

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

Faserklassen-spezifische Stimulation von C-Nozizeptoren

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

vorgelegt von
Julia Filip

aus
Hilden
2023

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Martin Schmelz

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	1
1. EINLEITUNG.....	2
1.1. Überblick: Chronische Schmerzen.....	2
1.2. Schmerzhaft diabetische Neuropathie.....	2
1.2.1. Die Herausforderung der Diagnostik.....	3
1.3. C-Fasern, C-Nozizeptoren und ihre Eigenschaften.....	3
1.3.1. „Stumme“ C-Nozizeptoren.....	4
1.4. Elektrische Stimulationsprofile.....	5
1.4.1. C-Faser spezifische elektrische Reizprofile.....	5
1.5. Großtier-Modelle in der Schmerzforschung.....	6
1.6. Die Rolle von HMGB1 in der Diabetes- und Schmerzforschung.....	7
1.7. Zielsetzung und Arbeitshypothesen.....	9
2. MATERIAL UND METHODEN.....	10
2.1. In-vivo Einzelfaserableitungen von C-Fasern am Schwein.....	10
2.1.1. Versuchstiere.....	10
2.1.2. Identifizierung und Charakterisierung C-nozizeptiver Einzelfasern.....	10
2.1.3. Schwellenwertaufzeichnungen bei halbsinusförmiger Stimulation.....	11
2.2. Psychophysik und Axon-Reflex-Erythem beim Menschen.....	12
2.2.1. Versuchspersonen.....	12
2.2.2. Untersuchung des subjektiven Empfindens bei elektrischer Halbsinusstimulation unterschiedlicher Dauer (Psychophysik).....	12
2.2.3. Messung der Hautdurchblutung zur Testung optimierter Halbsinusreize auf die Aktivierung stummer Nozizeptoren (Axon-Reflex-Erythem).....	14
2.3. Ex-vivo Ableitung von C-Faser-Summenaktionspotentialen am Nervus saphenus des Schweins.....	17
2.3.1. Präparation der Faszikel und Versuchsaufbau.....	17
2.3.2. Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Kurven bei Stimulation mit Halbsinusimpulsen unterschiedlicher Dauer.....	19
2.3.3. Testung der Metabolite HMGB1 und LPS.....	20
2.4. Statistik.....	20

3. ERGEBNISSE	21
3.1. Aufzeichnungen einzelner C-Fasern am Schwein in-vivo	21
3.1.1. Getestete C-Faserklassen	21
3.1.2. Schwellenwerte und Chronaxie	21
3.2. Psychophysik und Axon-Reflex-Erythem beim Menschen	23
3.2.1. Versuchspersonen	23
3.2.2. Psychophysik (Dosis-Wirkungsbeziehung von Halbsinusreizen unterschiedlicher Länge am Unterarm und am Fußrücken).....	23
3.2.3. Axon-Reflex-Erythem (Schmerzrating und Axonreflexausbreitung bei optimierter Halbsinusstimulation unterschiedlicher Impulsanzahl).....	29
3.3. Ableitung von Summenaktionspotentialen am porcinen Nerv ex-vivo	33
3.3.1. Dosis-Wirkungs-Kurven und Latenzzeiten bei verschiedenen Halbsinusdauern	33
3.3.2. Auswirkungen von HMGB1 und LPS auf die Dosis-Wirkungs-Kurven..	38
4. DISKUSSION	42
4.1. Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse.....	42
4.2. Beurteilung der C-Faser Erregbarkeit durch elektrische Halbsinusimpulse..	42
4.2.1. Interpretation der Einzelfaserableitungen	43
4.2.2. Interpretation von Psychophysik und Axon-Reflex-Erythem	44
4.2.3. Interpretation der Summenaktionspotential-Ableitungen	45
4.3. Veränderbarkeit der C-Faser-Erregbarkeit durch HMGB1	47
4.4. Bewertung und Limitationen der gewählten Methodik	48
4.5. Klinische Implikationen und offene Fragen	49
4.6. Schlussfolgerung.....	50
5. ZUSAMMENFASSUNG	51
6. LITERATURVERZEICHNIS	53
7. LEBENS LAUF	62
9. DANKSAGUNG.....	63

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AUC	„Area Under the Curve“ (Fläche unter der Kurve)
ADS	Aktivitätsabhängige Verlangsamung der Reizleitung
CMi	Mechano-insensitive C-Nozizeptoren
C-SAP	C-Faser-Summenaktionspotential
HMGB1	„High-Mobility-Group-Box-1“-Protein
HS	Halbsinus
ID	Impulsdauer
KI	Konfidenzintervall
LDI	„Laser-Doppler-Imaging“ (Laser-Doppler-Bildgebung)
LPS	Lipopolysaccharide
Na _v	Spannungsabhängiger Natriumkanal
NRS	Numerische Ratingskala (hier zur Schmerzbewertung, Skala 0 - 10)
RAGE	Rezeptor für „Advanced Glycation End products“
Rec.	Rechteckreiz
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler / Stichprobenfehler
TLR	„Toll-like“ - Rezeptor
TRPV1	„Transient Receptor Potential Vanilloid 1“ - Rezeptor
X-half	Zum Erreichen der halbmaximalen Amplitude benötigte Stromstärke

1. EINLEITUNG

1.1. Überblick: Chronische Schmerzen

Chronische Schmerzen im Allgemeinen werden als Schmerzzustände definiert, die länger als 3 bis 6 Monate andauern. Sie sind dann oft von der ursprünglichen Schutz- und Warnfunktion des Körpers losgelöst und können - im Gegensatz zu dem Symptom Akutschmerz - ein eigenständiges ICD-codiertes Krankheitsbild darstellen [1]. Weiter differenziert werden chronische Schmerzen in nozizeptive bzw. entzündliche Schmerzen (durch Gewebeschädigung) und neuropathische Schmerzen, welche durch eine Läsion bzw. Dysfunktion des Nervensystems (z. B. im Rahmen von Verletzungen oder metabolischen Erkrankungen) gekennzeichnet sind. Weltweit sind circa 20 % der Bevölkerung von mäßigen bis schweren chronischen Schmerzen sowie deren Auswirkungen auf den psychischen und physischen Gesundheitszustand und das alltägliche Leben betroffen [2]. Eine vollständige Rehabilitation der Patienten wird selten erreicht und mittels - in der Regel rein symptomatischer - Pharmakotherapie kann bei einem Großteil der Betroffenen nur eine unzureichende Linderung der Beschwerden erzielt werden [2,3]. Dies geht mit einer erheblichen sozioökonomischen Belastung des Einzelnen, der Gesellschaft und des Gesundheitssystems einher [3]. Die aktuellen diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten sind folglich begrenzt, nicht zuletzt aufgrund der vielfältigen Optionen pathophysiologischer Mechanismen im komplexen nozizeptiven System. Neben psychosozialen Komorbiditäten nehmen dabei funktionelle sowie strukturelle Veränderungen des nozizeptiven Systems auf zerebraler, spinaler und peripherer Ebene eine bedeutende Rolle ein [4,5]. In früheren Forschungsergebnissen wird von erhöhten Aktivitäten und der Vermehrung kortikaler nozizeptiver Areale sowie von Veränderungen in den erregenden und hemmenden Transmittersystemen und in der synaptischen Übertragung nozizeptiver Informationen bei chronischen Schmerzpatienten berichtet [6,7]. Zudem wird ein pathophysiologischer Zusammenhang mit ektopischen Aktivitäten in Neuronen und Spinalganglien, Veränderungen von Ionenkanälen, der Aktivierung von Immunzellen sowie mit einer pathologischen Zell-Zell-Interaktion, molekularen Signalübertragung und Ausschüttung von Mediatoren beschrieben [5]. Aktuelle Studienergebnisse weisen zudem auf die Entstehung chronischer Schmerzen durch strukturelle Plastizität, abnorme Vernetzung und Fehlfunktionen von Nozizeptoren im Rahmen der Reinnervation nach Nervenverletzungen hin [8]. Im Kontext dieser Veränderungen können eine periphere oder zentrale Sensibilisierung, eine gestörte endogene Schmerzmodulation sowie spontane oder dauerhafte Aktivierungszustände von Nozizeptoren und Schmerzfasern zu der Entstehung und Aufrechterhaltung chronischer Schmerzen führen [7,9,10].

1.2. Schmerzhaft diabetische Neuropathie

Eine Erkrankung an Diabetes mellitus ist die häufigste Ursache für periphere Neuropathien [11]. Im Verlauf einer Diabeteserkrankung treten bei über 50 % der Menschen neuropathische Komplikationen auf. Am häufigsten ist dabei die distale symmetrische Polyneuropathie [12,13], deren charakteristisches Erscheinungsbild sich durch an den Füßen beginnende und im Progress der Erkrankung symmetrisch aufsteigende sensorische und motorische Funktionsverluste kennzeichnet [12].

Hauptsymptome stellen schleichend einsetzende Hyper-, Par-, und Dysästhesien bis zum vollständigen Verlust von Vibrations-, Druck- und Berührungsempfinden im betroffenen Bereich dar [5,14]. In 30 - 40 % der Fälle wird die Erkrankung zudem von neuropathischen Schmerzen begleitet [11,12,15]. Diese werden typischerweise als stark brennend, kribbelnd oder stechend-einschießend charakterisiert, treten häufig spontan auf und können mit Hyperalgesie und Allodynie einhergehen [5,16]. Das Auftreten der beschriebenen Schmerzqualitäten ist dabei in der Regel mit einer Schädigung kleiner Nervenfasern verbunden [17,5]. Diese „small-fiber“-Neuropathien (oder „Dünnfaserneuropathien“) sind durch eine beeinträchtigte Funktion der dünn myelinisierten A-Delta- und nicht myelinisierten C-Nozizeptoren gekennzeichnet [16].

1.2.1. Die Herausforderung der Diagnostik

Die Verdachtsdiagnose „Dünnfaserneuropathie“ wird in der Regel über die medizinische Historie sowie eine körperliche Untersuchung des Patienten gestellt [14]. Zudem können Hautbiopsien zur Beurteilung der Nervenfaserdichte entnommen oder quantitativ sensorische Tests durchgeführt werden [14,16]. Da die Schmerzsymptomatik unabhängig von der Schwere anderweitiger neuropathischer Defizite auftritt und nicht mit dem Grad aktuell messbarer struktureller und funktioneller Nervenschädigungen korreliert [15,5], stellt jedoch insbesondere die diagnostische Differenzierung zwischen schmerzhaften und schmerzlosen Neuropathien weiterhin eine große Herausforderung dar [12]. So konnte in einer kürzlich durchgeführten multizentrischen Studie bei der Untersuchung der axonalen Erregbarkeit der größeren sensorischen Fasern mittels Threshold-Tracking kein Unterschied zwischen Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser diabetischer oder Chemotherapie-induzierter Polyneuropathie festgestellt werden [18]. Um dieser Problematik zu entgegnen, sind alternative diagnostische Methoden erforderlich, die neue Erkenntnisse über die unterschiedlichen zu Grunde liegenden Pathomechanismen liefern und somit den Grundstein für eine erfolgreichere, maßgeschneiderte Behandlung bilden können [19,13,12]. Dabei könnte insbesondere eine frühzeitige, C-Faser-spezifische Funktionsdiagnose bei betroffenen Patienten zu einer individuellen Charakterisierung der Nervenfunktion beitragen.

1.3. C-Fasern, C-Nozizeptoren und ihre Eigenschaften

Bei den Faser-Hauptgruppen des nozizeptiven Systems handelt es sich um dünn myelinisierte A δ - und unmyelinisierte C-Fasern. Diese Fasertypen unterscheiden sich insbesondere in der von Faserdicke und Myelinisierungsgrad abhängigen Leitungsgeschwindigkeit. Entsprechend dieser Eigenschaften erfolgt über die schneller leitenden A δ - Fasern (ca. 10-30 m/s) die erste Schmerzantwort, zumeist spürbar als frühzeitige „hell-stechende“ Schmerzkomponente. Durch Aktivierung der langsamer leitenden C-Fasern (ca. 0,5-2 m/s) tritt anschließend ein späterer „dumpf-brennender“ Schmerz auf, welcher nebenbei die dominierende Schmerzwahrnehmung bei von neuropathischen Schmerzen betroffenen Diabetespatienten darstellt (siehe 1.2.). Weitere Unterschiede zwischen den Fasertypen sind unter anderem im Vorhandensein funktionell verschiedener Ionenkanäle, in der Lokalisation der Nozizeptorenendigungen in den vorhandenen Haut- und

Unterhautschichten sowie in der Chronaxie zu finden. Unter dem Begriff Chronaxie versteht man die minimale Zeit, welche benötigt wird, um mittels eines elektrischen Stimulus mit doppelter Stromstärke des spezifischen Schwellenwertes für sehr lang andauernde Impulse (Rheobase) das Neuron zu erregen. Im Vergleich zu A-Fasern [20,21,22] haben C-Fasern eine längere Chronaxie [23]. Des Weiteren differenzieren sich die genannten Faserarten über das Vorhandensein funktionell verschiedener Ionenkanäle. Dabei stehen insbesondere spannungsabhängige Natrium-Kanäle, welche für die Erregung und Weiterleitung von Aktionspotentialen unerlässlich sind, im Verdacht an der Pathogenese schmerzhafter Neuropathien beteiligt zu sein [24]. Frühere Studien zeigen, dass spezifische Mutationen im Na_v -Kanal 1.7 die Entstehung verschiedenster Störungen der Schmerz Wahrnehmung, darunter auch Dünnfaserneuropathien, bewirken oder begünstigen können [4,25]. Na_v 1.7 und 1.8 stellen die vorwiegenden Natriumkanäle der C-Fasern dar [26]. Na_v 1.7 unterscheidet sich funktionell anhand seines langsamen Inaktivierungsverhaltens („closed state inactivation“) von dem auf A-Fasern vorherrschenden Na_v -Kanal 1.6, welcher während länger anhaltender Depolarisierung schnell vom geschlossenen in den inaktiven Zustand übergeht [27]. Ein weiterer Kanal, der physiologisch vor allem auf C-Fasern exprimiert wird, ist der nicht-selektive Kationenkanal TRPV1 (transient receptor potential vanilloid receptor 1), welcher für eine thermisch-chemische Transduktion zuständig und für den Liganden Capsaicin sensibel ist [28]. Auch TRPV1-Kanäle werden in Verbindung mit der Entstehung neuropathischer Schmerzen bei Diabetes gebracht [29, 30].

1.3.1. „Stumme“ C-Nozizeptoren

Darüber hinaus existieren multiple C-Nozizeptor-Subtypen, die sich anhand ihrer sensorischen Empfindlichkeit auf verschiedene Reizmodalitäten sowie ihrer axonalen Eigenschaften (insbesondere anhand der aktivitätsabhängigen Verlangsamung der Reizleitung, ADS) klassifizieren lassen [31,32,33]. Eine grobe Einteilung erfolgt hierbei in polymodale Nozizeptoren und sogenannte „stumme“ Nozizeptoren. Die polymodalen Nozizeptoren sind aktivierbar durch mechanische, thermische und chemische Stimuli. Dagegen sind „stumme“ Nozizeptoren mechano-insensitiv (sie werden daher auch als „CMI“-Nozizeptoren bezeichnet) und haben hohe elektrische Erregungsschwellen [34,33]. Erst im Rahmen von Entzündungen oder anderweitiger lang andauernder, toxischer Stimuli (z.B. durch topische Applikation von Capsaicin) können sie für zusätzliche Reizmodalitäten sensibilisiert und ihre Erregungsschwellen herabgesetzt werden [32,35]. Zudem wird vermutet, dass diese Nozizeptorklasse ursächlich für die Induktion einer zentralen Sensibilisierung und sekundären Hyperalgesie ist [32,36]. Eine Übererregbarkeit stummer C-Nozizeptoren konnte unter anderem bei Patienten mit schmerzhafter Polyneuropathie erfasst werden [37]. Besonders interessant ist zudem die Feststellung einer unter pathologischen Umständen auftretenden Spontanaktivität, welche in früheren Probandenversuchen mit der Intensität spontaner Schmerzzustände bei Patienten mit chronischen neuropathischen Schmerzen korrelierte [37]. Daher wird vermutet, dass diese Nozizeptoren eine bedeutende Rolle in der Entstehung und der Aufrechterhaltung von chronischen neuropathischen Schmerzen einnehmen. Stumme Nozizeptoren zeichnen sich - in Abgrenzung zu anderen Subgruppen - durch ein wesentlich ausgeprägteres Ermüden bei repetitiver Stimulation („activity dependent slowing“ ADS) aus [33], welches bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen verändert ist [35]. Es wird angenommen, dass dieses Merkmal auf die unterschiedliche Expression axonaler Ionenkanäle, vorrangig auf die

aktivitätsabhängige langsame Inaktivierung der spannungsabhängigen Natriumkanäle, zurückzuführen ist [38,26]. Darüber hinaus kann die Erregung stummer Nozizeptoren (via Freisetzung von Neuropeptiden) zu einer neurogenen Entzündung führen, wodurch sich ihre Aktivierung anhand der Entstehung einer Axonreflex-vermittelten Steigerung der Hautdurchblutung objektivieren lässt [39]. Dabei korreliert die Fläche des Axon-Reflex-Erythems mit der Nervenfaserdichte und der Funktion der kutanen C-Fasern. Entsprechend kann die Entstehung dieser Flare-Reaktion im Rahmen einer „small-fiber“-Neuropathie beeinträchtigt sein [40], was sich bereits in früheren Studien mittels Laser-Doppler Imaging (LDI) darstellen ließ [41].

1.4. Elektrische Stimulationsprofile

Die elektrische Stimulation stellt eine etablierte Methode zur kontrollierten Erregung von Neuronen unter Umgehung chemischer, thermischer oder mechanischer Signaltransduktionspfade dar. Sie wird klinisch eingesetzt, um die Leitungsgeschwindigkeit und Erregbarkeit von A-Fasern [42,43] sowie somatosensorisch evozierte Potenziale bei der Diagnose von Neuropathien zu beurteilen [16]. Eine differenzierte Erregung der ursächlichen A-Delta- und C-Faserklassen mit Hilfe elektrischer Reize wäre ein vielversprechendes Instrument, um eine detailliertere Patientendiagnose zu ermöglichen. Eine spezifischere Aktivierung von C-Nozizeptoren im Allgemeinen und insbesondere von „stummen“ C-Nozizeptoren ist jedoch angesichts ihrer hohen Aktivierungsschwellen schwer zu erreichen (1.3.1). Anstatt die Stimulationsintensität zu erhöhen, haben Forscher in früheren Studien daher die Geometrie der Stimulationselektroden optimiert und intraepidermale [44] oder mikrostrukturierte [45] epikutane Elektroden entwickelt, mit dem Ziel C-Nozizeptoren spezifischer zu aktivieren. Im Rahmen dieser Ansätze wurde die ausschließliche Innervation der Epidermis durch nicht myelinisierte Nervenfasern [46] genutzt. Daher werden durch Verwendung der entsprechenden Elektroden die oberflächlichen, nicht myelinisierten Nervenfasern stärkeren elektrischen Feldern ausgesetzt, als die tiefer gelegenen, myelinisierten Axone in der Dermis. Dabei gilt es jedoch zu bedenken, dass A-Delta-Fasern ihre Myelinscheide erst in der Dermis erhalten, während sich nicht myelinisierte Verzweigungen einige Zentimeter weit in die Dermis-Epidermis-Grenze ausbreiten können [47].

1.4.1. C-Faser spezifische elektrische Reizprofile

Dem zeitlichen Profil der elektrischen Stimulation wurde im Hinblick auf eine differenzierte Nozizeptoraktivierung bislang weniger Aufmerksamkeit geschenkt. Seit Jahrzehnten werden hauptsächlich Rechteckimpulse (Abb.1) zur neuronalen Aktivierung verwendet. Der Chronaxie von A-Fasern [20,21,22] entsprechend, wurde in psychophysikalischen Untersuchungen am Menschen festgestellt, dass Impulsdauern um 0,2 ms für ihre Rekrutierung ausreichen [48]. Dahingegen weisen Berechnungsmodelle für die Chronaxie von C-Fasern [23] darauf hin, dass Dauern um 1 ms für eine Erregung der C-Fasern genügen. Dementsprechend wurden Rechteckimpulse mit einer Dauer von 1 ms erfolgreich für Schwellentests von C-Faser-Axonon ex-vivo [49] eingesetzt und allgemein für schmerzhaft elektrische Stimulationen bei Freiwilligen verwendet [50,51]. Es gibt weniger Berichte über alternative Stimulationsprofile wie die Dreiecks-Stimulation [44], welche hauptsächlich auf A-Delta-Nozizeptoren abzielt. In jüngerer Zeit wurden in einer

systematischen Untersuchung länger andauernde Rechteckimpulse mit linear oder exponentiell ansteigenden Profilen (1-50 ms) verglichen [52]. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass ein begrenzter exponentieller Impuls in Form einer Haifischflosse mit einer Dauer von 50 ms für die Aktivierung der C-Fasern optimal wäre. Eine weitere Verlängerung auf 100 ms verbesserte die Spezifität nicht und eine entsprechende Verlängerung von Rechteckimpulsen zeigte ebenfalls keine wesentlichen Auswirkungen auf die Schmerzbewertung [53]. Die Untersuchungen lieferten im Rahmen der Stimulation mit rechteckigen Impulsen von 0,5 ms Dauer [34] jedoch auch Hinweise auf eine Verbesserung durch die Verwendung einer fokalen elektrischen Stimulation über Stiftelektroden [54]. Daraufhin wurden transdermale Stimulationen mittels bipolarer Stiftelektrode mit einem 500 ms langen, langsam depolarisierenden Halbsinusimpuls (1 Hz) [55,56] oder einer kontinuierlichen 4 Hz-Sinuswellenstimulation [57] (Abb.1) kombiniert. Hierüber konnten C-Nozizeptoren beim Menschen erfolgreich selektiver stimuliert werden, was sich in Aufzeichnungen einzelner Nervenfasern beim Schwein und durch Mikroneurographie beim Menschen bestätigte. Bemerkenswert ist, dass das charakteristisch durch C-Nozizeptoren vermittelte Axonreflex-Erythem (als spezifischer Test für die Aktivierung von Chemonozizeptoren) in diesen Studien bereits bei Stimulationsintensitäten im Bereich der Wahrnehmungsgrenze auftrat. Es ist demnach bekannt, dass die transkutane elektrische 4 Hz-Sinuswellenstimulation in der Lage ist, eine Flare-Reaktion zuverlässig auszulösen [55].

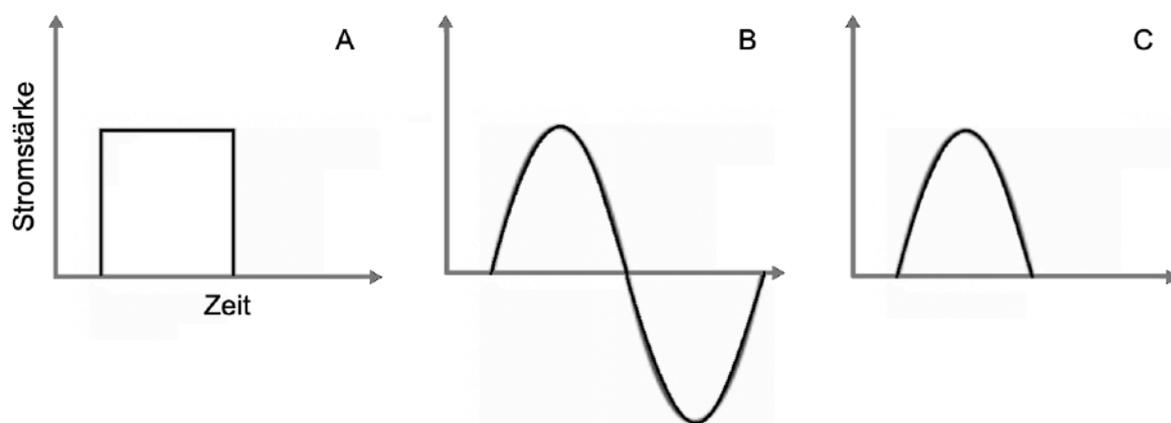


Abb. 1: Darstellung verschiedener Stimulationsformen. A: klassischer Rechteckreiz (0,5 ms), B: einzelner Zyklus eines Sinusreizes (250 ms), C: Halbsinusreiz (500 ms)

1.5. Großtier-Modelle in der Schmerzforschung

Zu den etabliertesten und am häufigsten in der Schmerz- und Diabetesforschung verwendeten Tiermodellen gehören verschiedenste Nagetiermodelle (zumeist Mäuse oder Ratten). Frühere Studien weisen jedoch auf zahlreiche Unterschiede im Schmerzsystem von Menschen und Nagetieren hin [58,59] und brachten Limitationen dieses Tiermodells insbesondere hinsichtlich der klinischen Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen zu Tage [60,61,62,63]. Schweinemodelle werden seltener eingesetzt, bieten in Bezug auf viele Eigenschaften des Stoffwechsels, auf

die Anatomie und Histologie von Haut und Nervensystem, die nozizeptiven Faserklassen sowie die axonale Erregbarkeit jedoch eine größere Ähnlichkeit mit dem Menschen [64,65,66]. Auch Funktionsweisen nervaler Strukturen - zum Beispiel in Hinblick auf die vorhandenen Ionenkanäle und axonalen Eigenschaften - entsprechen weitestgehend denen des Menschen. So konnte für die Gruppe der mechanisch-unempfindlichen „stummen“ C-Nozizeptoren beim Schwein - ebenso wie beim Menschen - die Auslösung der axonalen Reflexreaktion nachgewiesen [67] und eine gleichermaßen starke Leitungsverlangsamung (ADS) bei andauernder elektrischer Stimulation festgestellt werden [68]. Dahingegen ist die Haut von Nagetieren nicht mit C-Mi-Nozizeptoren mit vergleichbaren sensorischen, axonalen und funktionalen Eigenschaften ausgestattet [58] und die Auslösung einer Flare-Reaktion lässt sich bei ihnen auf die Aktivierung polymodaler Nozizeptoren zurückführen [69]. Frühere Forschungsergebnisse zeigten mittels Hautbiopsien zudem, dass in Schweinemodellen für chronische Schmerzen ähnliche pathologische Veränderungen der nervalen Strukturen und kutanen Innervation induziert werden, wie sie auch bei menschlichen Patienten mit chronischen neuropathischen Schmerzen beobachtet werden können [70].

1.6. Die Rolle von HMGB1 in der Diabetes- und Schmerzforschung

Die bedeutende Rolle einer chronischen Entzündungsreaktion in der Pathogenese von Diabetes mellitus sowohl in Hinblick auf die β -Zellzerstörung als auch auf die Insulinresistenz wird in vielen Studien dargelegt [71]. Als proinflammatorische Mediatoren bzw. Metabolite sind Lipopolysaccharide (LPS) oder das High-Mobility-Group-Box-1-Protein (HMGB1) wesentlich an der Pathogenese von Diabetes beteiligt [71,72]. Bei HMGB1 handelt es sich um ein DNA-bindendes Kernprotein, welches Genexpressionen regulieren [73], aber auch passiv von nekrotischen Zellen [74] oder aktiv von Immunzellen als Antwort auf inflammatorische Signale in den Extrazellularraum sezerniert werden kann [72]. Dort kann es beispielsweise die Sekretion von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen und Interleukinen oder des Tumornekrosefaktors-alpha auslösen und Rezeptoren weiterer Immunzellen aktivieren [75,76]. Zudem besitzt es die Fähigkeit dendritische Zellen anzuziehen, diese zu aktivieren und antigenspezifische Immunantworten zu fördern, weswegen es auch als „Immularmin“ (oder „DAMP“ = „Danger Associated Molecular Pattern“) bezeichnet wird [77].

Darüber hinaus wird HMGB1 zunehmend als ursächliche Komponente für die Entstehung chronischer Schmerzzustände im Rahmen von Neuropathien in Betracht gezogen. So deuten frühere Studien an Nagetieren darauf hin, dass HMGB1 nach Nervenverletzungen als neuromodulatorisches Zytokin wirken und eine anhaltende endogene Freisetzung von HMGB1 durch sensorische Neuronen einen relevanten Modulator der neuronalen Erregbarkeit darstellen kann [78,79]. Obgleich die genauen zu Grunde liegenden Mechanismen unbekannt sind, werden in der Literatur potentielle Signalwege beschrieben, die durch Bindung der Liganden HMGB1 und LPS an die zellmembranständige Rezeptoren RAGE (receptor für advanced glycation end products) und TLR4 (Toll-like-receptor 4) ausgelöst werden [80] und zu einer Sensibilisierung des nozizeptiven Systems beitragen können. So wird unter anderem berichtet, dass LPS in der Lage ist, trigeminale Neuronen direkt zu aktivieren und den Kationenkanal TRPV1 über einen TLR4-vermittelten Mechanismus zu sensibilisieren [81]. Zudem kann durch Bindung der Metabolite an

den genannten Rezeptoren der NF- κ B-Signalweg aktiviert werden [82] (Abb.2). Dieser resultiert in einer Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , welche wiederum Auswirkungen auf den ionotropen NMDA-Rezeptor zeigen, der zur Übererregbarkeit peripherer Nervenendigungen beitragen kann [83]. Insgesamt wird insbesondere die Aktivierung von RAGE als Auslöser für die Entstehung neuronaler Sensibilisierung und mechanischer Hyperalgesie vorgeschlagen [84,85]. Aber auch von einer Endotoxin vermittelten TLR4 Aktivierung ist bekannt, dass sie neuronale Erregungszustände in akut dissoziierten nozizeptiven Neuronen direkt erhöhen kann [86].

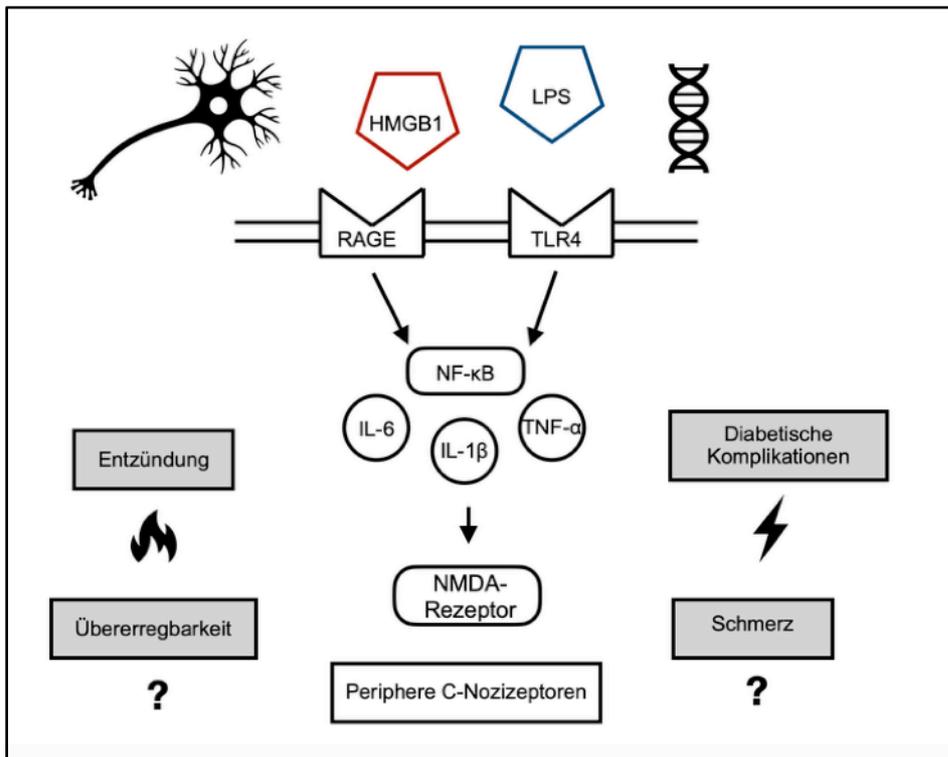


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Signalwegs und möglicher Auswirkungen von HMGB1 und LPS. Eigene Darstellung nach [83,115].

In diabetischen Tiermodellen und bei Diabetes-Patienten wurden bereits erhöhte HMGB1-, RAGE- und TLR-Spiegel erfasst [76,87,88,72]. Zudem konnte bei menschlichen Nervenfasern unter pathologischen Bedingungen im Rahmen einer diabetischen oder idiopathischen peripheren Neuropathie eine erhöhte Expression von HMGB1 und RAGE festgestellt werden [89]. Die Hemmung von HMGB1 und seiner nachgeschalteten Rezeptoren RAGE und TLR4 können demnach als potenzielle therapeutische Ziele bei Diabetes mellitus und den auftretenden Komplikationen der Erkrankung wie neuropathischen Schmerzen angesehen werden [71,90,78]. Ebenso stellt HMGB1 mit seinen komplexen Reaktionswegen und Wirkungsmechanismen im Rahmen der Entstehung chronischer Schmerzzustände einen spannenden Ansatzpunkt dar.

1.7. Zielsetzung und Arbeitshypothesen

Hauptziel dieser Arbeit war die Entwicklung und Optimierung eines elektrischen Stimulationsverfahrens mit dem eine spezifischere Aktivierung der unmyelinisierten C-Fasern erzielt werden kann und welches sowohl im Tiermodell als auch zur klinischen Erprobung am Menschen einsetzbar ist. Des Weiteren sollte mittels der erarbeiteten Stimulationsform in einem translationalen Ansatz in Bezugnahme auf potenzielle Pathomechanismen einer „small-fiber“-Neuropathie untersucht werden, ob HMGB1 und LPS als Liganden der Rezeptoren RAGE und TLR4 die Erregbarkeit von C-Fasern erhöhen können.

Folgende Arbeitshypothesen wurden in diesem Kontext formuliert:

- 1) Durch die langsame Depolarisation mit kontinuierlich wechselnder Stromstärke bei Stimulation mit länger andauernden Halbsinusreizen kann eine spezifischere Aktivierung der für chronische Schmerzen und Neuropathien relevanten C-Nozizeptoren erzielt werden als mittels des traditionell verwendeten 1 ms-Rechteckreizes.
- 2) HMGB1 kann eine Sensibilisierung der neuronalen Erregbarkeit von C-Nozizeptoren auslösen.

Zur Überprüfung der Hypothesen wurden folgende experimentelle Methodiken eingesetzt:

- 1) Einzelfaseraufzeichnungen am Schwein in-vivo: Erfassung der elektrischen Aktivierungsschwellen verschiedener C-Nozizeptorklassen bei Stimulation mit unterschiedlichen Halbsinusdauern von 1 ms bis 250 ms. *(Diese Versuchsreihe wurde von der Forschungsgruppe für Experimentelle Schmerzforschung der medizinischen Fakultät Mannheim durchgeführt. Die erhobenen Daten wurden anschließend zur Auswertung im Rahmen dieser Doktorarbeit zur Verfügung gestellt.)*
- 2) Testung verschiedener Halbsinusimpulse am menschlichen Probanden: Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehung verschiedener Impulsdauern anhand der Psychophysik und der Axon-Reflex-Reaktion zur Überprüfung der Übertragbarkeit der Ergebnisse aus 1) auf den Menschen und der Aktivierung stummer C-Nozizeptoren. *(Die Probandenversuche wurden in kollegialer Zusammenarbeit mit Dr. med. Tobias Schneider (Chronic Pain Unit, Department of Anesthesiology, University Hospital Basel, Basel, Switzerland) durchgeführt.)*
- 3) Ableitung von C-Faser-Summenaktionspotentialen am Nervus saphenus des Schweins ex-vivo: Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Kurven bei Verwendung der unterschiedlichen Halbsinusdauern von 1 ms bis 250 ms Dauer zur Überprüfung der Ergebnisse aus 1) und 2). Zudem Untersuchung der Auswirkungen von HMGB1 und LPS auf die Dosis-Wirkungskurven.

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden unter dem Titel „Optimized electrical stimulation of C-nociceptors in humans based on the chronaxie of porcine C-fibers“ veröffentlicht bei: The Journal of Pain (Januar 2023).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. In-vivo Einzelfaserableitungen von C-Fasern am Schwein

Die ethische Genehmigung für die Tierversuche an Schweinen wurde von der Ethikkommission des Regierungspräsidiums Karlsruhe (Nummer G-78/18, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland) erteilt.

2.1.1. Versuchstiere

Zur Vorbereitung auf den chirurgischen Eingriff (vorbeschrieben in [68,91]) wurden die insgesamt 21 männlichen Schweine (*Sus scrofa domesticus*, deutsche Landrasse, Körpergewicht 22-27 kg, Alter 10-14 Wochen) mittels intramuskulärer Injektion von 5 mg/kg Azaperon (Stresnil; Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien) und 1 mg/kg Midazolam (Dormicum, Roche, Basel, Schweiz) prämediziert. Die Einleitung der Allgemeinanästhesie erfolgte durch intravenöse Injektion von 1-1,5 mg/kg Propofol (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland), die Aufrechterhaltung mittels 15-20 mg/kg/h intravenösem Phenobarbital (Narcoren; Merial, Halbergmoos, Deutschland). Die Schweine wurden für den Eingriff intubiert und beatmet (Atemfrequenz 15/min; Tidalvolumen 10-15 ml/kg), zudem fand eine kontinuierliche Überwachung der Vitalparameter (Herzfrequenz, Sauerstoffsättigung, rektale Temperatur) statt. Eine angemessene Narkosetiefe wurde anhand der Herzfrequenz und des Fehlens motorischer oder hämodynamischer Reaktionen auf schädliche Reize kontrolliert. Die Euthanasie erfolgte am Ende jedes Versuchs durch Vertiefung der Narkose mit einem Phenobarbital-Bolus von 30 mg/kg, gefolgt von einer i.v.-Injektion von 0,3 ml/kg übersättigter Kaliumchloridlösung (Sigma-Aldrich, Deutschland) zur Induktion des Herzstillstandes. Der Tod wurde durch die Persistenz einer isoelektrischen Linie (Nulllinie) im EKG und das Verschwinden des Karotispulses bestätigt.

2.1.2. Identifizierung und Charakterisierung C-nozizeptiver Einzelfasern

Die Freilegung des Nervus saphenus erfolgte an der Mitte des Oberschenkels über eine Länge von circa 6 cm [68]. Daraufhin wurden isolierte Nervenbündel in dünne Filamente zerlegt bis einzelne Aktionspotentiale durch eine Stimulation mit Rechteckimpulsen (Dauer 0,5 ms, 20 mA) extrazellulär abgeleitet werden konnten (sogenannte „teased fiber“-Technik [92]; Abb. 3). Die elektrischen Stimuli wurden mit einem Konstantstromstimulator (DS7A, Digitimer Ltd, Hertfordshire, Vereinigtes Königreich) bei 0,25 Hz erzeugt und über ein Paar nicht isolierte Wolframelektroden (FHC, Bowdoinham, ME US) im entsprechenden peripheren rezeptiven Feld der Einheit auf die Haut appliziert. Die Signale wurden verstärkt (Model 5113; Ametek Inc, Berwyn, US), gefiltert (Modell 3364; Krohn-Hite Corp., Brockton, US) und mittels der Software DAPSYS 8 (www.dapsys.net, ©Brain Turnquist, Johns Hopkins Universität, US) aufgezeichnet. Die anschließende Klassifikation der Nervenfasern [93] erfolgte anhand ihrer Leitungsgeschwindigkeit, ihrer Empfindlichkeit gegenüber einer Reizung mit mechanischen Bürsten (Brush05, Somedic SenseLab™, Schweden) und punktuellen Reizen (bewertet mit Semmes Weinstein Monofilamenten Touch-Test™ Sensory Evaluator, US) sowie anhand ihrer aktivitätsabhängigen Verlangsamung der Leitungslatenz (ADS) bei wiederholter

elektrischer Stimulation (mit 2 Hz für 3 min). Hierdurch konnten auch mechanisch-insensitive Nozizeptoren (CMI, „brush negativ“) eindeutig identifiziert werden.

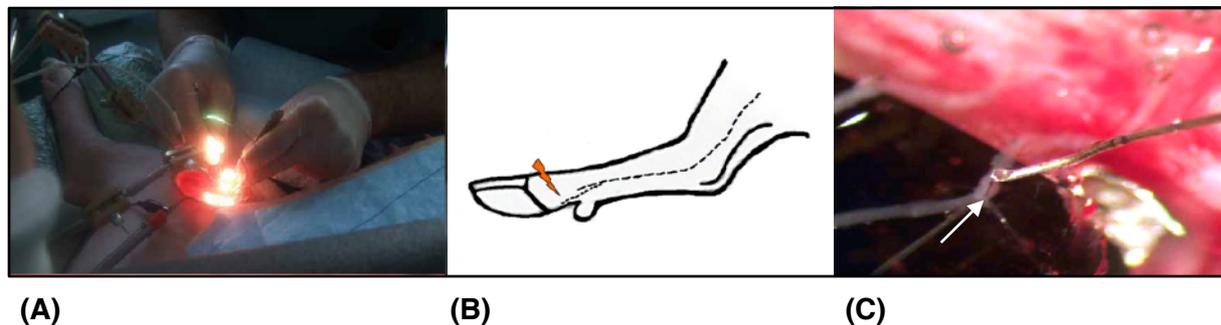


Abb. 3: Einzelfaserableitung am Schwein in-vivo mittels „teased fiber“ - Technik (Bildquelle [116]: Habilitationsschrift „Erregbarkeitsänderungen von Nozizeptoren“, Otilia Obreja, Universität Heidelberg, 2013)

- (A) Freigelegter Nervus saphenus am Oberschenkel des Schweins, Zerlegung des Nervenbündels in dünne Filamente.*
- (B) Applikation des elektrischen Stimulus im zugehörigen peripheren Innervationsfeld auf der Haut*
- (C) Extrazelluläre „teased-fiber“-Ableitung einer Einzelfaser (weißer Pfeil) mittels Goldelektrode*

2.1.3. Schwellenwertaufzeichnungen bei halbsinusförmiger Stimulation

Die Halbsinusimpulse wurden von einem Paar abgerundeter bipolarer Platinelektroden (Durchmesser 0,4 mm, Abstand 2 mm, Nørresundby, Dänemark; Abb. 4) abgegeben, welche im rezeptiven Feld der Einheit auf der Haut platziert wurden. Die Erzeugung der elektrischen Impulse erfolgte mit Hilfe eines linearen Stimulusisolators (Modell A395, World Precision Instruments, Sarasota, US), der von der Software DAPSYS 8 (www.dapsys.net, ©Brain Turnquist, Johns Hopkins Universität, US) gesteuert wurde. Die Antwort einer C-Faser-Einheit auf einen einzelnen Halbsinuswellenimpuls wurde anhand der für ihre Aktivierung benötigten Stimulusstärke und Impulsdauer (Stärke-Dauer-Kurve) definiert. Halbsinusimpulse von 1, 2, 5, 10, 25, 50, 100 und 250 ms Dauer wurden mit 2 Hz abgegeben, dabei wurde die Stromstärke der Stimulation in Schritten von 0,01 mA alle 2 Sekunden erhöht, bis Aktionspotentiale vom Gerät aufgezeichnet werden konnten (Schwellenwert). Der Schwellenwert für die Nervenfaseraktivierung wurde durch den Strom definiert, der erforderlich war, um mindestens zwei aufeinanderfolgende Einzelentladungen der Einheit hervorzurufen, die zeitlich jeweils an einen einzelnen Halbsinuswellenreiz gekoppelt waren. Für jede Faserklasse wurde eine lineare Anpassung des Verhältnisses zwischen der Stromstärke des Schwellenwertes und der Halbsinus-Stimulationsdauer berechnet und der entsprechende Achsenabschnitt auf der Zeitachse der Halbsinusdauer auf der Grundlage der Weiss-Gleichung [21] als Chronaxie bestimmt.

2.2. Psychophysik und Axon-Reflex-Erythem beim Menschen

Die ethische Genehmigung für die Versuche an gesunden, menschlichen Versuchspersonen wurde von der Ethikkommission der Universität Heidelberg (Nummer 2021-570, Baden-Württemberg, Deutschland) erteilt.

2.2.1. Versuchspersonen

Die Freiwilligen für die Probandenversuche wurden von Mai bis Oktober 2021 mit Hilfe von Mund-zu-Mund-Propaganda sowie über ein Posting in einer online-Gruppe der Studentenschaft der Universitätsmedizin Mannheim rekrutiert. Alle Teilnehmenden erfüllten die Aufnahmekriterien eines guten Gesundheitszustandes (American Society of Anaesthesiologists Physical Status, ASA I oder II) und eines Alters zwischen 18 und 65 Jahren. Darüber hinaus bestanden bezüglich der Auswahl der Versuchspersonen folgende Ausschlusskriterien:

- Hauterkrankungen oder Hautdefekte im Bereich der Messstelle
- Psychiatrische Erkrankungen
- Bestehender Wirkungsspiegel einer Medikation, welche mit einer veränderten Schmerzwahrnehmung einhergeht (z.B. Schmerzmittel, Antihistaminika, Calcium-Kanal-Blocker, Antidepressiva, Steroide)
- Akute oder chronische Erkrankungen mit (Verdacht auf) Beeinflussung des Nervensystems (z.B. akute oder chronische Schmerzsymptomatik, Diabetes mellitus, Multiple Sklerose, Polyneuropathie)
- Akuter Alkohol-/Drogeneinfluss
- Bestehende Schwangerschaft

Jeder Proband durchlief vor den eigentlichen Messungen im Rahmen dieser Studie eine Einführung, welche eine Erläuterung des Versuchsaufbaus sowie Probemessungen beinhaltete. Dabei wurde mittels Testreizen (ein 4 Hz-Sinusreiz für eine typischerweise lang-brennende sowie ein 1 ms-Rechteckreiz für eine typischerweise kurz-stechende Empfindung und ein Halbsinus-Testreiz mittlerer Dauer) die subjektive Wahrnehmung geschult sowie das Schmerzrating mittels numerischer Rating Skala (NRS) eingeübt. Bei Versuchsteil 2 (2.2.3) wurden die Probanden zusätzlich bezüglich der Sicherheitsmaßnahmen gemäß Laser-Produkten der Klasse 3R instruiert und waren zum Tragen einer Schutzbrille verpflichtet. Für die Teilnahme an der Studie wurde eine finanzielle Entschädigung gewährt, welche nach Abschluss der Studie ausgezahlt wurde.

2.2.2. Untersuchung des subjektiven Empfindens bei elektrischer Halbsinusstimulation unterschiedlicher Dauer (Psychophysik)

Es wurden Halbsinusreize mit acht verschiedenen Impulsdauern von 1 ms bis 250 ms untersucht (Tab. 1) und in Bezug auf die bei Stimulation erfassten, subjektiv empfundenen Dosis-Wirkungs-Beziehungen untereinander sowie mit dem verwendeten Kontrollreiz (1 ms-Rechteckreiz) verglichen. Ein Paar abgerundeter bipolarer Platinelektroden (Durchmesser 0,4 mm, Abstand 2 mm; Nørresundby, Dänemark; Abb. 4) diente der Applikation der elektrischen Reize. Zur Stimulation mit Halbsinusreizen wurden die Elektroden an den Konstantstromgenerator „Digitimer DS5“ (DS5 Digitimer Ltd., Welwyn Garden City, Vereinigtes Königreich; Abb. 4) angeschlossen. Die jeweiligen Halbsinus-Impulsgaben wurden anschließend über das Computerprogramm Dapsys 8.0 (©Brain Turnquist, Johns Hopkins Universität,

US) gesteuert, welches über die Definition von Dauer, Amplitude und Abfolge einzelner Stromimpulse die Erstellung der gewünschten elektrischen Stimulationsprotokolle ermöglichte. Die Applikation der Rechteckreize erfolgte über Anschluss der Elektroden an den Konstantstrom-Generator „Digitimer DS7A“ (DS7 Digitimer Ltd, Welwyn, Garden City, Vereinigtes Königreich, Abb. 4), an welchem die gewünschte Dauer und Stromstärke der Rechteckreize manuell eingestellt wurde. Anhand des verbundenen Pulsgenerators (PG01, Rimkus Medizintechnik, Parsdorf, Deutschland) konnten zudem Impulsanzahl und -abstand definiert und die Rechteck-Reizabgabe ausgelöst werden.

Tab. 1: Zur Untersuchung der Psychophysik verwendete Reizformen und -dauern.

Reizform	Reizdauern [ms]	Stromstärke [mA]	Frequenz [Hz]
Halbsinusreiz	1, 2, 5, 10, 25, 50, 100, 250	0,0125 - 1,8	2
Rechteckreiz	1	0,1 -1,4	2

Mit Hilfe der Website „www.randomizer.org“ (Copyright © 1997-2022 by Geoffrey C. Urbaniak and Scott Plous) wurde die Reihenfolge der Testreize für jeden Probanden individuell festgelegt. Dies ermöglichte eine zufällig randomisierte Versuchsdurchführung. Die Applikation der Stromreize erfolgte repetitiv an insgesamt vier vor Versuchsstart definierten und markierten Hautstellen. Hierzu wurden zwei Testbereiche auf der volaren Seite eines Unterarms und zwei auf der Rückseite eines Fußes eingezeichnet - jeweils einer am proximalen und einer am distalen Rand des medialen Drittels der Extremität. Die Auswahl der für die Versuchsdurchführung verwendeten Körperseite geschah auf Wunsch des Probanden (insofern beidseitig keine Ausschlusskriterien auftraten). Löste die Stimulation an der ausgewählten Hautstelle einen ausstrahlenden Schmerz oder eine Muskelzuckung aus, so erfolgte ein Wechsel der Applikationsstelle (und gegebenenfalls der Körperseite). Vereinzelt war zur erfolgreichen Reizapplikation eine Vorbereitung der jeweiligen Hautpartie mittels Hautpeeling (Nuprep Hautvorbereitungsgel, Weaver and Company) notwendig. Jede Einzelmessung bestand aus der Applikation von fünf aufeinanderfolgenden Impulsen mit der gleichen Halbsinusdauer. Im Anschluss erfolgte eine kleinstufige, schrittweise Erhöhung der Stromstärke (0.0125-1.8 mA) bis die folgenden drei individuellen Schwellenwerte für den jeweiligen Testreiz erfasst werden konnten:

- 1) Wahrnehmungsschwelle (Definition: niedrigste Stromstärke, bei der mindestens 3 der 5 applizierten Impulse wahrgenommen wurden)
- 2) Schmerzschwelle (Definition: niedrigste Stromstärke, bei der die Impulsabfolge erstmalig als schmerzhaft empfunden wurde)
- 3) Schmerzstärke 3 von 10 (Definition: niedrigste Stromstärke, bei der eine Schmerzintensität 3 von 10 auf einer numerischen Ratingskala (NRS) erreicht wurde; hierbei gilt 0 = kein Schmerz, 10 = maximal vorstellbarer Schmerz)

Hierzu wurden die Versuchspersonen nach jeder verwendeten Stromstärke zur Wahrnehmung des Testreizes sowie zur empfundenen Schmerzstärke befragt und die jeweiligen Stromstärken bei Erreichen der Schwellen protokolliert. Als Kontrolle erfolgte die Bestimmung der oben beschriebenen Schwellenwerte 1) - 3) zudem für Rechteckimpulse (Tab.1) mit einer Impulsdauer von 1 ms und ansteigender Intensität (0,2 mA/s). Beim jeweiligen Erreichen der Schmerzstärke NRS 3/10 wurden die Probanden darüber hinaus nach der subjektiv empfundenen Schmerzqualität befragt, insbesondere ob der Stimulus eher als kurz-stechend oder lang-brennend wahrgenommen wurde. Jede untersuchte Reizform wurde insgesamt vierfach (zweimal am Unterarm, zweimal am Fußrücken) appliziert. Diesbezüglich wurde bereits im Rahmen der Randomisierung die Bedingung hinterlegt, dass für jede Reizform einmal die distale und einmal die proximale Hautstelle (jeweils an Unterarm und Fußrücken) zur Verwendung kommen soll.



Abb. 4: Verwendete abgerundete bipolare Platinelektroden (rechtes Bild; Durchmesser 0,4 mm, Abstand 2 mm; Nørresundby, Dänemark) und Konstantstromgeneratoren (linkes Bild; DS5 Digitimer Ltd. für die Applikation der Halbsinusreize und DS7 Digitimer Ltd. für die Applikation der Rechteckreize).

2.2.3. Messung der Hautdurchblutung zur Testung optimierter Halbsinusreize auf die Aktivierung stummer Nozizeptoren (Axon-Reflex-Erythem)

Anhand der erhaltenen psychophysikalischen Ergebnisse aus Versuch 2.2.2. konnten die zwei Halbsinusreize mit der optimalen Dosis-Wirkungs-Beziehung (möglichst niedrige Schwellenwerte in Kombination mit einer möglichst kurzen Impulsdauer) für weitere Versuche ausgewählt werden. Diese Folgeversuche beinhalteten die Erfassung der Schmerzbewertung sowie der Axon-Reflex-Reaktion (als Prüfung der Aktivierung stummer Nozizeptoren) in Abhängigkeit von der Impulsanzahl. Es wurden die Halbsinusreize mit den Dauern 10 ms und 25 ms jeweils mit einer Anzahl von 8, 16 und 32 Impulsen, einer Frequenz von 5 Hz und einer Stromstärke von 0,2 mA appliziert (Tab. 2). Die genannte Stimulationsintensität wurde gewählt, da diese im vorherigen Probandenversuch (2.2.2) einen durchschnittlichen überschwelligen Reiz darstellte. Sie wurde festgelegt als Mittelwert zwischen der Schmerzschwelle aller Probanden und der Stromstärke die

erforderlich ist, um eine Schmerzbewertung von NRS 3/10 auszulösen. Zur elektrischen Stimulation wurden die bereits in 2.2.2. für die unterschiedlichen Reizformen beschriebenen technischen Gerätschaften verwendet. Neben den Halbsinusreizen wurde erneut der 1 ms-Rechteckreiz als Negativkontrolle genutzt, darüber hinaus wurde ein Sinusreiz (Standardreiz mit 4 Hz, 0,2 mA) als Positivkontrolle inkludiert [57] (Tab. 2). Die Applikation des Sinusreizes erfolgte analog der Stimulation mit Halbsinusreizen (siehe 2.2.2.) über den Konstantstrom-Stimulator „DS 5 Digitimer Ltd.“ (Welwyn Garden City, Vereinigtes Königreich), die Programmierung und Steuerung der Impulse erfolgte entsprechend über das Programm Dapsys 8.0 (©Brain Turnquist, Johns Hopkins Universität, US).

Tab. 2: Zur Untersuchung der Entstehung eines Axon-Reflex-Erythems verwendete Reizformen und -dauern.

Reizform	Funktion	Reizdauern [ms]	Impulsanzahl	Stromstärke [mA]	Frequenz [Hz]
Halbsinusreize	Testreize	10, 25	8, 16, 32	0,2 mA	5
Rechteckreiz	Negativkontrolle	1	32	0,4 mA	5
Sinusreiz	Positivkontrolle		16	0,2 mA	4

Die Applikation jedes Testreizes erfolgte auf zwei von vier bereits vorab definierten und markierten Hautstellen an der volaren Oberfläche des medialen Drittels beider Unterarme der Probanden (jeweils zwei Teststellen pro Arm; Abb. 5). Im Rahmen der Doppelbestimmung jeder Reizvariante wurde sichergestellt, dass jede Reizform mit der spezifischen Reizdauer und Impulsanzahl einmal an der distaleren und einmal an der proximaleren Stelle angewendet wurde. Die Reihenfolge der Reizapplikationen wurde zuvor randomisiert (www.randomizer.org; Bedingung: jeder Reiz wird einmal proximal und einmal distal appliziert). Nach jeder Stimulation wurden die Probanden zur maximal empfundenen Schmerzstärke und dem Auftreten von Juckreiz befragt (jeweils auf einer numerischen Ratingskala von 0-10, wobei 0 keine und 10 die stärkste vorstellbare Empfindung darstellt). Die Juckreiz-Befragungen wurden als Kriterium für das Auftreten einer Histaminausschüttung aus Mastzellen als möglicher Confounder für die Entstehung einer Flare-Reaktion verwendet [94]. Zur Ermittlung des Axon-Reflex-Erythems wurde vor jeder Reizapplikation (Kontrollmessung) sowie in Abständen von 30 Sekunden für insgesamt 5 Minuten nach jeder Reizapplikation die oberflächliche Hautdurchblutung mittels Laser-Doppler-Bildgebung (Moor Instruments Ltd, Millwey, Vereinigtes Königreich) gemessen. Diese Aufzeichnung erfolgte auf einem Areal von 12,25 cm² (3,5 cm x 3,5 cm) um die jeweilige Stimmulationsstelle. Zur Größenjustierung des Messfeldes für die digitale Auswertung wurde im Anschluss an die Kontrollmessung (vor Reizabgabe) eine weitere LDI-Messung mit einem zentral auf dem Stimulationspunkt platziertem 2 cm x 2 cm großen Kartonplättchen durchgeführt (Abb. 5). Anschließend wurde der Reiz appliziert und für weitere 5 Minuten lang die lokalen Veränderungen der oberflächlichen Hautdurchblutung um die Stimulationsstelle aufgezeichnet (10 Bilder, Dauer der Einzelbild-Aufnahmen jeweils 30 Sekunden). Um an den Teststellen eine

Adaptation auf die elektrische Reizung sowie eine noch bestehende Reaktion auf einen vorherigen Testreiz zu vermeiden, wurden die Stimulationsstelle nach jeder Messung gewechselt. Im Anschluss an die Messungen wurden die LDI-Bilder digital mittels des Programms „MoorLDI analysis“ (Moor Instruments Ltd., Millwey, Vereinigtes Königreich) ausgewertet. Dabei wurden Pixel mit Flusswerten, die den Basisfluss der Kontrollmessung um die 2-fache Standardabweichung überstiegen, als signifikanter Flussanstieg betrachtet und für die Berechnung der Fläche des Axon-Reflex-Erythems verwendet. Die Fläche unter der Kurve (AUC) der Flare-Entwicklung über die Zeit wurde anhand der Trapezregel berechnet.

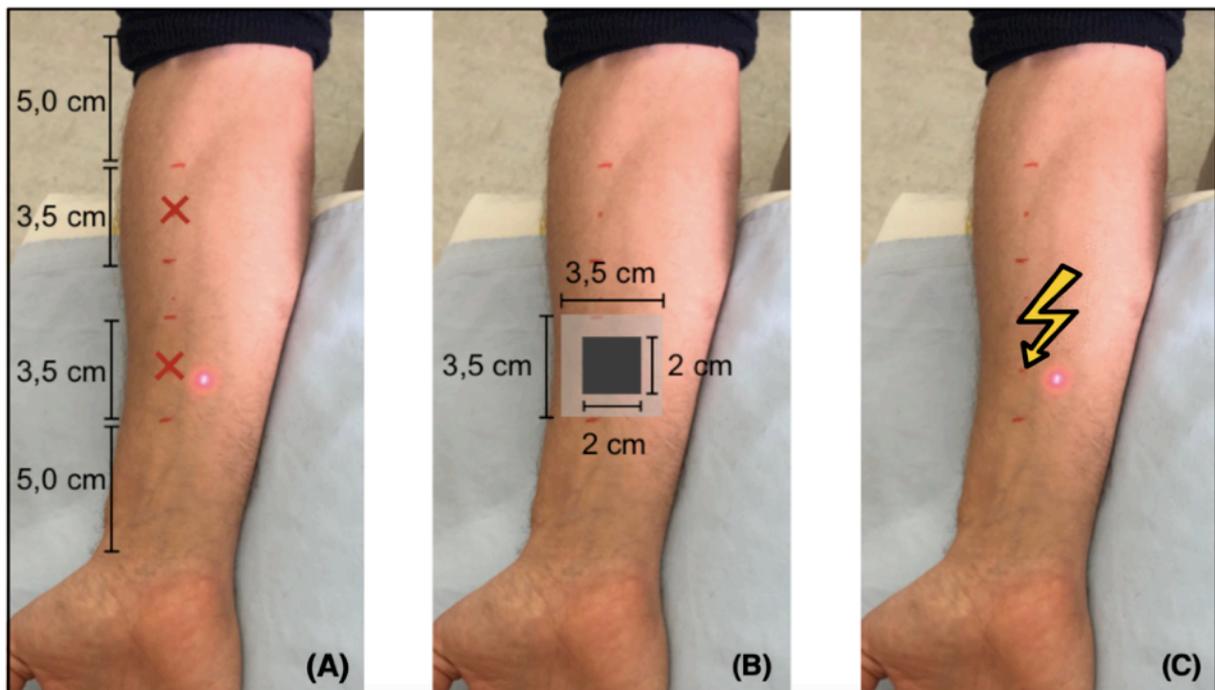


Abb. 5: Markierung der Stimulationsstellen und Ablauf der LDI-Messungen

- (A) LDI-Kontrollmessung vor Reizabgabe nach Abmessung der Testbereiche und Stimulationsstellen (hier ist der Laserstrahl beispielhaft im distalen Messfeld eines rechten Unterarms zu sehen): Die 3,5 cm x 3,5 cm großen Messbereiche wurden bei jedem Probanden in 5 cm Entfernung vom Handgelenk (distaler Messbereich) sowie von der Ellenbeuge (proximaler Messbereich) eingezeichnet. Die Stimulationsstellen wurden als Mittelpunkte der Messfelder definiert (mit rotem X markiert).
- (B) LDI-Messung mit aufgelegtem 2 cm x 2 cm großen Kartonplättchen zur Größenjustierung für die digitale Auswertung (skizzierte Darstellung des Messplättchens sowie des Laser-Messfeldes mit einer Größe von 3,5 cm x 3,5 cm)
- (C) Reizabgabe an der Stimulationsstelle, anschließend Durchführung 10 weiterer LDI-Messungen über einen Zeitraum von insgesamt 5 min (30 s pro Messung)

2.3. Ex-vivo Ableitung von C-Faser-Summenaktionspotentialen am Nervus saphenus des Schweins

Die ethische Genehmigung für die Tierversuche mit Schweinen wurde von der Ethikkommission des Regierungspräsidiums Karlsruhe (Nummer G-78/18, Karlsruhe, Baden-Württemberg, Deutschland) erteilt.

2.3.1. Präparation der Faszikel und Versuchsaufbau

Die ex-vivo Versuche am porcinen N. saphenus wurden jeweils im Anschluss an einen von der Forschungsgruppe für Schmerzmedizin der Universitätsmedizin Mannheim durchgeführten in-vivo Versuch am Schwein durchgeführt (vergleichbar mit dem Versuchsaufbau unter 2.1.1). Hierdurch konnte nach Abschluss der jeweiligen Experimente der N. saphenus der bislang nicht getesteten Körperseite im Bereich seines Ursprungs freigelegt und ein Segment von ca. 2-3,5 cm Länge gewonnen werden. Dieser Vorgang wurde unter noch bestehender Allgemeinanästhesie vor der Euthanasie der Schweine durchgeführt. Unmittelbar nach der Entnahme wurde das Nervensegment für den gesamten weiteren Versuchsablauf in physiologischer Lösung (Zusammensetzung und Herstellung in Tabelle 3 gelistet) aufbewahrt. Diese diente als synthetischer Ersatz der interstitiellen Flüssigkeit [95] zum Erhalt der Vitalität und der Funktion des Nerven.

Tab. 3: Substanzen mit Mengenangaben zur Herstellung der physiologischen Lösung in destilliertem Wasser. Die Substanzen wurden in der entsprechenden Reihenfolge ihrer Auflistung hinzugefügt. Nach Hinzugabe von Natriumgluconat erfolgte eine Anpassung des pH-Wertes auf 7,4 mittels Hinzufügen von Salzsäure (HCl) oder Natronlauge (NaOH) unter kontinuierlicher elektronischer pH-Messung. Erst im Anschluss wurden die verbleibenden Substanzen hinzugefügt.

Substanz	Stoffmenge [mM]	Konzentration [pro Liter]
Natriumchlorid (NaCl)	118.0	6.89 g
Kaliumchlorid (KCl)	3.2	0.24 g
HEPES	6.0	1.43 g
Natrium-Gluconat	20	4.36 g
pH-Adjustierung auf 7,4 (7,35-7,45)		
Calciumchlorid (CaCl ₂)	5.6	1.5 ml
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	1.5	1.0 ml
Glukose	1.0	1 g

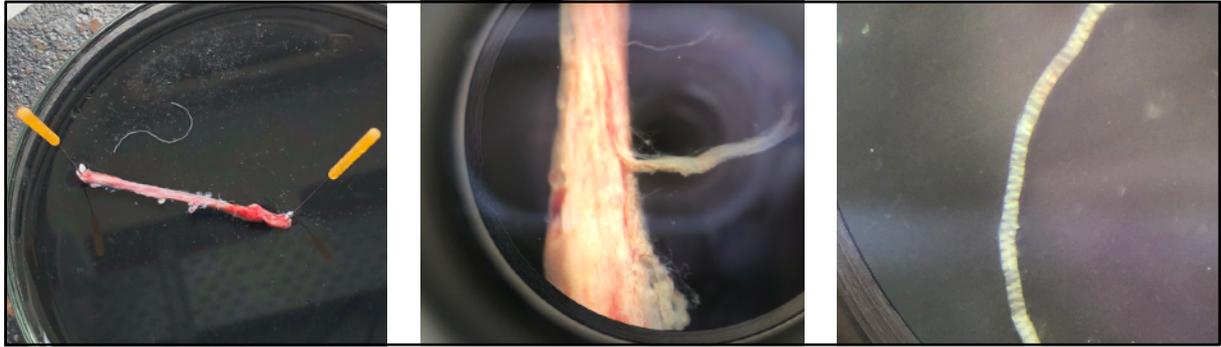


Abb. 6: Entnommener Abschnitt des Nervus saphenus (links), Ansicht des N. saphenus unter dem Mikroskop im Prozess der Abtrennung eines einzelnen Faszikels (Mitte) und Abbildung eines einzelnen Faszikels unter dem Mikroskop mit erkennbarer weiß-gräulicher Streifung (rechts).

Im Anschluss an die Entnahme wurde der Nerv unter dem Mikroskop mechanisch von Blutgefäßen, umliegendem Gewebe und Epineurium befreit und ein einzelner Faszikel abgetrennt (Abb. 6). Die noch vorhandene Vitalität konnte orientierend anhand einer optisch schimmernden, weiß-gräulichen Streifung des gesäuberten Faszikels überprüft werden. Der isolierte Faszikel wurde in ein Versuchsbad (Avere Solutions UG, Erlangen, Deutschland; Abb. 7) zwischen zwei am medialen Ende mit Silikon gepfropften Glasröhrchen eingespannt. Hierdurch entstand um den Faszikel eine mechanische und hochohmige elektrische Abdichtung. Das Organbad sowie das freie Volumen der Glasröhrchen wurden mit physiologischer Lösung befüllt. Für die anschließende Durchführung des Experiments (Ableitung von C-SAPs vorbeschrieben in [96, 95]) wurde das Versuchsbad an ein Temperaturmessgerät und über einen zu- sowie abführenden Schlauch an eine Pumpe (505S, Watson-Marlow Ltd., Falmouth, UK) angeschlossen. Hierdurch konnte ein konstanter Flüssigkeitsaustausch mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min gewährleistet werden, der das Versuchsbad mit physiologischer Lösung perfundierte, welche kontinuierlich mit gasförmigem Sauerstoff angereichert wurde. Chlorierte Silberdrähte in den Glaspipetten (lateral des Silikonpfropfens) und im Versuchsbad dienten als Anode (in der Glaspipette) und Kathode (im Versuchsbad) für Konstantstromstimuli mit einer Frequenz von 1 Hz (A395 Linear Stimulus Isolator, WPI, Sarasota, USA) und ermöglichten die Aufzeichnung der extrazellulären Signale über den Dichtungswiderstand des Silikons. Die erfassten Signale wurden verstärkt (N104 Neurolog, Digitimer, Hertfordshire, Vereinigtes Königreich), gefiltert (Tiefpass 5 kHz; Hochpass 0,1 Hz) und rauschunterdrückt (Hum Bug 50/60 Hz Noise Eliminator, Quest Scientific, North Vancouver, Kanada) sowie digitalisiert (NI-600, National Instruments, USA). Die Steuerung der Stimulationsintensität und die Datenerfassung erfolgten mittels QTRAC-Software (Digitimer Ltd, Welwyn, Garden City, Vereinigtes Königreich). Nach jedem vollständigen Versuchsdurchlauf an einem Faszikel wurde der Abstand zwischen den beiden Glaspipetten (entsprechend zwischen Stimulations- und Messseite) im Versuchsbad gemessen, dieser variierte zwischen 3,1 mm und 6,3 mm.

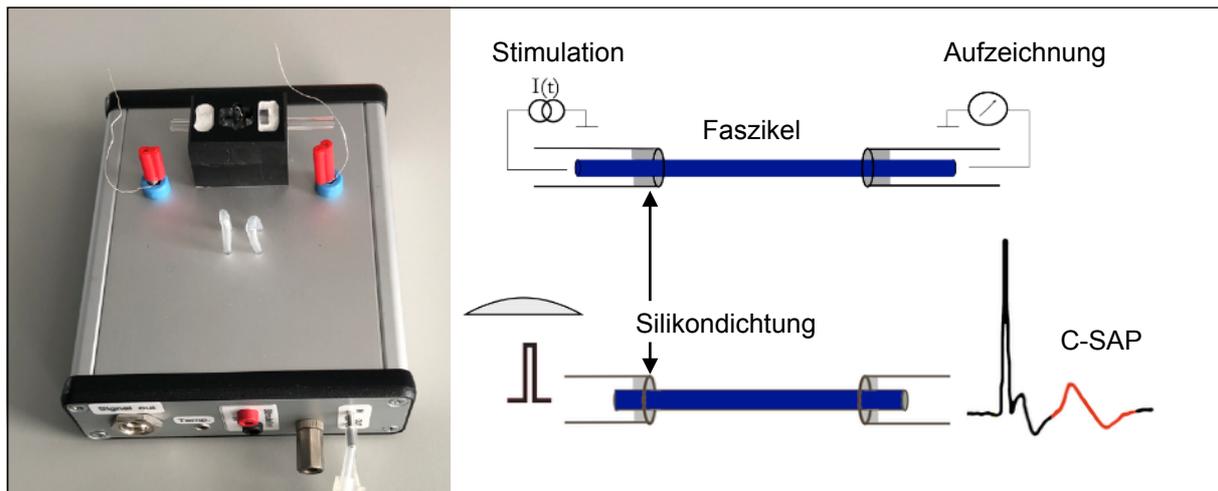


Abb. 7: Verwendetes Versuchsbad (links) und schematische Darstellung des in die Glaspipetten eingespannten Faszikels (rechts) mit den verwendeten Stimulationsformen (Rechteckreiz und Halbsinusreiz) und dem abgeleiteten C-Faser Summenaktionspotential (C-SAP).

2.3.2. Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Kurven bei Stimulation mit Halbsinusimpulsen unterschiedlicher Dauer

Es wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven für die Stimulation mit einem rechteckigen Standard-Stimulus von 1 ms Dauer und für acht Halbsinus-Stimuli von unterschiedlichen Dauern (1 ms, 2 ms, 5 ms, 10 ms, 25 ms, 50 ms, 100 ms, 250 ms) erstellt. Das Versuchsprotokoll wurde mittels QTRAC-Software (Digitimer Ltd, Welwyn, Garden City, Vereinigtes Königreich) unter Verwendung vorprogrammierter Befehle für die verschiedenen Reizformen, Reizdauern und Stromstärken durchgeführt. Für jeden Stimulus wurde die Aktivierungsschwelle bestimmt, indem die Stimulusamplitude von $0 \mu\text{A}$ in Schritten von $0,05\text{-}1 \mu\text{A}$ bis zum ersten Auftreten eines Summenaktionspotentials (SAP) gesteigert wurde. Anschließend erfolgte die Steigerung der Stimulusamplitude in mindestens fünf weiteren Schritten, bis die maximale Antwortamplitude des C-Faser-SAPs erreicht war. Die Antworten wurden bei jeder Stimulusintensität in dreifacher Ausführung erfasst. Neben den Schwellenwerten und Maximalamplituden wurden zusätzlich die Latenzen der evozierten Summenaktionspotentiale für jede Stimulation aufgezeichnet. Die C-SAP-Dosis-Wirkungs-Kurven wurden im Anschluss an die Experimente auf der Grundlage einer sigmoidalen Anpassung ihrer Form (Sigmoidalfunktion, bei der $A(x) = \text{SAP-Amplitude}$; $A = 0$; $B = \text{maximale C-SAP-Amplitude}$; $x = \text{Stimulus-Amplitude}$) mit speziellen Routinen in Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) analysiert. Dabei wurden die halbmaximale Stimulationsintensität (x_{half}), die Steigung und die maximale Amplitude für jedes Stimulationsprofil in jedem Faszikel ermittelt. Der Fit-Parameter x_{half} wurde zusätzlich für Vergleiche zwischen den einzelnen Aufzeichnungen verwendet.

2.3.3. Testung der Metabolite HMGB1 und LPS

Unter der Verwendung von drei verschiedenen ausgewählten Reizformen wurde die Reaktion der Dosis-Wirkungs-Kurven einzelner Faszikel auf ein Hinzufügen der Metabolite LPS und HMGB1 in das Versuchsbad getestet. Bei diesem Versuchsprotokoll wurden die Halbsinusreize mit den Impulsdauern 25 ms und 100 ms als Testreize sowie der Rechteckreiz mit 1 ms Dauer als Kontrollreiz verwendet. Die Versuchsvorbereitung verlief wie unter 2.3.1. beschrieben. Im Anschluss wurde für den jeweils eingesetzten Faszikel eine Kontroll-Messung (ohne Zusatz von HMGB1 oder LPS) mit der Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven (siehe 2.3.2) für alle verwendeten Reize durchgeführt. Das Versuchsbecken wurde hierbei mit reiner physiologischer Lösung (angereichert mit gasförmigem Sauerstoff) perfundiert. Die Reize wurden stets in der gleichen Reihenfolge - beginnend mit dem Rechteckreiz, danach der Halbsinusreiz von 25 ms Dauer und zuletzt der Halbsinusreiz von 100 ms Dauer - getestet. Nach den erfolgten Kontrollmessungen wurde die Perfusion des Organbades gestoppt, um ein direktes Auswaschen der Metabolite zu verhindern. Daraufhin wurden entweder 80 nM HMGB1 [79,97] oder 2500 IE LPS [86] in das Becken des Versuchsbads (Volumen ca. 1 ml) pipettiert und erneut Dosis-Wirkungs-Kurven für die drei Reizformen in oben genannter Reihenfolge erstellt. Diese Messungen wurden jeweils 5 min, 15 min, 30 min, 45 min sowie 60 min nach Hinzugabe der jeweiligen Substanz wiederholt.

2.4. Statistik

Die statistischen Tests wurden mit SPSS Statistics 25 (IBM Corp, Armonk, NY, USA) durchgeführt, die sigmoidalen oder linearen Anpassungen mit Igor Pro (Wavemetrics, Lake Oswego, USA) berechnet und die Abbildungen mit Graph Pad Prism 8 (Graph Pad Inc, San Diego, CA, USA) erstellt. Die Schwellenwerte wurden anhand einer Varianzanalyse (ANOVA) und Tukey-HSD-Test oder Bonferroni-Korrektur verglichen. Die Bonferroni-Korrektur wurde angewandt, um Mehrfachmessungen bei der Post-hoc-Analyse auszuschließen. Die Daten wurden als Mittelwerte mit Standardabweichung (Ausgangsmerkmale) oder als Standardfehler des Mittelwerts (SEM) mit 95 %-Konfidenzintervall (KI) angegeben.

3. ERGEBNISSE

3.1. Aufzeichnungen einzelner C-Fasern am Schwein in-vivo

3.1.1 Getestete C-Faserklassen

Es wurden die extrazellulären Signale einzelner C-nozizeptiver Nervenfasern bei insgesamt 21 männlichen Hausschweinen im Alter von drei Monaten in-vivo aufgezeichnet. Unter den getesteten Fasern befanden sich 21 polymodale Nozizeptoren (Leitungsgeschwindigkeit $1,06 \pm 0,31$ m/s), 13 mechanosensible („brush-positive“) C-Touch-Fasern (auch als „Berührungs-Fasern“ bezeichnet; Leitungsgeschwindigkeit $1,14 \pm 0,26$ m/s) und 12 mechano-unempfindliche „stumme“ Nozizeptoren (Leitungsgeschwindigkeit $0,91 \pm 0,32$ m/s) (Tab. 4). Die mechanische Schwelle der polymodalen Nozizeptoren lag im Median bei 4 g (Spannweite 2-10 g).

Tab. 4: Anzahl und Eigenschaften der getesteten Einzelfasern der unterschiedlichen C-Nozizeptorklassen.

Faserklassen	Anzahl (n)	Mittelwert der Leitungsgeschwindigkeit [ms] (± Standardfehler)	Mittelwert der Chronaxie [ms] (± Standardfehler)
Polymodale Fasern	21	$1,06 \pm 0,31$	$14,2 \pm 2,9$
C-Touch-Fasern	13	$1,14 \pm 0,26$	$15,8 \pm 4,1$
Stumme C-Fasern	12	$0,91 \pm 0,32$	$16,8 \pm 4,7^*$

* n = 8

3.1.2 Schwellenwerte und Chronaxie

Bei Verwendung länger andauernder Halbsinusimpulse (2 ms - 250 ms) anstelle des kurzen 1 ms-Halbsinusreizes zeigten sich über alle Faserklassen hinweg reduzierte elektrische Aktivierungsschwellen (Abb. 8, Tab. 5). Eine Verlängerung der Stimulusdauer von 1 ms auf 25 ms reduzierte die Aktivierungsschwellen je nach Faserklasse um einen Faktor von 2-3, die polymodalen Nervenfasern zeigten dabei die stärkste Reduktion der benötigten Stromstärke (Abb. 8). Polymodale Nozizeptoren hatten außerdem für Stimulationsdauern zwischen 1 ms und 10 ms signifikant höhere Aktivierungsschwellen als C-Touch-Fasern, ihre Schwellenwerte unterschieden sich untereinander aber nicht mehr signifikant bei noch längeren Stimulationsdauern von 25 bis 250 ms (Abb. 8, Tab. 5). Eine Verlängerung der Stimulationsdauer über 50 ms hinaus führte lediglich bei den stummen Nozizeptoren zu einer weiteren Reduktion der Aktivierungsschwelle (Abb. 8). Bei Betrachtung der Chronaxie (Tab. 4) wurde kein signifikanter Unterschied zwischen polymodalen ($14,2 \pm 2,9$ ms; Mittelwert ± Standardfehler) und C-Touch-Fasern ($15,8 \pm 4,1$ ms) festgestellt ($p = 0,9$, ANOVA). Stumme C-Nozizeptoren hatten - verglichen mit polymodalen Nozizeptoren sowie C-touch-Fasern - die höchsten Aktivierungsschwellen für alle Halbsinus-Stimulationsdauern. Die Chronaxie konnte für 8 von ihnen berechnet werden und betrug im Mittel $16,8 \pm 4,7$ ms.

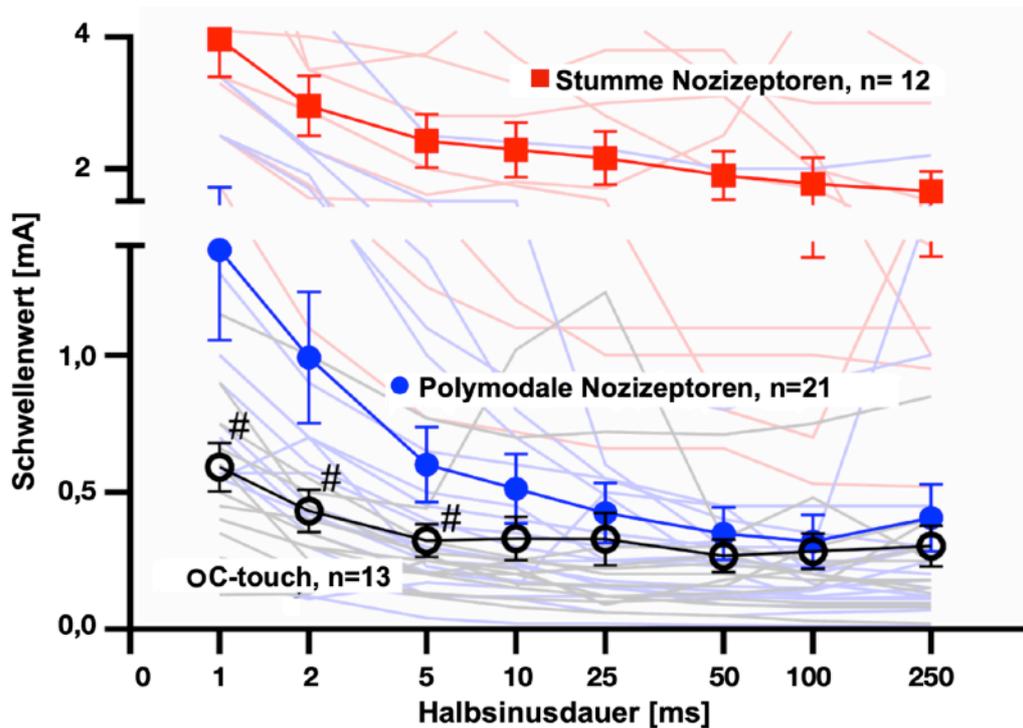


Abb. 8: Erregungsschwellen [mA] einzelner porciner C-Fasern unterschiedlicher Faserklassen in Abhängigkeit von der Dauer des verwendeten Halbsinus-Reizes. Die Symbolzentren stellen den mittleren Strom [mA] bei einer bestimmten Impulsdauer [ms] plus Standardfehler des Mittelwerts (SEM, durch Balken gekennzeichnet) dar. Die abgeschwächt dargestellten Linien im Hintergrund stellen die Ergebnisse der einzelnen Fasern dar. Farblegende: schwarzer, offener Kreis: C-Touch-Fasern (Berührungs-Fasern); blauer Kreis: polymodale Fasern; rotes Quadrat: stummer Nozizeptor. # zeigt signifikante Unterschiede zwischen C-Touch- und polymodalen Nozizeptoren bei einer bestimmten Impulsdauer an ($p < 0,05$). Für alle Stimulationsdauern hatten stumme C-Nozizeptoren höhere Schwellenwerte als polymodale Nozizeptoren ($p < 0,01$; Tukey post-hoc).

Tab. 5: Mittelwerte der Schwellenwerte getesteter C-Faserklassen (\pm Standardabweichung) bei Stimulation mit unterschiedlichen Halbsinus (HS) - Dauern; *signifikant unterschiedlich zu dem mittleren Schwellenwert der polymodalen Fasern der entsprechenden Impulsdauer ($p < 0,05$).

Faserklasse	Mittelwerte der Schwellenwerte verschiedener C-Faserklassen (\pm Standardabweichung) bei unterschiedlichen Halbsinusdauern							
	HS 1 ms	HS 2 ms	HS 5 ms	HS 10 ms	HS 25 ms	HS 50 ms	HS 100 ms	HS 250 ms
Polymodale (n = 21)	1,39 $\pm 1,48$	0,99 $\pm 1,07$	0,60 $\pm 0,61$	0,51 $\pm 0,56$	0,42 $\pm 0,49$	0,35 $\pm 0,43$	0,32 $\pm 0,44$	0,41 $\pm 0,30$
C-touch (n = 13)	0,59* $\pm 0,32$	0,43* $\pm 0,28$	0,32* $\pm 0,21$	0,33* $\pm 0,29$	0,33 $\pm 0,35$	0,27 $\pm 0,21$	0,28 $\pm 0,24$	0,28 $\pm 0,27$
„Stumme“ (n = 12)	3,97* $\pm 1,82$	2,96* $\pm 1,45$	2,42* $\pm 1,3$	2,29* $\pm 1,3$	2,16* $\pm 1,29$	1,89* $\pm 1,76$	1,76* $\pm 1,28$	1,40* $\pm 0,99$

3.2. Psychophysik und Axon-Reflex-Erythem beim Menschen

3.2.1. Versuchspersonen

Im ersten Teil der Probandenstudie (3.2.2. Psychophysik) nahmen insgesamt 15 Testpersonen (5 weibliche und 10 männliche) an den Messungen am Unterarm sowie am Fußrücken (je zwei Messstellen) teil. Die Versuchspersonen waren durchschnittlich 31,6 Jahre alt (Standardabweichung $\pm 10,5$ Jahre). Am zweiten Abschnitt der Probandenstudie (3.2.3. Axon-Reflex-Erythem) nahmen insgesamt 20 Testpersonen (darunter 10 Frauen und 10 Männer) im Alter von durchschnittlich 33,5 Jahren (Standardabweichung $\pm 11,5$ Jahre) teil. Insgesamt waren 12 Freiwillige (4 weiblich, 8 männlich) an beiden Experimenten beteiligt (Tab. 6). 21 Teilnehmende waren kaukasischer, einer indischer und einer hispanischer Herkunft.

Tab. 6: Alters- und Geschlechterverteilung der Testpersonen beider Versuchsteile

Experiment	Experiment I (Psychophysik)			Experiment II (Axon-Reflex-Erythem)			Experiment I + II (Alle Teilnehmer)		
	♀	♂	Total	♀	♂	Total	♀	♂	Total
Anzahl (n)	5	10	15	10	10	20	11	12	23
Alter [Jahre] Mittelwert (SD)	29.8 (13.0)	32.5 (10.0)	31.6 (10.5)	34 (13.0)	33 (10.4)	33.5 (11.5)	32.7 (12.2)	33.3 (9.5)	33 (10.6)
Alter [Jahre] Spannweite	23-53	24-57	23-57	21-56	25-58	21-58	21-56	24-58	21-58

3.2.2. Psychophysik (Dosis-Wirkungsbeziehung von Halbsinusreizen unterschiedlicher Länge am Unterarm und am Fußrücken)

3.2.2.1 Schwellenwerte (Wahrnehmungsschwelle, Schmerzschwelle, NRS3)

Sowohl für die Wahrnehmungsschwelle, als auch für die Schmerzschwelle und zum Erreichen einer Schmerzstärke von NRS 3 von 10, waren mit länger werdenden Dauern eines Halbsinusstimulus geringere Stromamplituden an den getesteten Hautstellen erforderlich (Abb. 9). Im paarweisen Vergleich mit dem rechteckigen 1 ms-Reiz ergab sich für die Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen eine signifikante Reduzierung der benötigten Stromstärke ab einer Halbsinusdauer von 10 ms. Für das Erreichen der Schmerzstärke NRS 3/10 traf dies ab einer Impulsdauer von 25 ms zu (p -Werte $< 0,05$). Diese Signifikanz ergab sich sowohl für die Messungen am Unterarm, als auch für jene am Fußrücken (Tab. 7 und Tab. 8). Wurde anstelle des 1 ms-Rechteckreizes der 25 ms-Halbsinusreiz verwendet, so reduzierten sich die Schmerzschwellen im Durchschnitt auf weniger als ein Viertel der zuvor benötigten Stromstärke. Zum Erreichen einer Schmerzstärke 3 von 10 war im Mittel weniger als die Hälfte der zuvor benötigten Stromstärke notwendig (Tab. 7 und Tab. 8). Die im Verlauf abflachenden Schwellenwert-Kurven in Abbildung 9

veranschaulichen, dass eine weitere Verlängerung der Impulsdauer über 25 ms hinaus im direkten Vergleich mit dem 25 ms-Reiz zu keiner weiteren signifikanten Verringerung der Stromintensitäten führte. Einzige Ausnahme bildete hierbei die NRS 3-Messung am Unterarm, bei der eine Erhöhung auf die maximal getestete Reizlänge von 250 ms eine zusätzliche signifikante Reduzierung erreichte (vgl. Tab. 7 (Unterarm) und Tab. 8 (Fuß) für die genauen Werte; Abb. 9 für den Kurvenverlauf). In Anbetracht dieser Ergebnisse und der für eine effiziente Reizform zu berücksichtigenden Faktoren a) möglichst geringe Stromstärke bei b) möglichst geringer Halbsinuslänge, wurde im zweiten Versuchsteil (3.2.3.) mit einer Testung der Halbsinuslängen 10 ms und 25 ms als „optimierte Halbsinusstimuli“ fortgefahren. Die in 3.2.3. verwendete Stromstärke orientiert sich mit 0,2 mA an einer Stimulationsintensität, welche bei Verwendung der optimierten Reizlängen am Unterarm eine klar überschwellige, jedoch nicht zu schmerzhaft empfindung hervorrief (Tab. 7).

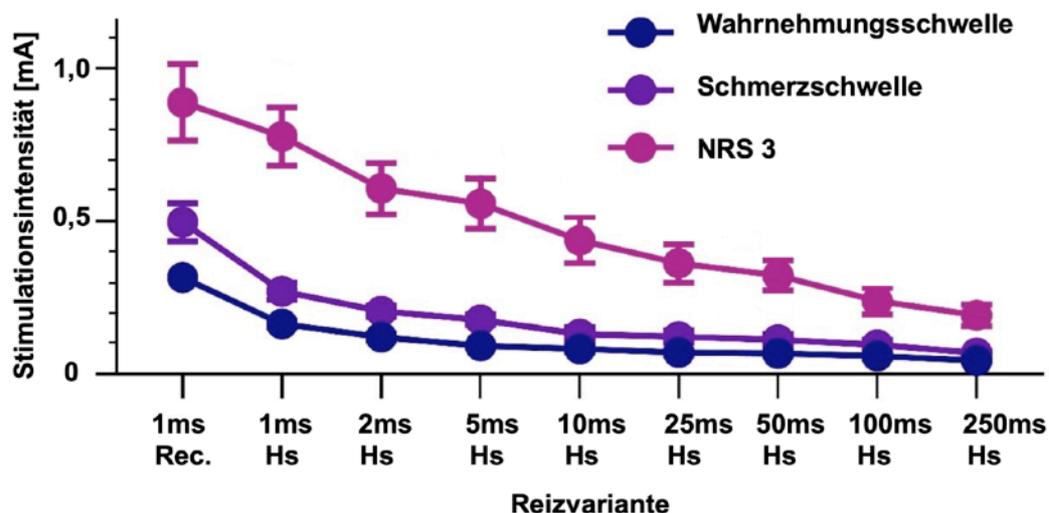


Abb. 9: Verlauf der Wahrnehmungsschwellen (dunkelblau), Schmerzschwellen (lila) und der für NRS 3 (pink) benötigten Stromstärken [mA] bei Stimulation mittels eines Rechteckreizes von 1 ms und Halbsinusimpulsen von 1-250 ms Dauer. Die Symbole stellen den Mittelwert der benötigten Stromstärke dar, die Balken geben den jeweiligen Standardfehler an.

3.2.2.2 Einfluss von Geschlecht, Alter und Stimulationsstelle

Die Dosis-Wirkungs-Kurven für Wahrnehmungsschwelle, Schmerzschwelle und Schwelle zum Erreichen von NRS 3 unterschieden sich nicht signifikant zwischen Unterarm und Fußrücken, nicht zwischen proximaler oder distaler Stimulation des Unterarms und auch nicht hinsichtlich des Geschlechts (n.s.; ANOVA). Die Wahrnehmungsschwelle zeigte eine signifikante Altersabhängigkeit mit höheren Schwellenwerten bei älteren Probanden ($p = 0,015$; $\eta^2 = 0,401$), dieser Trend war hingegen für die Schmerzschwelle und für NRS 3 nicht signifikant.

Tab. 7: Ermittelte Schwellenwerte am Unterarm für rechteckige und halbsinusförmige Stimulationen: Wahrnehmungsschwelle (niedrigste Intensität, bei der eine Empfindung registriert wurde); Schmerzschwelle (niedrigste Intensität, bei der eine schmerzhafte Empfindung wahrgenommen wurde); Schwelle für NRS 3 (Intensität, welche zu einer Schmerzbewertung 3 auf einer numerischen Rating-Skala von 0-10 führte). Gelistet sind zudem die Prozentsätze polymodaler Nervenfasern, welche beim Einzelfaserversuch am Schwein (3.1.) mit der gemittelten Stromstärke aus dem Probandenversuch und der entsprechenden Reizform aktiviert worden wären („aktiv. Nozizeptoren [%]“, grau schattierte Spalte).

Unterarm	Wahrnehmungsschwelle [mA]			Schmerzschwelle [mA]			NRS 3 [mA]		
	Mittelwert (SEM)	CI (95%)	Aktiv. Nozizeptoren [%]	Mittelwert (SEM)	CI (95%)	Aktiv. Nozizeptoren [%]	Mittelwert (SEM)	CI (95%)	Aktiv. Nozizeptoren [%]
1 (rect.)	0.31** (.02)	[.27; .35]		0.50** (.06)	[.36; .64]		0.86* (.13)	[.59; 1.3]	
1 (HS)	0.17** (.01)	[.15; .20]	4.8	0.27** (.03)	[.21; .33]	19.0	0.74** (.10)	[.54; .94]	57.1
2 (HS)	0.12** (.01)	[.09; .15]	4.8	0.20** (.02)	[.16; .24]	19.0	0.57* (.08)	[.39; .75]	52.4
5 (HS)	0.09** (.01)	[.08; .10]	4.8	0.17* (.02)	[.13; .21]	23.8	0.52* (.08)	[.34; .70]	76.2
10 (HS)	0.08 (.01)	[.06; .10]	4.8	0.12 (.02)	[.08; .17]	19.0	0.42* (.08)	[.26; .59]	71.4
25 (HS)	0.07 (.01)	[.05; .09]	14.3	0.12 (.02)	[.08; .16]	14.3	0.36 (.06)	[.21; .42]	71.4
50 (HS)	0.07 (.01)	[.05; .08]	14.3	0.12 (.02)	[.08; .15]	19.0	0.31 (.05)	[.21; .42]	76.2
100 (HS)	0.06 (.01)	[.04; .08]	9.5	0.10 (.02)	[.06; .13]	19.0	0.24 (.04)	[.15; .34]	61.9
250 (HS)	0.05 (.01)	[.04; .05]	14.3	0.07 (.01)	[.01; .09]	19.0	0.20* (.04)	[.12; .28]	47.6

Anmerkungen: SEM: Standardfehler des Mittelwerts; CI: 95 % Konfidenzintervall

*signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zu den Mittelwerten der Impulsdauern (ID) von ≥ 25 ms innerhalb der jeweiligen Spalte

** signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zu den Mittelwerten der Impulsdauern von ≥ 5 ms innerhalb der jeweiligen Spalte

Tab. 8: Ermittelte Schwellenwerte am Fußrücken für rechteckige und halbsinusförmige Stimulationen: Wahrnehmungsschwelle (niedrigste Intensität, bei der eine Empfindung registriert wurde); Schmerzschwelle (niedrigste Intensität, bei der eine schmerzhaft empfundene Empfindung wahrgenommen wurde); Schwelle für NRS 3 (Intensität, welche zu einer Schmerzbewertung 3 auf einer numerischen Rating-Skala von 0-10 führte). Gelistet sind zudem die Prozentsätze polymodaler Nervenfasern, welche beim Einzelfaserversuch am Schwein (3.1.) mit der gemittelten Stromstärke aus dem Probandenversuch und der entsprechenden Reizform aktiviert worden wären („aktiv. Nozizeptoren [%]“, grau schattierte Spalte).

Fuß	Wahrnehmungsschwelle			Schmerzschwelle			NRS 3		
	[mA]			[mA]			[mA]		
Impuls- dauer [ms]	Mittel- wert (SEM)	CI (95%)	Aktiv. Nozize- ptoren [%]	Mittel- wert (SEM)	CI (95%)	Aktiv. Nozize- ptoren [%]	Mittel- wert (SEM)	CI (95%)	Aktiv. Nozize- ptoren [%]
1 (rect.)	0.35** (.03)	[.29; .41]		0.46** (.04)	[.36; .55]		0.73** (.07)	[.57; .89]	
1 (HS)	0.16** (.02)	[.12; .20]	4.8	0.25** (.03)	[.20; .31]	14.3	0.59** (.07)	[.43; .75]	42.9
2 (HS)	0.12 (.01)	[.09; .14]	4.8	0.17** (.01)	[.14; .20]	14.3	0.54* (.10)	[.33; .74]	52.4
5 (HS)	0.08 (.01)	[.06; .10]	4.8	0.13 (.02)	[.09; .16]	19.0	0.39° (.07)	[.24; .54]	61.9
10 (HS)	0.08 (.01)	[.06; .10]	4.8	0.12 (.02)	[.09; .16]	19.0	0.35° (.07)	[.21; .49]	57.1
25 (HS)	0.07 (.01)	[.04; .10]	14.3	0.11 (.02)	[.07; .14]	14.3	0.28 (.04)	[.19; .37]	57.1
50 (HS)	0.8 (.01)	[.06; .09]	14.3	0.11 (.01)	[.08; .13]	19.0	0.24 (.03)	[.18; .30]	57.1
100 (HS)	0.07 (.01)	[.05; .08]	14.3	0.09 (.01)	[.07; .11]	19.0	0.18 (.02)	[.13; .29]	52.4
250 (HS)	0.05 (.01)	[.04; .07]	14.3	0.09 (.03)	[.04; .15]	23.8	0.16 (0.2)	[.11; .20]	38.1

Anmerkungen: SEM: Standardfehler des Mittelwerts; CI: 95 % Konfidenzintervall

*signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zu den Mittelwerten der Impulsdauern (ID) von ≥ 25 ms innerhalb der jeweiligen Spalte

** signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zu den Mittelwerten der Impulsdauern von ≥ 5 ms innerhalb der jeweiligen Spalte

3.2.2.2 Schmerzqualitäten

Die von den Versuchspersonen geäußerte, subjektive Beschreibung der Schmerzwahrnehmung war über alle getesteten Reizformen, -dauern und -lokalisationen hinweg heterogen. Obgleich bei jedem der Teilnehmenden vorab eine Probemessung zur Schulung einer kurz-stechenden sowie einer lang-brennenden Wahrnehmungsbeurteilung durchgeführt wurde, gaben die Probanden während der Durchführung des Experimentes Schwierigkeiten bei der klaren Benennung der Schmerzqualitäten an. Hierdurch entstanden für die Protokollierung 3 Abstufungen, die einen fließenden Übergang zwischen den zwei Schmerzqualitäten erlaubten (siehe Abb. 10 und Abb. 11). Es dominierte über fast alle getesteten Reizformen hinweg eine ausschließlich kurz-stechende Empfindung (Abb. 10 und Abb. 11, blauer Balkenanteil), alleinige Ausnahme bildete hierbei der 250 ms Halbsinusreiz am Unterarm (Abb. 10). Allgemein fiel am Unterarm mit länger werdenden Halbsinusreizen eine zunehmende Unsicherheit in der Wahrnehmungsbeurteilung durch die Versuchspersonen auf, diese spiegelte sich in der häufigeren Angabe einer zusätzlichen länger-brennenden Schmerz-Komponente wider (Abb. 10, Abnahme des blauen Balkenanteils für eine ausschließlich kurz-stechende Wahrnehmung, Zunahme der zur Abstufung verwendeten "Mischqualitäten"). Am Fußrücken zeigte sich über alle Impulslängen hinweg ein diffuses Mischbild der Schmerzqualitäten ohne richtungsweisende Tendenz (Abb. 11).

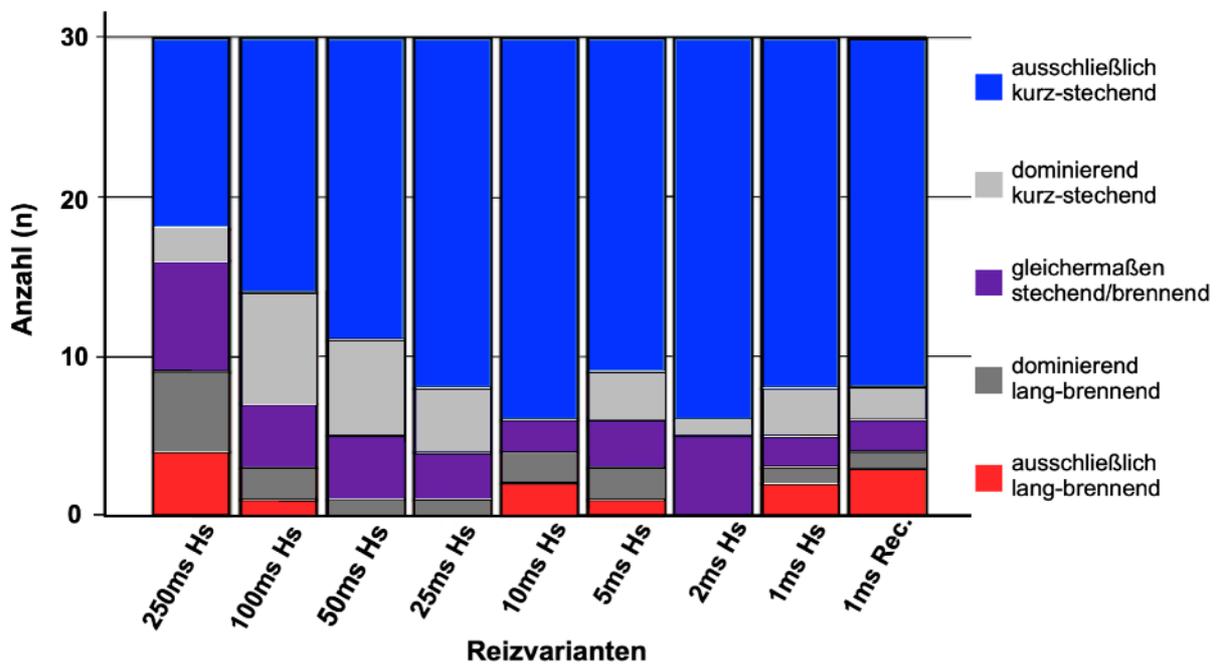


Abb. 10: Am Unterarm wahrgenommene Schmerzqualitäten beim Erreichen einer Schmerzstärke von NRS 3. Dargestellt für die Stimulation mit unterschiedlichen Reizformen und -dauern (1 ms-Rechteckreiz, Halbsinusreize 1 ms-250 ms). Anzahl der Befragungen (n) = 30 (15 Probanden bei jeweils 2 getesteten Hautstellen); mögliche Schmerzqualitäten: ausschließlich kurz-stechend (blau), dominierend kurz-stechend (hellgrau), gleichermaßen kurz-stechende und lang-brennende Komponente (lila), dominierend lang-brennend (dunkelgrau), ausschließlich lang-brennend (rot).

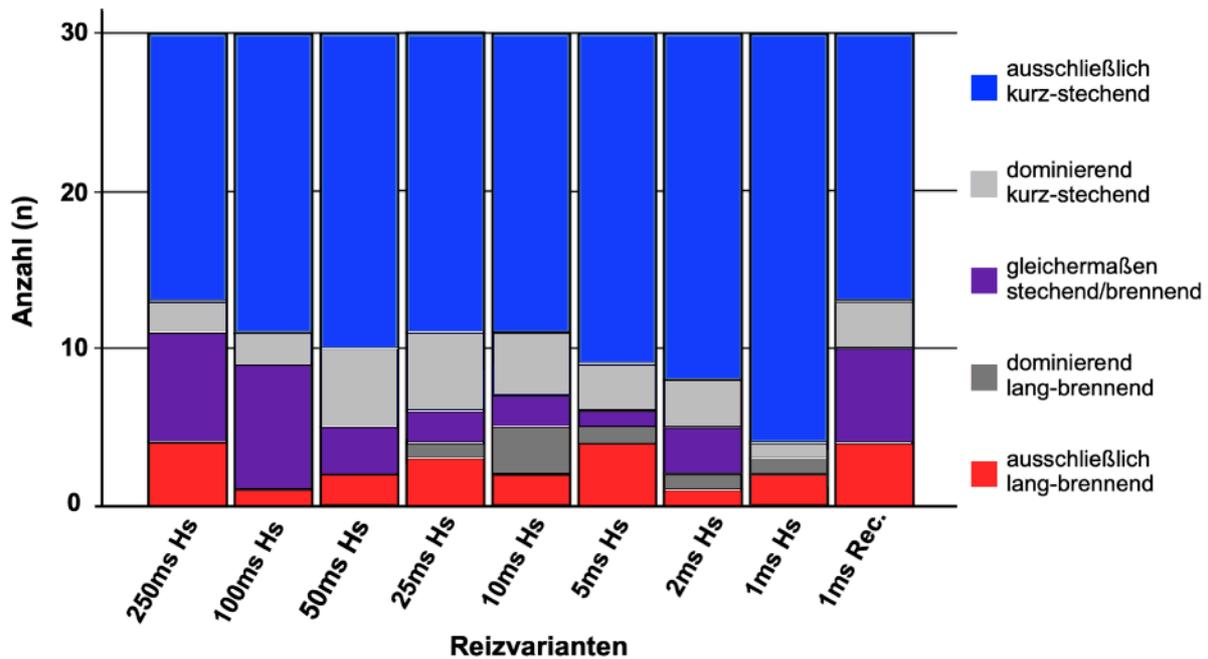


Abb. 11: Am Fußrücken wahrgenommene Schmerzqualitäten beim Erreichen einer Schmerzstärke von NRS 3. Dargestellt für die Stimulation mit unterschiedlichen Reizformen und -dauern (1 ms Rechteckreiz, Halbsinusreize 1 ms-250 ms). Anzahl der Befragungen (n) = 30 (15 Probanden bei jeweils 2 getesteten Hautstellen); mögliche Schmerzqualitäten: ausschließlich kurz-stechend (blau), dominierend kurz-stechend (hellgrau), gleichermaßen kurz-stechende und lang-brennende Komponente (lila), dominierend lang-brennend (dunkelgrau), ausschließlich lang-brennend (rot).

3.2.2.3 Psychophysik im Vergleich zu Schwellenwerten polymodaler Fasern

In den Tabellen 7 und 8 wurden zusätzlich zu den psychophysikalischen Daten aus den Probandenversuchen die entsprechenden Prozentsätze der polymodalen Nozizeptoren angegeben, die in den Einzelfaser-Experimenten am Schwein (siehe orientierend Tab. 5 unter 3.1.) mit der jeweiligen Stromstärke der menschlichen Psychophysik aktiviert worden wären. Bereits bei Stromstärken im Bereich der Wahrnehmungsschwelle der Versuchspersonen wurden 5-15 % der polymodalen Nozizeptoren beim Schwein aktiviert. Dieser Prozentsatz stieg auf 14-24 % für Stromamplituden, die zum Erreichen der Schmerzschwelle benötigt wurden, und verdreifachte sich auf ungefähr 38-76 % bei Stromstärken, welche bei den Testpersonen eine Schmerzbewertung von NRS 3/10 hervorriefen.

Zudem wurde in Abbildung 12 zusätzlich zu den Verlaufskurven der 3 an den Testpersonen gemessenen Schwellen der Verlauf der Aktivierungsschwelle der polymodalen Nozizeptoren aus dem Einzelfaser-Versuch am Schwein (siehe 3.1) abgebildet. Während sich im Bereich von 1-2 ms Stimulationsdauer noch eine deutliche Abweichung zu den Kurven der Psychophysik zeigte, ergab sich bei weiterer Verlängerung der Stimulationsdauer eine Annäherung an die Kurve der NRS 3-Messung. Im Bereich um die Halbsinustlängen von 10 ms bis 25 ms entstand dabei ein nahezu paralleler Verlauf zwischen den genannten Schwellenwert-Kurven.

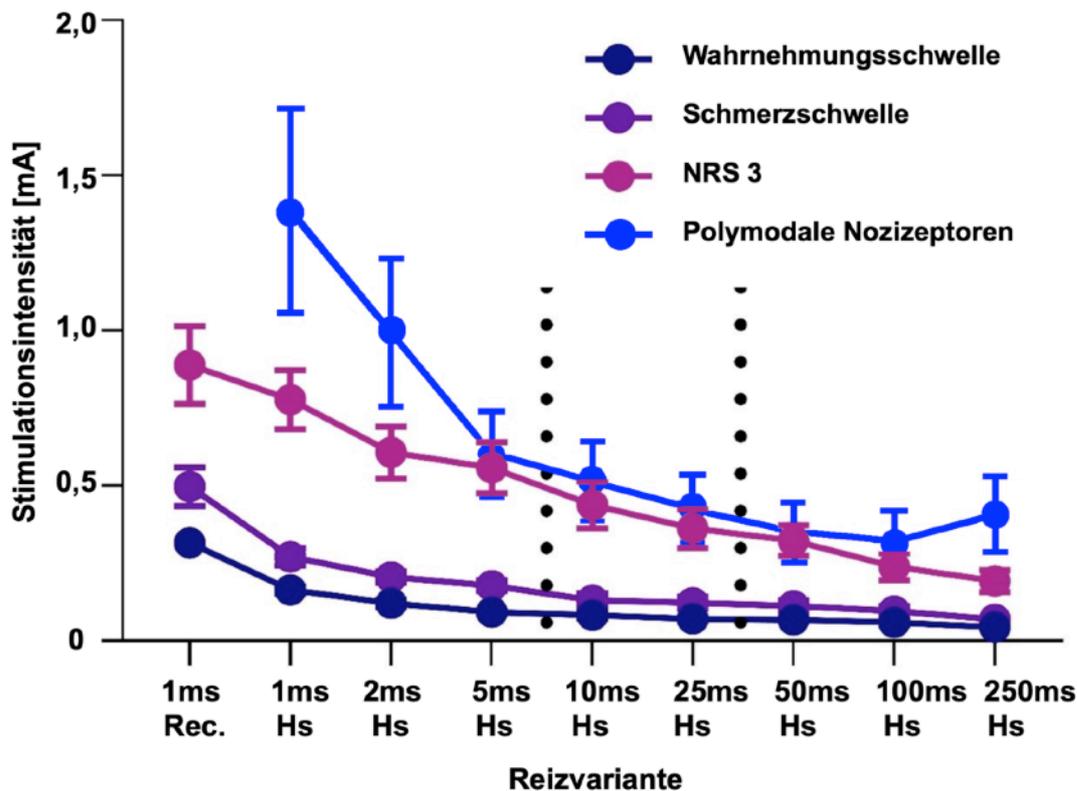


Abb. 12: Verlauf von Wahrnehmungsschwelle (dunkelblau), Schmerzschwelle (lila) und der für NRS 3 (pink) benötigten Stromstärke [mA] für einen Rechteckreiz von 1 ms und Halbsinusimpulse von 1-250 ms Dauer. Die Kreissymbole stellen den Mittelwert der benötigten Stromstärke bei der jeweiligen Reizdauer dar, die Balken geben den Standardfehler an. Zudem wurden die Erregungsschwellen [mA] für polymodale Nozizeptoren (blau) aus den Einzelfaserversuchen an Schweinen für die Halbsinusimpulse von 1-250 ms (siehe Abb. 8 Versuch 3.1) zur besseren Veranschaulichung in die Abbildung integriert.

3.2.3. Axon-Reflex-Erythem (Schmerzrating und Axonreflexausbreitung bei optimierter Halbsinusstimulation unterschiedlicher Impulsanzahl)

3.2.3.1 Schmerzrating und Axon-Reflex-Erythem

Signifikante Auswirkungen auf die Schmerzbewertungen der Testpersonen und das erzeugte Axon-Reflex-Erythem wurden für die angewandte Reizform, die Anzahl der angewandten Pulse und die jeweilige Pulsdauer festgestellt (siehe Abbildungen 14 und 16 für Vergleiche und exakte p-Werte und Tabelle 9 für die genauen Zahlenwerte). Die exemplarische Abbildung von LDI-Lasermessungen einer ausgewählten Testperson (Abb. 13) lässt erkennen, dass sowohl mittels der Halbsinusreize (10 ms und 25 ms, jeweils 32 Pulse) als auch mittels des Sinusreizes (16 Pulse, Positiv-Kontrolle) ein Axon-Reflex-Erythem ausgelöst werden konnte. Nach Stimulation mit dem Rechteckreiz (32 Pulse, Negativ-Kontrolle) wurde hingegen keine wesentliche Veränderung der Hautdurchblutung erfasst (Abb. 13).

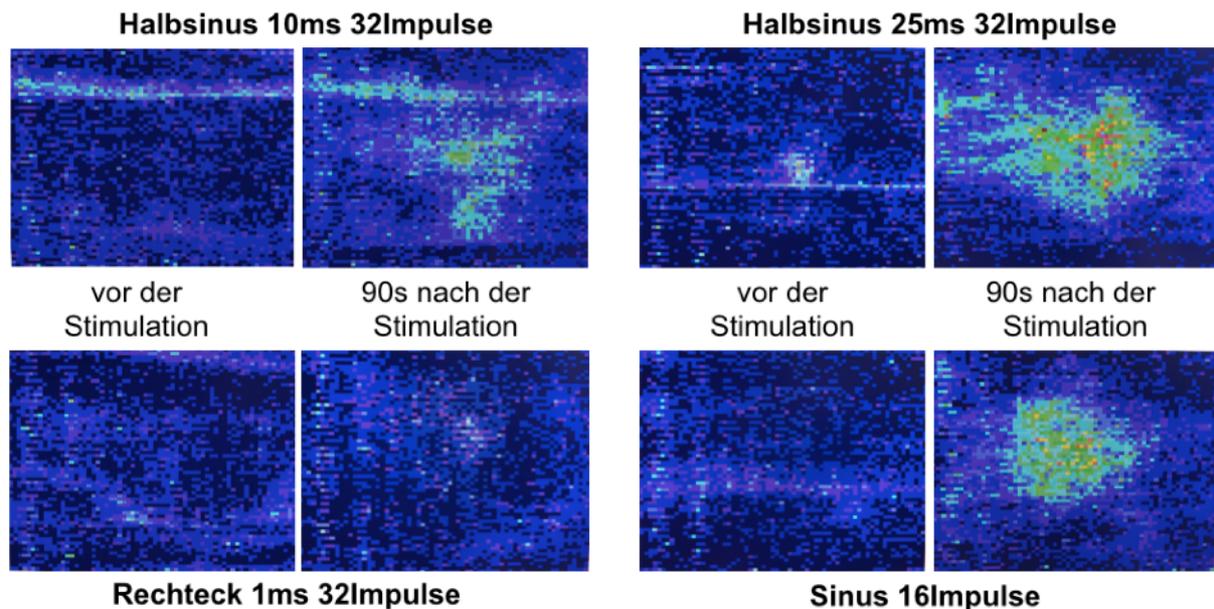


Abb. 13: Beispiel von Messungen der Hautdurchblutung mittels LDI-Laser bei einer ausgewählten Testperson. Farblich aufgelöstes Ausmaß der Hautdurchblutung jeweils vor und 90 Sekunden nach der Stimulation (Zunahme der Hautdurchblutung in folgender Farb-Reihenfolge: dunkelblau - lila - hellblau - grün - gelb - orange - rot). Dargestellt für die 4 getesteten Reizformen mit der jeweils höchsten getesteten Pulsanzahl (Halbsinus 10 ms und 25 ms mit jeweils 32 Impulsen, 1 ms-Rechteckreiz mit 32 Impulsen und Sinusreiz mit 16 Zyklen).

Sowohl mit steigender Impulsdauer (25 ms vs. 10 ms) als auch mit steigender Impulsanzahl der Halbsinusreize (32 vs. 16 vs. 8 Impulse) erhöhte sich das durchschnittliche Schmerzrating der Versuchspersonen (Abb. 14). Im analogen Zusammenhang (mit steigender Impulsdauer, steigender Impulsanzahl, höherem Schmerzrating) konnte zudem eine stärkere Flare-Reaktion registriert werden (Abb. 16). Unter den getesteten Halbsinusreizen erzielte demnach der 25 ms Reiz mit 32 Impulsen bei Betrachtung der Mittelwerte aller Versuchspersonen (Tab. 9) das höchste Schmerzrating und das großflächigste Axon-Reflex-Erythem. Beide verwendeten Halbsinusdauern lösten bei Stimulation mit 32 Pulsen signifikant höhere Schmerzratings und der 25 ms-Reiz zudem signifikant stärkere Flare-Reaktionen aus als der Standard-Rechteckimpuls, obwohl nur eine halb so starke Stimulusintensität verwendet wurde (Stromstärke beim verwendeten Halbsinusreiz 0,2 mA und beim Rechteckreiz 0,4 mA; siehe Tab. 2). Das ausgelöste Axon-Reflex-Erythem unterschied sich bei Applikation des 25 ms-Halbsinusreizes mit 32 Pulsationen darüber hinaus nicht signifikant von dem der 4 Hz-Sinuswellen-Stimulation mit vergleichbarer Pulsanzahl, obgleich im Schmerzrating ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Reizformen bestand. Die über alle Versuchspersonen gemittelte Flare-Reaktion erreichte ihre maximale Ausbreitung zu einem Zeitpunkt zwischen 60 und 90 Sekunden nach Reizapplikation und reduzierte sich nach Ablauf der Gesamtbeobachtungszeit von 5 min wieder auf ungefähr die Hälfte ihrer maximalen Fläche (Abb. 15).

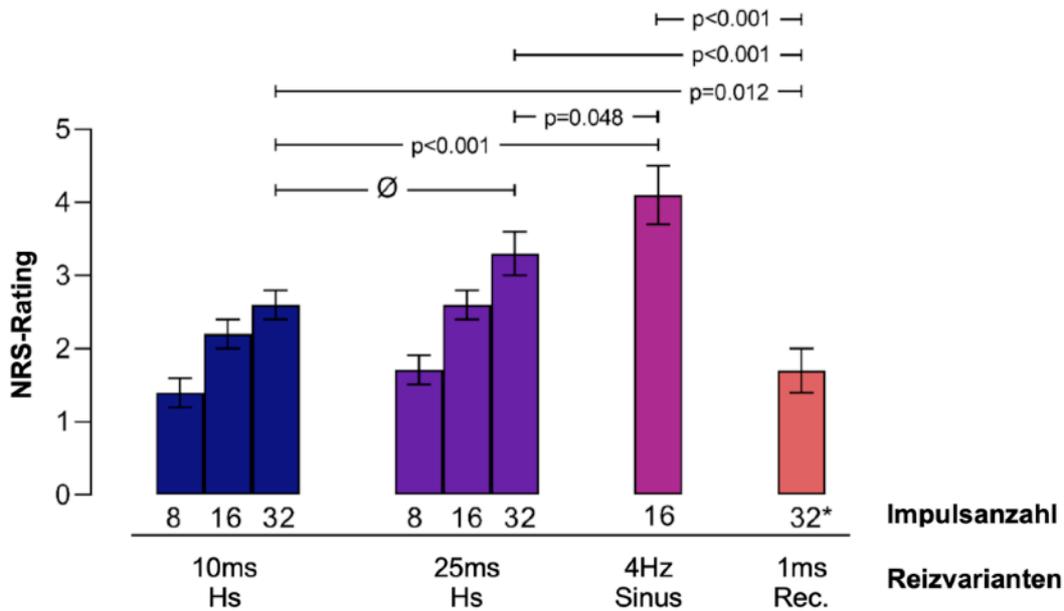


Abb. 14: Mittelwerte der maximalen Schmerzratings (numerische Ratingskala 0-10) bei Stimulation mit 10 ms- und 25 ms-Halbsinusreizen mit jeweils 8, 16 und 32 Halbsinuspulsen. Zum Vergleich dienten 16 Sinuszyklen und 32 Rechteckimpulse als Kontrollen. Die vertikalen Balken stellen den Standardfehler dar, die horizontalen Balken zeigen die p-Werte für Unterschiede an (\emptyset = nicht signifikant). Farblegende: orange: 1 ms-Rechteckreiz (0,4 mA, 32 Pulse, 5 Hz), blau: 10 ms-Halbsinusreiz (0,2 mA, 8-16-32 Pulse, 5 Hz), violett: 25 ms-Halbsinusreiz (0,2 mA, 8-16-32 Pulse, 5 Hz), pink: Sinusreiz (0,2 mA, 16 Zyklen, 4 Hz).

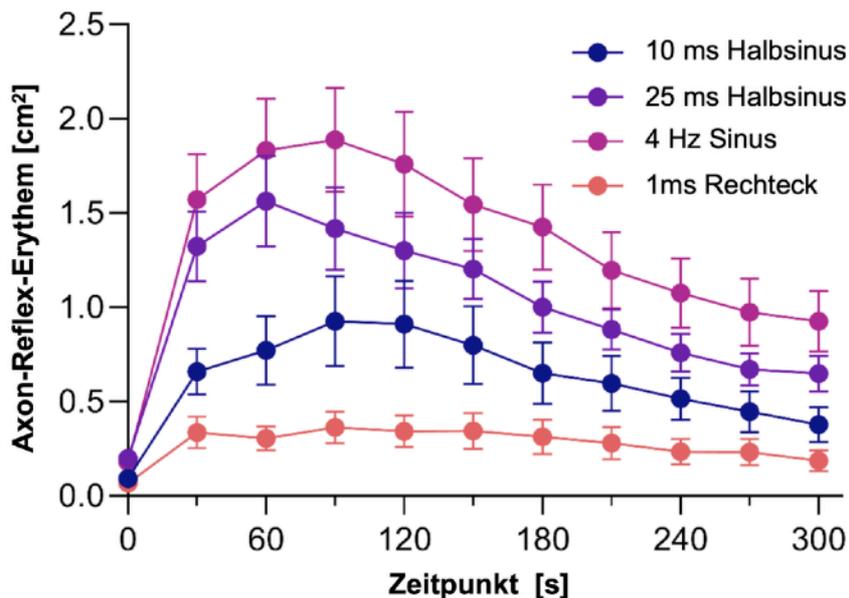


Abb. 15: Entwicklung der Axonreflex-Reaktion (cm^2) über die Zeit (5 min nach Stimulation). Dargestellt für 4 verschiedene Reizformen: 1 ms-Rechteckreiz mit 32 Impulsen (orange), 10 ms-Halbsinusreiz mit 32 Impulsen (blau), 25 ms-Halbsinusreiz mit 32 Impulsen (violett), Sinusreiz mit 16 Zyklen (pink). Die Kreise stellen die Mittelwerte dar, die Balken den Standardfehler.

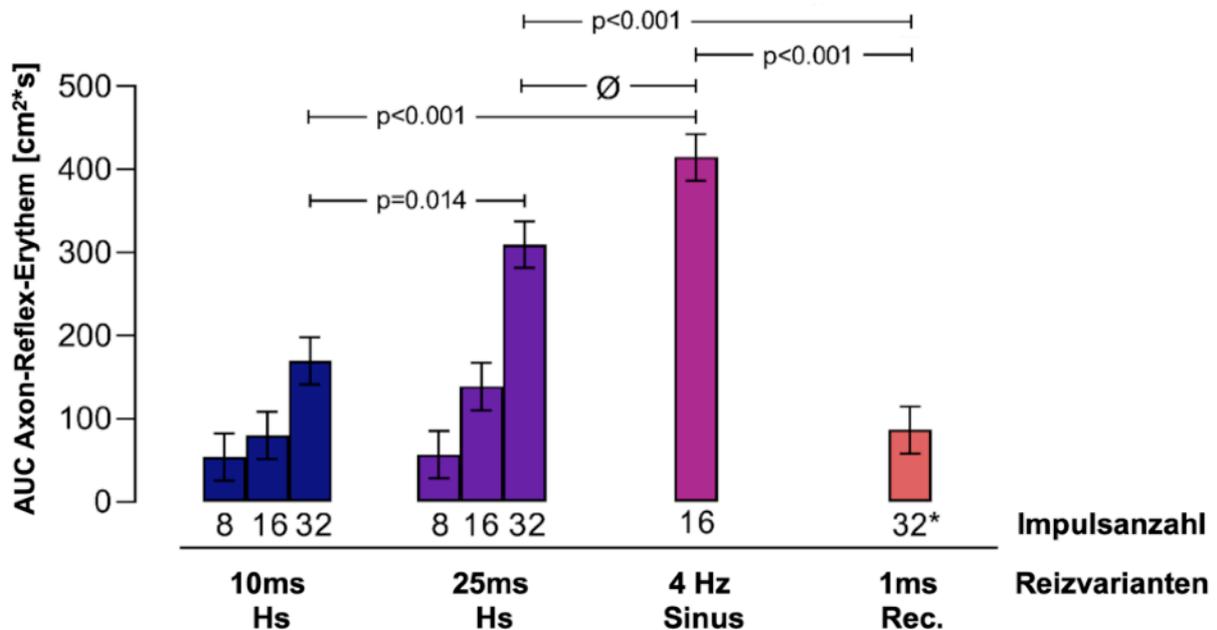


Abb. 16: Axonreflex-Reaktion auf Stimulation mit 10 ms- und 25 ms-Halbsinusreizen beim Menschen mit jeweils 8, 16 und 32 Halbsinusimpulsen. Als Kontrollen dienten 16 Sinuszyklen und 32 Rechteckimpulse. Darstellung als Fläche unter der Kurve (AUC [cm²*s]). Die vertikalen Balken stellen den Standardfehler dar, die horizontalen Balken zeigen die p-Werte für Unterschiede an (Ø = nicht signifikant). Farblegende: orange: 1 ms-Rechteckreiz (0,4 mA, 32 Pulse, 5 Hz); blau: 10 ms-Halbsinusreiz (0,2 mA, 8-16-32 Pulse, 5 Hz); violett: 25 ms-Halbsinusreiz (0,2 mA, 8-16-32 Pulse, 5 Hz), pink: Sinuswellen (0,2 mA, 16 Zyklen, 4 Hz).

3.2.3.2 Auswirkungen von Geschlecht und Stimulationsstelle

Das Geschlecht hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Schmerzbewertungen (n.s.; ANOVA). Weibliche Testpersonen zeigten tendenziell größere Flare-Reaktion, dieser Trend war jedoch nicht statistisch signifikant (AUC_Flare weiblich insgesamt: 192,73 cm² × s vs. AUC_Flare männlich insgesamt: 135,62 cm² × s; p = 0,100). Dahingegen ergab sich für die zur Reizapplikation verwendete Hautstelle ein signifikanter Einfluss auf die Flare-Entwicklung. Bei proximaler Stimulation wurden größere Axon-Reflex-Erytheme erzeugt als bei distaler Stimulation (AUC_Flare proximal: 199,78 cm² × s (19,36) vs. AUC_Flare distal: 130,32 cm² × s (14,24); p = 0,004).

3.2.3.3 Juckreiz

Bei 3 von 20 Versuchspersonen trat bei vereinzelt Messungen ein leichter Juckreiz auf. Dieser wurde im Mittel mit einem Wert von 0,95 (Spannweite 0,5-1,5) auf einer numerischen Ratingskala von 0 (kein Juckreiz) bis 10 (maximal vorstellbarer Juckreiz) bewertet. Er beschränkte sich auf 3,1 % aller durchgeführten Einzelmessungen (eine Stimulation mit einer Reizform bei einer Versuchsperson). Der Juckreiz trat über die verschiedenen Reizformen und Stimulationslokalisationen willkürlich verteilt auf.

Tab. 9: Gemittelttes Schmerzrating (NRS von 0-10) und durchschnittliche Axonreflexreaktion (mittlere AUC [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}$]) für die verschiedenen Stimulationsprofile von Halbsinus- (HS), Sinus- (Sinus 4 Hz) und Rechteckimpulsen (Rect.) und die angewandte Anzahl der applizierten Impulse (Pl.). Angegeben sind zudem der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) und die 95 %-Konfidenzintervalle (KI).

Stimulationsform	Mittelwert NRS (SEM)	NRS KI 95%	Mittlere AUC der Flare-Reaktion [$\text{cm}^2 \cdot \text{s}$] (SEM)	AUC Flare KI 95%
HS 10ms 8 Pl. (0.2mA)	1.4 (.2)	[1.0; 1.8]	54.0 (28.3)	[-1.72; 109.64]
HS 10ms 16 Pl. (0.2mA)	2.2 (.2)	[1.6; 2.8]	80.0 (28.3)	[24.32; 135.68]
HS 10ms 32 Pl. (0.2mA)	2.6 (.2)	[1.8; 3.4]	169.6 (28.3)	[113.96; 225.32]
HS 25ms 8 Pl. (0.2mA)	1.71 (.2)	[1.3; 2.3]	56.7 (28.3)	[.89; 112.25]
HS 25ms 16 Pl. (0.2mA)	2.6 (.2)	[2.0; 3.2]	138.6 (28.7)	[82.26; 196.03]
HS 25ms 32 Pl. (0.2mA)	3.3 (.3)	[2.6; 4.1]	309.4 (28.0)	[254.36; 364.35]
Sinus 4Hz 16 Pl (0.2mA)	4.1 (.4)	[3.5; 4.8]	414.66 (28.30)	[358.98; 470.36]
Rect. 32 Pl (0.4mA)	1.7 (.3)	[1.2; 2.1]	86.34 (28.30)	[30.66; 142.02]

3.3. Ableitung von Summenaktionspotentialen am porcinen Nerv ex-vivo

3.3.1. Dosis-Wirkungs-Kurven und Latenzzeiten bei verschiedenen Halbsinusdauern

Die Dosis-Wirkungs-Kurven wurden für insgesamt sieben periphere Faszikel ($n=7$) aus dem Nervus saphenus vom Schwein ex-vivo ermittelt. Mittels sigmoidaler Anpassung aller erstellten Dosis-Wirkungs-Kurven konnten die mittleren halbmaximalen Stimulationsintensitäten („x-half“ = Stromstärke, welche erforderlich ist, um eine halbmaximale Amplitude des Summenaktionspotentials zu erzeugen) und die maximalen Amplituden der Summenaktionspotentiale für jede Halbsinuswellendauer einheitlich bestimmt werden. Anhand des neuen Datensatzes wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven der 7 Einzelfaszikel (Beispiel eines Faszikels in 17A) anschließend für jede Halbsinusdauer gemittelt (Abb. 17 B, $n=7$). Die höchste Sensitivität (niedrige Stromstärke zum Erreichen der halbmaximalen Amplitude sowie niedrige Schwellenwerte) wurde für alle Faszikel bei Verwendung einer Halbsinus-Impulsdauer von 10 oder 25 ms festgestellt (Tab. 10, Abb. 18). Darüber hinaus führte eine Verringerung oder Erhöhung der Halbsinusimpulsdauer zu einer geringeren

Empfindlichkeit der Faszikel, welche unter anderem anhand einer Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurven in Abbildung 17 A und B erkenntlich wird und mit einer Steigerung der notwendigen Stimulationsintensitäten einherging. Verglichen mit dem ebenfalls getesteten 1 ms-Rechteckreiz konnte eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven (in Richtung einer gesteigerten Sensitivität) bereits ab einer Halbsinus-Impulsdauer von 2 ms beobachtet werden. Insbesondere bei der Verwendung der Impulslängen 100 und 250 ms wurde darüber hinaus eine Reduktion der erzielten Maximalamplitude im Vergleich zu den kürzeren Reizdauern registriert.

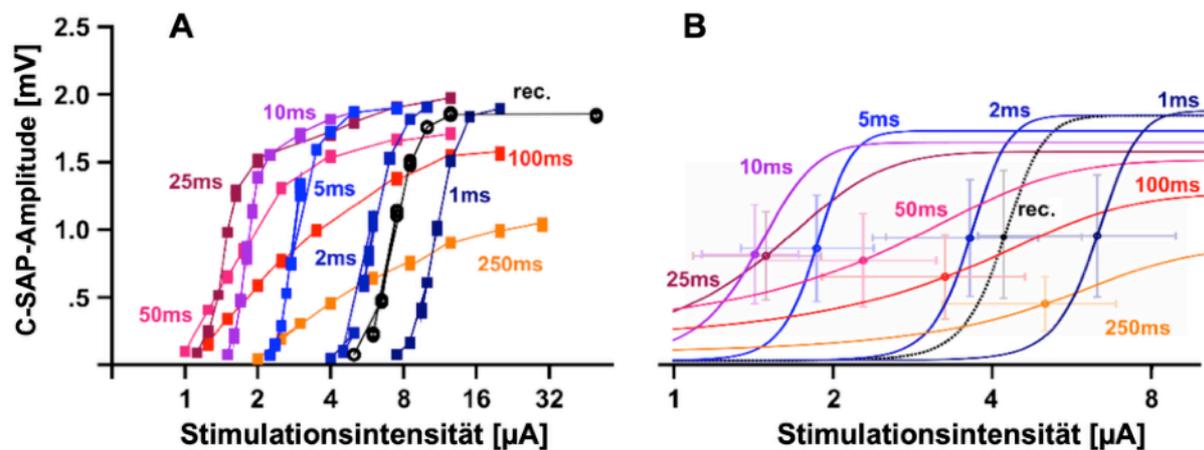


Abb. 17: Dosis-Wirkungs-Kurven von C-Faser-Summenaktionspotentialen. **A:** Beispiel für die Messung des Summenaktionspotentials an einem einzelnen Faszikel für die verwendeten Halbsinus- und Rechteckimpulse (schwarze Kreise, 1 ms Dauer). Die Dauer des jeweiligen Halbsinusreizes (1-250 ms) ist in der entsprechenden Farbe angegeben. **B:** Mittelwerte und Standardabweichungen des halbmaximalen Stroms und gemittelte C-SAP-Amplituden für die verwendeten Reizformen und -dauern. Die dargestellten Werte basieren auf einer sigmoidalen Anpassung der Stärke-Dauer-Kurven für jede Reizdauer in jedem Faszikel ($n=7$).

Um die Anschaulichkeit und Vergleichbarkeit der Einzeldaten zu verbessern, erfolgte zudem die Normierung aller halbmaximalen Stromstärken eines Faszikels auf die halbmaximale Intensität, welche im Rahmen der Stimulation des jeweiligen Faszikels mittels des 1 ms-Rechteckreizes aufgezeichnet wurde (Tab. 10). Die graphische Abbildung der x-half Werte für alle getesteten Halbsinusdauern zwischen 1ms und 250 ms verdeutlicht dabei die parabolische Beziehung der ermittelten Werte (Abb. 18). Während bei sehr kurzen (1 ms) oder sehr langen (250 ms) Impulsen die Stromstärken zur Auslösung der halbmaximalen C-SAPs sogar über denen des rechteckigen Kontrollimpulses lagen (Abb. 18, Tab. 10), führte eine Halbsinuswellen-Stimulation von 2 - 100 ms Dauer im Allgemeinen zu einer höheren Empfindlichkeit des Faszikels mit niedrigeren halbmaximalen Intensitäten (Abb. 18). Wurde die Stimulationsdauer des Halbsinusreizes von 1 ms auf die jeweils optimale Dauer von 10 oder 25 ms erhöht, so reduzierte dies die normierten halbmaximalen Stimulationsintensitäten durchschnittlich um den Faktor 4,6 (Spannweite 2,8-7,1), die Schwellenwerte im Mittel um den Faktor 5,0 (Tabelle 10). Verglichen mit dem

Kontrollreiz (1 ms-Rechteckreiz) zeigte sich eine durchschnittliche Reduktion der Schwellen- und „x-half“-Werte um den Faktor 3 ($p < 0,001$, t-Test). Eine Erhöhung der Halbsinusdauer über die optimale Länge von 10-25 ms hinaus führte hingegen zu einem erneuten Anstieg der zur Faszikelaktivierung und Erzeugung der halbmaximalen C-SAP-Amplituden erforderlichen Stromstärken (Tab.10, Abb. 18).

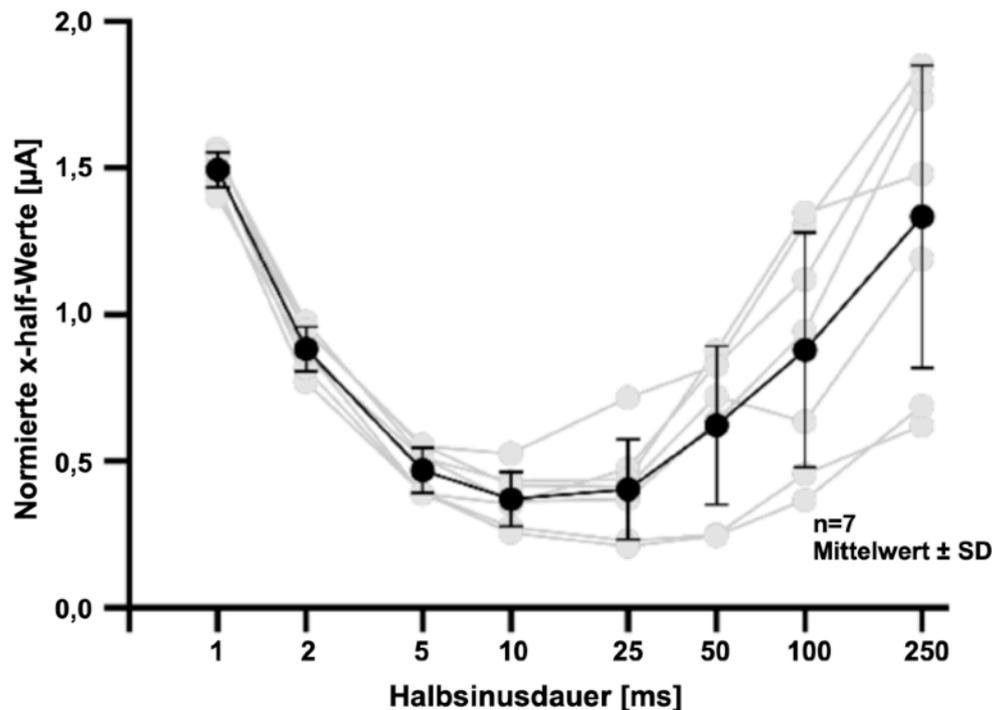


Abb. 18: Normierte Stromstärken, die für Halbsinusreize (1 ms - 250 ms) zur Erzeugung der halbmaximalen Amplitude der Summenaktionspotentiale benötigt wurden. Die halbmaximalen Intensitäten [μA] wurden auf die halbmaximalen Ströme normiert, die mit 1 ms-Rechteckimpulsen gemessen wurden. Die Kurve der Durchschnittswerte aller 7 Faszikel ist mittels schwarzer Symbole (Mittelwert und Standardabweichung) dargestellt. Die hellgrauen Linien und Kreissymbole bezeichnen die Verläufe der einzelnen Faszikel ($n=7$).

Tab. 10: Auf den Rechteckreiz normierte halbmaximale Stromstärken [μA] und gemittelte Schwellenwerte (\pm SD) für alle 7 Faszikel der C-Faser-Summenaktionspotentiale (C-SAP) und alle verwendeten Stimulationsprofile (1 ms Rechteck- und 1 - 250 ms Halbsinusimpulse). Für jeden Faszikel ist der bei einer spezifischen Halbsinuslänge minimal benötigte Halbmaximalstrom durch eine grüne Schattierung gekennzeichnet.

Reizprofile und Impulsdauern	Halbmaximale Stromstärken für die 7 gemessenen Faszikel [μA]							Mittelwert d. Schwellenwerte [μA] \pm SD
	Fasz. 1	Fasz. 2	Fasz. 3	Fasz. 4	Fasz. 5	Fasz. 6	Fasz. 7	
Rechteck 1ms	1	1	1	1	1	1	1	1 \pm 0
Halbsinus 1ms	1.56	1.44	1.50	1.54	1.40	1.54	1.48	1,51 \pm 0,24
Halbsinus 2ms	0.88	0.77	0.81	0.97	0.87	0.95	0.94	0,91 \pm 0,08
Halbsinus 5ms	0.39	0.39	0.39	0.51	0.51	0.55	0.55	0,52 \pm 0,08
Halbsinus 10ms	0.35	0.27	0.25	0.36	0.43	0.42	0.52	0,39 \pm 0,07
Halbsinus 25ms	0.47	0.23	0.21	0.37	0.43	0.41	0.71	0,30 \pm 0,05
Halbsinus 50ms	0.83	0.25	0.24	0.63	0.87	0.72	0.82	0,33 \pm 0,09
Halbsinus 100ms	1.30	0.45	0.36	0.94	1.34	0.63	1.12	0,41 \pm 0,12
Halbsinus 250ms	1.85	0.62	0.68	1.73	1.48	1.19	1.79	0,85 \pm 0,33

3.3.1.1 Latenzzeiten

Die Latenzzeiten der C-Faser-Summenaktionspotentiale stiegen allgemein im Schwellenwertbereich der jeweiligen Reizintensität an, nahmen aber auch deutlich mit der Halbsinusstimulationsdauer zu (Tab. 11). Hierbei zeigte sich für Halbsinusdauern bis 10 ms ein leichter Anstieg der gemittelten Latenzzeiten bei Steigerung der Stromstärke. Für Stimulationsdauern ab 25 ms nahm hingegen bei schwelennahen Stimulationsintensitäten die Latenzzeit stark zu (Tab. 11). Bei Verwendung der maximal getesteten Halbsinusdauer von 250 ms stieg die Latenz dabei im Mittel um 43 % (beziehungsweise um 18,9 ms) (Tab. 11, Abb.19).

Abbildung 19 zeigt die exponentielle Anpassung aller gemessenen Einzelwerte als Funktion der Halbsinusimpulsdauer und der Stimulationsintensität. Dies ermöglicht den direkten Vergleich der Latenzzeiten unterschiedlicher Halbsinusimpulsdauern für spezifische Stimulationsintensitäten. Dabei waren die Latenzen für eine Stimulusdauer unter 10 ms bei Verwendung verschiedener Stimulationsintensitäten weitestgehend stabil und vergleichbar mit der C-SAP-Latenz, die bei Rechteckimpulsen von 1 ms Dauer aufgezeichnet wurden (Abb. 19). Für länger andauernde Halbsinus-Stimuli ab 25 ms zeigten die C-SAP-Latenzen dahingegen eine deutliche Variabilität, sie waren im Vergleich zu dem 1 ms-Halbsinusimpuls bei niedrigen Stimulationsintensitäten um einen Faktor von 3-4 erhöht und sanken mit ansteigender Stromstärke je nach Halbsinusdauer und getestetem Faszikel um bis zu 30 ms (Abb. 19).

Tab. 11: Mittelwerte der C-SAP-Latenzzeiten [ms] (\pm Standardabweichung) der 7 getesteten Faszikel für jede Stimulationsform- und -dauer. Angegeben sind jeweils die gemittelten Latenzen für Stimulationsintensitäten im Bereich der individuellen Schwellenwerte sowie im Bereich der individuellen Maximalamplitude der einzelnen Faszikel.

Stimulations-profile	Rect. 1ms	HS 1 ms	HS 2 ms	HS 5 ms	HS 10 ms	HS 25 ms	HS 50 ms	HS 100 ms	HS 250 ms
Gemittelte Latenz im Bereich der Schwellenwerte \pm SD [ms]	11,18 \pm 2,92	9,27 \pm 2,69	12,34 \pm 1,42	12,73 \pm 2,22	16,83 \pm 4,25	26,48 \pm 10,14	33,15 \pm 12,46	39,06 \pm 14,93	44,16 \pm 17,62
Gemittelte Latenz im Bereich der Maximalamplitude \pm SD [ms]	14,51 \pm 1,71	15,01 \pm 2,55	15,38 \pm 2,27	18,30 \pm 6,06	18,79 \pm 4,00	20,57 \pm 5,87	17,20 \pm 5,60	23,36 \pm 7,79	25,26 \pm 4,60

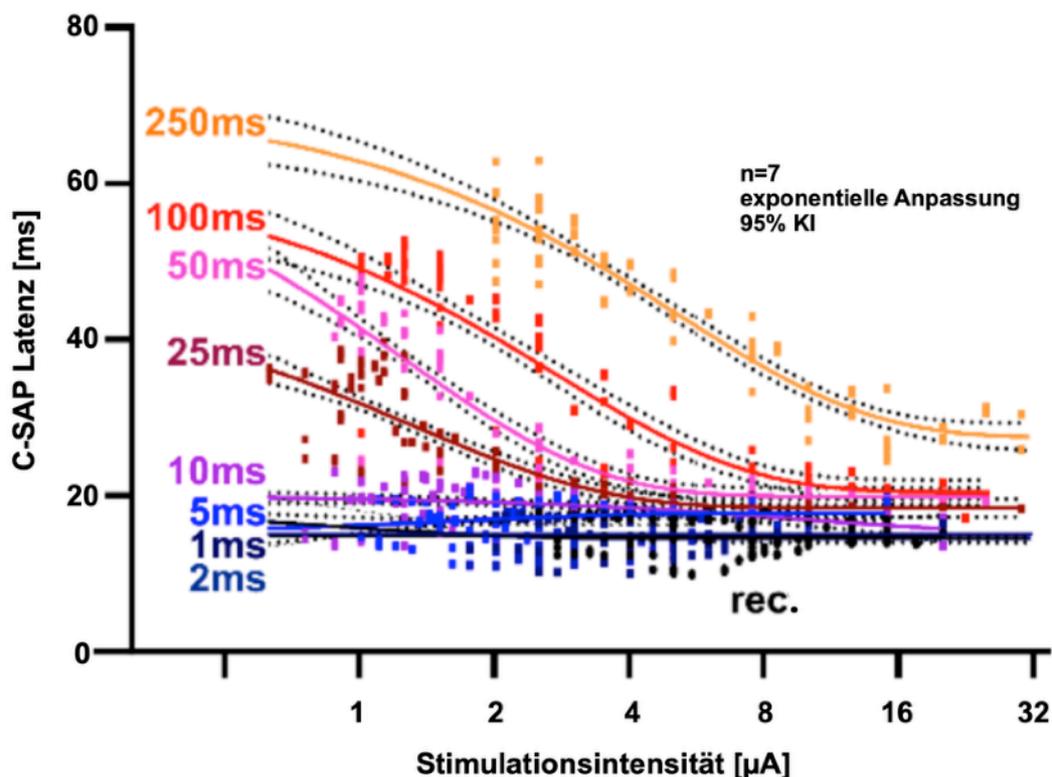


Abb. 19: Die C-SAP-Latenzen sind für Halbsinus- und Rechteckimpulse als Funktion der Impulsdauer und der Stimulationsintensität dargestellt. Die farbigen Linien stellen eine exponentielle Anpassung für die Halbsinusdauern (1 - 250 ms) dar, die schwarze Linie für die Rechteckimpulse von 1 ms (die schwarz gepunkteten Linien geben jeweils das 95 %-Konfidenzintervall an). Die quadratischen Symbole stellen die Ergebnisse einzelner Faszikel dar ($n = 7$).

3.3.2. Auswirkungen von HMGB1 und LPS auf die Dosis-Wirkungs-Kurven

Es wurden mögliche Auswirkungen von HMGB1 und LPS in Hinblick auf eine Veränderlichkeit des C-Faser-Summenaktionspotentials getestet. Hierfür erfolgte die Erstellung von Dosis-Wirkungskurven für insgesamt 10 Faszikel (jeweils 5 Faszikel pro Testsubstanz) und 3 verschiedene Reizformen (1 ms-Rechteckreiz, 25 ms-Halbsinusreiz, 100 ms-Halbsinusreiz) zum Zeitpunkt vor und für 5 Zeitpunkte (5, 15, 30, 45, 60 min) nach Applikation der entsprechenden Substanz.

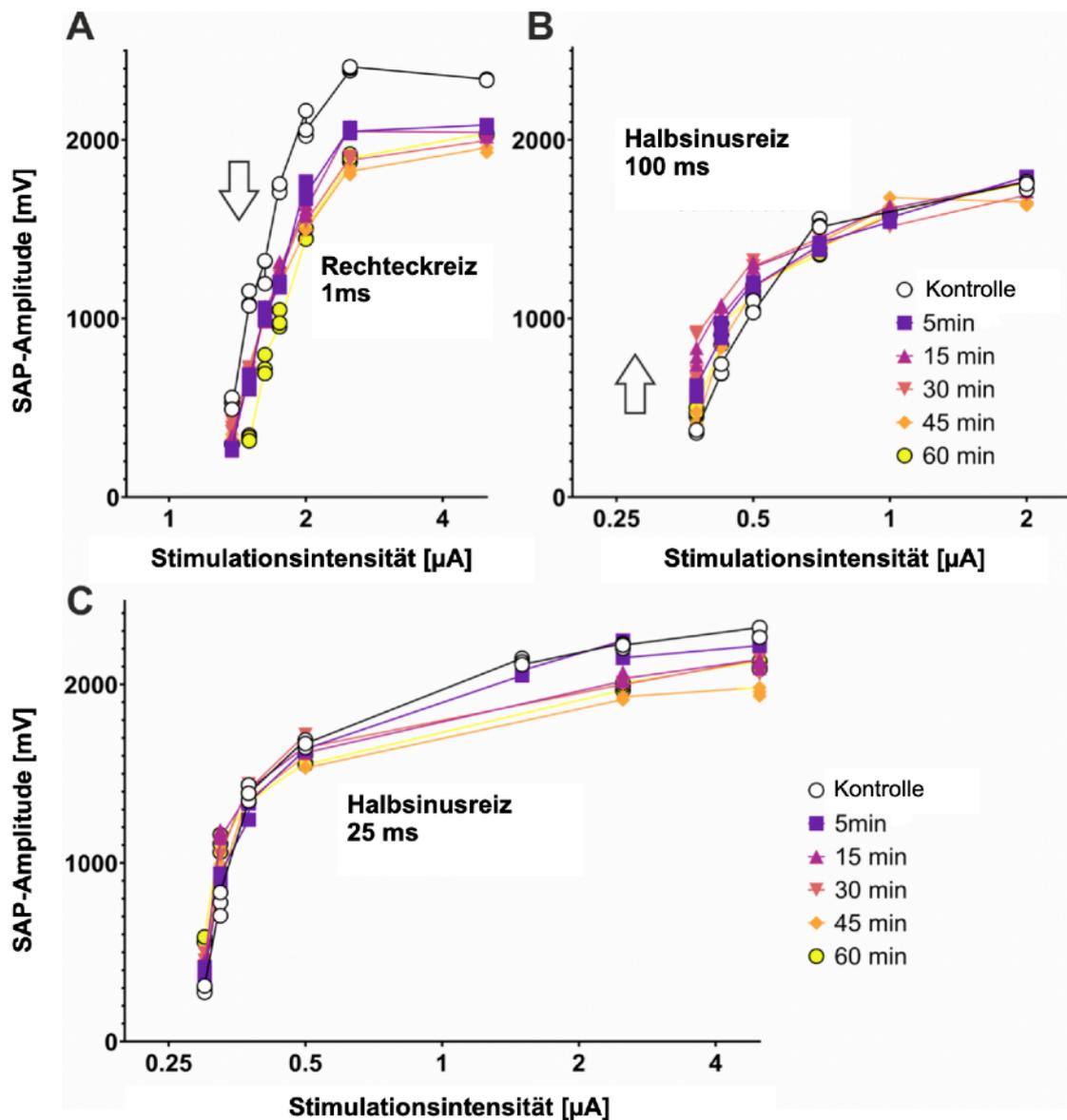


Abb. 20: Beispiel für die Wirkung von HMGB1 auf die Erregbarkeit eines einzelnen Faszikels ($n=1$). Summenaktionspotential-Amplituden [mV] bei Stimulation mit spezifischer Stromstärke [μA] bei Verwendung eines **A:** 1 ms-Rechteckreizes, **B:** 100 ms-Halbsinusreizes, **C:** 25 ms-Halbsinusreizes. Messungen vor und zu 5-60 min nach HMGB1-Gabe (farbkodiert). Während die Erregbarkeit für den Rechteckreiz durch die HMGB1 Wirkung abnimmt (Pfeil in **A**), steigt sie für den 100 ms Halbsinusreiz insbesondere bei niedrigen Reizstärken an (Pfeil in **B**).

In der Darstellung der Dosis-Wirkungs-Kurven einer exemplarischen Einzelmessung (Abb. 20) zeigt sich, dass bei Stimulation mittels 1 ms-Rechteckreiz nach Hinzugabe von HMGB1 eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve zu höheren erforderlichen Stimulationsintensitäten auftrat. Diese verminderte Erregbarkeit blieb für den gesamten Testzeitraum von 60 Minuten erhalten. Dahingegen resultierte die Stimulation mittels 100 ms-Habsinusreiz bei niedrigen Stimulusintensitäten im Bereich der Schwellenwerte und insbesondere im Zeitraum von 5-30 Minuten nach Hinzugabe von HMGB1 in einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurven. Nach Applikation der Substanz in das Versuchsbad wurden bei gleicher Stimulationsintensität höhere C-SAP-Amplituden erzeugt (Abb. 20).

Für die Messungen wurden zudem die gemittelten halbmaximalen Stromstärken der jeweils 5 Faszikel berechnet (Tab.12 und Tab. 13) und anschließend als Funktion über die Zeit (vor und bis 60 Minuten nach Applikation) abgebildet (Abb. 21). Bei Verwendung des Rechteckreizes wurde bereits 5 Minuten nach Applikation von HMGB1 eine Erhöhung der zum Erreichen der halbmaximalen Amplitude erforderlichen Stromstärke um 4 % (Tab. 12; 8 % bei LPS, Tab. 13) erfasst. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei Stimulation mit dem 100 ms-Halbsinusreiz 5 min nach Hinzugabe von HMGB1 bereits eine Reduktion der halbmaximalen Stromstärke um 13 % (Tab. 12; 7 % bei LPS, Tab. 13) im Vergleich zum jeweiligen Kontrollwert. Um diese Veränderungen der benötigten halbmaximalen Stimulationsintensitäten zu verdeutlichen, wurden zusätzlich die Differenzen der nach der Applikation aufgezeichneten Werte zu dem jeweiligen Kontrollwert (vor Applikation der Substanzen) berechnet und in Abbildung 22 dargestellt. Über den gesamten Verlauf der Messungen hinweg (Ausnahme HMGB1 nach 60 min) bewirkten LPS und HMGB1 eine Sensibilisierung, wenn mit dem 100 ms-Halbsinusreiz stimuliert wurde. Beim 25 ms-Halbsinusreiz trat hingegen eine geringfügige und beim Rechteckreiz eine stärkere Desensibilisierung nach Hinzugabe der Substanzen auf.

*Tab. 12: Gemittelte halbmaximale Stromstärken [μ A] von 5 Faszikeln zu den 6 Messzeitpunkten vor (Zeitpunkt „0“) und nach (5-60 min) Hinzufügen von HMGB1. Signifikante Anstiege gegenüber dem Kontrollwert (Zeitpunkt „0“) zeigen eine Reduktion der Erregbarkeit an (rot hinterlegt; repeated measures ANOVA, LSD post hoc test, * $p < 0.05$). Signifikante Reduktionen zeigen erhöhte Erregbarkeit an (grün hinterlegt; repeated measures ANOVA, LSD post hoc test, * $p < 0.05$).*

HMGB1	Mittelwert (\pm Standardabweichung) der halbmaximalen Stromstärke [μ A] für jeden Messzeitpunkt [min]; n=5					
	0	5	15	30	45	60
Rechteck 1ms	4,85 (\pm 2,96)	5,05 (\pm 3,01)	5,39 (\pm 3,45)	5,22* (\pm 3,07)	5,39* (\pm 3,16)	5,55* (\pm 3,14)
Halbsinus 25ms	1,32 (\pm 0,81)	1,38 (\pm 0,86)	1,40 (\pm 0,88)	1,46 (\pm 0,89)	1,50 (\pm 0,89)	1,56 (\pm 0,93)
Halbsinus 100ms	2,18 (\pm 1,13)	1,89 (\pm 1,17)	1,93* (\pm 1,26)	1,85 (\pm 1,28)	1,89 (\pm 1,32)	2,32 (\pm 1,42)

Tab. 13: Gemittelte halbmaximale Stromstärken [μA] von 5 Faszikeln zu den 6 Messzeitpunkten vor (Zeitpunkt „0“) und nach (5-60 min) Hinzufügen von LPS. Signifikante Anstiege gegenüber dem Kontrollwert (Zeitpunkt „0“) zeigen eine Reduktion der Erregbarkeit an (rot hinterlegt; repeated measures ANOVA, LSD post hoc test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Signifikante Reduktionen zeigen erhöhte Erregbarkeit an (grün hinterlegt; repeated measures ANOVA, LSD post hoc test, * $p < 0.05$).

LPS	Mittelwert (\pm Standardabweichung) der halbmaximalen Stromstärke [μA] für jeden Messzeitpunkt [min]; n=5					
	0	5	15	30	45	60
Rechteck 1ms	5,88 ($\pm 2,10$)	6,35* ($\pm 2,02$)	6,78* ($\pm 2,21$)	7,24* ($\pm 2,16$)	7,75* ($\pm 1,91$)	8,37** ($\pm 1,61$)
Halbsinus 25ms	1,61 ($\pm 0,48$)	1,81 ($\pm 0,79$)	1,79 ($\pm 0,72$)	1,83* ($\pm 0,65$)	1,89* ($\pm 0,63$)	2,00* ($\pm 0,67$)
Halbsinus 100ms	1,93 ($\pm 0,65$)	1,79* ($\pm 0,70$)	1,92 ($\pm 0,67$)	1,86 ($\pm 0,70$)	1,85 ($\pm 0,73$)	1,91 ($\pm 0,72$)

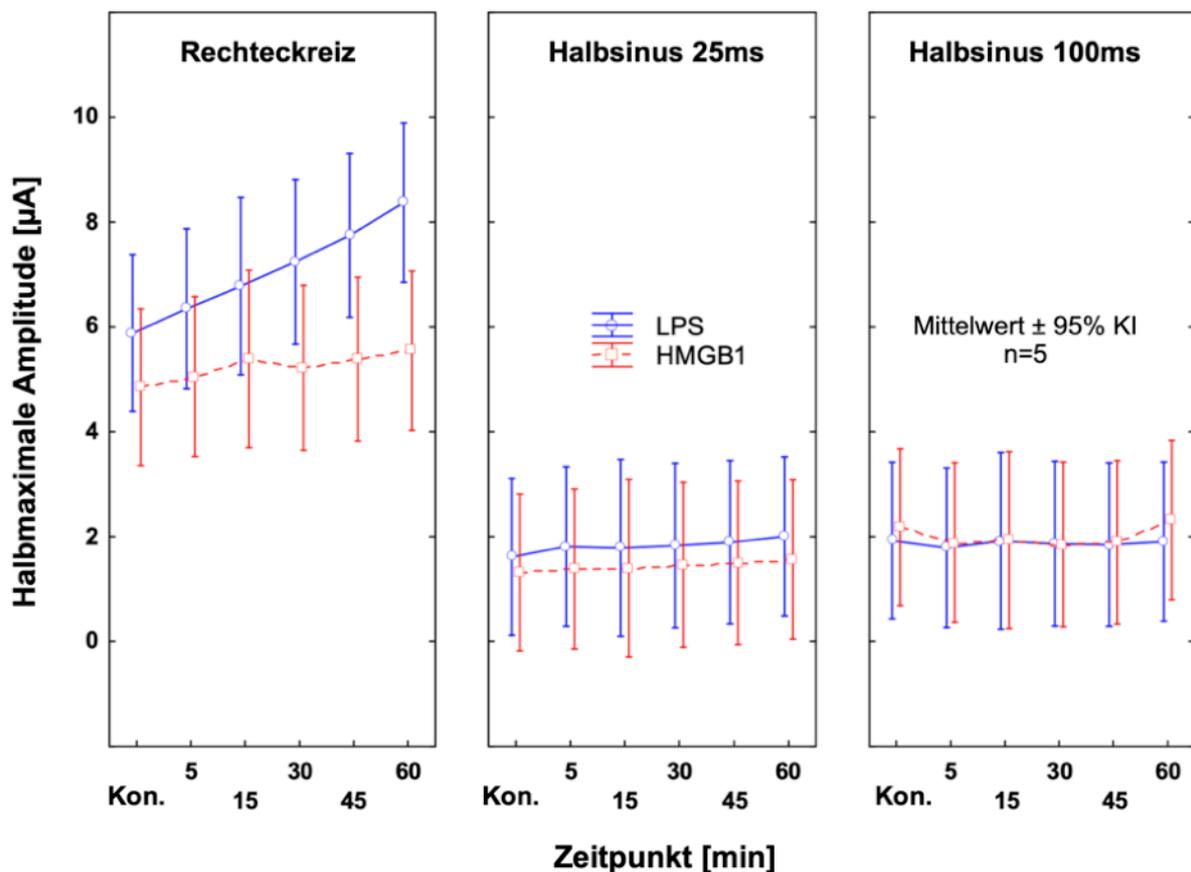


Abb. 21: Halbmaximale Stromstärke [μA] vor (Kontrolle) und bis 60 Minuten nach Applikation von HMGB1 (rot, n = 5) und LPS (blau, n = 5) für Stimulation mit 1 ms-Rechteckreiz, 25 ms-Halbsinusreiz und 100 ms-Halbsinusreiz. Die Balken geben das jeweilige 95 %-Konfidenzintervall an.

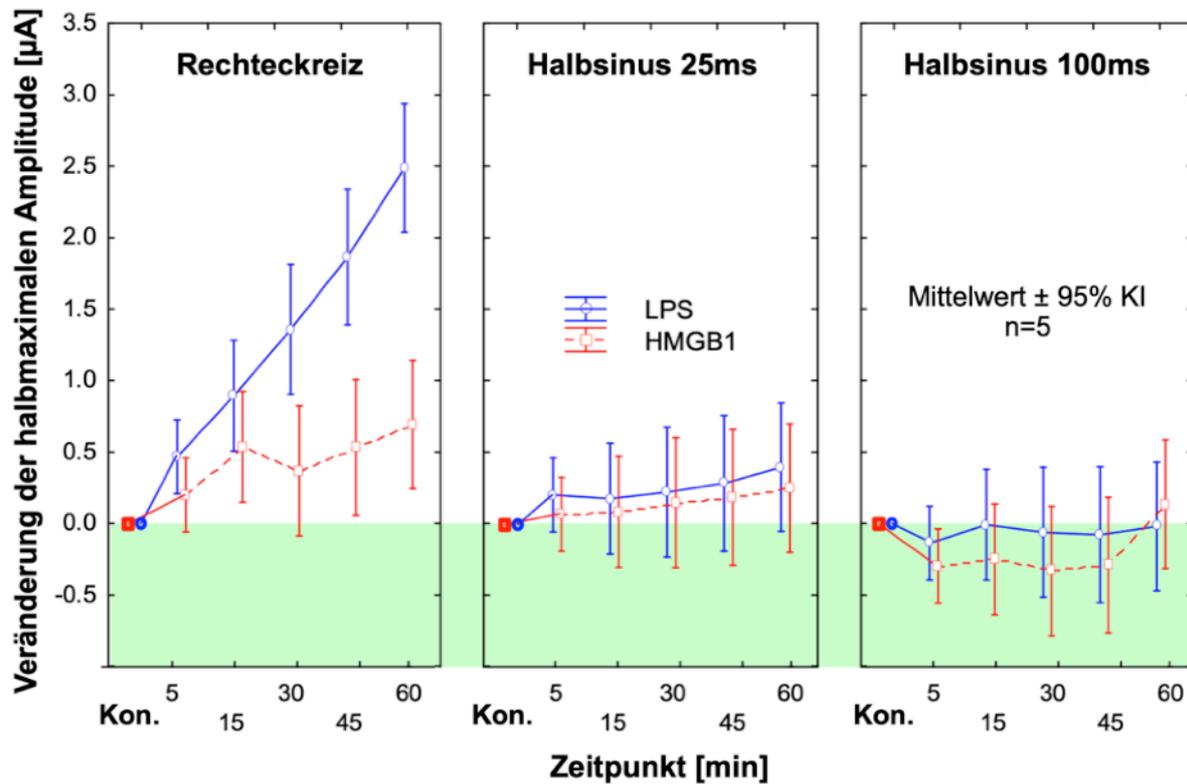


Abb. 22: Halbmaximale Stromstärke nach Applikation von HMGB1 (rot, $n = 5$) und LPS (blau, $n = 5$) für alle Stimulationsformen (1 ms-Rechteckreiz, 25 ms-Halbsinusreiz, 100 ms-Halbsinusreiz). Die halbmaximalen Stromstärken sind auf den Kontrollwert vor Applikation normiert. Die Balken geben das jeweilige 95 %-Konfidenzintervall an. Der weiße Bereich zeigt eine Desensibilisierung, der grüne Bereich eine Sensibilisierung im Vergleich zum Kontrollwert an.

4. DISKUSSION

4.1. Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse

Die Durchführung dieser Arbeit diene primär der Optimierung elektrischer Reize für eine spezifischere Aktivierung unmyelinisierter C-Fasern, wobei insbesondere die optimale Dauer von langsam depolarisierenden halbsinusförmigen Pulsen getestet werden sollte. Sekundär sollten diese optimierten Reizprotokolle in einem ersten translationalen Ansatz eingesetzt werden, um Erregbarkeitsveränderungen durch HMGB1 und LPS zu untersuchen, die als Mediatoren der schmerzhaften diabetischen „small-fiber“-Neuropathie angesehen werden.

Insgesamt zeigten sich halbsinusförmige Reize mit einer Dauer von mindestens 25 ms als besonders geeignet. So nahmen in den Einzelfaserversuchen am Schwein in-vivo die Aktivierungsschwellen aller Faserklassen um das circa 2- bis 3-fache ab, wenn die Dauer der Halbsinusimpulse von 1 ms auf 25 ms erhöht wurde. Gleichermäßen reduzierten sich bei Verwendung des 25 ms andauernden Halbsinusreizes in den Probandenversuchen die Wahrnehmungsschwelle, die Schmerzschwelle und die Schwelle für Schmerzbewertungen von NRS 3/10 signifikant um einen Faktor 2-4 im Vergleich zur Verwendung eines 1 ms-Rechteckreizes. Halbsinusimpulse von 25 ms Dauer wurden dabei als schmerzhafter beschrieben und lösten eine signifikant größere Axonreflex-Reaktion aus als Rechteckimpulse, die mit der doppelten Stimulationsintensität bei gleicher Impulsanzahl appliziert wurden. In Übereinstimmung zeigten die Dosis-Wirkungskurven der ex-vivo abgeleiteten C-Faser-Summenaktionspotentiale am N. saphenus des Schweins die höchste Empfindlichkeit für Halbsinusdauern zwischen 10 und 25 ms mit einer Reduktion der halbmaximalen Stromstärken um das Dreifache im Vergleich zur Stimulation mittels des 1 ms-Rechteckreizes.

Die Mediatoren HMGB1 und LPS führten bei Testungen mit einem konventionellen 1 ms-Rechteckreiz zu einer Desensibilisierung der C-Faser-Erregbarkeit mit einer Reduktion des C-Faser-Summenaktionspotentials. Nur bei Verwendung des neuen lang depolarisierenden 100 ms-Halbsinusreizes als Testreiz nahm die Erregbarkeit der C-Fasern durch HMGB1 und LPS zu, wobei dieser Effekt auf den klinisch relevanten Bereich einer schwachen Depolarisation begrenzt war.

4.2. Beurteilung der C-Faser Erregbarkeit durch elektrische Halbsinusimpulse

Die erhöhte Erregbarkeit der C-Fasern bei Verwendung optimierter Halbsinusreize von 10-25 ms Dauer äußerte sich in einer Verringerung der Aktivierungsschwellen einzelner C-Nozizeptorklassen von Schweinen in-vivo, in einer Verringerung der elektrischen Schmerzschwelle, der Schwelle zum Erreichen von NRS 3 sowie der elektrischen Schwelle für die Entwicklung einer Axon-Reflex-Reaktion beim Menschen und in einer Verringerung der halbmaximalen Intensität für die Induktion eines C-SAPs im Nervus saphenus von Schweinen ex-vivo. Es bestätigte sich die Hypothese, dass langsamer depolarisierende elektrische Impulse (mit einer Dauer von 25 ms) eine spezifischere Erregung von C-Nozizeptoren mit geringeren Stimulationsintensitäten ermöglichen, als der klassische 1 ms-Rechteckreiz.

4.2.1. Interpretation der Einzelfaserableitungen

Die Verlängerung der Dauer eines elektrischen Halbsinusreizes von 1 ms auf 25 ms führte zur einer Senkung der Schwellenwerte aller Faserklassen um einen Faktor von 2-3. Dies ist bemerkenswert, wenn man bedenkt, dass die Dauer eines 1 ms-Rechteckimpulses bislang als nahe an der Chronaxie für C-Fasern liegend betrachtet wurde [23]. Im Rahmen der hier ausgewerteten Forschungsergebnisse lag die Chronaxie für die Aktivierung nicht-myelinisierter Fasern des Schweins mittels Halbsinus-Stimulation bei durchschnittlich 14-17 ms (vgl. Tabelle 4) und war damit überraschend lang. Im Zusammenspiel liefert dies jedoch eine biophysikalische Erklärung für die hier erhaltenen Ergebnisse aus der Psychophysik gesunder Versuchspersonen (siehe 3.2), welche ebenfalls auf optimierte Reaktionen bei Halbsinusdauer von 10-25 ms Dauer hindeuteten.

Die Ergebnisse der Einzelfaser-Experimente zeigten zudem bei der Stimulation mit kurzen Halbsinusdauern eine Diskrepanz zwischen den Aktivierungsschwellen der am Schwein gemessenen C-Fasern und den am Probanden gemessenen elektrischen Schmerzschwellen. Es wurden im direkten Vergleich deutlich höhere Intensitäten für die Einzelfaser-Aktivierungen benötigt (siehe Tabelle 5 vs. Tabellen 7 und 8). Als naheliegende Erklärung für diese Abweichung käme eine zusätzliche Rekrutierung von A-Faser-Nozizeptoren in den psychophysikalischen Messungen am Probanden in Frage, welche zu einem (im Vergleich zu den Einzelfaserversuchen) reduzierten Mischwert für die Schmerzschwellen durch aktivierte C- und A-Fasern geführt haben könnte. Bei längeren Halbsinusdauern führte die für höhere Schmerzbewertungen benötigte Steigerung der Stromamplituden dann zu einem entsprechendem Anstieg in den Prozentsätzen der aktivierten polymodalen Nozizeptoren (Beispiel: 25 ms-Halbsinusreiz von Schmerzschwelle bis NRS 3: Anstieg von 14 % auf 71 % der aktivierten Nozizeptoren; siehe Tab. 7). Dieser parallele Anstieg sowie der anschauliche parallele Verlauf der Schwellenwertkurven von polymodalen Nozizeptoren und NRS 3-Messungen beim Probanden im Bereich von 10-25 ms Halbsinusdauer (Abb. 12), deuten auf eine Rolle der polymodalen Nozizeptoren bei der Codierung deutlich überschwelliger Schmerzintensitäten dieser Reizdauern hin. Von ähnlichen Resultaten, die eine Verbindung zwischen der Aktivierung einzelner C-Fasern und den ermittelten maximalen Schmerzratings beim Menschen herstellen, wurde bereits für die Hitzeschmerzempfindung durch polymodale Nozizeptoren berichtet [98].

Des Weiteren fällt auf, dass im Probandenversuch bereits bei Stromstärken von 0,2 mA (Tab. 2) Axon-Reflex-Erytheme als objektives Zeichen einer Aktivierung „stummer“ C-Nozizeptoren [39] beobachtet werden konnten, während bei den Einzelfaserableitungen am Schwein die niedrigste Schwelle für deren Aktivierung bei 0,4 mA lag und die durchschnittlichen Schwellenwerte sogar noch deutlich höher waren (Tab. 5). Hierbei gilt es zu bedenken, dass mechano-unempfindliche „stumme“ C-Nozizeptoren große Innervationsgebiete besitzen, innerhalb welcher starke Schwankungen bezüglich der elektrischen Schwellenwerte existieren [99]. Während der Versuchsdurchführung wurde auf die zeitaufwendige Suche nach der niedrigsten Schwelle innerhalb des entsprechenden rezeptiven Feldes verzichtet, um keinen Verlust der Aufzeichnung zu riskieren. Demnach spiegeln die erhaltenen Schwellenwerte der stummen Nozizeptoren eher den durchschnittlichen und nicht den niedrigsten Schwellenwert des ausgedehnten Innervationsgebietes dar. Im Vergleich dazu haben polymodale Nozizeptoren recht homogene elektrische

Schwellenwerte innerhalb ihrer Innervationsgebiete [100]. Es wurden dementsprechend auch nicht die exakten absoluten Unterschiede in der Stärke-Dauer-Reaktion zwischen polymodalen und "stummen" C-Nozizeptoren untersucht.

Darüber hinaus bestätigen die Ergebnisse (insbesondere für kurze Reizdauern und im Vergleich zu polymodalen Fasern) frühere Studien in denen niedrigere elektrische Schwellenwerte für C-Touch-Fasern (auch „C-Taktile“ Fasern) festgestellt wurden [55] (Abb. 8, Tab. 5). Allerdings wird die Hauptrolle dieser besonderen Faserklasse in der Vermittlung sozialer, affektiver Berührungen vermutet, dabei wird angenommen, dass ihre Aktivierung nicht zu einer klar diskriminierbaren Empfindung führt [101,102].

4.2.2. Interpretation von Psychophysik und Axon-Reflex-Erythem

In den durchgeführten Probandenversuchen führte die Verlängerung des Halbsinusreizes von 1 ms auf 25 ms zur Senkung der Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen sowie zu höheren Schmerzbewertungen. Der minimale Unterschied ($<0,1$ mA) zwischen der durchschnittlichen Wahrnehmungs- und Schmerzschwelle für den 25 ms-Halbsinusreiz unterstreicht dabei seine hohe Effizienz bei der Aktivierung von C- gegenüber A-Fasern (Tab. 7 und Tab. 8). Des Weiteren wurde die Applikation von 32 Halbsinusimpulsen mit einer Dauer von 25 ms bei halber Stromstärke im Vergleich zum verwendeten 1 ms-Rechteckreiz (0,2 mA vs 0,4 mA) als deutlich schmerzhafter empfunden und löste ein signifikant größeres Axon-Reflex-Erythem aus (Tab. 9). Dies verifiziert - als spezifischer Test für die Aktivierung von mechanoinsensitiven Chemozizeptoren [39] - die Überlegenheit der Stimulation mit optimierten Halbsinusimpulsen gegenüber der Stimulation mit 1 ms-Rechteckimpulsen in Hinblick auf eine spezifischere Aktivierung von (stummen) C-Nozizeptoren.

Bei Betrachtung der psychophysikalischen Ergebnisse fällt zudem auf, dass der 4 Hz-Sinusreiz wirksamer bei der Auslösung von Schmerzen ($p = 0,048$; siehe Abb. 14) sowie des Axonreflexes (keine Signifikanz; siehe Abb. 16) war als die optimierte Halbsinusstimulation von 25 ms Dauer. Der 4 Hz-Sinusreiz ist bekannterweise geeignet stumme C-Nozizeptoren zu aktivieren [55], erlaubt jedoch aufgrund seiner starren Frequenz keine unabhängige Untersuchung der Frequenz-Wirkungs-Beziehung. Zudem erzeugten überschwellige Sinusreize in früheren Studien durch jeden vollständigen Zyklus ein einzelnes C-SAP [55], während im Rahmen der Untersuchungen an Einzelfasern bei Schweinen (siehe Methodik 2.1) ein einzelner Halbsinusreiz bereits ausreichte, um ein einzelnes Aktionspotential effizienter auszulösen.

In die Probandenversuche wurden sowohl weibliche als auch männliche Teilnehmer eingeschlossen. Trotz bekannter geschlechtsspezifischer Unterschiede in der Hautbeschaffenheit (u.a. Dicke der Hornschicht [103]) und in den Expressionsmustern der primären Afferenzen [104] zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Dosis-Wirkungskurven zwischen den Geschlechtern. Es konnte lediglich eine Tendenz (ohne Signifikanz) zu einer größeren Entstehung eines Axon-Reflex-Erythems bei Frauen beobachtet werden. Möglicherweise wären bei einer größeren Probandenanzahl signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede aufgefallen. Bezüglich der Eigenschaften von C-Nozizeptoren wurden jedoch bisher weder in der menschlichen Mikroneurographie [105] noch in Einzelfaseraufzeichnungen bei

Schweinen geschlechtsspezifische Unterschiede [68] festgestellt. Einen signifikanten Einfluss auf die Messungen hatten hingegen die verwendeten Hautstellen, welche bei proximaler Stimulation eine deutlichere Flare-Reaktion zeigten als bei distaler Stimulation. Unterschiede im mikrozirkulatorischen Blutfluss zwischen distalen und proximalen Teststellen sind aus früheren Laser-Doppler-Messungen bekannt [106]; eine einfachere Erklärung wäre allerdings, dass die Innervationsgebiete der C-Fasern proximal größer sind. Eine Beeinflussung der Ergebnisse konnte durch die jeweilige Testung der unterschiedlichen Reizvarianten an einer proximalen und an einer distalen Hautstelle ausgeschlossen werden (siehe Methodik 2.2.2 und 2.2.3). Obwohl die Aktivierung kutaner C-Fasern eher mit einer dumpf-brennenden und die Aktivierung von A-delta Fasern mit einer vorrangig stechenden Schmerzqualität in Zusammenhang gebracht wurden [107], zeigte die Befragung der Versuchspersonen zur qualitativen Schmerzwahrnehmung im Rahmen dieser Arbeit keine Aussagekraft hinsichtlich einer Diskriminierung oder des Verhältnisses unterschiedlicher aktivierter Nozizeptorklassen (Abb. 11 und Abb.12).

4.2.3. Interpretation der Summenaktionspotential-Ableitungen

Die Dosis-Wirkungs-Kurven der Summenaktionspotentiale bestätigten die höhere Effizienz von Halbsinusimpulsen mit einer Dauer von 10 ms oder 25 ms für C-Faser-Aktivierungen im Vergleich zu kürzeren Impulsen. Für längere Impulse (ab 50 ms) waren wieder höhere Schwellenwerte und Stimulationsintensitäten für das Erreichen der halbmaximalen Amplitude erforderlich (Tab. 10, Abb. 18). Hierbei gilt es zu bedenken, dass Summenaktionspotential-Amplituden nicht nur die Anzahl der aktivierten Einzelaxone, sondern auch den Grad ihrer Synchronisation widerspiegeln. Eine Erklärung hierfür wäre demnach, dass besonders lange Impulsdauern zu einem desynchronisierteren Auftreten der Summenaktionspotentiale führten. Dies würde sich (wie in Abbildung 17 feststellbar) in geringeren Amplituden und längerem Andauern der Summenaktionspotentiale widerspiegeln. Dieser Theorie entsprechend trat der beschriebene Effekt bei den Einzelfasertestungen nicht auf, auch bei Impulsdauern > 50 ms wurde kein Anstieg der Aktivierungsschwellen gemessen (Abb. 8).

Darüberhinaus ermöglichte die Erfassung der Summenaktionspotentiale die Berechnung der Latenz, also in diesem Fall der Zeit, die nach Reizabgabe bis zur Auslösung des Aktionspotentials verging. Dabei zeigte sich im Rahmen dieses Experiments mit steigender Halbsinus-Impulsdauer und insbesondere bei schwachen Stimulationsintensitäten eine Zunahme der Latenzzeit (Abb. 19). Dies deutet darauf hin, dass C-Faser-Membranen die Ladung (Strom über Zeit) bei anhaltender, langsam ansteigender Depolarisation (z. B. durch Halbsinusimpulse > 10 ms) recht gut akkumulieren können. Somit würde es - nach entsprechend längerer Latenzzeit - auch bei sehr niedrigen Stimulationsintensitäten zur Überschreitung der Schwellenwerte und der Entstehung von Aktionspotentialen kommen, wenn die stimulierenden Impulse ausreichend lang sind. Zusätzlich zu den Membraneigenschaften tragen hierzu auch die besonderen spannungsabhängigen Natriumkanäle (Na_v) von C-Fasern bei: die langsame und wenig ausgeprägte Inaktivierungskinetik („closed state inactivation“) von $Na_v1.7$, der insbesondere von Nozizeptoren und sympathischen Efferenzen exprimiert wird [27], ist dabei besonders bedeutsam. Dahingegen würden $Na_v1.6$ -Kanäle, welche vorzugsweise im Ranvier'schen Knoten der A-Fasern exprimiert werden [108], bei einer entsprechend langen Stimulation deutlich schneller inaktivieren und somit keine weitere Entstehung

von Aktionspotentialen zulassen. Diese These wird von aktuellen Ergebnissen der Forschungsgruppe für Experimentelle Schmerzforschung der medizinischen Fakultät Mannheim gestützt, welche Aufzeichnungen von mittels Halbsinusstimulation unterschiedlicher Dauer erzeugten A-Faser-Summenaktionspotentialen und den entsprechenden Stärke-Dauer-Kurven in 6 Faszikeln des Suralnervs der Maus liefern (Abbildung 23).

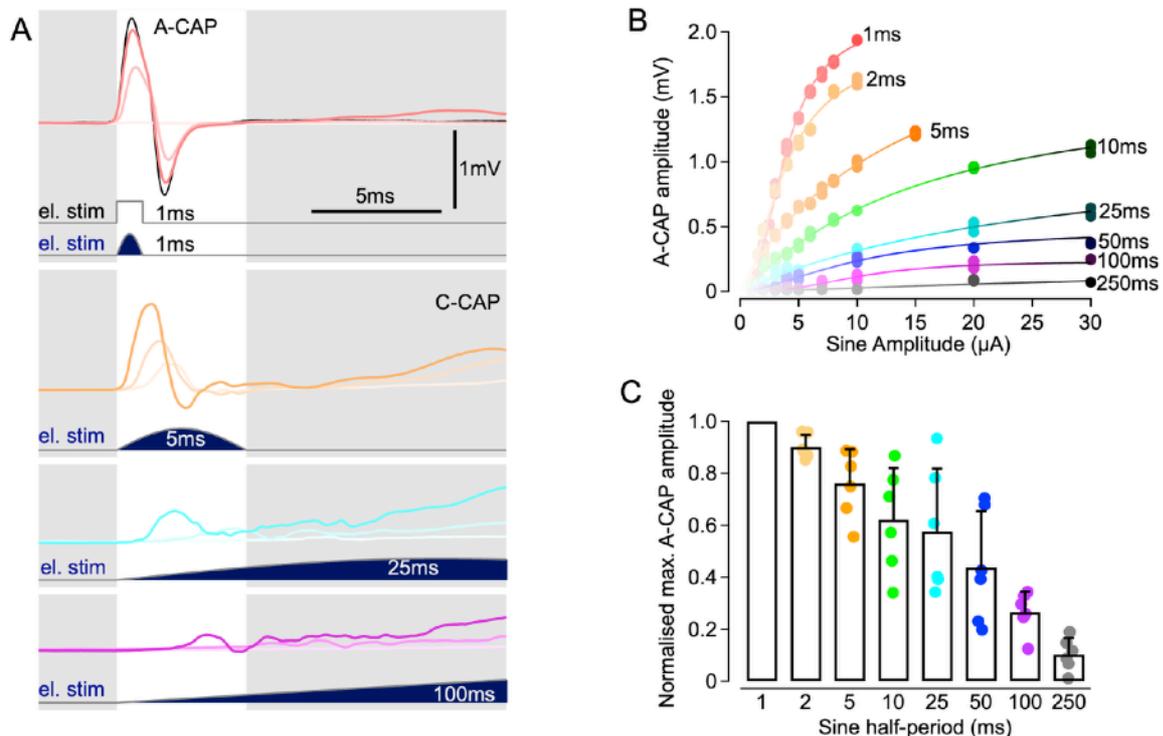


Abbildung 23: Reiz-Reaktions-Eigenschaften von A-Faser-Summenaktionspotentialen (A-SAP), die durch unterschiedlich lange Dauern von Halbsinus-Konstantstrom-Stimulationen des Suralnervs der Maus ex vivo hervorgerufen wurden ($n = 6$). (A) Extrazelluläre Aufzeichnungen als Reaktion auf Halbsinus-Konstantstromstimuli von 1 ms (rot), 5 ms (gelb), 25 ms (hellblau) und 100 ms (violett) Dauer (das zeitliche Stimulationsprofil ist in dunkelblau dargestellt) und verglichen mit der Reaktion auf einen überschwelligen 1 ms-Rechteckimpuls (schwarz, oberes Feld). Die Intensität der Halbsinuswellen-Stimulation spiegelt sich in der Intensität der Farbtonspuren wider. Man beachte, dass die frühen A-SAP bei längerer Stimulusdauer (weiß hinterlegt) abnehmen, während die späten C-Faser-SAPs (grau hinterlegt) allmählich ansteigen. (B) Vollständige Stärke-Dauer-Kurven der in A gezeigten Ergebnisse mit drei Messungen für jede Stimulationsintensität; angepasst mittels Hill-Funktionen zur Schätzung der maximalen A-CAP-Amplitude und der halbmaximalen Stimulusintensität. (C) Durchschnittliche maximale A-CAP-Amplitude für jede getestete Halbsinusdauer; dargestellt in Relation zur A-CAP-Amplitudenreaktion auf die 1ms-Halbsinus-Stimulation. Einzelne Datenpunkte sind als ausgefüllte Markierungen dargestellt und die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichungen dar ($n = 6$).

(Abbildungsquelle [117]: Schneider, T*, Filip, J*, Soares, S, Sohns, K, Carr, R, Rukwied, R, Schmelz, M: Optimized Electrical Stimulation of C-Nociceptors in Humans Based on the Chronaxie of Porcine C-Fibers. *J Pain*, 24: 957-969, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2023.01.009>)

Dabei zeigten sich im Kontrast zu den C-Faser-Summenaktionspotentialen reduzierte Amplituden des Summenaktionspotentials für länger anhaltende Reize, während Reize von 1 ms Dauer am effizientesten für eine A-Faser-Aktivierung waren (Abbildung 23B und 23C). In Abbildung 23A ist zudem ersichtlich, dass mit zunehmender Dauer des Halbsinusreizes das früh auftretende A-CAP (weiß hinterlegt) abnimmt, während das später auftretende C-CAP deutlicher hervortritt (im grau hinterlegten Bereich). Die Verlängerung der Dauer eines elektrischen Halbsinusreizes von 1 ms auf 25 ms beeinträchtigte demnach schrittweise die synchrone Aktivierung der A-Fasern, erhöhte jedoch die synchrone Aktivierung der C-Fasern. Dies bestätigt frühere Forschungserkenntnisse, die darauf hinweisen, dass menschliche A δ -Faser vor allem auf kürzere, synchronisierte Reize ein gutes Ansprechen zeigen [48].

4.3. Veränderbarkeit der C-Faser-Erregbarkeit durch HMGB1

Bei Verwendung der Halbsinusstimulation von 100 ms Dauer zeigte sich nach Hinzugabe von HMGB1 insbesondere bei niedrigen Stimulationsintensitäten eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurven (Abb. 20), was auf eine Übererregbarkeit im Bereich der Schwellenwerte hinweist. Diese Sensibilisierung steht in deutlichem Gegensatz zu der verringerten Erregbarkeit, welche bei der Stimulation mittels des Rechteckreizes auftrat. Eine im Verhältnis zu den Ergebnissen des Rechteckreizes deutlich abgeschwächte Desensibilisierung wurde zudem bei Verwendung des 25 ms-Halbsinusreizes beobachtet. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich für LPS (Abb. 22). Der sensibilisierende Effekt auf die C-Faser-Erregbarkeit durch HMGB1 und LPS scheint damit erst im Rahmen sehr langsam depolarisierender Reize demaskiert zu werden. Als physiologische Grundlage hierfür kämen im Rahmen der komplexen Signalkaskade erneut sensibilisierende Effekte auf spezifische spannungsabhängige Ionenkanäle in Frage. Alternativ könnte auch der Membranwiderstand erhöht werden, z.B. durch das vermehrte Schließen von Kaliumkanälen, die zum Ruhemembranpotenzial beitragen. Ein solcher Effekt wurde bereits für das Schließen von kalteempfindlichen Kaliumkanälen gezeigt [114]. Ein höherer Membranwiderstand verbessert die Fähigkeit von C-Nozizeptoren bei längerer Depolarisation die Ladung zu akkumulieren und senkt somit die Aktivierungsschwelle gerade bei sehr langen Impulsdauern.

Auf eine entstehende Sensibilisierung durch HMGB1 deuten auch frühere Studien an Nagetieren hin, im Rahmen derer eine spinale Injektion von HMGB1 eine direkte mechanische Überempfindlichkeit sowie eine indirekte Sensibilisierung über gliale Aktivierung auslöste, was als Hinweis auf einen Beitrag von HMGB1 zur nozizeptiven Signalübertragung in der Wirbelsäule über die Aktivierung von TLR4 interpretiert wurde [90]. Zudem konnten durch einen HMGB1-Inhibitor Einsatz bei an schmerzhafter diabetischer Neuropathie erkrankten Tieren bereits mechanische und thermische Schmerzschwellen erhöht und somit eine Desensibilisierung herbeigeführt werden [76]. In einer weiteren Studie wurde in der Haut und in primären sensorischen Neuronen diabetischer Ratten eine hochregulierte HMGB1- und RAGE-Expression zu Zeiten festgestellt, in denen das Schmerzverhalten der Tiere verstärkt war [97]. Dies wurde in Zusammenhang mit verstärkten - über RAGE vermittelten und über TRPV1 ausgelösten - Ca²⁺ getriggerten Reaktionen gebracht, welche in kultivierten DRG-Neuronen der diabetischen Tiermodelle beobachtet werden konnten [97]. Anhand neuropathischer Tiermodelle wurde zudem

herausgefunden, dass insbesondere eine spezifische Isoform von HMGB1 (das all-thiol-HMGB1 oder at-HMGB1) RAGE aktiviert und eine neuronale Erregung in akut dissoziierten sensorischen Neuronen auslöst, während die Verwendung eines neutralisierenden RAGE-Antikörpers eine taktile Schmerzüberempfindlichkeit blockieren konnte [84].

Ein weiterer interessanter Aspekt im Rahmen dieser Beobachtungen und der unter 1.6. vorgeschlagenen Signalkaskade ist, dass RAGE, TLR4 und HMGB1 laut früheren Forschungsergebnissen eine gegenseitig potenzierende und amplifizierende Wirkung ausüben können, wobei kaum negative Rückkopplungsmechanismen vorhanden zu sein scheinen. So kann HMGB1 die Expression der Rezeptoren induzieren, und RAGE den Transport von TLR4-Rezeptoren an die Zelloberfläche fördern, während TLR4 die Translation und Transkription von RAGE erhöhen kann. Eine vermehrte Rezeptordichte an der Zelloberfläche erlaubt wiederum eine erhöhte Bindungskapazität von HMGB1 [82]. Zusätzlich kann die Aktivierung des NF- κ B-Signalwegs die Expression von HMGB1 und seinen Rezeptoren induzieren [109]. Somit könnte sich insgesamt eine positive Rückkopplungsschleife zur Aufrechterhaltung und Chronifizierung von Entzündungs- und Schmerzzuständen bilden.

4.4. Bewertung und Limitationen der gewählten Methodik

Die verschiedenen Versuchsmodelle (in-vivo Versuche am menschlichen Probanden, in-vivo und ex-vivo Tierversuche am Schwein) zur C-Faser-Aktivierung mit unterschiedlichen Dauern von Halbsinusimpulsen führten zu übereinstimmenden Ergebnissen und zeigten im Rahmen dieser Arbeit eine gute Übertragbarkeit vom Tiermodell zum Humanmodell. Die psychophysikalischen Ergebnisse am Menschen waren im Einklang mit den elektrophysiologischen Messungen an der Einzelfaser in-vivo und deuten darauf hin, dass die Schmerzschwellen in der menschlichen Haut und die Aktivierungsschwellen von C-Nozizeptoren in der Schweinehaut bei Halbsinus-Stimulationen bemerkenswert parallel verlaufen. Die lange Chronaxie der C-Fasern beim Schwein (etwa 15 ms) war zudem im Einklang mit den optimalen Reizdauern für die Auslösung von Schmerzempfinden und Axonreflex-Erythemen bei den gesunden Freiwilligen. Dabei sollte bedacht werden, dass in allen durchgeführten Experimenten dieselbe Stimulationselektrode (Abb. 4) verwendet wurde. Insgesamt bestätigt dies, dass die Schweinehaut - sowohl in Bezug auf ihre Anatomie, als auch auf die Nozizeptorklassen [64,68] - ein gutes Modell hinsichtlich der Übertragbarkeit auf die menschliche Haut darstellt.

Die Erregbarkeit kutaner Nozizeptoren hängt unter anderem von der lokalen Hautstruktur und -temperatur [110] ab. Während bei der Durchführung der Probandenversuche auf eine bestmöglich übereinstimmende Hautlokalisation und Hautstruktur geachtet wurde (exakte Ausmessung der Stimulationsstellen, Ausschluss von Probanden mit Hautdefekten/-erkrankungen), können dennoch insbesondere ethnische, alters- und geschlechtsabhängige Unterschiede bestehen. Darüber hinaus wurde während der Experimente zwar die Raumtemperatur konstant gehalten, die spezifische Hauttemperatur und deren Auswirkungen auf die Psychophysik beim menschlichen Probanden wurde jedoch nicht berücksichtigt. Während der Experimente wurde weder die Hautoberflächentemperatur unter der Stimulationselektrode noch die Körperkerntemperatur gemessen. Letztendlich sind

die Auswirkungen der Temperatur auf die Chronaxie komplex [20], da z. B. eine erhöhte Chronaxie bei Abkühlung die Erregbarkeit auf länger anhaltende Reize verbessern könnte [114], die langsamere Kinetik von z. B. Natriumkanälen jedoch den gegenteiligen Effekt hätte. Daher ist es schwierig, den Gesamteffekt der Haut- und Kerntemperatur von Probanden und Versuchstieren auf die axonale Erregbarkeit vorherzusagen oder zu beurteilen.

Zudem hätten weiterführende und die Halbsinustimulation in ihrer klinischen Übertragbarkeit prüfende Versuchsprotokolle an neuropathischen Schmerzpatienten, diabetischen Tiermodellen oder unter der Verwendung der at-HMGB1-Isoform zusätzliche aufschlussreiche Ergebnisse liefern können.

4.5. Klinische Implikationen und offene Fragen

Die Stimulation mit optimierten Halbsinusimpulsen scheint zur Aktivierung von C-Nozizeptoren (einschließlich stummer Nozizeptoren) in der menschlichen Haut ein vielversprechendes Testverfahren zu sein. Dieses könnte in Zukunft für die klinische Beurteilung der C-Faser-Funktion bei Patienten, die an einer „small-fiber“-Neuropathie als diabetische Komplikation, Folge einer Chemotherapie oder auch unbekannter Ätiologie leiden, hilfreich sein. Von großem Nutzen wäre dabei eine frühzeitige und C-Faser-spezifische Funktionsdiagnose, insbesondere an den am weitesten distal gelegenen Körperstellen, die häufig zuerst betroffen sind [12]. Für entsprechende Stimmulationsstellen sollte die Halbsinusstimulation gut geeignet sein, da im Rahmen dieser Arbeit gleichwertige Versuchsergebnisse (ohne signifikante Unterschiede) von Messungen am Unterarm und am Fußrücken (3.2.2) erfasst wurden.

Laut früheren Studien kann sich die maximale Folgefrequenz von „stummen“ C-Nozizeptoren durch lokale Entzündungsbedingungen (z.B. bei Sonnenbrand [111]) oder die Sensibilisierung durch Nervenwachstumsfaktoren von weniger als 5 Hz auf über 20 Hz steigern [31]. Die Verwendung des 25 ms-Halbsinusreizes ermöglicht im Gegensatz zum Sinusreiz bei ähnlich guten Ergebnissen (3.2.3, Abb.16 kein signifikanter Unterschied in der Größe des erzeugten Axon-Reflex-Erythems) eine repetitive Durchführbarkeit und die freie Untersuchung frequenzabhängiger Erregbarkeitsänderungen. Durch diese verbesserte klinische Einsatzfähigkeit könnten höherer Bereiche der Nozizeptorentladungen unter pathologischen Bedingungen getestet und beispielsweise im Vergleich zu gesunden Kontrollen auf einen Zusammenhang mit der Entwicklung höherer Schmerzbewertungen überprüft werden. Von großem Interesse in Hinblick auf Folgestudien wäre zudem, ob mittels Erregbarkeitstests für C-Nozizeptoren mit optimierten Halbsinusimpulsen eine Differenzierung von Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser Neuropathien erreicht werden kann, was mittels Untersuchungen der Erregbarkeit der großen sensorischen Fasern bisher nicht möglich war [18].

Des Weiteren konnte in einer kürzlich durchgeführten Studie eine Verstärkung depolarisierender spontaner Fluktuationen des Membranpotentials menschlicher sensorischer Spinalganglienneurone festgestellt werden, welche mit neuropathischen Schmerzen bei Patienten in Verbindung gebracht wird [112]. Dabei zeigten die Neurone, die die schmerzhaften Bereiche innervieren, niedrigere

Aktivierungsschwellen und es konnte ein Anstieg der Zeit bis zur Auslösung eines Aktionspotentials von 12 auf 40 ms beobachtet werden [112].

Diese Beobachtungen bieten in Bezug auf die Ergebnisse dieser Arbeit (durchschnittliche Chronaxie der C-Fasern siehe 3.1 und Anstieg der Latenzzeiten für längere Halbsinusimpulse und geringe Stimulationsintensitäten 3.3) einen interessanten Blickwinkel, da dies im Zusammenhang mit einer gesteigerten Akkumulationsfähigkeit von C-Fasern unter pathologischen Bedingungen stehen könnte. Wenn sich diese bei menschlichen DRG-Neuronen beobachtete Veränderung auch in den nozizeptiven Endigungen in schmerzhafter Hautarealen widerspiegelt, würde man eine Verschiebung der Stärke-Dauer-Kurve von Halbsinus-Reizdauern um den entsprechenden Bereich erwarten. Dies könnte möglicherweise Informationen über die Schmerzmechanismen bei den Patienten liefern.

Von großer Bedeutung wären bis zum tatsächlichen klinischen Einsatz allerdings weitere Studien, die den hier vorgeschlagenen Nutzen und die Übertragbarkeit auf das klinische Umfeld überprüfen. Bei Verwendung entsprechender Halbsinus-Stimulationsprotokolle sollte dabei beachtet werden, dass die elektrische Stimulation von biologischem Gewebe elektrochemische Reaktionen [113] auslösen kann, die potenziell gewebeschädigend sind. Dabei werden die lokalen Auswirkungen neben Elektrodenoberfläche und -material auch durch das Stimulationsprotokoll bestimmt. Je geringer die pro Impuls aufgebrachte Ladung ist, desto kleiner kann der "sichere" Elektrodenbereich sein [113]. Im Rahmen der Probandenversuche konnte bei den verwendeten Stromstärken zu keinem Zeitpunkt eine Gewebeschädigung registriert werden, im Rahmen von Patientenstudien können jedoch höhere Stimulationsintensitäten notwendig sein. Um das Risiko für Gewebschäden so gering wie möglich zu halten, sollte zudem eine ladungsneutrale Stimulation mit biphasischer Wellenform anstelle einer monophasischen gewählt werden.

4.6. Schlussfolgerung

Eine elektrische Halbsinus-Stimulation mit Pulsdauern von 25 ms aktiviert die im Rahmen chronischer Schmerzen und Neuropathien relevanten C-Nozizeptoren spezifischer und mit deutlich geringeren Stimulationsintensitäten als der klassischerweise verwendete 1 ms-Rechteckreiz. Die erhöhte Erregbarkeit der C-Fasern konnte in Einzelfaserversuchen am Schwein in-vivo für alle Faserklassen beobachtet und sowohl in der Psychophysik am Menschen (anhand einer Verringerung der elektrischen Erkennungsschwelle, der elektrischen Schmerzschwelle und der elektrischen Schwelle für die Entwicklung einer Axon-Reflex-Reaktion) als auch mittels Ableitung von Summenaktionpotentialen am Schwein ex-vivo bestätigt werden. Zudem weisen die Untersuchungen mit HMGB1 auf eine Demaskierung von Sensibilisierungen der C-Fasererregbarkeit unter spezifischen (pathologischen) Bedingungen durch langandauernde Halbsinusreize hin. Obgleich vorerst weitere Studien und die klinische Erprobung der optimierten Halbsinusreize am Patienten notwendig sind, erscheinen C-Faser-spezifische Funktionsuntersuchungen mittels elektrischer Halbsinus-Stimulation vielversprechend zu sein, um Veränderungen der C-Faser Erregbarkeit (z.B. im Rahmen von „small-fiber“-Neuropathien) besser charakterisieren zu können und über die gewonnenen Erkenntnisse eine individuellere Therapie zu ermöglichen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Über die Hälfte der Diabetes-Patienten leidet an polyneuropathischen Komplikationen. Ein spezifisches Beispiel ist die „small-fiber“-Neuropathie, welche durch eine beeinträchtigte Funktion der dünn myelinisierten A-Delta- und nicht myelinisierten C-Nozizeptoren gekennzeichnet ist. 30 - 40 % dieser Patienten haben zudem neuropathische Schmerzen, welche komplexen Pathomechanismen unterliegen. Dabei ist es bislang nicht möglich, schmerzhaft und nicht schmerzhaft neuropathien diagnostisch voneinander zu unterscheiden. Klassischerweise werden zur elektrischen Erregung von C-Nozizeptoren Rechteckimpulse mit einer Dauer nahe der geschätzten Chronaxie der C-Fasern (etwa 2 ms) verwendet. Neuere Ergebnisse mit langsam depolarisierenden Stimuli deuten jedoch auf längere Chronaxien hin, weshalb im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Dauern von Halbsinusimpulsen auf eine spezifischere Aktivierung von C-Fasern (im Vergleich zu einem 1 ms-Rechteckreiz) untersucht wurden. Zudem wurde die Veränderbarkeit der C-Fasererregbarkeit bei Applikation der unter pathologischen Bedingungen bei Diabetes erhöhten Substanzen „High-Mobility-Group-Box-1“-Protein und Lipopolysaccharide getestet. Diese stehen unter Verdacht, über ihre Wirkung an den Rezeptoren „Toll-like-Receptor 4“ und „Receptor for advanced glycation end products“ an der Pathogenese neuropathischer Schmerzen beteiligt zu sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden anhand der Daten aus Einzelfaser-Versuchen am Schwein in-vivo die Aktivierungsschwellen einzelner C-Fasern für die Applikation unterschiedlich lang andauernder Halbsinusimpulse von 1 ms bis 250 ms ausgewertet. Anschließend wurde die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den Menschen überprüft. Hierzu erfolgten Untersuchungen der Psychophysik sowie der Entstehung eines Axon-Reflex-Erythems (als spezifischer Test für die Aktivierung stummer C-Nozizeptoren) an gesunden Probanden unter Verwendung optimierter Halbsinusdauern. Darüber hinaus wurden ex-vivo-Aufzeichnungen von C-Faser-Summenaktionspotentialen am Nervus saphenus des Schweins genutzt, um die Ergebnisse zu verifizieren und die Veränderbarkeit der C-Faser-Erregbarkeit durch „High-Mobility-Group-Box-1“-Protein und Lipopolysaccharide zu testen.

Die Auswertung von Aufzeichnungen einzelner C-Fasern ($n = 46$) bei Schweinen ergab hohe Chronaxiewerte von durchschnittlich 15,6 ms. Die Aktivierungsschwellen nahmen in allen Faserklassen um das zwei- bis dreifache ab, wenn die Dauer der Halbsinusimpulse von 1 ms auf 25 ms erhöht wurde ($p < 0,05$). Zudem zeigten psycho-physikalische Untersuchungen an gesunden Menschen ($n = 23$), dass eine halbsinusförmige Reizdauer von mehr als 10 ms die Wahrnehmungsschwellen, die Schmerzschwellen und die Stimulationsintensitäten reduzierte, die erforderlich waren, um eine Schmerzbewertung von 3 auf einer 11-stufigen numerischen Bewertungsskala zu erzeugen, verglichen mit Rechteckimpulsen von 1 ms Dauer ($p < 0,05$). Eine Verlängerung der Halbsinus-Dauer von 1 ms auf 25 ms führte zu einer vierfachen Amplitudenreduktion der Schmerzschwellen, außerdem löste ein 25 ms-Halbsinusreiz mit 32 Impulsen ein signifikant größeres Axon-Reflex-Erythem aus als die Stimulation mittels eines Rechteckimpulses doppelter Stimulationsintensität und gleicher Impulsanzahl. Die am Nervus saphenus des Schweins getesteten Stärke-Dauer-Kurven von C-Faser-Summenaktionspotentialen ($n = 7$) wiesen die höchste Empfindlichkeit für Halbsinusdauern zwischen 10 und 25 ms auf. Die halbmaximalen Stimulationsintensitäten der C-Faser-Summenaktionspotentiale

waren dabei im Vergleich zu 1 ms-Rechteckimpulsen um das Dreifache reduziert ($p < 0,01$). Zudem zeigte sich nach Applikation von „High-Mobility-Group-Box-1“-Protein und Lipopolysacchariden, insbesondere bei niedrigen Stimulationsintensitäten und bei Verwendung eines langen Halbsinusreizes von 100 ms Dauer, eine Sensibilisierung der C-Fasererregbarkeit im Kontrast zu einer Desensibilisierung bei Stimulation mittels des 1 ms-Rechteckreizes. Diese Reizbedingungen sind von großer klinischer Relevanz, da eine dauerhafte milde Depolarisation in Nozizeptoren als treibende Kraft für deren Spontanaktivität angesehen wird und diese beim Patienten zu Spontanschmerz führen kann.

Eine elektrische Stimulation mit optimierten Halbsinusimpulsen ermöglichte folglich eine spezifischere Aktivierung von C-Nozizeptoren als eine Stimulation mittels 1 ms-Rechteckreiz und erlaubt im Gegensatz zur Verwendung eines 4 Hz-Sinusreizes die freie Untersuchung von Frequenz-Wirkungsbeziehungen. Die Ergebnisse deuten resümierend darauf hin, dass mittels länger andauernder Halbsinusimpulse (> 10 ms Dauer) eine spezifischere C-Faser-Funktionsdiagnostik erreicht werden könnte, welche für den Einsatz bei Patienten mit chronischen neuropathischen Schmerzen ein vielversprechendes klinisches Bewertungsinstrument darstellen würde. Die Verwendung könnte hilfreich sein, um schmerzhafte von schmerzlosen Neuropathien zu unterscheiden oder eine Übererregbarkeit von C-Nozizeptoren anhand von Stärke-Dauer-Kurven zu demaskieren.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Nugraha, B, Gutenbrunner, C, Barke, A, Karst, M, Schiller, J, Schafer, P, Falter, S, Korwisi, B, Rief, W, Treede, RD, Pain, ITftCoC: The IASP classification of chronic pain for ICD-11: functioning properties of chronic pain. *Pain*, 160: 88-94, 2019. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001433>
2. Reid, KJ, Harker, J, Bala, MM, Truysers, C, Kellen, E, Bekkering, GE, Kleijnen, J: Epidemiology of chronic non-cancer pain in Europe: narrative review of prevalence, pain treatments and pain impact. *Curr Med Res Opin*, 27: 449-462, 2011. <https://doi.org/10.1185/03007995.2010.545813>
3. Breivik, H, Eisenberg, E, O'Brien, T, Openminds: The individual and societal burden of chronic pain in Europe: the case for strategic prioritisation and action to improve knowledge and availability of appropriate care. *BMC Public Health*, 13: 1229, 2013. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-13-1229>
4. Schaible, HG, Ebersberger, A, Natura, G: Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. *Arthritis Res Ther*, 13: 210, 2011.
5. Finnerup, NB, Kuner, R, Jensen, TS: Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment. *Physiol Rev*, 101: 259-301, 2021. <https://doi.org/10.1152/physrev.00045.2019>
6. Maihofner, C, Nickel, FT, Seifert, F: [Neuropathic pain and neuroplasticity in functional imaging studies]. *Schmerz*, 24: 137-145, 2010. <https://doi.org/10.1007/s00482-010-0902-6> [doi]
7. Schliessbach, J, Siegenthaler, A, Streitberger, K, Eichenberger, U, Nuesch, E, Juni, P, Arendt-Nielsen, L, Curatolo, M: The prevalence of widespread central hypersensitivity in chronic pain patients. *Eur J Pain*, 17: 1502-1510, 2013. <https://doi.org/10.1002/j.1532-2149.2013.00332.x>
8. Gangadharan, V, Zheng, H, Taberner, FJ, Landry, J, Nees, TA, Pistolic, J, Agarwal, N, Mannich, D, Benes, V, Helmstaedter, M, Ommer, B, Lechner, SG, Kuner, T, Kuner, R: Neuropathic pain caused by miswiring and abnormal end organ targeting. *Nature*, 606: 137-145, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04777-z>
9. Apkarian, VA, Hashmi, JA, Baliki, MN: Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. *Pain*, 152: S49-S64, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.11.010>
10. Maier, C, Baron, R, Tolle, TR, Binder, A, Birbaumer, N, Birklein, F, Gierthmuhlen, J, Flor, H, Geber, C, Hugel, V, Krumova, EK, Landwehrmeyer, GB, Magerl, W, Maihofner, C, Richter, H, Rolke, R, Scherens, A, Schwarz, A, Sommer, C, Tronnier, V, Uceyler, N, Valet, M, Wasner, G, Treede, RD: Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes. *Pain*, 150: 439-450, 2010.
11. Tavakoli, M, Malik, RA: Management of painful diabetic neuropathy. *Expert Opin Pharmacother*, 9: 2969-2978, 2008. <https://doi.org/10.1517/14656560802498149>
12. Jensen, TS, Karlsson, P, Gylfadottir, SS, Andersen, ST, Bennett, DL, Tankisi, H, Finnerup, NB, Terkelsen, AJ, Khan, K, Themistocleous, AC, Kristensen, AG, Itani, M, Sindrup, SH, Andersen, H, Charles, M, Feldman, EL, Callaghan, BC: Painful and non-painful diabetic neuropathy, diagnostic challenges and implications for future management. *Brain*, 144: 1632-1645, 2021. <https://doi.org/10.1093/brain/awab079>

13. Feldman, EL, Callaghan, BC, Pop-Busui, R, Zochodne, DW, Wright, DE, Bennett, DL, Bril, V, Russell, JW, Viswanathan, V: Diabetic neuropathy. *Nat Rev Dis Primers*, 5: 41, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41572-019-0092-1>
14. Hovaguimian, A, Gibbons, CH: Diagnosis and treatment of pain in small-fiber neuropathy. *Curr Pain Headache Rep*, 15: 193-200, 2011. <https://doi.org/10.1007/s11916-011-0181-7>
15. Abbott, CA, Malik, RA, van Ross, ER, Kulkarni, J, Boulton, AJ: Prevalence and characteristics of painful diabetic neuropathy in a large community-based diabetic population in the U.K. *Diabetes Care*, 34: 2220-2224, 2011. <https://doi.org/10.2337/dc11-1108>
16. Terkelsen, AJ, Karlsson, P, Lauria, G, Freeman, R, Finnerup, NB, Jensen, TS: The diagnostic challenge of small fibre neuropathy: clinical presentations, evaluations, and causes. *Lancet Neurol*, 16: 934-944, 2017. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30329-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30329-0)
17. Galosi, E, Di Pietro, G, La Cesa, S, Di Stefano, G, Leone, C, Fasolino, A, Di Leonardo, A, Leonetti, F, Buzzetti, R, Mollica, C, Cruccu, G, Truini, A: Differential involvement of myelinated and unmyelinated nerve fibers in painful diabetic polyneuropathy. *Muscle Nerve*, 63: 68-74, 2021. <https://doi.org/10.1002/mus.27080>
18. Themistocleous, AC, Kristensen, AG, Sola, R, Gylfadottir, SS, Bennedsgaard, K, Itani, M, Kroigard, T, Ventzel, L, Sindrup, SH, Jensen, TS, Bostock, H, Serra, J, Finnerup, NB, Tankisi, H, Bennett, DLH: Axonal excitability does not differ between painful and painless diabetic or chemotherapy-induced distal symmetrical polyneuropathy in a multi-centre observational study. *Ann Neurol*, 2022. <https://doi.org/10.1002/ana.26319>
19. Orstavik, K, Namer, B, Schmidt, R, Schmelz, M, Hilliges, M, Weidner, C, Carr, RW, Handwerker, H, Jorum, E, Torebjork, HE: Abnormal function of C-fibers in patients with diabetic neuropathy. *J Neurosci*, 26: 11287-11294, 2006. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2659-06.2006>
20. Bostock, H: The strength-duration relationship for excitation of myelinated nerve: computed dependence on membrane parameters. *J Physiol*, 341: 59-74, 1983. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1983.sp014792>
21. Mogyoros, I, Kiernan, MC, Burke, D: Strength-duration properties of human peripheral nerve. *Brain*, 119 (Pt 2): 439-447, 1996. <https://doi.org/10.1093/brain/119.2.439>
22. Panizza, M, Nilsson, J, Roth, BJ, Grill, SE, Demirci, M, Hallett, M: Differences Between the Time Constant of Sensory and Motor Peripheral-Nerve Fibers - Further-Studies and Considerations. *Muscle Nerve*, Vol 21: 48-54, 1998.
23. Pelot, NA, Catherall, DC, Thio, BJ, Titus, ND, Liang, ED, Henriquez, CS, Grill, WM: Excitation properties of computational models of unmyelinated peripheral axons. *J Neurophysiol*, 125: 86-104, 2021. <https://doi.org/10.1152/jn.00315.2020>
24. Lauria, G, Ziegler, D, Malik, R, Merkies, IS, Waxman, SG, Faber, CG, group, PS: The role of sodium channels in painful diabetic and idiopathic neuropathy. *Curr Diab Rep*, 14: 538, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11892-014-0538-5>
25. Lampert, A, Eberhardt, M, Waxman, SG: Altered sodium channel gating as molecular basis for pain: contribution of activation, inactivation, and resurgent currents. *Handb Exp Pharmacol*, 221: 91-110, 2014. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41588-3_5
26. Hoffmann, T, Sharon, O, Wittmann, J, Carr, RW, Vyshnevskaya, A, Col, R, Nassar, MA, Reeh, PW, Weidner, C: NaV1.7 and pain: contribution of peripheral

- nerves. *Pain*, 159: 496-506, 2018. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001119>
27. Herzog, RI, Cummins, TR, Ghassemi, F, Dib-Hajj, SD, Waxman, SG: Distinct repriming and closed-state inactivation kinetics of Nav1.6 and Nav1.7 sodium channels in mouse spinal sensory neurons. *JPhysiol*, 551: 741-750, 2003.
 28. Szallasi, A, Cortright, DN, Blum, CA, Eid, SR: The vanilloid receptor TRPV1: 10 years from channel cloning to antagonist proof-of-concept. *NatRevDrug Discov*, 6: 357-372, 2007. <https://doi.org/nrd2280> [pii];10.1038/nrd2280 [doi]
 29. Pabbidi, RM, Yu, SQ, Peng, S, Khardori, R, Pauza, ME, Premkumar, LS: Influence of TRPV1 on diabetes-induced alterations in thermal pain sensitivity. *Mol Pain*, 4: 9, 2008. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-4-9>
 30. Cui, YY, Xu, H, Wu, HH, Qi, J, Shi, J, Li, YQ: Spatio-temporal expression and functional involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in diabetic mechanical allodynia in rats. *PLoS One*, 9: e102052, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102052>
 31. 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>
 32. Schmidt, R, Schmelz, M, Forster, C, Ringkamp, M, Torebjork, E, Handwerker, H: Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci*, 15: 333-341, 1995. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.15-01-00333.1995>
 33. Weidner, C, Schmelz, M, Schmidt, R, Hansson, B, Handwerker, HO, Torebjork, HE: Functional attributes discriminating mechano-insensitive and mechano-responsive C nociceptors in human skin. *J Neurosci*, 19: 10184-10190, 1999. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-22-10184.1999>
 34. 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>
 35. Orstavik, K, Weidner, C, Schmidt, R, Schmelz, M, Hilliges, M, Jorum, E, Handwerker, HO, Torebjörk, HE: Pathological C-fibres in patients with a chronic painful condition. *Brain*, 126: 567-578, 2003.
 36. Schmelz, M, Schmid, R, Handwerker, HO, Torebjork, HE: Encoding of burning pain from capsaicin-treated human skin in two categories of unmyelinated nerve fibres. *Brain*, 123 Pt 3: 560-571, 2000. <https://doi.org/10.1093/brain/123.3.560>
 37. 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.
 38. De Col, R, Messlinger, K, Carr, RW: Conduction velocity is regulated by sodium channel inactivation in unmyelinated axons innervating the rat cranial meninges. *J Physiol*, 586: 1089-1103, 2008.
 39. 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.
 40. Kramer, HH, Schmelz, M, Birklein, F, Bickel, A: Electrically stimulated axon reflexes are diminished in diabetic small fiber neuropathies. *Diabetes*, 53: 769-774, 2004. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.3.769>

41. Bickel, A, Kramer, HH, Hilz, MJ, Birklein, F, Neundorfer, B, Schmelz, M: Assessment of the neurogenic flare reaction in small-fiber neuropathies. *Neurology*, 59: 917-919, 2002. <https://doi.org/10.1212/wnl.59.6.917>
42. Urmeý, WF, Grossi, P: Use of sequential electrical nerve stimuli (SENS) for location of the sciatic nerve and lumbar plexus. *Reg Anesth Pain Med*, 31: 463-469, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.rapm.2006.06.004>
43. Bostock, H, Cikurel, K, Burke, D: Threshold Tracking Techniques in the Study of Human Peripheral- Nerve. *Muscle Nerve*, Vol 21: 137-158, 1998.
44. Otsuru, N, Inui, K, Yamashiro, K, Miyazaki, T, Takeshima, Y, Kakigi, R: Assessing Adelta fiber function with lidocaine using intraepidermal electrical stimulation. *J Pain*, 11: 621-627, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2009.10.001>
45. Di Stefano, G, Di Lionardo, A, La Cesa, S, Di Pietro, G, Fasolino, A, Galosi, E, Leone, C, Cruccu, G, Marinelli, L, Leandri, M, Truini, A: The new micropatterned interdigitated electrode for selective assessment of the nociceptive system. *Eur J Pain*, 24: 956-966, 2020. <https://doi.org/10.1002/ejp.1545>
46. Hilliges, M, Wang, L, Johansson, O: Ultrastructural evidence for nerve fibers within all vital layers of the human epidermis. *JInvestDermatol*, 104: 134-137, 1995.
47. Peng, YB, Ringkamp, M, Campbell, JN, Meyer, RA: Electrophysiological assessment of the cutaneous arborization of Adelta-fiber nociceptors. *JNeurophysiol*, 82: 1164-1177, 1999.
48. Tanaka, S, Gomez-Tames, J, Wasaka, T, Inui, K, Ueno, S, Hirata, A: Electrical Characterisation of Adelta-Fibres Based on Human in vivo Electrostimulation Threshold. *Front Neurosci*, 14: 588056, 2020. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.588056>
49. Sittl, R, Lampert, A, Huth, T, Schuy, ET, Link, AS, Fleckenstein, J, Alzheimer, C, Grafe, P, Carr, RW: Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype Na(V)1.6-resurgent and persistent current. *ProcNatlAcadSciUSA*, 109: 6704-6709, 2012.
50. Quesada, C, Kostenko, A, Ho, I, Leone, C, Nochi, Z, Stouffs, A, Wittayer, M, Caspani, O, Brix Finnerup, N, Mouraux, A, Pickering, G, Tracey, I, Truini, A, Treede, RD, Garcia-Larrea, L: Human surrogate models of central sensitization: A critical review and practical guide. *Eur J Pain*, 25: 1389-1428, 2021. <https://doi.org/10.1002/ejp.1768>
51. Schneider, T, Zurbriggen, L, Dieterle, M, Mauermann, E, Frei, P, Mercer-Chalmers-Bender, K, Ruppen, W: Pain response to cannabidiol in induced acute nociceptive pain, allodynia, and hyperalgesia by using a model mimicking acute pain in healthy adults in a randomized trial (CANAB I). *Pain*, 163: e62-e71, 2022. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002310>
52. Hugosdottir, R, Morch, CD, Andersen, OK, Helgason, T, Arendt-Nielsen, L: Preferential activation of small cutaneous fibers through small pin electrode also depends on the shape of a long duration electrical current. *BMC Neurosci*, 20: 48, 2019. <https://doi.org/10.1186/s12868-019-0530-8>
53. Hennings, K, Frahm, KS, Petrini, L, Andersen, OK, Arendt-Nielsen, L, Morch, CD: Membrane properties in small cutaneous nerve fibers in humans. *Muscle Nerve*, 55: 195-201, 2017. <https://doi.org/10.1002/mus.25234>
54. Hugosdottir, R, Morch, CD, Andersen, OK, Arendt-Nielsen, L: Investigating stimulation parameters for preferential small-fiber activation using exponentially rising electrical currents. *J Neurophysiol*, 122: 1745-1752, 2019. <https://doi.org/10.1152/jn.00390.2019>

55. 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>
56. Schnakenberg, M, Thomas, C, Schmelz, M, Rukwied, R: Nerve growth factor sensitizes nociceptors to C-fibre selective supra-threshold electrical stimuli in human skin. *Eur J Pain*, 25: 385-397, 2021. <https://doi.org/10.1002/ejp.1678>
57. 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>
58. Hoffmann, T, De Col, R, Messlinger, K, Reeh, PW, Weidner, C: Mice and rats differ with respect to activity-dependent slowing of conduction velocity in the saphenous peripheral nerve. *Neurosci Lett*, 592: 12-16, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2015.02.057>
59. McIntyre, P, McLatchie, LM, Chambers, A, Phillips, E, Clarke, M, Savidge, J, Toms, C, Peacock, M, Shah, K, Winter, J, Weerasakera, N, Webb, M, Rang, HP, Bevan, S, James, IF: Pharmacological differences between the human and rat vanilloid receptor 1 (VR1). *Br J Pharmacol*, 132: 1084-1094, 2001. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703918>
60. Percie du Sert, N, Rice, AS: Improving the translation of analgesic drugs to the clinic: animal models of neuropathic pain. *Br J Pharmacol*, 171: 2951-2963, 2014. <https://doi.org/10.1111/bph.12645>
61. Mogil, JS: Animal models of pain: progress and challenges. *NatRevNeurosci*, 10: 283-294, 2009. <https://doi.org/nrn2606> [pii]; [10.1038/nrn2606](https://doi.org/10.1038/nrn2606) [doi]
62. Hill, R: NK1 (substance P) receptor antagonists--why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol Sci*, 21: 244-246, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01502-9](https://doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01502-9)
63. Burma, NE, Leduc-Pessah, H, Fan, CY, Trang, T: Animal models of chronic pain: Advances and challenges for clinical translation. *J Neurosci Res*, 95: 1242-1256, 2017. <https://doi.org/10.1002/jnr.23768>
64. Meijs, S, Schmelz, M, Meilin, S, Jensen, W: A systematic review of porcine models in translational pain research. *Lab Anim (NY)*, 50: 313-326, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41684-021-00862-4>
65. Hellman, A, Maietta, T, Clum, A, Byraju, K, Raviv, N, Staudt, MD, Jeannotte, E, Nalwalk, J, Belin, S, Poitelon, Y, Pilitsis, JG: Development of a common peroneal nerve injury model in domestic swine for the study of translational neuropathic pain treatments. *J Neurosurg*: 1-8, 2021. <https://doi.org/10.3171/2020.9.JNS202961>
66. Castel, D, Sabbag, I, Brenner, O, Meilin, S: Peripheral Neuritis Trauma in Pigs: A Neuropathic Pain Model. *J Pain*, 17: 36-49, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2015.09.011>
67. Lynn, B, Schutterle, S, Pierau, FK: The vasodilator component of neurogenic inflammation is caused by a special subclass of heat-sensitive nociceptors in the skin of the pig. *JPhysiol(Lond)*, 494: 587-593, 1996.
68. Obreja, O, Ringkamp, M, Namer, B, Forsch, E, Klusch, A, Rukwied, R, Petersen, M, Schmelz, M: Patterns of activity-dependent conduction velocity changes differentiate classes of unmyelinated mechano-insensitive afferents including cold nociceptors, in pig and in human. *Pain*, 148: 59-69, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2009.10.006>

69. Gee, MD, Lynn, B, Cotsell, B: The relationship between cutaneous C fibre type and antidromic vasodilatation in the rabbit and the rat. *J Physiol (Lond)*, 503: 31-44, 1997.
70. Rice, FL, Castel, D, Ruggiero, E, Dockum, M, Houk, G, Sabbag, I, Albrecht, PJ, Meilin, S: Human-like cutaneous neuropathologies associated with a porcine model of peripheral neuritis: A translational platform for neuropathic pain. *Neurobiol Pain*, 5: 100021, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ynpai.2018.07.002>
71. Wang, Y, Zhong, J, Zhang, X, Liu, Z, Yang, Y, Gong, Q, Ren, B: The Role of HMGB1 in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *J Diabetes Res*, 2016: 2543268, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/2543268>
72. Li, M, Song, L, Gao, X, Chang, W, Qin, X: Toll-like receptor 4 on islet beta cells senses expression changes in high-mobility group box 1 and contributes to the initiation of type 1 diabetes. *Exp Mol Med*, 44: 260-267, 2012. <https://doi.org/10.3858/emm.2012.44.4.021>
73. Czura, CJ, Wang, H, Tracey, KJ: Dual roles for HMGB1: DNA binding and cytokine. *J Endotoxin Res*, 7: 315-321, 2001. <https://doi.org/10.1177/09680519010070041401>
74. Bell, CW, Jiang, W, Reich, CF, 3rd, Pisetsky, DS: The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291: C1318-1325, 2006. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00616.2005>
75. Wang, FC, Pei, JX, Zhu, J, Zhou, NJ, Liu, DS, Xiong, HF, Liu, XQ, Lin, DJ, Xie, Y: Overexpression of HMGB1 A-box reduced lipopolysaccharide-induced intestinal inflammation via HMGB1/TLR4 signaling in vitro. *World J Gastroenterol*, 21: 7764-7776, 2015. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i25.7764>
76. Thakur, V, Sadanandan, J, Chattopadhyay, M: High-Mobility Group Box 1 Protein Signaling in Painful Diabetic Neuropathy. *Int J Mol Sci*, 21, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijms21030881>
77. Yang, D, Chen, Q, Yang, H, Tracey, KJ, Bustin, M, Oppenheim, JJ: High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol*, 81: 59-66, 2007. <https://doi.org/10.1189/jlb.0306180>
78. Feldman, P, Due, MR, Ripsch, MS, Khanna, R, White, FA: The persistent release of HMGB1 contributes to tactile hyperalgesia in a rodent model of neuropathic pain. *J Neuroinflammation*, 9: 180, 2012. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-180>
79. Shibasaki, M, Sasaki, M, Miura, M, Mizukoshi, K, Ueno, H, Hashimoto, S, Tanaka, Y, Amaya, F: Induction of high mobility group box-1 in dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. *Pain*, 149: 514-521, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2010.03.023>
80. Klune, JR, Dhupar, R, Cardinal, J, Billiar, TR, Tsung, A: HMGB1: endogenous danger signaling. *Mol Med*, 14: 476-484, 2008. <https://doi.org/10.2119/2008-00034.Klune>
81. Diogenes, A, Ferraz, CC, Akopian, AN, Henry, MA, Hargreaves, KM: LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons. *J Dent Res*, 90: 759-764, 2011. <https://doi.org/10.1177/0022034511400225>
82. Zhong, H, Li, X, Zhou, S, Jiang, P, Liu, X, Ouyang, M, Nie, Y, Chen, X, Zhang, L, Liu, Y, Tao, T, Tang, J: Interplay between RAGE and TLR4 Regulates HMGB1-Induced Inflammation by Promoting Cell Surface Expression of RAGE and TLR4. *J Immunol*, 205: 767-775, 2020. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900860>

83. Paudel, YN, Shaikh, MF, Chakraborti, A, Kumari, Y, Aledo-Serrano, A, Aleksovskaja, K, Alvim, MKM, Othman, I: HMGB1: A Common Biomarker and Potential Target for TBI, Neuroinflammation, Epilepsy, and Cognitive Dysfunction. *Front Neurosci*, 12: 628, 2018. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00628>
84. Allette, YM, Due, MR, Wilson, SM, Feldman, P, Ripsch, MS, Khanna, R, White, FA: Identification of a functional interaction of HMGB1 with Receptor for Advanced Glycation End-products in a model of neuropathic pain. *Brain Behav Immun*, 42: 169-177, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.06.199>
85. Fang, P, Schachner, M, Shen, YQ: HMGB1 in development and diseases of the central nervous system. *Mol Neurobiol*, 45: 499-506, 2012. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8264-y>
86. Due, MR, Piekarz, AD, Wilson, N, Feldman, P, Ripsch, MS, Chavez, S, Yin, H, Khanna, R, White, FA: Neuroexcitatory effects of morphine-3-glucuronide are dependent on Toll-like receptor 4 signaling. *J Neuroinflammation*, 9: 200, 2012. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-200>
87. Dasu, MR, Devaraj, S, Park, S, Jialal, I: Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care*, 33: 861-868, 2010. <https://doi.org/10.2337/dc09-1799>
88. Skrha, J, Jr., Kalousova, M, Svarcova, J, Muravska, A, Kvasnicka, J, Landova, L, Zima, T, Skrha, J: Relationship of soluble RAGE and RAGE ligands HMGB1 and EN-RAGE to endothelial dysfunction in type 1 and type 2 diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 120: 277-281, 2012. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1283161>
89. Juranek, JK, Kothary, P, Mehra, A, Hays, A, Brannagan, TH, 3rd, Schmidt, AM: Increased expression of the receptor for advanced glycation end-products in human peripheral neuropathies. *Brain Behav*, 3: 701-709, 2013. <https://doi.org/10.1002/brb3.176>
90. Agalave, NM, Larsson, M, Abdelmoaty, S, Su, J, Baharpoor, A, Lundback, P, Palmblad, K, Andersson, U, Harris, H, Svensson, CI: Spinal HMGB1 induces TLR4-mediated long-lasting hypersensitivity and glial activation and regulates pain-like behavior in experimental arthritis. *Pain*, 155: 1802-1813, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.06.007>
91. Rukwied, R, Schley, M, Forsch, E, Obreja, O, Dusch, M, Schmelz, M: Nerve growth factor-evoked nociceptor sensitization in pig skin in vivo. *J NeurosciRes*, 88: 2066-2072, 2010.
92. Lynn, B, Faulstich, K, Pierau, FK: The classification and properties of nociceptive afferent units from the skin of the anaesthetized pig. *EurJNeurosci*, 7: 431-437, 1995.
93. Obreja, O, Schmelz, M: Single-fiber recordings of unmyelinated afferents in pig. *NeurosciLett*, 470: 175-179, 2010.
94. Lehmann, S, Deuring, E, Weller, K, Scheffel, J, Metz, M, Maurer, M, Hawro, T: Flare Size but Not Intensity Reflects Histamine-Induced Itch. *Skin Pharmacol Physiol*, 33: 244-252, 2020. <https://doi.org/10.1159/000508795>
95. Carr, RW, Sittl, R, Fleckenstein, J, Grafe, P: GABA increases electrical excitability in a subset of human unmyelinated peripheral axons. *PLoS ONE*, 5: e8780, 2010.
96. Klein, AH, Vyshnevskaja, A, Hartke, TV, De Col, R, Mankowski, JL, Turnquist, B, Bosmans, F, Reeh, PW, Schmelz, M, Carr, RW, Ringkamp, M: Sodium Channel Nav1.8 Underlies TTX-Resistant Axonal Action Potential Conduction

- in Somatosensory C-Fibers of Distal Cutaneous Nerves. *J Neurosci*, 37: 5204-5214, 2017. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3799-16.2017>
97. Bestall, SM, Hulse, RP, Blackley, Z, Swift, M, Ved, N, Paton, K, Beazley-Long, N, Bates, DO, Donaldson, LF: Sensory neuronal sensitisation occurs through HMGB-1-RAGE and TRPV1 in high-glucose conditions. *J Cell Sci*, 131, 2018. <https://doi.org/10.1242/jcs.215939>
98. Torebjörk, HE, LaMotte, RH, Robinson, CJ: Peripheral neural correlates of magnitude of cutaneous pain and hyperalgesia: simultaneous recordings in humans of sensory judgments of pain and evoked responses in nociceptors with C-fibers. *J Neurophysiol*, 51: 325-339, 1984.
99. Schmidt, R, Schmelz, M, Weidner, C, Handwerker, HO, Torebjörk, HE: Innervation territories of mechano-insensitive C nociceptors in human skin. *J Neurophysiol*, 88: 1859-1866, 2002.
100. Schmidt, R, Schmelz, M, Ringkamp, M, Handwerker, HO, Torebjörk, HE: Innervation territories of mechanically activated C nociceptor units in human skin. *Journal of Neurophysiology*, 78: 2641-2648, 1997.
101. Olausson, H, Wessberg, J, Morrison, I, McGlone, F, Vallbo, A: The neurophysiology of unmyelinated tactile afferents. *NeurosciBiobehavRev*, 34: 185-191, 2010. [https://doi.org/S0149-7634\(08\)00169-3](https://doi.org/S0149-7634(08)00169-3) [pii];10.1016/j.neubiorev.2008.09.011 [doi]
102. Cascio, CJ, Moore, D, McGlone, F: Social touch and human development. *Dev Cogn Neurosci*, 35: 5-11, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.dcn.2018.04.009>
103. Fitzmaurice, S, Maibach, HI: Gender Differences in Skin. In: *Textbook of Aging Skin*. Herausgegeben von FARAGE, M. A., MILLER, K. W., MAIBACH, H. I., Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg, 2010, S. 999-1017.
104. Ray, PR, Shiers, S, Caruso, JP, Tavares-Ferreira, D, Sankaranarayanan, I, Uhelski, ML, Li, Y, North, RY, Tatsui, C, Dussor, G, Burton, MD, Dougherty, PM, Price, TJ: RNA profiling of human dorsal root ganglia reveals sex-differences in mechanisms promoting neuropathic pain. *Brain*, 2022. <https://doi.org/10.1093/brain/awac266>
105. Namer, B, Barta, B, Orstavik, K, Schmidt, R, Carr, R, Schmelz, M, Handwerker, HO: Microneurographic assessment of C-fibre function in aged healthy subjects. *J Physiol*, 587: 419-428, 2009.
106. de Boer, EM, Bezemer, PD, Bruynzeel, DP: A standard method for repeated recording of skin blood flow using laser Doppler flowmetry. *Derm Beruf Umwelt*, 37: 58-62, 1989.
107. Hansen, N, Klein, T, Magerl, W, Treede, RD: Psychophysical evidence for long-term potentiation of C-fiber and Adelta-fiber pathways in humans by analysis of pain descriptors. *J Neurophysiol*, 97: 2559-2563, 2007.
108. Caldwell, JH, Schaller, KL, Lasher, RS, Peles, E, Levinson, SR: Sodium channel Na(v)1.6 is localized at nodes of ranvier, dendrites, and synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97: 5616-5620, 2000. <https://doi.org/10.1073/pnas.090034797>
109. van Beijnum, JR, Buurman, WA, Griffioen, AW: Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis*, 11: 91-99, 2008. <https://doi.org/10.1007/s10456-008-9093-5>
110. 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>

111. Werland, F, de Col, R, Hirth, M, Turnquist, B, Schmelz, M, Obreja, O: Mechanical sensitization, increased axonal excitability, and spontaneous activity in C-nociceptors after ultraviolet B irradiation in pig skin. *Pain*, 162: 2002-2013, 2021. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002197>
112. North, RY, Odem, MA, Li, Y, Tatsui, CE, Cassidy, RM, Dougherty, PM, Walters, ET: Electrophysiological Alterations Driving Pain-Associated Spontaneous Activity in Human Sensory Neuron Somata Parallel Alterations Described in Spontaneously Active Rodent Nociceptors. *J Pain*, 23: 1343-1357, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2022.02.009>
113. Merrill, DR, Bikson, M, Jefferys, JG: Electrical stimulation of excitable tissue: design of efficacious and safe protocols. *J Neurosci Methods*, 141: 171-198, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2004.10.020>
114. Pakalniskis, J, Soares, S, Rajan, S, Vyshnevskaya, A, Schmelz, M, Solinski, HJ, Rukwied, R, Carr, RW: Human pain ratings to electrical sinusoids increase with cooling via a cold-induced increase in C-fibre excitability. *Pain*. in press, 2023.
115. Paudel, YN, Angelopoulou, E, Piperi, C, Othman, I, Aamir, K, Shaikh, MF: Impact of HMGB1, RAGE, and TLR4 in Alzheimer's Disease (AD): From Risk Factors to Therapeutic Targeting. *Cells*, 9, 2020. <https://doi.org/10.3390/cells9020383>
116. Obreja, O: Erregbarkeitsänderungen von Nozizeptoren - sensorische und axonale Mechanismen. Med. Dissertation. Medizinische Fakultät Mannheim, Universität Heidelberg, 2013.
117. Schneider, T, Filip, J, Soares, S, Sohns, K, Carr, R, Rukwied, R, Schmelz, M: Optimized Electrical Stimulation of C-Nociceptors in Humans Based on the Chronaxie of Porcine C-Fibers. *J Pain*, 24: 957-969, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2023.01.009>

Publikationen (*geteilte Erstautorschaft):

Schneider, T*, Filip, J*, Soares, S, Sohns, K, Carr, R, Rukwied, R, Schmelz, M: Optimized Electrical Stimulation of C-Nociceptors in Humans Based on the Chronaxie of Porcine C-Fibers. *J Pain*, 24: 957-969, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2023.01.009>

7. LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Filip, Julia
Geburtsdatum: 14.08.1995
Geburtsort: Hilden

SCHULISCHER WERDEGANG

2001 – 2005 Hans-Geiger-Grundschule in Neustadt an der Weinstraße
2005 – 2014 Leibniz Gymnasium in Neustadt an der Weinstraße
21.03.2014 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2014/2015 Beginn des Studiums der Biowissenschaften
An der Universität Kaiserslautern
WS2016/2017 Beginn des Studiums der Humanmedizin
An der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität
Heidelberg
05.09.2018 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
07.04.2022 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
11.05.2023 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)
29.06.2023 Approbation als Ärztin

9. DANKSAGUNG

An erster Stelle und in ganz besonderem Maße möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Martin Schmelz - meinem Doktorvater und geschätztem Mentor - für die Überlassung des Themas dieser Promotionsarbeit und die herausragende Betreuung danken.

Darüber hinaus bedanke ich mich herzlichst bei meinem Zweitbetreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. Roman Rukwied und der gesamten Arbeitsgruppe für experimentelle Schmerzforschung der Medizinischen Fakultät Mannheim für Ihre freundliche Aufnahme und unermessliche Hilfsbereitschaft. Insbesondere dank Frau Sabrina Soares und Herrn PD Dr. Richard Carr wurde mir eine hervorragende Einarbeitung und Unterstützung zuteil. Die mir zur Auswertung überlassenen Versuchsergebnisse und zur Verfügung gestellten Arbeitsmaterialien ermöglichten einen optimalen Start in Hinblick auf die Durchführung dieser Arbeit.

Außerordentlicher Dank gilt zudem Dr. med. Tobias Schneider für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, welche zu einer gemeinsamen Publikation über Teilergebnisse unserer Forschungsarbeiten führte. Im Rahmen dessen möchte ich zudem allen Koautoren für ihre investierte Mühe und Zeit danken.

Dem DIAMICOM-Graduiertenkolleg (IRTG 1874/2, DFG gefördert) unter Leitung von Prof. Dr. Hans-Peter Hammes und Prof. Dr. Jens Kroll danke ich für die wissenschaftliche und finanzielle Förderung, welche mir im Rahmen der Mitgliedschaft und des erhaltenen Stipendiums zuteil wurde.

Ein besonderer Dank gilt zudem allen Probandinnen und Probanden, darunter zahlreiche meiner Kommilitoninnen und Kommilitonen, die an diesem Projekt teilgenommen und es hierdurch erst ermöglicht haben.

Herrn Philipp Herrmann und Frau Gudrun Denig danke ich für ihren unermüdlichen Beistand während des Studiums und dem Entstehen dieser Arbeit. Vielen Dank Mama für deine Kraft und dein Geleit.