hitzesignaltransduktion lässt die Zunahme der Schmerzempfindung der Probanden auf der NGF-Seite auch auf einen niedrigeren Hitze-Schwellenwert zur Generierung von Aktionspotenzialen schließen. In der Tat war der Anstieg der Schmerzempfindung bei stärkeren, d. h. länger anhaltenden Wärmereizen (Abb. 2C) am NGF-Injektionsort deutlich steiler und führte bei den Probanden besonders an den Tagen 1 und 3 zu maximalen NRS Werten. Selbst bei sehr kurzen Stimulationen durch den Laser, wodurch sehr oberflächliche Hitzereize lediglich die oberste Hautschicht penetrierten, hatte diese Stimulation einen bereits signifikant höheren Schmerzreiz zur Folge. Dies erklärt mitunter eine erleichterte Erzeugung von Aktionspotenzialen in hitzeempfindlichen C-Nozizeptoren mit höheren Entladungsfrequenzen und steht in Einklang zu den zuvor in 4.2.1 diskutierten Reaktionen auf langsame depolarisierende 500 ms-Halbsinuswellen-Reize.

4.4 Evozierte Schmerzen während der A-Faser-Leitungsblockade

4.4.1 Leitungsblock der A-Fasern

Um den Beitrag der durch NGF sensibilisierten C-Nozizeptoren zu untersuchen, wurde eine A-Faser-Leitungsblockade durchgeführt. Um das möglichst vollständige Fehlen einer A-delta Nozizeptor Nervenfasern Beteiligung nachzuweisen, wurde die kontrollierte Anwendung einer Nervenblockade mittels einer Druck-Manschette am Arm durchgeführt. Ähnlich wie bei der intravenösen Regionalanästhesie (IVRA) wurde

dabei der venöse Abfluss und der arterielle Zufluss mit einer Manschette unterbunden. Aufgrund der kurzen Dauer der Leitungsblockade wurde kein i.v. Lokalanästhetikum benötigt, wie es bei der Methode des Bier Block-Verfahren standardisiert erforderlich ist. Mit dem Verfahren der IVRA ist es möglich, für mehrere Stunden das zu operierende Gebiet der Extremität zu betäuben. Diese schonende Methode wird vor allem für ambulante Operationen gewählt, bei der eine Rückkehr der Funktionalität und Sensibilität schnell und kontrolliert erzielt werden kann. Wir bedienten uns für unser Experiment des Mechanismus zur Erzeugung einer kontrollierten Ischämie und damit einhergehend kurzfristig erzeugter sensiblen Ausfälle. Dieses Vorgehen erlaubte uns, einen kontrollierten und zeitlich engmaschig dokumentierten Ausfall primär sensorischer Afferenzen an Hand des Myelinisierungsgrades der jeweiligen Nervenfaserklassen zu untersuchen. Wie bereits erwähnt war eine intravenöse Applikation eines Anästhetikums nicht erforderlich und hätte zudem zu einem unspezifischen Ausfall aller Nervenfasern geführt, welcher das Ergebnis deutlich verfälscht hätte. Das Verfahren wurde unter anderem wegen des geringen Risikoprofils gewählt, zumal es sich seit vielen Jahren als gängiges, sicheres, als auch gut untersuchtes Verfahren der Anästhesie bewährt hat ⁴³. Unsere Ischämiezeit von maximal 50 Minuten wurde von allen Probanden gut toleriert. Frühere Untersuchungen zeigten, dass Ischämien von 2 – 4 Stunden einer Extremität toleriert werden können, ohne dass mit irreversiblen Schäden zu rechnen wäre oder, als schlimmste Komplikationsform, ein Reperfusionssyndrom zu befürchten wäre. In unserem Versuch unterschritten wir deutlich die Zeit, in der es zu Ischämie bedingten Komplikationen kommen könnte und hielten eine große zeitliche Sicherheitstoleranz ein ⁴³. Unter Abwägung von jeglichen Sicherheitsaspekten und der Praktikabilität der Durchführung unserer Untersuchungen wählten wir diese Methode gezielt aus und entschieden uns bewusst gegen das Verfahren eines oberflächlichen Nervus radialis Block. Hierbei wird durch das Ausüben mit gezielten direkt auf den Nerv gerichteten und durch ein Gewicht ausgeübten Drücken eine Leitungsblockade erzeugt. Durch die Quetschung kann es jedoch zu irreversiblen Schäden direkt am Nerv kommen, weshalb von dieser Methode in der vorliegenden Arbeit Abstand genommen wurde. Erschwerend kommt hinzu, dass der kutane sensibel innervierte Bereich, welcher bei der Blockade des Radialsnerv für die Untersuchung zur Messung in Frage käme, für unsere Untersuchungen, insbesondere der Axon-Reflex Erythem Bestimmung mittels Laser Doppler, grenzwertig klein gewesen wäre. Die Applikationsorte von NGF und

NaCl würden im Untersuchungsgebiet der Hautstellen nahe beieinanderliegen und die psycho-physische Diskriminierung der jeweiligen Stellen erschweren oder teils unmöglich machen. Auch eine Randomisierung der zu untersuchenden Hautareale, die bei der Applikation von Reizmustern gewählt wurde, könnte hier verzerrt werden, da durch die Nervenfaserdichte der Hand im Vergleich zum distalen Unterarm die Zweipunkt Diskriminierung und Wahrnehmung des Probanden beeinflusst werden könnte. Sensorische Überschneidungen der jeweiligen Injektionsorte konnte durch die von uns gewählte Methode (Bier-Block des Unterarmes) und der somit größeren Hautareale, welche uns während der Untersuchung zur Verfügung standen, gänzlich vermieden werden. Der Ausfall der Nervenfasern durch die Kompressionsblockade erfolgte schnell und gleichmäßig, sodass in Abständen von Minuten bereits Veränderungen der Wahrnehmung bzw. Sensibilisierung registriert werden konnten. Die Leitungsblockade von A-delta Fasern wurde durch den Verlust der Kälteempfindung signalisiert und durch das Fehlen der Empfindung auf transkutane überschwellige elektrische Rechteckimpulse von 20 Hz bestätigt und validiert. Insbesondere diese Methode der hochfrequenten elektrischen Stimulation mit Rechteckpulsen erwies sich als einfacher Test zur Bestimmung der A-Faser-Leitungsblockade. Als eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung des A-Faser-Leitungsblocks hat sich die Erfassung der Latenzen in der Reaktionszeit nach Stimulation etabliert ^{73, 74}. Dieses Verfahren ist jedoch mit einem deutlich höheren experimentellen Aufwand und möglicher subjektiver Streuung verbunden. Durch unsere Ergebnisse der Überprüfung einer A-Faser Leitungsblockade können wir dieses Testverfahren der hochfrequenten elektrischen Stimulation für zukünftige Studien zur Nervenfasersblockade durch Manschetten-Druck empfehlen.

4.4.2 Schmerzen bei elektrischer Stimulation mit Sinus- und Halb-Sinuswellen

Sinus- und Halbsinus förmige Stromreize werden in normaler Haut unter der A-Faser Blockade reduziert wahrgenommen. Wohingegen an der mit NGF behandelten Hautstelle dies unter A-Faserblock eine etwas geringere Schmerz-Reduzierung bei 4 Hz- und 1 Hz zur Folge hatte. Im Vergleich zur Kontrollhaut wurde signifikant mehr Schmerz an den NGF-Hautstellen während des gesamten A-Faserblocks vernommen. Es ist möglich, dass die nozizeptive Signalübertragung durch die Temperaturveränderungen der Extremität, die mit der Blutleere einhergehen,

beeinflusst wird. Die Weiterleitung von Aktionspotenzialen ist temperaturabhängig und Kälte reduziert die axonale Leitungsgeschwindigkeit, möglicherweise durch eine langsamere Ionenkanal-Kinetik bei niedrigen Temperaturen bedingt. Das Abkühlen der untersuchten Extremität während des A-Faser Blocks würde demnach auch zu einer Dispersion der ohnehin langsamen C-Faser Weiterleitung führen. Dies hat zur Folge, dass die spinal eintreffenden Aktionspotenziale einzelner C-Fasern weniger synchronisiert auf Rückenmarksebene übertragen werden und folglich zu geringeren Amplituden postsynaptisch erregender Potentiale (EPSP) führt. Dies bedingt letztlich eine geringer eingeschätzte Schmerzintensität oder führt dazu, dass die eintreffenden Signale als diffuser Schmerz vernommen werden. Dieser Effekt ist unter NGF Einwirkung weniger stark gehemmt worden. Interessanterweise wurde unter A-Faser Blockade bei elektrischer Stimulation der NGF sensibilisierten Haut an Tag 7 keine signifikante Reduktion der Schmerzen registriert. Eine mögliche Ursache für diese Beobachtung könnte darin liegen, dass insbesondere C-Nozizeptoren durch NGF sensibilisiert und durch unser elektrisches Stimulationsmuster bevorzugt stimuliert werden. Ebenso denkbar wäre, dass die Verbesserung der axonalen Leitfähigkeit unmyelinisierter Afferenzen nach NGF ⁴⁰ einen kompensatorischen Effekt der zuvor geschilderten Dispersion unter A-Faser Blockade bewirkt und demzufolge die Schmerzwahrnehmung im Vergleich zur Kontrollhaut weniger deutlich reduziert wird. Dies entspräche einer effizienteren C-Faser Rekrutierung unter NGF und somit einer besseren Synchronisation der Aktionspotenziale trotz Abkühlung beim ischämischen A-Faser Block.

4.4.3 Dynamisch-mechanische Aufprallstimulation

Interessanterweise war der Schmerz bei mechanischer Prell-Einwirkungen während der A-Faser-Blockade nicht signifikant verringert. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollhaut wurde auch unter A-Faser Leitungsblockade signifikant mehr Prell-Schmerz an den NGF behandelten Hautstellen vernommen. In früheren Studien, bei denen eine differenzierte Nervenblockade des oberflächlichen Radialnervs bei Probanden durchgeführt wurde, bestätigte sich, dass Schmerzen durch mechanische Einwirkungen hauptsächlich durch C-Fasern vermittelt werden ⁷⁵. Dennoch führte der Verlust der Reizleitung in A-delta Nozizeptoren mitunter zu einer marginalen Reduzierung des Prellschmerzes, welcher subjektiv als dumpfer wahrgenommen

wurde. Eine geringe Beteiligung von A-delta Fasern bei der Vermittlung von Prellschmerz kann demnach nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Ein weiterer Aspekt ist, dass durch den starken mechanischen Reiz auch Nervenendigungen aktiviert werden die in tieferen Hautschichten lokalisiert liegen. Diese Hautschichten sind etwas wärmer als diejenigen der oberflächlichen Haut. Zusammen mit den Befunden, dass niedrigere Temperaturen die Erregbarkeit von nicht-myelinisierten Nervenfasern *ex-vivo* erhöhen ⁷⁶, könnte eine zusätzliche Rekrutierung tiefer gelegener Nozizeptoren durch starke mechanische Prellreize zu einer gesteigerten Schmerzwahrnehmung beitragen. Während der Ischämie-Zeit könnte zudem eine physiologische Zunahme der kutanen, sympathischen Nervenaktivität erwartet werden. Eine frühere Studie konnte jedoch zeigen, dass sympathische Aktivität die akute Erregbarkeit von nicht-myelinisierten (polymodalen) Nozizeptoren bei menschlichen Probanden unverändert lässt ⁷⁷. In der vorliegenden Studie wurde jedoch die Sympathikus-Aktivität jedoch nicht erfasst. Somit schlussfolgern wir anhand unserer Ergebnisse der Aufprallstimulation der Haut, zusammen mit den Ergebnissen aus der elektrischen Stimulation mit Sinus- und Halbsinuspulsen, dass unter Cuff-Block induzierter A-Faser Leitungsblockade eine spezifische C-Faser Sensibilisierung nach Applikation des Neurotrophins NGF nachweisbar wird.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Nervenwachstumsfaktor (NGF) spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung und Unterhaltung von chronischen Entzündungsschmerzen. Auch eine Beteiligung zur Sensibilisierung von Prurizeptoren unter NGF Beteiligung wird diskutiert. Ergänzend zu der hier diskutierten Fragestellung wurde von uns in Studien an Patienten mit atopischer Dermatitis die axonale Sensibilisierung von unmyelinisierten Afferenzen untersucht. Dabei konnte demonstriert werden, dass eine langandauernde elektrische Sinus-Stimulation der ekzematösen Haut einen nicht-histaminergen Juckreiz provoziert.

Die kutane Applikation von NGF (intradermale Injektion von 1 µg) löst bei gesunden Menschen eine lokale und über Wochen andauernde mechanische und thermische Hyperalgesie sowie eine elektrische Übererregbarkeit von Nozizeptoren aus. Welche Nervenfaserkategorie spezifisch unter der Einwirkung von NGF mit einer Hypersensibilisierung reagiert, konnte bisher jedoch bei gesunden Probanden noch nicht eindeutig aufgezeigt werden. Um diese Fragestellung zu klären, untersuchten wir den Beitrag von A-delta Fasern und spezifische C-Nozizeptor Untergruppen in NGF-sensibilisierter Haut an den Tagen 1 bis 14 nach intrakutaner NGF-Injektion durch Verwendung langsam depolarisierender transkutaner elektrischer Stromreize, CO₂-Laser Hitzereize, mechanischer Prellreize, und zusätzlich an den Tagen 3 und 7 das elektrische und mechanische Sensibilisierungsmuster während eines A-Faser-Kompressionsblocks. Bei der elektrischen Stimulation verwendeten wir langsam depolarisierende (halbsinus- und sinus-förmige) Stromreize, die eine bevorzugte Aktivierung von „polymodalen“ und „stummen“ C-Nozizeptoren bewirken. Generell waren die Schmerzbewertungen bei elektrischen, CO₂-Wärme- und mechanischen Stoßreizen an den NGF-Injektionsstellen um mehr als 30% erhöht ($p < 0,0005$, ANOVA). Erstmals konnte gezeigt werden, dass das durch die elektrische Stimulation hervorgerufene Axonreflex-Erythem an den NGF-Injektionsstellen signifikant größer war ($p < 0,02$, ANOVA). Die Ausbildung eines Axonreflex-Erythems ist abhängig von der Aktivierung „stummer“ C-Nozizeptoren und somit ein indirektes Indiz für die Sensitivierung dieser speziellen Nozizeptor-Kategorie durch NGF. Applikation von elektrischen Sinuspulsen aktiviert neben „polymodalen“ Nozizeptoren auch „stumme“ C-Fasern und bewirkte in NGF-behandelter Haut deutlich mehr Schmerz. Die Habituation des Schmerzes unter kontinuierlicher (1 Minute) sinusförmiger

Stimulation, ein Kardinalsymptom gesunder Probanden (im Gegensatz zu chronischen Schmerz- und Juckreiz-Patienten) war an der NGF behandelten Hautstelle weniger deutlich ausgeprägt ($p < 0,05$, ANOVA). Die Schmerzbewertungen bei elektrischen sinusförmigen und mechanischen Prellreizen während der A-Faser-Leitungsblockade waren an den NGF-Hautstellen, im Vergleich zu NaCl-behandelter Haut, signifikant erhöht ($p < 0,05$, ANOVA).

Die Befunde der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die NGF-induzierte Sensibilisierung der menschlichen Haut auf elektrische und mechanische Reize primär durch C-Nozizeptoren und nur in geringem Maße durch A-delta Fasern gesteuert wird. Die weniger stark ausgeprägte Schmerz-Habituation während kontinuierlicher sinusförmiger Stimulation deutet darauf hin, dass NGF die axonale Erzeugung von Aktionspotenzialen und deren Weiterleitung in primären afferenten unmyelinisierten Nozizeptoren beim Menschen erleichtert. Weiterführende klinische Studien, bei denen dieses sinusförmige elektrische Stimulationsprofil zur Untersuchung von Patienten mit chronisch-entzündlichen Schmerzen verwendet wird, könnten eine diagnostische Bewertung der Funktionalität von spezifischen C-Nozizeptoren der Haut und ihrer mutmaßlichen Erregbarkeitsänderungen unter pathologischen Bedingungen ermöglichen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

References

1. Janig, W, Habler, HJ: Neurophysiological analysis of target-related sympathetic pathways--from animal to human: similarities and differences. *Acta Physiol Scand*, 177: 255-274, 2003.
2. Mano, T, Iwase, S, Toma, S: Microneurography as a tool in clinical neurophysiology to investigate peripheral neural traffic in humans. *Clin Neurophysiol*, 117: 2357-2384, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.clinph.2006.06.002>
3. Grant, G: The 1932 and 1944 Nobel Prizes in physiology or medicine: rewards for ground-breaking studies in neurophysiology. *J Hist Neurosci*, 15: 341-357, 2006. <https://doi.org/10.1080/09647040600638981>
4. Lowery, LA, Van Vactor, D: The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 332-343, 2009. <https://doi.org/10.1038/nrm2679>
5. Reuss, B, von Bohlen und Halbach, O: Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res*, 313: 139-157, 2003. <https://doi.org/10.1007/s00441-003-0756-7>
6. Rita Levi-Montalcini: the discovery of nerve growth factor and modern neurobiology Luigi Aloe 2004
7. Nudo, RJ: Recovery after brain injury: mechanisms and principles. *Front Hum Neurosci*, 7: 887, 2013. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2013.00887>
8. Remiche, G, Kadhim, H, Maris, C, Mavroudakos, N: [Peripheral neuropathies, from diagnosis to treatment, review of the literature and lessons from the local experience]. *Rev Med Brux*, 34: 211-220, 2013.
9. Löscher, W.N., Igseder, B. Polyneuropathie im Alter. *Internist* 61, 254-260 (2020).
10. Hanewinkel, R, Ikram, MA, Van Doorn, PA: Peripheral neuropathies. *Handb Clin Neurol*, 138: 263-282, 2016. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-802973-2.00015-x>
11. Boulton, AJ: Diabetic neuropathy and foot complications. *Handb Clin Neurol*, 126: 97-107, 2014. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-53480-4.00008-4>
12. Apfel SC, Kessler JA, Adornato BT, Litchy WJ, Sanders C, Rask CA, et al. Recombinant human nerve growth factor in the treatment of diabetic polyneuropathy. *Neurology*.1998;51(3) 695-702.
13. Apfel, SC, Schwartz, S, Adornato, BT, Freeman, R, Biton, V, Rendell, M, Vinik, A, Giuliani, M, Stevens, JC, Barbano, R, Dyck, PJ: Efficacy and safety of recombinant human nerve growth factor in patients with diabetic polyneuropathy: A randomized controlled trial. rhNGF Clinical Investigator Group. *JAMA*, 284: 2215-2221, 2000.
14. Lane, NE, Schnitzer, TJ, Birbara, CA, Mokhtarani, M, Shelton, DL, Smith, MD, Brown, MT: Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee. *NEnglJMed*, 363: 1521-1531, 2010.
15. Dietz, BW, Nakamura, MC, Bell, MT, Lane, NE: Targeting Nerve Growth Factor for Pain Management in Osteoarthritis-Clinical Efficacy and Safety. *Rheum Dis Clin North Am*, 47: 181-195, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.rdc.2020.12.003>
16. Tiseo, PJ, Kivitz, AJ, Ervin, JE, Ren, H, Mellis, SJ: Fasinumab (REGN475), an Antibody against Nerve Growth Factor for the Treatment of Pain: Results from a Double-Blind, Placebo-Controlled Exploratory Study in Osteoarthritis of the Knee. *Pain*, 155: 1254-1252, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.03.018>

17. Sanga, P, Katz, N, Polverejan, E, Wang, S, Kelly, KM, Haeussler, J, Thippawong, J: Efficacy, Safety, and Tolerability of Fulranumab, an Anti-Nerve Growth Factor Antibody, in Treatment of Patients with Moderate to Severe Osteoarthritis Pain. *Pain*, 154: 1910-1919, 2013.
18. Kohlloffel, LU, Koltzenburg, M, Handwerker, HO: A novel technique for the evaluation of mechanical pain and hyperalgesia. *Pain*, 46: 81-87, 1991.
19. Rukwied, R, Weinkauff, B, Main, M, Obreja, O, Schmelz, M: Inflammation meets sensitization - an explanation for spontaneous nociceptor activity? *Pain*, 154: 2707-2714, 2013.
20. Rukwied, R, Weinkauff, B, Main, M, Obreja, O, Schmelz, M: Axonal hyperexcitability after combined NGF sensitization and UV-B inflammation in humans. *EurJPain*, 18: 785-793, 2014.
21. White, JP, Cibelli, M, Rei Fidalgo, A, Paule, CC, Noormohamed, F, Urban, L, Maze, M, Nagy, I: Role of transient receptor potential and acid-sensing ion channels in peripheral inflammatory pain. *Anesthesiology*, 112: 729-741, 2010. <https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e3181ca3179>
22. Dhaka, A, Uzzell, V, Dubin, AE, Mathur, J, Petrus, M, Bandell, M, Patapoutian, A: TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci*, 29: 153-158, 2009. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.4901-08.2009>
23. Peier, AM, Moqrich, A, Hergarden, AC, Reeve, AJ, Andersson, DA, Story, GM, Earley, TJ, Dragoni, I, McIntyre, P, Bevan, S, Patapoutian, A: A TRP channel that senses cold stimuli and menthol. *Cell*, 108: 705-715, 2002. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00652-9)
24. Weinkauff, B, Deising, S, Obreja, O, Hoheisel, U, Mense, S, Schmelz, M, Rukwied, R: Comparison of NGF-induced sensitization pattern in lumbar and tibial muscle and fascia. *Muscle Nerve*, 52: 265-272, 2015. <https://doi.org/10.1002/mus.24537>
25. Deising, S, Weinkauff, B, Blunk, J, Obreja, O, Schmelz, M, Rukwied, R: NGF-evoked sensitization of muscle fascia nociceptors in humans. *Pain*, 153: 1673-1679, 2012.
26. Gerber, RK, Nie, H, Arendt-Nielsen, L, Curatolo, M, Graven-Nielsen, T: Local pain and spreading hyperalgesia induced by intramuscular injection of nerve growth factor are not reduced by local anesthesia of the muscle. *ClinJPain*, 27: 240-247, 2011.
27. Svensson, P, Castrillon, E, Cairns, BE: Nerve growth factor-evoked masseter muscle sensitization and perturbation of jaw motor function in healthy women. *JOrfacPain*, 22: 340-348, 2008.
28. Delcroix, JD, Valletta, JS, Wu, C, Hunt, SJ, Kowal, AS, Mobley, WC: NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron*, 39: 69-84, 2003.
29. Nicol, GD, Vasko, MR: Unraveling the story of NGF-mediated sensitization of nociceptive sensory neurons: ON or OFF the Trks? *Mol Interv*, 7: 26-41, 2007. <https://doi.org/10.1124/mi.7.1.6>
30. Woo, SH, Ranade, S, Weyer, AD, Dubin, AE, Baba, Y, Qiu, Z, Petrus, M, Miyamoto, T, Reddy, K, Lumpkin, EA, Stucky, CL, Patapoutian, A: Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature*, 509: 622-626, 2014. <https://doi.org/10.1038/nature13251>
31. Prato, V, Taberner, FJ, Hockley, JRF, Callejo, G, Arcourt, A, Tazir, B, Hammer, L, Schad, P, Heppenstall, PA, Smith, ES, Lechner, SG: Functional and Molecular Characterization of Mechanoinsensitive "Silent" Nociceptors. *Cell reports*, 21: 3102-3115, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.11.066>

32. Hirth, M, Rukwied, R, Gromann, A, Turnquist, B, Weinkauff, B, Francke, K, Albrecht, P, Rice, F, Hagglof, B, Ringkamp, M, Engelhardt, M, Schultz, C, Schmelz, M, Obreja, O: Nerve growth factor induces sensitization of nociceptors without evidence for increased intraepidermal nerve fiber density. *Pain*, 154: 2500-2511, 2013.
33. Obreja, O, Rukwied, R, Nagler, L, Schmidt, M, Schmelz, M, Namer, B: Nerve growth factor locally sensitizes nociceptors in human skin. *Pain*, 159: 416-426, 2018. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001108>
34. Kleggetveit, IP, Namer, B, Schmidt, R, Helas, T, Ruckel, M, ORstavik, K, Schmelz, M, Jorum, E: High spontaneous activity of C-nociceptors in painful polyneuropathy. *Pain*, 153: 2040-2047, 2012.
35. Serra, J, Bostock, H, Sola, R, Aleu, J, Garcia, E, Cokic, B, Navarro, X, Quiles, C: Microneurographic identification of spontaneous activity in C-nociceptors in neuropathic pain states in humans and rats. *Pain*, 153: 42-55, 2012.
36. Weinkauff, B, Obreja, O, Schmelz, M, Rukwied, R: Differential time course of NGF-induced hyperalgesia to heat versus mechanical and electrical stimulation in human skin. *Eur J Pain*, 19: 789-796, 2015. <https://doi.org/10.1002/ejp.603>
37. Rukwied, R, Thomas, C, Obreja, O, Werland, F, Kleggetveit, IP, Jorum, E, Carr, RW, Namer, B, Schmelz, M: Slow depolarizing stimuli differentially activate mechanosensitive and silent C-nociceptors in human and pig skin. *Pain*, 161: 2119-2128, 2020. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001912>
38. Landmann, G, Stockinger, L, Lustenberger, C, Schmelz, M, Rukwied, R: Effects of Current Density on Nociceptor Activation Upon Electrical Stimulation in Humans. *Pain Pract*, 16: 273-281, 2016. <https://doi.org/10.1111/papr.12339>
39. Jonas, R, Namer, B, Stockinger, L, Chisholm, K, Schnakenberg, M, Landmann, G, Kucharczyk, M, Konrad, C, Schmidt, R, Carr, R, McMahon, S, Schmelz, M, Rukwied, R: Tuning in C-nociceptors to reveal mechanisms in chronic neuropathic pain. *Ann Neurol*, 83: 945-957, 2018. <https://doi.org/10.1002/ana.25231>
40. Werland, F, Hirth, M, Rukwied, R, Ringkamp, M, Turnquist, B, Jorum, E, Namer, B, Schmelz, M, Obreja, O: Maximum axonal following frequency separates classes of cutaneous unmyelinated nociceptors in the pig. *J Physiol*, 599: 1595-1610, 2021. <https://doi.org/10.1113/jp280269>
41. Rukwied, R, Schnakenberg, M, Solinski, HJ, Schmelz, M, Weisshaar, E: Transcutaneous Slowly Depolarizing Currents Elicit Pruritus in Patients with Atopic Dermatitis. *Acta Derm Venereol*, 100: adv00302. DOI: 00310.02340/00015555-00013658, 2020. <https://doi.org/10.2340/00015555-3658>
42. Andresen, T, Nilsson, M, Nielsen, AK, Lassen, D, Arendt-Nielsen, L, Drewes, AM: Intradermal Injection with Nerve Growth Factor: A Reproducible Model to Induce Experimental Allodynia and Hyperalgesia. *Pain Pract*, 16: 12-23, 2016. <https://doi.org/10.1111/papr.12267>
43. Casale, R, Glynn, C, Buonocore, M: The role of ischaemia in the analgesia which follows Bier's block technique. *Pain*, 50: 169-175, 1992.
44. Koppert, W, Zeck, S, Sittl, R, Likar, R, Knoll, R, Schmelz, M: Low-dose lidocaine suppresses experimentally induced hyperalgesia in humans. *Anesthesiology*, 89: 1345-1353, 1998.
45. Koppert W, Sittl R, Schmelz M. The Bier Block asan experimentaltool todifferentiate peripheral and central effects of analgetics on people. *Schmerz* 2000; 14(2):69-76

46. Friess, H, Zhu, ZW, di Mola, FF, Kulli, C, Graber, HU, Andren-Sandberg, A, Zimmermann, A, Korc, M, Reinshagen, M, Buchler, MW: Nerve growth factor and its high-affinity receptor in chronic pancreatitis. *Ann Surg*, 230: 615-624, 1999.
47. Schnitzer, TJ, Lane, NE, Birbara, C, Smith, MD, Simpson, SL, Brown, MT: Long-term open-label study of tanezumab for moderate to severe osteoarthritic knee pain. *OsteoarthritisCartilage*, 19: 639-646, 2011.
48. Katz, N, Borenstein, DG, Birbara, C, Bramson, C, Nemeth, MA, Smith, MD, Brown, MT: Efficacy and safety of tanezumab in the treatment of chronic low back pain. *Pain*, 152: 2248-2258, 2011.
49. Pezet, S, McMahon, SB: Neurotrophins: Mediators and Modulators of Pain. *AnnuRevNeurosci*, 29: 507-538, 2006.
50. Jonas, R, Namer, B, Schnakenberg, M, Soares, S, Pakalniskis, J, Carr, R, Schmelz, M, Rukwied, R: Sympathetic efferent neurons are less sensitive than nociceptors to 4 Hz sinusoidal stimulation. *Eur J Pain*, 24: 122-133, 2020. <https://doi.org/10.1002/ejp.1467>
51. Schmelz, M, Michael, K, Weidner, C, Schmidt, R, Torebjörk, HE, Handwerker, HO: Which nerve fibers mediate the axon reflex flare in human skin? *Neuroreport*, 11: 645-648, 2000.
52. Rukwied, R, Mayer, A, Kluschina, O, Obreja, O, Schley, M, Schmelz, M: NGF induces non-inflammatory localized and lasting mechanical and thermal hypersensitivity in human skin. *Pain*, 148: 407-413, 2010.
53. Obreja, O, Ringkamp, M, Turnquist, B, Hirth, M, Forsch, E, Rukwied, R, Petersen, M, Schmelz, M: Nerve growth factor selectively decreases activity-dependent conduction slowing in mechano-insensitive C-nociceptors. *Pain*, 152: 2138-2146, 2011.
54. Magerl, W, Westerman, RA, Mohner, B, Handwerker, HO: Properties of transdermal histamine iontophoresis: differential effects of season, gender, and body region. *J InvestDermatol*, 94: 347-352, 1990.
55. Tuckett, RP: Itch evoked by electrical stimulation of the skin. *J Invest Dermatol*, 79: 368-373, 1982.
56. Ikoma, A, Handwerker, H, Miyachi, Y, Schmelz, M: Electrically evoked itch in humans. *Pain*, 113: 148-154, 2005.
57. Wang, H, Romano, G, Fedgchin, M, Russell, L, Sanga, P, Kelly, KM, Frustaci, ME, Thippawong, J: Fulranumab in Patients With Pain Associated With Postherpetic Neuralgia and Posttraumatic Neuropathy: Efficacy, Safety, and Tolerability Results From a Randomized, Double-blind, Placebo-controlled, Phase-2 Study. *Clin J Pain*, 33: 99-108, 2017. <https://doi.org/10.1097/ajp.0000000000000388>
58. Zheng, Y, Liu, P, Bai, L, Trimmer, JS, Bean, BP, Ginty, DD: Deep Sequencing of Somatosensory Neurons Reveals Molecular Determinants of Intrinsic Physiological Properties. *Neuron*, 103: 598-616.e597, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.05.039>
59. Leffler, A, Cummins, TR, Dib-Hajj, SD, Hormuzdiar, WN, Black, JA, Waxman, SG: GDNF and NGF reverse changes in repriming of TTX-sensitive Na(+) currents following axotomy of dorsal root ganglion neurons. *JNeurophysiol*, 88: 650-658, 2002.
60. Hameed, S: Na(v)1.7 and Na(v)1.8: Role in the pathophysiology of pain. *Mol Pain*, 15: 1744806919858801, 2019. <https://doi.org/10.1177/1744806919858801>
61. Fjell, J, Cummins, TR, Fried, K, Black, JA, Waxman, SG: In vivo NGF deprivation reduces SNS expression and TTX-R sodium currents in IB4-negative DRG

- neurons. *J Neurophysiol*, 81: 803-810, 1999.
<https://doi.org/10.1152/jn.1999.81.2.803>
62. McGlone, F, Wessberg, J, Olausson, H: Discriminative and affective touch: sensing and feeling. *Neuron*, 82: 737-755, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2014.05.001>
63. Koltzenburg, M, Handwerker, HO: Differential ability of human cutaneous nociceptors to signal mechanical pain and to produce vasodilatation. *J Neurosci*, 14: 1756-1765, 1994.
64. Nencini, S, Morgan, M, Thai, J, Jobling, AI, Mazzone, SB, Ivanusic, JJ: Piezo2 Knockdown Inhibits Noxious Mechanical Stimulation and NGF-Induced Sensitization in A-Delta Bone Afferent Neurons. *Front Physiol*, 12: 644929, 2021. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.644929>
65. Marchandise, E, Mouraux, A, Plaghki, L, Henrotte, F: Finite element analysis of thermal laser skin stimulation for a finer characterization of the nociceptive system. *J Neurosci Methods*, 223: 1-10, 2014.
<https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2013.11.010>
66. TREEDE, RD, Meyer, RA, Raja, SN, Campbell, JN: Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J Physiol*, 483 (Pt 3): 747-758, 1995.
67. Wooten, M, Weng, HJ, Hartke, TV, Borzan, J, Klein, AH, Turnquist, B, Dong, X, Meyer, RA, Ringkamp, M: Three functionally distinct classes of C-fibre nociceptors in primates. *Nature communications*, 5: 4122, 2014.
<https://doi.org/10.1038/ncomms5122>
68. Churyukanov, M, Plaghki, L, Legrain, V, Mouraux, A: Thermal detection thresholds of Adelta- and C-fibre afferents activated by brief CO2 laser pulses applied onto the human hairy skin. *PLoS ONE*, 7: e35817, 2012.
69. Bhave, G, Hu, HJ, Glauner, KS, Zhu, W, Wang, H, Brasier, DJ, Oxford, GS, Gereau, RW: Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 12480-12485, 2003.
70. Bonnington, JK, McNaughton, PA: Signalling pathways involved in the sensitisation of mouse nociceptive neurones by nerve growth factor. *J Physiol*, 551: 433-446, 2003.
71. Zhang, X, Huang, J, McNaughton, PA: NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J*, 24: 4211-4223, 2005.
72. Davis, JB, Gray, J, Gunthorpe, MJ, Hatcher, JP, Davey, PT, Overend, P, Harries, MH, Latcham, J, Clapham, C, Atkinson, K, Hughes, SA, Rance, K, Grau, E, Harper, AJ, Pugh, PL, Rogers, DC, Bingham, S, Randall, A, Sheardown, SA: Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*, 405: 183-187, 2000. <https://doi.org/10.1038/35012076>
73. Henrich, F, Magerl, W, Klein, T, Greffrath, W, Treede, RD: Capsaicin-sensitive C- and A-fibre nociceptors control long-term potentiation-like pain amplification in humans. *Brain*, 2015. <https://doi.org/10.1093/brain/awv108>
74. Ziegler, EA, Magerl, W, Meyer, RA, TREEDE, RD: Secondary hyperalgesia to punctate mechanical stimuli - Central sensitization to A-fibre nociceptor input. *Brain*, 122: 2245-2257, 1999.
75. Kilo, S, Schmelz, M, Koltzenburg, M, Handwerker, HO: Different patterns of hyperalgesia induced by experimental inflammation in human skin. *Brain*, 117: 385-396, 1994.
76. Hugosdottir, R, Morch, CD, Jorgensen, CK, Nielsen, CW, Olsen, MV, Pedersen, MJ, Tigerholm, J: Altered excitability of small cutaneous nerve fibers during

- cooling assessed with the perception threshold tracking technique. *BMC Neurosci*, 20: 47, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0527-3>
77. Elam, M, Olausson, B, Skarphedinsson, JO, Wallin, BG: Does sympathetic nerve discharge affect the firing of polymodal C-fibre afferents in humans? *Brain*, 122 (Pt 12): 2237-2244, 1999.

7 VORVERÖFFENTLICHUNGEN

Schnakenberg, Mark & Thomas, Christian & Schmelz, Martin & Rukwied, Roman. (2020). Nerve growth factor sensitizes nociceptors to C - fibre selective supra - threshold electrical stimuli in human skin. *European Journal of Pain*. 25. 10.1002/ejp.1678.

Rukwied, Roman & Schnakenberg, Mark & Solinski, Hans & Schmelz, Martin & Weisshaar, Elke. (2020). Transcutaneous Slowly Depolarizing Currents Elicit Pruritus in Patients with Atopic Dermatitis. *Acta dermato-venereologica*. 100. adv00302. 10.2340/00015555-3658.

Jonas, Robin & Namer, Barbara & Schnakenberg, Mark & Soares, Sabrina Da & Pakalniskis, Julius & Carr, Richard & Schmelz, Martin & Rukwied, Roman. (2019). Sympathetic efferent neurons are less sensitive than nociceptors to 4 Hz sinusoidal stimulation. *European Journal of Pain*. 24. 10.1002/ejp.1467.

Jonas, Robin & Namer, Barbara & Stockinger, Lenka & Chisholm, Kim & Schnakenberg, Mark & Landmann, Gunther & Kucharczyk, Mateusz & Konrad, Christoph & Schmidt, Roland & Carr, Richard & McMahon, Stephen & Schmelz, Martin & Rukwied, Roman. (2018). Tuning in C - nociceptors to reveal mechanisms in chronic neuropathic pain. *Annals of Neurology*. 83. 10.1002/ana.25231.

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname:	Schnakenberg, Mark Michael
Geburtsdatum:	22.03.1989
Geburtsort:	Natal / Brasilien
Familienstand:	Ledig
Vater:	Claus Schnakenberg
Mutter:	Roseane Schnakenberg

SCHULISCHER WERDEGANG

1995 – 1999	Grundschule Wichlinghauser Str. Wuppertal
1999 – 2008	Carl-Duisberg-Gymnasium Wuppertal
28.05.2008	Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2012/2013	Beginn des Studiums für Humanmedizin An der Universität für Medizin und Pharmazie Targu Mures
WS2015/2016	Hochschulortswechsel an die Medizinische Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
(04.09.2014)	Anerkennung 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(2015) – (2019)	Hauptstudium, Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
(25.06.2020)	Approbation

9 DANKSAGUNG

Zunächst bedanke ich mich herzlichst bei Herrn Prof. Dr. med. Martin Schmelz. Nicht nur für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, sondern auch für sein Vertrauen in mich und den Umgang mit seinen Gerätschaften, als auch Probanden und für die Zeit ein Teil seiner Arbeitsgruppe werden zu dürfen.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Prof. (apl.) Dr. rer. nat. Roman Rukwied, der mich geduldig und allezeit hilfsbereit durch meine Arbeit begleitet hat. Es freut mich behaupten zu können, dass ich über das professionelle Arbeiten hinaus einen Freund gewonnen habe.

Ebenso danke ich Herrn Elmar Forsch, der mich tatkräftig bei der Durchführung dieser Studie, selbst über den Ruhestand hinaus, als liebenswerten Freund begleitet hat.

Der Arbeitsgruppe „Experimentelle Schmerzforschung“, möchte ich ebenfalls mein Dankeschön widmen, da diese ebenfalls jederzeit für mich ansprechbar war.

In Erinnerung an meinen Großvater Karl Adolf Schnakenberg gilt mein größter Dank, der mich während meiner schulischen Laufbahn immer begleitet und motiviert hat und mein Interesse in die Medizin bereits als Kind geweckt hatte.

Und zuletzt möchte ich meinen Eltern Roseane und Claus, meinen Freunden und meiner Partnerin danken, die mich in der Zeit geduldig ertragen und trotzdem stets motiviert haben. Ohne Sie wäre ich niemals zum Abschluss gekommen.