

Aus der Klinik für Neurologie
(Direktorin: Frau Prof. Dr. med. Daniela Berg)
Sektion Neurologische Schmerzforschung und -therapie
(Leiter: Prof. Dr. med. Ralf Baron)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Erforschung und Identifizierung unterschiedlicher Immunzellpopulationen und ihre Rolle
bei der Entstehung chronischer Schmerzen**

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

vorgelegt von
Josephine Inés Lassen
aus Kiel
Kiel (2021)

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Philipp Hüllemann

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Regine Gläser

Tag der mündlichen Prüfung: 18.03.2022

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 12.01.2022

gez. Prof. Dr. med. Ann-Kristin Helmers

(Vorsitzende der Prüfungskommission)

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Definition Schmerz	1
1.2	Epidemiologie des chronischen Schmerzes.....	1
1.3	Schmerzformen	2
1.3.1	Definition Neuropathischer Schmerz	3
1.3.2	Akuter Schmerz	5
1.3.3	Chronischer Schmerz.....	5
1.3.4	Periphere und zentrale Sensibilisierung.....	5
1.3.5	Patientenstratifizierung.....	7
1.4	Rolle des Immunsystems bei Schmerzchronifizierung	7
1.5	Fragestellung	9
2	Methodik	10
2.1	Ein- und Ausschlusskriterien	11
2.2	PainDETECT Fragebogen.....	12
2.3	Quantitative Sensorische Testung.....	12
2.3.1	Thermische Detektionsschwelle und Schmerzschwelle	12
2.3.2	Mechanische Detektionsschwelle	13
2.3.3	Mechanische Schmerzschwelle	13
2.3.4	Stimulus-Antwort-Funktion und dynamische mechanische Allodynie	14
2.3.5	Vibrations-Detektionsschwelle.....	14
2.3.6	Wind-up Ratio.....	14
2.3.7	Druckschmerzschwelle	15
2.4	Durchflusszytometrie	15
2.4.1	Prinzip	15
2.4.2	Durchführung	21
2.5	Statistische Auswertung.....	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Schmerzintensität und Fragebogen-Scores bei Baseline und Follow-up	26
3.2	Somatosensorische Profile	27
3.2.1	Vergleich der QST-Profile bei Baseline und Follow-up.....	27
3.2.2	Vergleich der QST-Profile der beiden Patientengruppen.....	29
3.3	Liquoranalyse	30
3.4	Durchflusszytometrische Analyse	31
3.5	Korrelationsanalysen.....	33

3.5.1	Immunzellhäufigkeiten und PDQ-Scores.....	33
3.5.2	Immunzellhäufigkeiten und somatosensorischen Parametern	33
3.5.3	Immunzellhäufigkeiten und Schmerzentwicklung	36
4	Diskussion.....	38
4.1	Protektiver Effekt von NK-Zellen auf zentrale Sensibilisierung.....	38
4.2	Zytotoxische T-Zellen und Sensibilisierung	40
4.3	Leukozyten-Einwanderung in das ZNS	41
4.4	Limitationen	41
5	Zusammenfassung	43
6	Literaturverzeichnis	45
7	Anhang	48
7.1	Patientenaufklärung.....	48
7.2	Einwilligungserklärung	49
7.3	PainDETECT Fragebogen.....	50
7.4	QST Dokumentationsbogen	51
8	Tabellenverzeichnis.....	52
8.1	Tabelle 1	52
8.2	Tabelle 2	52
8.3	Tabelle 3	52
8.4	Tabelle 4	52
8.5	Tabelle 5	52
8.6	Tabelle 6	52
8.7	Tabelle 7	52
8.8	Tabelle 8	52
8.9	Tabelle 9	52
9	Abbildungsverzeichnis.....	53
9.1	Abbildung 1.....	53
9.2	Abbildung 2.....	53
9.3	Abbildung 3.....	53
9.4	Abbildung 4.....	53
9.5	Abbildung 5.....	53
9.6	Abbildung 6.....	53
9.7	Abbildung 7.....	53
9.8	Abbildung 8.....	53
9.9	Abbildung 9.....	53
9.10	Abbildung 10	53

9.11	Abbildung11	53
9.12	Abbildung 12	53
9.13	Abbildung 13	53
9.14	Abbildung 14	53
9.15	Abbildung 15	53
9.16	Abbildung 16	54
9.17	Abbildung 17	54
10	Danksagung.....	55
11	Lebenslauf.....	57

Abkürzungsverzeichnis

7AAD	Antikörper zur Färbung apoptotischer Zellen
A	Fläche (Area); errechnet sich aus Height x Width
APC	CD19-Antikörper
APC-Cy7	CD8-Antikörper
CD	Cluster of Differentiation
CD4-Zellen	CD4 positive Lymphozyten; T-Helferzellen
CD8-Zellen	CD8 positive Lymphozyten; zytotoxische T-Zellen
CD19-Zellen	CD19 positive Lymphozyten; B-Zellen
CD56-Zellen	CD56 positive Zellen; natürliche Killerzellen; NK-Zellen
CDT	Cold detection threshold; Kälteerkennungsschwelle
CPT	Cold pain threshold; Kälteschmerzschwelle
DMA	Dynamic mechanical allodynia; dynamische mechanische Allodynie
FACS	fluorescence-activated cell sorting; Durchflusszytometrie
FITC	CD3-Antikörper
FSC	Forward scatter; Vorwärtsstreulicht
H	Höhe (Height); beschreibt die Intensität des Signals
HPT	Heat pain threshold; Hitzeschmerzschwelle
IASP	International Association for the Study of Pain
MDT	Mechanical detection threshold; mechanische Detektionsschwelle
MPT	Mechanical pain threshold; mechanische Schmerzschwelle
MPS	Mechanical pain sensitivity; mechanische Schmerzsensibilität
NAS	Nummerische Analogskala
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen; CD56 positive Zellen
PDQ	PainDETECT questionnaire; PainDETECT Fragebogen
PE	CD56-Antikörper
PE-Cy7	CD4-Antikörper
PerCP-Cy 5.5	CD45-Antikörper
PHS	Paradoxial heat sensation; paradoxe Hitzeempfindung
PNP	Polyneuropathie
PPT	Pressure pain threshold; Druckschmerzschwelle

QST	Quantitative Sensorische Testung
SSC	Side scatter; Seitwärtsstreulicht
TSL	Thermal sensory limen; thermische Unterschiedsschwelle
VDT	Vibration detectionthreshold; Vibrationsdetektionsschwelle
VZV	Varizella-Zoster-Virus
W	Breite (Width); beschreibt die Zeit, die die Zelle benötigt, um den Laser zu passieren. Ist proportional zur Zellgröße und der Dauer des Signals.
WDT	Warm detection threshold; Wärmedetektionsschwelle
WUR	Wind-up ratio
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Definition Schmerz

Die IASP (International Association for the Study of Pain) definiert Schmerz als „unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit einer tatsächlichen oder potentiellen Gewebeschädigung einhergeht“ (Raja, Carr et al. 2020).

Diese Gewebeschädigungen können zum Beispiel durch chemische, thermische und mechanische Noxen, aber auch durch Fehl- oder Überbelastungen oder durch Krankheiten (wie zum Beispiel Diabetes, Infektionen, Polyneuropathie oder Herpes Zoster) verursacht werden.

Um Schmerzen weiter differenzieren zu können, werden verschiedene Schmerzformen und –stadien unterschieden, welche im Folgenden (siehe Punkt 1.3) beschrieben sind.

1.2 Epidemiologie des chronischen Schmerzes

Chronischer Schmerz ist ein weit verbreitetes Phänomen in der modernen westlichen Gesellschaft und darüber hinaus ein gravierendes Problem der Gesundheitsfürsorge. Schon seit mehr als zehn Jahren ist bekannt, dass etwa ein Fünftel der europäischen Bevölkerung von chronischen Schmerzen betroffen und zu Hause oder am Arbeitsplatz beeinträchtigt ist (Breivik, Collett et al. 2006).

Allerdings werden nur 2% der Patienten, die eine Behandlung durch spezialisierte Schmerztherapeuten benötigen, adäquat behandelt (Breivik, Collett et al. 2006, Smith and Torrance 2011). Ergebnisse einer repräsentativen Stichprobe zur schmerztherapeutischen Versorgung in Deutschland zeigen, dass 31,9% der Patienten mit beeinträchtigenden Schmerzen von einem Schmerzspezialisten behandelt wurden und unterstreichen den derzeitigen Mangel an Therapeuten (Hauser, Schmutzer et al. 2014).

1.3 Schmerzformen

Eine Einteilung von Schmerzen erfolgt oft anhand der Intaktheit des somatosensorischen Systems. Hierbei werden nozizeptive, nozioplastische, neuropathische und gemischte Schmerzen unterschieden (Kosek, Cohen et al. 2016).

Die Erregung von peripheren sensorischen Nozizeptoren durch gewebereizende oder –schädigende Stimuli (mechanisch, chemisch oder thermisch) vermittelt *nozizeptiven Schmerz* (Kehlet, Jensen et al. 2006). Das nozizeptive System bleibt hierbei intakt (Wolfe and Michaud 2007). Beispiele für diese Schmerzform können zum Beispiel Verbrennungen, Verätzungen, Entzündungsschmerz, Schmerz nach Quetschungen oder Stauchungen sein.

Liegt eine Veränderung des schmerzverarbeitenden Systems ohne Gewebeschaden vor (wie es bei Fibromyalgie oder dem komplexen regionalen Schmerzsyndrom (CRPS) der Fall sein kann (Trouvin and Perrot 2019)), so werden auftretende Schmerzen als *nozioplastisch* beschrieben (neue Definition der IASP seit 2017 (Raja, Carr et al. 2020)).

Als *neuropathischen Schmerz* bezeichnet man Schmerz, der als direkte Folge einer Irritation oder Schädigung im somatosensorischen System (peripher und/oder zentral) entsteht (Finnerup, Haroutounian et al. 2016, Kosek, Cohen et al. 2016, Colloca, Ludman et al. 2017). Typische Erkrankungen mit neuropathischen Schmerzkomponenten sind die Postzosterische Neuralgie, Schmerzen bei Polyneuropathien, Schmerzen nach Rückenmarkverletzungen, die Trigeminusneuralgie sowie Phantomschmerz.

Nozizeptiver und neuropathischer Schmerz sind oft nicht eindeutig voneinander abgrenzbar, sondern liegen gemeinsam als „*gemischter Schmerz*“ vor (Kosek, Cohen et al. 2016): Bei vielen Erkrankungen kommt es gleichzeitig zur chronischen Erregung afferenter Nerven (nozizeptiv) und zur Schädigung der Nervenwurzeln (neuropathisch). Ein typisches Beispiel für gemischte Schmerzen sind Rückenschmerzen im Rahmen von Bandscheibenvorfällen, welche neuropathische (Nervenwurzelkompression mit ausstrahlenden Schmerzen) sowie nozizeptive Schmerzkomponenten (lokaler Bindegewebs-/ Gelenks- oder Muskelschmerz) haben können.

Es können weitere Schmerzformen definiert werden: Schmerz, der aufgrund einer inadäquaten Funktion der (physiologischen und biochemischen) Regulationssysteme entsteht, wird als *funktioneller Schmerz* bezeichnet. Beispiele hierfür sind die fehlerhafte

motorische Steuerung der Skelettmuskulatur (Hartspann, Schmerzen bei Fehlhaltung) sowie die Fehlregulation der Wirkung von Neurotransmittern (bei Migräne).

Psychische bzw. psychosoziale Faktoren können Hauptursache für Auftreten und Intensität von somatoformem Schmerz sein. Das Auftreten von Schmerzen nach psychischer Belastung zählt hierzu (Pschyrembel 2013).

1.3.1 Definition Neuropathischer Schmerz

Als neuropathischen Schmerz bezeichnet man das Resultat einer Erkrankung oder Läsion des somatosensorischen Systems inklusive der peripheren Fasern (A-beta, A-delta und C Fasern) und der zentralen Neurone (Colloca, Ludman et al. 2017). Dabei können entweder periphere Nerven durch eine Vielzahl entzündlicher, metabolischer, mechanischer oder toxischer Prozesse geschädigt werden, oder Läsionen des Rückenmarks oder Gehirns z.B. durch Schlaganfälle, Entzündungen oder Medikamente zu zentralen neuropathischen Schmerzen führen (Sommer 2003).

Bei der Entstehung und bei der Verarbeitung der neuropathischen Schmerzkomponente kann sowohl eine Abnahme der Erregbarkeit durch verminderte Nervenaktionen als auch eine Übererregbarkeit durch verstärkte neuronale Aktivität auftreten und Einfluss nehmen (Baron, Binder et al. 2010).

Unabhängig von der zugrundeliegenden Erkrankung unterscheidet man daher sogenannte Positiv- (verstärktes sensorisches Empfinden) und Negativsymptome (vermindertes sensorisches Empfinden) (siehe **Tabelle 1**). Kennzeichnend für die Variabilität des neuropathischen Schmerzes ist, dass beide Symptomgruppen durchaus auch gemeinsam auftreten können (Baron, Binder et al. 2010).

Positivsymptome	
Verstärktes sensorisches Empfinden	
Hyperalgesie	Ein schmerzhafter Reiz wird verstärkt schmerzhaft wahrgenommen
Parästhesie	Empfindungsstörung wie „Ameisenlaufen“ oder Kribbeln
Dysästhesie	Missempfindung, die schmerzhaft ist
Allodynie	Ein nicht-schmerzhafter Stimulus wird als schmerzhaft wahrgenommen
Spontane Schmerzattacke	Einschießend, kurz anhaltend
Brennschmerz	Schmerz wird als brennend beschrieben
Negativsymptome	
Reduziertes sensorisches Empfinden	
Hypalgesie	Reduzierte Schmerzwahrnehmung
(Therm-) Hypästhesie	reduzierte Empfindlichkeit auf nicht-schmerzhaft (thermische) Reize
Pallhypästhesie	Reduziertes Vibrationsempfinden

Tabelle 1: Typische Symptome neuropathischer Schmerzen

Angelehnt an:

Baron, R., A. Binder, and G. Wasner, *Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. Lancet Neurol*, 2010. 9(8): p. 807-19. Gierthmühlen, J., Baron, R. *Neuropathic Pain. Semin Neurol* 2016; 36:462–468.

Mit einer Prävalenz von 7-10% (Colloca, Ludman et al. 2017) ist der neuropathische Schmerz eine relativ häufige Erkrankung (Moalem and Tracey 2006). Es sind häufiger Frauen als Männer (8% vs. 5,7%) betroffen, außerdem nimmt die Erkrankungswahrscheinlichkeit mit höherem Alter zu (8,9% Patienten >50 Jahre vs. 5,6% Patienten <49 Jahre; (Colloca, Ludman et al. 2017)). Die genauen Mechanismen der Schmerzentstehung sind bisher nur unzureichend bekannt, daher ist die Symptomkontrolle besonders schwierig zu erreichen: Von 151 Patienten mit neuropathischen Schmerzen unterschiedlicher Ursache klagten 72,8% über eine unzureichende Schmerzkontrolle (Gilron, Bailey et al. 2002).

1.3.2 Akuter Schmerz

Akuter Schmerz hat die physiologische Funktion eines Warnsignals und soll den Körper schützen (Elman and Borsook 2016). Der akute Schmerz nimmt in der Regel mit dem Grad der Ausheilung des ursprünglich auslösenden Traumas ab.

Krankheitswert erhält der Schmerz dann, wenn er länger als drei Monate anhält, obwohl er seine Ursache verloren hat, denn damit hat er auch seine Funktion verloren (Kehlet, Jensen et al. 2006).

1.3.3 Chronischer Schmerz

Chronische Schmerzen gehen mit einer abnormen neuronalen Aktivität im ZNS einher und verursachen eine Überempfindlichkeit des nozizeptiven Systems.

Eine adaptive „kurze“ Antwort auf Gewebeschäden entwickelt sich zu einer langanhaltenden maladaptiven Erkrankung, dafür sind vermutlich Sensibilisierungsprozesse verantwortlich: Diese führen zu Schmerzen, die nach der Ausheilung der ursprünglichen Verletzung oder der ursächlichen Krankheit autonom weiterbestehen.

Aber nur ein Teil der Patienten entwickelt nach dem akuten auch einen chronischen Schmerz: Bei 7-18% der Bevölkerung (Bouhassira, Lanteri-Minet et al. 2008) bleibt der Schmerz nach der Ausheilung der Verletzung bestehen und gelangt in ein Stadium des chronischen neuropathischen Schmerzes (Austin and Moalem-Taylor 2010). Warum ist das so? Gibt es Risikofaktoren oder Marker für die Entwicklung eines chronischen Schmerzes?

1.3.4 Periphere und zentrale Sensibilisierung

Gewebetrauma sowie -entzündung führen (vorübergehend) zu einer Sensibilisierung und leichteren Erregbarkeit umliegender Nozizeptoren (Baron, Hans et al. 2013). Diese periphere Sensibilisierung geht in der Regel mit zunehmender Ausheilung zurück.

Bei der zentralen Sensibilisierung kommt es aufgrund einer Schädigung des zentralen Nervensystems oder aufgrund einer dauerhaften Weiterleitung nozizeptiver Stimulation bei geschädigtem peripherem Nervensystem zu strukturellen Veränderungen des nozizeptiven Systems und der Aktivität beteiligter Neurone.

Ein typisches Symptom zentraler Sensibilisierung stellt z.B. die Allodynie dar: Eigentlich nicht-schmerzhaft Reize (wie Berührung oder ein Windhauch) werden als schmerzhaft wahrgenommen (Baron, Binder et al. 2010). Pathophysiologisch liegen u.a. Umbauprozesse im Hinterhorn des Rückenmarks zugrunde, bei denen Verbindungen zwischen Berührungsafferenzen und zentralen nozizeptiven Neuronen entstehen: Die Erregbarkeit der Wide-Dynamic-Range-Neurone (WDR-Neurone), welche nozizeptive sowie nicht-nozizeptive Informationen an schmerzverarbeitende Hirnstrukturen vermitteln, wird bei dauerhafter Stimulation peripherer Nozizeptoren gesteigert. Die hierunter stattfindenden strukturellen Veränderungen haben eine fehlerhafte Weiterleitung der Informationen zur Folge – nicht-schmerzhaft Reize werden schmerzhaft wahrgenommen (Guan, Borzan et al. 2006).

Zum Prozess der Sensibilisierung gehört nach neueren Erkenntnissen auch ein Ungleichgewicht zwischen schmerzfördernden und schmerzhemmenden Faktoren: Die absteigenden schmerzhemmenden Neuronensysteme, welche im Wesentlichen Noradrenalin als Neurotransmitter und GABAerge Interneurone verwenden, kontrollieren physiologischerweise eine überaktive Nozizeption (Melzack and Wall 1965, Ossipov, Morimura et al. 2014). Diese Bahnen können in ihrer Aktivität zunehmend kompromittiert sein (Kosek and Ordeberg 2000). Dies führt in der Konsequenz zu einer verminderten bis inkompetenten körpereigenen Schmerzhemmung (Dickenson 2014, Goncalves, Friend et al. 2015) und einer daraus resultierenden dauerhaften Weiterleitung nozizeptiver Impulse.

Marker für periphere sowie zentrale Sensibilisierung können mittels Quantitativ Sensorischer Testung detektiert werden. Eine veränderte Hitzeschmerzschwelle (HPT) liefert Anzeichen für eine periphere Sensibilisierung (LaMotte, Thalhammer et al. 1982), Zeichen für zentrale Sensibilisierung stellen die mechanische Schmerzempfindlichkeit (MPS), eine veränderte mechanische Schmerzschwelle (MPT) sowie eine pathologische Wind-up ratio dar (WUR) (Baron, Hans et al. 2013). Diese Parameter lassen sich mithilfe der Quantitativen Sensorischen Testung (QST; siehe 4.3.) detektieren.

1.3.5 Patientenstratifizierung

Die Quantitative Sensorische Testung (QST) ist ein standardisiertes Verfahren zur Messung der somatosensorischen Funktion afferenter Nervenfasern (A β -, A δ - und C-Fasern) und ihrer zentralen Bahnen (siehe Punkt 2.3) (Rolke, Baron et al. 2006). Mithilfe der QST ist eine Subgruppierung der Patienten in verschiedene sensorische Phänotypen möglich. Hierbei werden die Sensorik, das Vorliegen einer thermischen Hyperalgesie (schmerzhafte Überempfindlichkeit gegenüber thermischen Reizen) sowie eine Allodynie zur Einteilung in Cluster berücksichtigt (Vollert, Maier et al. 2017). Die verschiedenen sensorischen Phänotypen zeigen auf, dass bei den einzelnen Patienten - auch bei gleichen Grunderkrankungen - unterschiedliche neurobiologische Pathomechanismen zugrunde liegen können (Baron, Maier et al. 2017). Die Einteilung in einzelne sensorische Profile bietet die Möglichkeit, Patienten anhand vorliegender Pathomechanismen einzuteilen nicht nur (wie bisher) anhand ihrer Symptome. So kann eine genauere, Mechanismen-basierte Therapie möglich werden.

1.4 Rolle des Immunsystems bei Schmerzchronifizierung

Abgesehen von bestimmten Risikofaktoren für chronische Schmerzen (wie niedriger sozioökonomischer Status (Smith, Macfarlane et al. 2007), Depression (Ramond, Bouton et al. 2011, Taylor, Goode et al. 2014) oder Unzufriedenheit im Beruf (Smith, Macfarlane et al. 2007, Shaw, van der Windt et al. 2009)) ist bekannt, dass das Immunsystem einen großen Einfluss auf die Schmerzentstehung nach Nervenverletzungen hat. Als Hauptauslöser der peripheren und zentralen Sensibilisierung kristallisieren sich immer deutlicher Vorgänge im Immunsystem heraus: Die wichtigsten Mechanismen der zellulären Immunantwort sind Entzündung und Zytotoxizität (Ren and Dubner 2010, Totsch and Sorge 2017, Raoof, Willemsen et al. 2018, Davies, Rinaldi et al. 2020).

Austin und Moalem-Taylor wiesen 2010 nach, dass nach Nervenläsionen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem eine entscheidende Beteiligung zukommt (Austin and Moalem-Taylor 2010): Periphere Nervenverletzungen provozieren eine Reaktion im Immunsystem wie zum Beispiel die Infiltration von inflammatorischen Zellen (wie z.B. T-Zellen) oder die Aktivierung residenter Immunzellen (wie Mastzellen und Mikroglia).

Bisherige Tierstudien zeigten eine Assoziation zwischen spezifischen Immunzellmustern im Liquor und (persistierenden) Schmerzzuständen, außerdem fanden sie eine Leukozyten-

Einwanderung ins Rückenmark nach peripherer L5-Nervenverletzung, was mit mechanischer Allodynie korrelierte (Sweitzer, Hickey et al. 2002, Rutkowski, Lambert et al. 2004, Marchand, Perretti et al. 2005). Nervenverletzungen führen regelmäßig zu chronischen neuropathischen Schmerzen, die mit einer peripheren und zentralen neuroimmunologischen-Aktivierung und Entzündungsreaktionen des Nervengewebes assoziiert sind (Austin and Moalem-Taylor 2010). Dabei begünstigen Entzündungsmediatoren eine Aktivierung immunkompetenter Nervenzellen, sensibilisieren afferente Neurone und führen im Ergebnis zur Hyperalgesie (Moalem and Tracey 2006), die für neuropathische Schmerzphänomene symptomatisch ist. Eine maladaptive Immunantwort bewirkt dabei aktiv den bleibenden Schmerz (Calvo, Dawes et al. 2012).

Auch die Unterdrückung der Immunantwort im verletzten Nerven kann die Entwicklung einer Hyperalgesie, einem der häufigsten Symptome chronischer Schmerzen, verhindern (Clatworthy, Illich et al. 1995).

1.5 Fragestellung

Bisherige Tierstudien untersuchten Immunreaktionen in neuropathischen Schmerzmodellen. Sie fanden heraus, dass zentrale Neuroinflammation die zentrale Sensibilisierung und möglicherweise die Schmerzchronifizierung vorantreibt (Sweitzer, Hickey et al. 2002, Rutkowski, Lambert et al. 2004, Marchand, Perretti et al. 2005). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die ZNS-Immunität auch eine schützende Rolle bei Schmerzen zu spielen scheint (Davies, Kim et al. 2019). Beim Menschen wurde das Immunzellmuster im Liquor bisher nicht im Hinblick auf chronische neuropathische Schmerzzustände untersucht.

Unsere Studie befasste sich mit den Fragen: Gibt es spezifische Immunzellmuster, die zur Schmerzchronifizierung beitragen können? Gibt es eine Korrelation zwischen Immunzellprofilen und somatosensorischen Profilen, wenn Schmerzen chronisch werden?

Mit diesem Ansatz wollten wir spezifische Immunzellen detektieren, die an der Entstehung von chronischen Schmerzen beteiligt sein können.

Immunologische Marker der Schmerzchronifizierung wären von hohem Wert für eine effizientere Schmerztherapie, weil sie

1. dazu beitragen könnten, Patienten mit einem höheren Chronifizierungsrisiko früher zu identifizieren und deren Behandlung frühzeitig einzuleiten und
2. ermöglichen, immunologisch wirksame Medikamente aus den gewonnenen Erkenntnissen zu konzipieren.

2 Methodik

In dieser Arbeit werden Patienten mit einer akuten neuropathischen Erkrankung (Herpes-Zoster-Infektion) und einer chronischen neuropathischen Erkrankung (Polyneuropathie) initial (Baseline-Untersuchung) und im Verlauf (Follow-up) mittels Quantitativer Sensorischer Testung (QST) phänotypisiert. Eine QST wird sowohl initial als auch im Verlauf durchgeführt, um eine (entstehende) Chronifizierung nachzuweisen.

Zehn Patienten mit Postzosterische Neuralgie und 31 Polyneuropathie-Patienten wurden von Juni 2016 bis Januar 2019 untersucht. Es handelte sich um eine translationale Untersuchung zu Mechanismen der Schmerzentstehung und -chronifizierung.

Bei der Baseline-Untersuchung erhielten die Patienten Fragebögen sowie eine Quantitative Sensorische Testung (QST) im am stärksten betroffenen Bereich und der entsprechenden kontralateralen Seite (Herpes Zoster Patienten) oder auf beiden Seiten des am stärksten betroffenen Areals (PNP-Patienten) zur Beurteilung des somatosensorischen Profils.

Der Liquor wurde gemäß der klinischen Routinediagnostik analysiert, einschließlich Zellzahlen, Protein, Laktat und Glukose. Zusätzlich wurde eine durchflusszytometrische Analyse des Liquors (siehe unten) durchgeführt.

Drei Monate später wurden die QST und die Fragebögen wiederholt, um eine mögliche Schmerzchronifizierung zu ermitteln. Die Studie ist im Deutschen Register für klinische Studien registriert (Registrierungsstudie: DRKS00023537) und wurde in Übereinstimmung mit der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Das Versuchsdesign wurde durch die Ethikkommission der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel genehmigt (ID: D552/15). Alle Teilnehmer gaben nach ausführlicher Aufklärung ihre schriftliche Einwilligung.

2.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Allgemeine Einschlusskriterien

Kriterium	Begründung
1. Die Studienteilnehmer müssen eine Einwilligungserklärung unterschrieben haben, in der sie erklären, den Zweck der Studie und die darin angewendeten Verfahren zu verstehen und in die Studie einzuwilligen.	Gesetzliche Vorgabe
2. Männliche oder weibliche Person > 18 Jahre	Standardisierung, Sicherheit
3. Studienteilnehmer müssen zu angemessener Kommunikation fähig und auch imstande sein, die Lokalisation und Intensität von Schmerzen zu benennen bzw. unterscheiden und die in dieser Studie verwendeten Fragebögen ausfüllen zu können.	Standardisierung

Studienspezifische Einschlusskriterien

Kriterium	Begründung
4. Diagnosestellung einer Polyneuropathie oder einer Postzosterischen Neuralgie klinisch durch einen Facharzt.	Standardisierung

Allgemeine Ausschlusskriterien (Rekrutierungsvisite)

Kriterium	Begründung
1. Früherer Alkohol-, Drogen- oder Arzneimittelmisbrauch oder dahingehender Verdacht des Prüfers.	Sicherheit, Standardisierung
2. Bekannte andere Erkrankungen, die mit einer Veränderung der sensorischen Wahrnehmung oder immunologischen Prozessen einhergehen.	Fehlinterpretation der Ergebnisse
3. Bekannte Immunschwäche, Schwangerschaft	
4. Gleichzeitige Teilnahme an Medikamentenstudien	Standardisierung, Sicherheit

Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien

2.2 PainDETECT Fragebogen

Dieser Fragebogen wird als Screeningverfahren bei Verdacht auf neuropathische Schmerzkomponente eingesetzt (Freyhagen, Baron et al. 2006). Er enthält Fragen zu Schmerzintensität, -verlauf, -ausstrahlung und –intensität. Bei einem Gesamtergebnis zwischen 13 und 18 ist keine eindeutige Aussage zu treffen. Hinweis für eine neuropathische Komponente (>90% Wahrscheinlichkeit) besteht ab einer Gesamtpunktzahl von 18 Punkten.

2.3 Quantitative Sensorische Testung

Zur Beurteilung des somatosensorischen Profils der Patienten wurde eine Quantitative Sensorische Testung (QST) verwendet. Es handelt sich um eine standardisierte Messung, die die somatosensorische Funktion der primär afferenten Nervenfasern (A β -, A δ - und C-Fasern) und ihrer zentralen Bahnen testet.

Die QST wurde nach dem Protokoll des Deutschen Forschungsverbundes Neuropathischer Schmerz (DFNS) durchgeführt (Rolke, Baron et al. 2006, Geber, Scherens et al. 2009, Vollert, Maier et al. 2017). Getestet wurde im betroffenen Dermatom und der entsprechenden kontralateralen Seite bei Herpes Zoster Patienten und beidseitig im am meisten betroffenen Areal bei Polyneuropathie-Patienten (d.h. Fußrücken (n= 29) und Handrücken (n= 2)).

Die folgenden 13 Parameter wurden aufgezeichnet: Kälteerkennungsschwelle (CDT), Wärmeerkennungsschwelle (WDT), thermische Unterschiedsschwelle (TSL), Kälteschmerzschwelle (CPT), Hitzeschmerzschwelle (HPT), Druckschmerzschwelle (PPT), mechanische Schmerzschwelle (MPT), mechanische Schmerzsensibilität (MPS), Wind-up ratio (WUR), mechanische Detektionsschwelle (MDT), Vibrationsdetektionsschwelle (VDT) sowie dynamische mechanische Allodynie (DMA) und paradoxe Hitzeempfindung (PHS).

2.3.1 Thermische Detektionsschwelle und Schmerzschwelle

Für die Prüfung der Temperaturempfindungen wurde der ThermoTester (TSA; MEDOC, Israel) zuerst auf die kontralaterale Seite, dann auf das betroffene Dermatom aufgelegt.

Es handelt sich hierbei um eine ca. 9,0 cm² große Temperaturelektrode, welche eine Basistemperatur von 32 °C aufweist.

Es wurden zuerst die Kälteschwelle (CDT) und die Wärmeschwelle (WDT) ermittelt: Dabei kühlte/erwärmte sich die Temperaturelektrode um 1 °C/Sekunde. Sobald der Patient die

Abkühlung bzw. Erwärmung wahrnahm, zeigte er dies mit einem Mausklick an, die Temperaturelektrode wärmte/kühlte zur Ausgangstemperatur zurück und begann erneut, bis drei Testzyklen durchlaufen waren.

Darauf folgte die Testung der Wahrnehmung von Temperaturveränderungen und des paradoxen Hitzeempfindens: Die Temperaturelektrode wurde entweder kälter oder wärmer. Der Patient hatte die Aufgabe, anzuzeigen, wenn er eine Temperaturveränderung wahrnahm und diese daraufhin als „kälter“ oder „wärmer“ zu definieren.

Als letztes wurden die Schmerzschwellen für Kälte (CPT) und für Wärme (HPT) bestimmt: Genau wie bei der Temperaturschwellenmessung (CDT und WDT) wird dazu die Temperaturelektrode kühler oder wärmer. Diesmal sollte der Patient anzeigen, wenn zusätzlich zu der Empfindung Kälte/Wärme Dysästhesien wie Brennen, Stechen, Bohren oder Ziehen auftraten.

Jedes Messverfahren wurde drei Mal durchgeführt, um einen Mittelwert zu finden.

2.3.2 Mechanische Detektionsschwelle

Für die Testung der mechanischen Detektionsschwelle (MDT) wurde ein Standardset aus Frey-Haaren (Optihair₂-Set, Marstock Nervtest, Stärke 0,25 mN bis 512 mN, Kontaktfläche jeweils Durchmesser von 0,5 mm) verwendet.

Beginnend mit 16 mN wurden die Frey-Haare in aufsteigender Stärke für ein bis zwei Sekunden im Testareal aufgesetzt und die Stärke dokumentiert, bei der der Patient erstmals eine Berührung empfand. Dann wurden die Frey-Haare in absteigender Reihenfolge verwendet, bis der Patient sie nicht mehr wahrnahm, auch dieser Wert wurde dokumentiert. Dieses Messverfahren wurde fünf Mal durchgeführt.

2.3.3 Mechanische Schmerzschwelle

Die Messung der mechanischen Schmerzschwelle (MPT) wurde mit einem Pinprickset durchgeführt. Das Set besteht aus sieben Stiften mit einem Durchmesser von je 0,2 mm. Durch die unterschiedlichen Gewichte der Stifte werden unterschiedliche Kräfte auf der Haut erzeugt: 8 mN, 16 mN, 32 mN, 64 mN, 128 mN, 256 mN, 512 mN.

Der Patient wurde angewiesen, zwischen „stumpfem“ und „spitzem“ Reiz zu unterscheiden. Beginnend mit 8mN wurden die Pinpricks mit aufsteigender Intensität senkrecht auf das

Testareal gesetzt, bis ein Reiz als „spitz“ empfunden wurde, die auslösende Kraft wurde dokumentiert und die Testung in absteigender Reihenfolge fortgeführt, bis ein Reiz als „stumpf“ empfunden wurde. Die dazugehörige Kraft wurde ebenfalls dokumentiert und dieses Verfahren insgesamt fünf Mal durchgeführt.

2.3.4 Stimulus-Antwort-Funktion und dynamische mechanische Allodynie

Dasselbe Pinprick-Set wurde auch zur Bestimmung der mechanischen Schmerzintensität (MPS) verwendet. Zusätzlich wurden ein Pinsel (Intensität 200-400 mN), ein Q-Tip (Intensität 100 mN) und ein Wattebausch (3 mN) verwendet, wozu sie jeweils ca. 2 cm weit über das Testareal gestrichen wurden.

Das Messprotokoll sah 50 Stimulationen in einer festgelegten, pseudo-randomisierten Reihenfolge (siehe QST-Bogen im Anhang) vor.

Der Patient beurteilte jeden Reiz nach seiner Schmerzhaftigkeit mittels einer numerischen Analogskala (NAS) mit den Grenzen 0 (kein Schmerz) und 100 (stärkster vorstellbarer Schmerz).

2.3.5 Vibrations-Detektionsschwelle

Für die Bestimmung der Vibrations-Detektionsschwelle (VDT) wurde eine Stimmgabel (64 Hz, 8/8 Skala) verwendet. Sie wurde vibrierend auf einen Knochenvorsprung der betroffenen Region (zum Beispiel: im Gesicht der Processus zygomaticus, bei betroffener oberer Extremität der Processus styloideus ulnae, bei betroffener unterer Extremität der Malleolus medialis) gesetzt, wobei der Patient angab, sobald er keine Vibration mehr wahrnahm. Dieser Wert wurde notiert und die Untersuchung drei Mal durchgeführt.

2.3.6 Wind-up Ratio

Bei der Bestimmung der Wind-up Ratio (WUR) wurde ein definierter Pinprick (im Gesicht mit 128 mN, am Körper mit 256 mN) als Einzelstimulus aufgesetzt. Der Patient sollte die Schmerzhaftigkeit auf einer numerischen Analogskala (NAS, Grenzen 0 bis 100, siehe oben) bewerten. Dann wurden mit einem Rhythmus von 1/Sekunde zehn Reize hintereinander gesetzt, welche der Patient in ihrer Gesamtheit auf der NAS beurteilen sollte. Diese Untersuchung wurde drei Mal durchgeführt.

2.3.7 Druckschmerzschwelle

Die Ermittlung der Druckschmerzschwelle wurde mithilfe eines Druckmessers (FDN200, Auflagefläche 1 cm²) durchgeführt. Hierzu wurde der Druckmesser auf einen Muskel des betroffenen Hautareals (zum Beispiel: im Gesicht dem M. masseter, bei betroffener oberer Extremität dem Thenarmuskel, bei betroffener unterer Extremität dem M. abductor hallucis) aufgesetzt und mit einer Geschwindigkeit von 0,5 kg/Sekunde aufgedrückt, bis der Patient einen Schmerz angab. Diese Untersuchung wurde drei Mal durchgeführt.

2.4 Durchflusszytometrie

Die folgende Beschreibung des Verfahrens der Durchflusszytometrie basiert auf (Biosciences) sowie (Rothe 2007).

2.4.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie oder auch FACS (fluorescence activated cell sorting) Analyse ist eine Methode, um Zellen in flüssigen Medien (z.B. Blut oder Liquor) zu sortieren und zu charakterisieren. Dabei durchläuft die zu untersuchende Zellsuspension einen Laser (siehe **Abbildung 1**). Durch unterschiedliche Brechungsindices bezogen auf das Laserlicht verschiedener Zellen und ihrer Bestandteile gelingt die genaue Identifizierung einzelner Zellpopulationen.

Wenn Partikel den Laser passieren, streuen sie Licht. Das entstehende Streulicht (light scatter), welches von Detektoren erfasst wird, ist für verschiedene Zelltypen charakteristisch. Es werden Vorwärtsstreulicht (Forward scatter, FSC) und Seitwärtsstreulicht (Side scatter, SSC) unterschieden. Durch Messung des Streulichts können Aussagen über die jeweils untersuchte Zelle bezüglich u.a. ihrer Größe, Granularität, intrazellulärer Kompartimente enthaltener Zellorganellen getroffen werden. Der FSC definiert die Lichtmenge, die in Vorwärtsrichtung gestreut wird. Er ermöglicht die Bestimmung der Zellgröße. Der SSC bezeichnet die Lichtmenge, die zur Seite gestreut wird. Er gibt Auskunft über die Granularität, die Größe des Zellkerns sowie die Anzahl der Vesikel in der gemessenen Zelle.

Die Durchflusszytometrie ist außerdem in der Lage, zellassozierte Fluoreszenz zu quantifizieren. Hierfür können verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe verwendet werden: Mithilfe fluoreszenzmarkierter monoklonaler Antikörper ist es möglich, einzelne

Oberflächenantigene auf Zellen oder intrazelluläre Antigene zu markieren und die jeweilige Intensität der Fluoreszenz zu messen: Entsprechend ihrer Markierungen emittieren die Zellen spezifische Signale, welche über Spektralfilter in die Emissionsspektren der verschiedenen Farbstoffe aufgespalten werden. Lichtdetektoren erfassen und quantifizieren die entstandenen Signale.

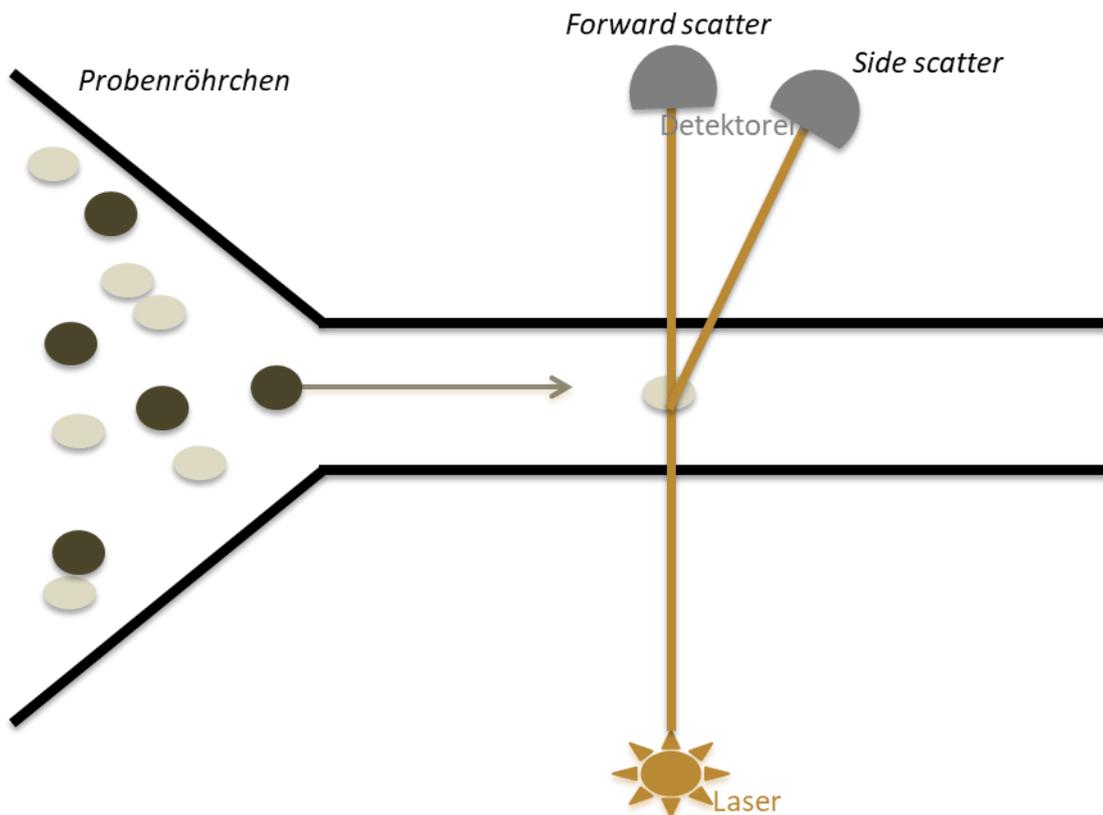


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie

Neben den Streulicht-parametern (FSC und SSC, siehe oben) wird auch die Intensität der Fluoreszenz der angeregten Farbstoffe auf den Antikörpern detektiert.

Die Detektoren wandeln erfasstes Licht in proportionale elektronische Signale um, welche dann weiterverarbeitet und an den Computer gesendet werden. Die Daten für jede Zelle bzw. jedes Teilchen werden im Computer gespeichert und auf verschiedene Weise (z.B. als Streudiagramme, siehe weiter unten) für die weitere Analyse aufbereitet.

Die ermittelten Parameter können einzeln oder in Kombination beurteilt werden. Verschiedene Darstellungen ermöglichen hierbei die Identifikation einzelner Zellpopulationen: Mithilfe von Streudiagrammen (sog. „Dot-Plots“) können zwei Größen gleichzeitig betrachtet und Informationen über ihre Beziehung zueinander erhoben werden (siehe **Abbildung 2**).

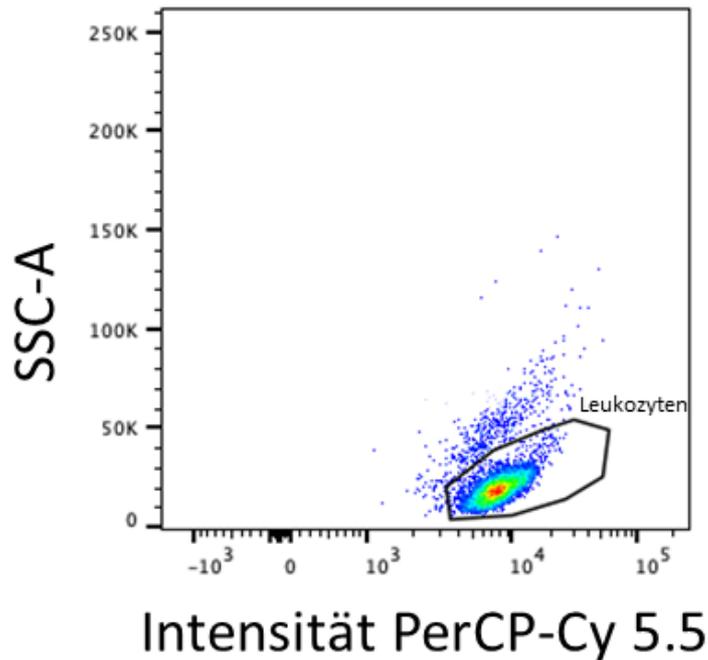


Abbildung 2: Streudiagramm CD45 exprimierender Leukozyten

Jeder einzelne Punkt im Streudiagramm (Dotplot) stellt ein Ereignis (eine detektierte Zelle) dar. Auf der x- bzw. y-Achse werden die Intensitäten jeweils eines Parameters (z.B. Zellgröße oder Fluoreszenz) dargestellt. Anhand der aufgezeigten Eigenschaften können einzelne Zellpopulationen identifiziert werden.

Hier: x-Achse = Intensität der CD45-Expression; y-Achse = Side scatter (Granularität). Es können CD45 exprimierende Leukozyten identifiziert werden. Die Population der Leukozyten ist eingekreist.

SSC = side scatter; PerCP-Cy 5.5 = CD45-Antikörper

Soll ein bestimmter Bereich im Streudiagramm näher untersucht werden, erfolgt ein weiterer Schritt, das sog. Gating. Markierte Regionen (sog. „Gates“; in **Abbildung 2** z.B. die markierte Region der Leukozyten) können hierbei gesondert betrachtet und so bezüglich weiterer Parameter beurteilt werden (siehe **Abbildung 3**). Die betrachteten Zellen können z.B. auf das Vorliegen verschiedener Oberflächenantigene untersucht werden, wodurch eine immer genauere Sortierung möglich wird. Wiederholte Gating-Schritte ermöglichen die Abgrenzung von Zellpopulationen, die anhand aller erhobenen Parameter beurteilt wurden.

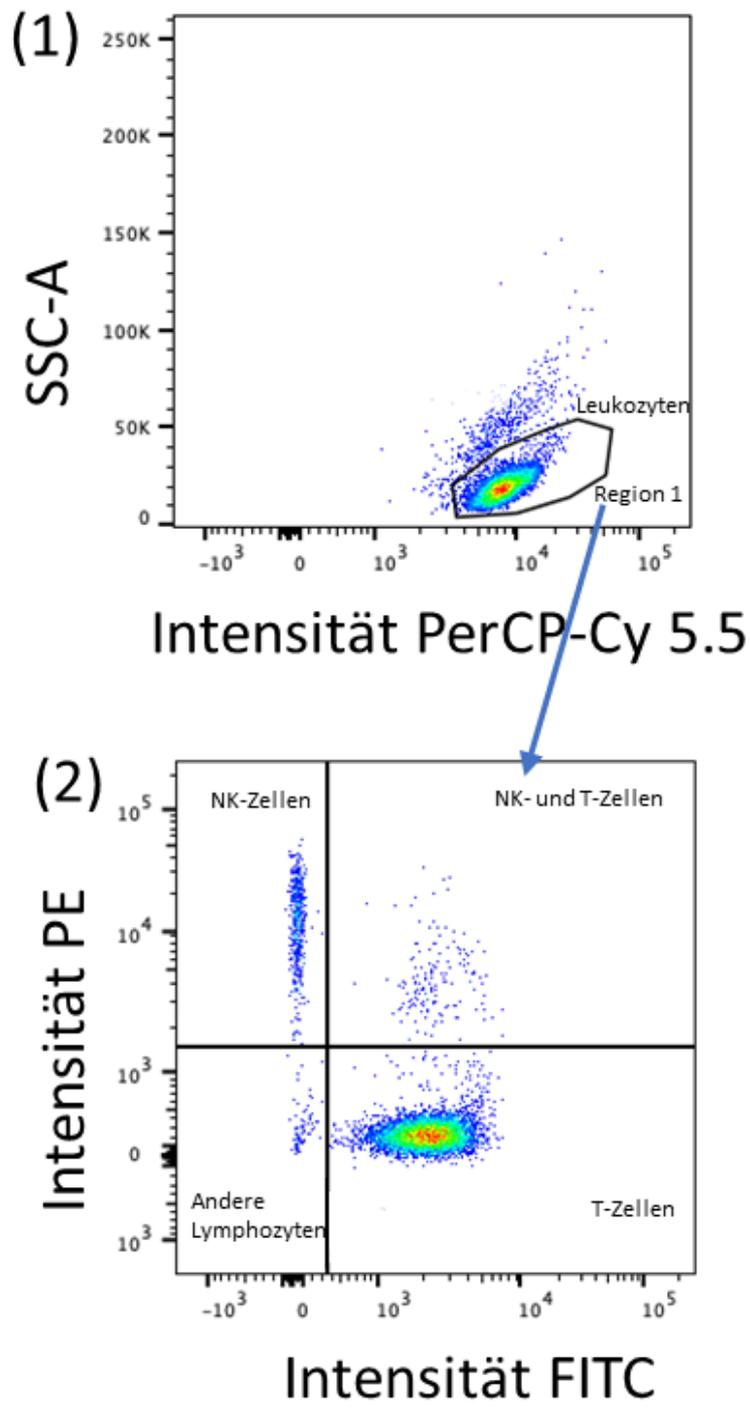


Abbildung 3: Prinzip des Gatings am Beispiel der Leukozyten-Subgruppierung

Wenn mehr als zwei Parameter wichtig sind, um die Zellen zu identifizieren, werden die Zellen in einzelne Regionen, sog. „Gates“ eingeteilt. (1) Die Zellen werden anhand ihrer CD45-Expression und ihrer Granularität (SSC) dargestellt. Mit „Region 1“ werden CD45 exprimierende Leukozyten markiert. (2) Es werden lediglich Zellen der „Region 1“ betrachtet und anhand ihrer Expression von CD3 und CD56 eingeteilt. CD3 exprimierende T-Zellen können im unteren rechten Quadranten, CD56 exprimierende natürliche Killerzellen (NK-Zellen) können im oberen linken Quadranten identifiziert werden.

SSC = Side scatter; PerCP-Cy 5.5 = CD45-Antikörper; PE = CD56-Antikörper; FITC = CD3-Antikörper; NK-Zellen = natürliche Killerzellen

Zu Beginn einer Messreihe sollte zur Qualitätskontrolle ein sogenannter Doublettenausschluss sowie die Unterscheidung lebender von toten Zellen mittels Färbung erfolgen.

Als *Doubletten* werden Zellen bezeichnet, die aggregieren. Diese müssen aussortiert werden, bzw. ihre Abwesenheit muss nachgewiesen werden, um die Korrektheit der Ergebnisse zu gewährleisten. Zellen können andernfalls z.B. aufgrund einer falschen Größe und Granularität als eine andere Zellpopulation fehlinterpretiert werden. Zellen einer Population zeigen ähnliche Größe und Granularität. Daher werden einzelne Zellen diagonal bzw. waagrecht (je nach Darstellung) geclustert und von den Doubletten separiert. Doubletten können so direkt identifiziert werden (siehe **Abbildung 4**).

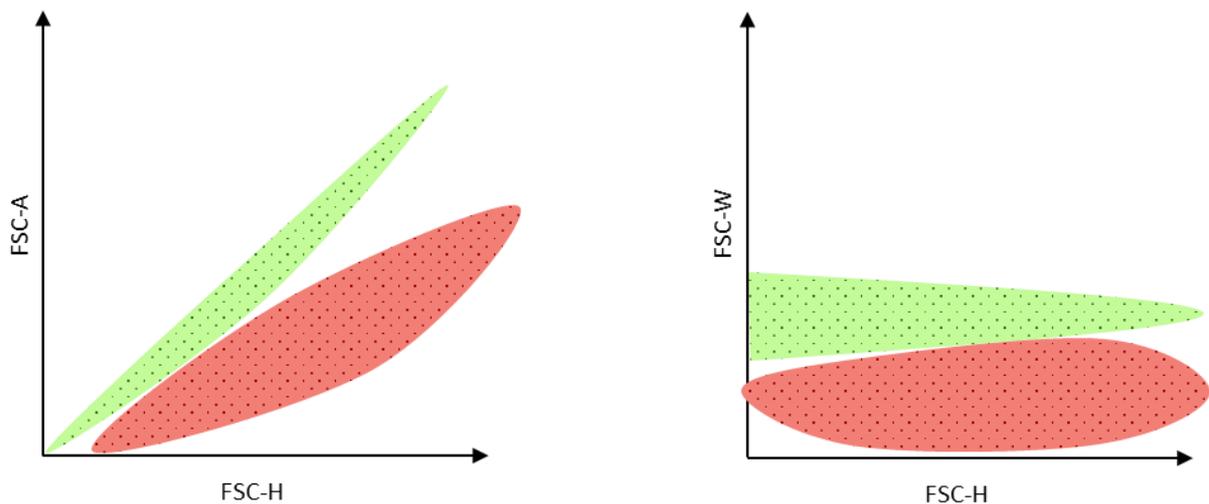


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Doublettenausschluss

Es sind zwei verschiedene Möglichkeiten der Darstellung präsentiert. Einzelzellen sind innerhalb der grünen Fläche zu finden. Doubletten finden sich im rot markierten Areal.

FSC = Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter); H = Höhe (Height): beschreibt die Intensität des Signals; W = Breite (Width): beschreibt die Zeit, die die Zelle benötigt, um den Laser zu passieren. Ist proportional zur Zellgröße und der Dauer des Signals; A = Fläche (Area): errechnet sich aus $H \times W$.

Die Unterscheidung *lebender von toten* Zellen (im Folgenden „Live/Dead cell staining“ genannt) (siehe **Abbildung 5**) ermöglicht eine klare Detektion und gegebenenfalls Exklusion toter Zellen. Die Zellintegrität apoptotischer und avitaler Zellen verändert sich. Die bei der Analyse verwendeten Antikörper können unspezifisch an diese toten Zellen binden und falsch-positive Werte bedingen und somit das Gesamtergebnis verfälschen. Der Farbstoff kann vitale Zellmembranen nicht überwinden und färbt sie daher nur wenig (an der Zelloberfläche) an. Bei avitalen Zellen tritt eine verstärkte Anfärbung mit dem Farbstoff und somit eine deutlich

erhöhte Fluoreszenz auf. Der Unterschied der Fluoreszenzintensitäten ermöglicht eine klare Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen.

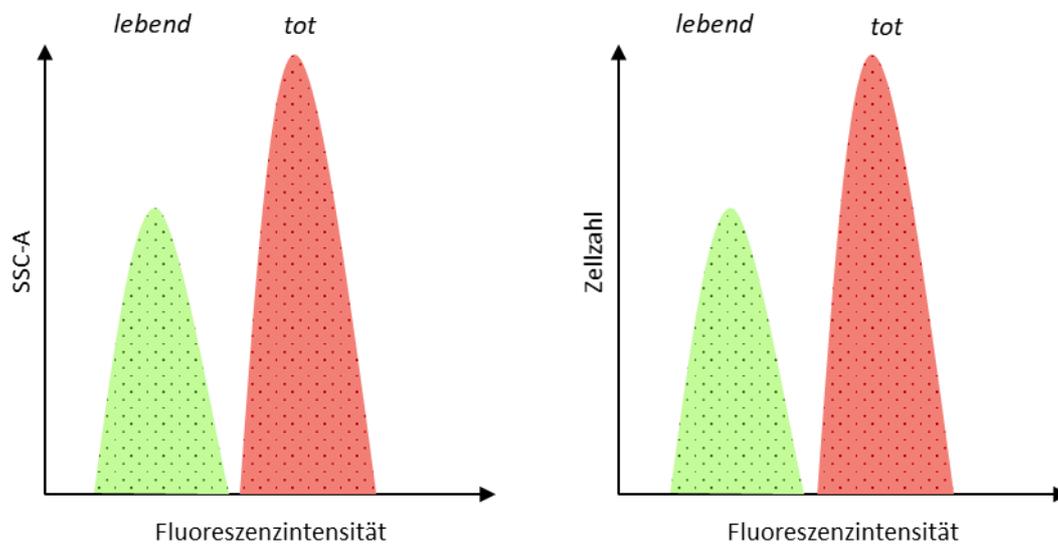


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Live/Dead cell staining

Es sind zwei verschiedene Möglichkeiten der Darstellung präsentiert. Die Intensität der Fluoreszenz lebender Zellen ist deutlich geringer (grüne Fläche) als die der avitalen Zellen (rotes Areal).

SSC = Seitwärtsstreulicht (Side scatter); H = Höhe (Height): beschreibt die Intensität des Signals; W = Breite (Width): beschreibt die Zeit, die die Zelle benötigt, um den Laser zu passieren. Ist proportional zur Zellgröße und der Dauer des Signals; A = Fläche (Area): errechnet sich aus $H \times W$.

Mittels Durchflusszytometrie ist außerdem die Sortierung einzelner Zelltypen möglich. Diese Technik wurde in der vorliegenden Arbeit nicht angewendet und wird hier daher nicht genauer erläutert.

2.4.2 Durchführung

Der Anwendungsbereich der Durchflusszytometrie ist vielseitig. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sie genutzt, um Subgruppen von Leukozyten im Liquor genauer zu untersuchen.

Die Färbung der Zellen erfolgt nach Angaben des Herstellers mit den folgenden monoklonalen, murinen Antikörpern (mit Fluorochromen) von BD Biosciences (siehe **Tabelle 3**).

Zellpopulation	Antigen	Antikörper
T-Zellen	CD3	Anti-CD3: FITC
T-Helferzellen	CD4	Anti-CD4: PE-Cy7
Zytotoxische T-Zellen	CD8	Anti-CD8: APC-Cy7
B-Zellen	CD19	Anti-CD19: APC
Leukozyten	CD45	Anti-CD45: PerCP-Cy 5.5
Natürliche Killerzellen	CD56	Anti-CD56: PE

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten monoklonalen, murinen Antikörper

Da Liquor hauptsächlich T-, B- und natürliche Killerzellen enthält (Svenningsson, Hansson et al. 1993, Svenningsson, Andersen et al. 1995), konzentrierte sich die FACS-Analyse in dieser Arbeit auf diese Zellen. Alle Analysen wurden mit einem BD FACSCanto™ (BD Biosciences) durchgeführt und die Daten wurden mit FlowJo (Version 10.6.2) analysiert. In die Analyse wurden ausschließlich Proben mit mindestens 500 Leukozyten (definiert durch CD45-Expression) einbezogen. Die Qualitätskontrolle für Doublettenausschluss (**Abbildung 6**) und Live/Dead cell staining (**Abbildung 7**) wurde exemplarisch durchgeführt und zeigte weder eine Doppelzellpopulation (Doubletten) noch eine relevante Menge apoptotischer Zellen (keine Liquorprobe überschritt 100 Zellen/ μ l).

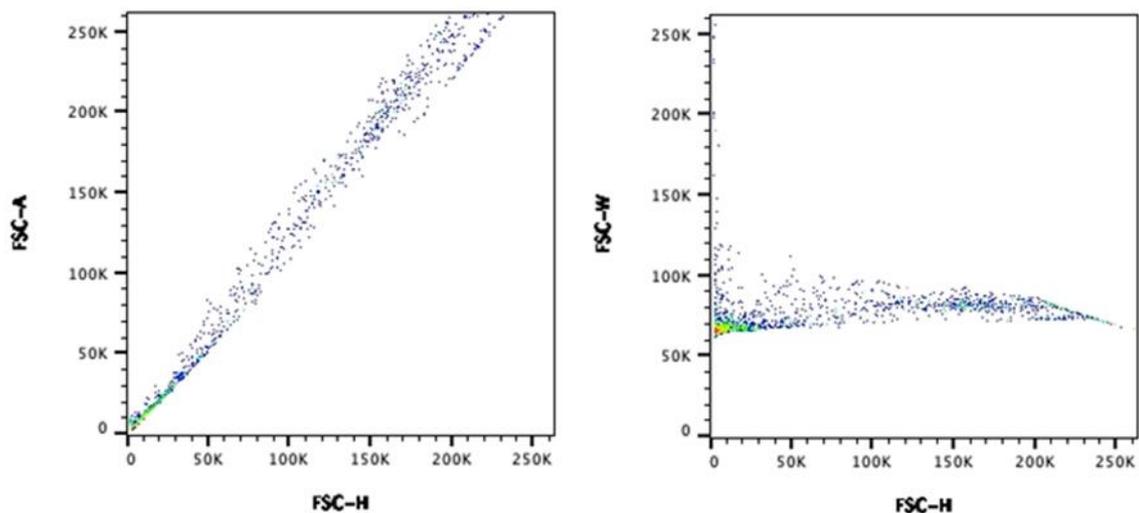


Abbildung 6: Qualitätskontrolle Doublettenausschluss

FSC = Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter); H = Höhe (Height): beschreibt die Intensität des Signals; W = Breite (Width): beschreibt die Zeit, die die Zelle benötigt, um den Laser zu passieren. Ist proportional zur Zellgröße und der Dauer des Signals; A = Fläche (Area): errechnet sich aus $H \times W$. Dieses Beispiel der durchgeführten Qualitätskontrollen zum Doublettenausschluss in der Liquorfärbung zeigt keine Doubletten.

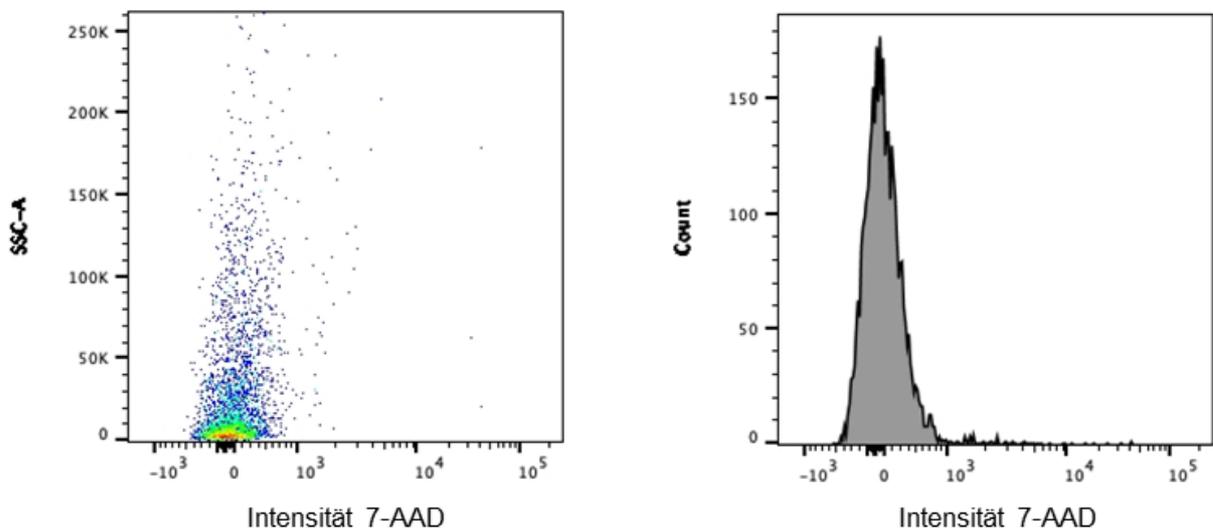


Abbildung 7: Qualitätskontrolle apoptotische Zellen

Das Beispiel der Qualitätskontrolle für die Färbung von lebenden/toten Zellen mit 7-AAD zeigt nahezu keine apoptotischen Zellen in der Liquorfärbung.

Hervorzuheben ist, dass die Liquorproben innerhalb von 30 Minuten nach der Lumbalpunktion bearbeitet wurden. Für die Proben wurden die Häufigkeiten von CD3+CD4+-Zellen (CD4+- T-Helfer-Zellen), CD3+CD8+-Zellen (zytotoxische T-Zellen), CD19+-Zellen (B-Zellen) und CD56+-Zellen (natürliche Killerzellen) bestimmt (**Abbildung 8**).

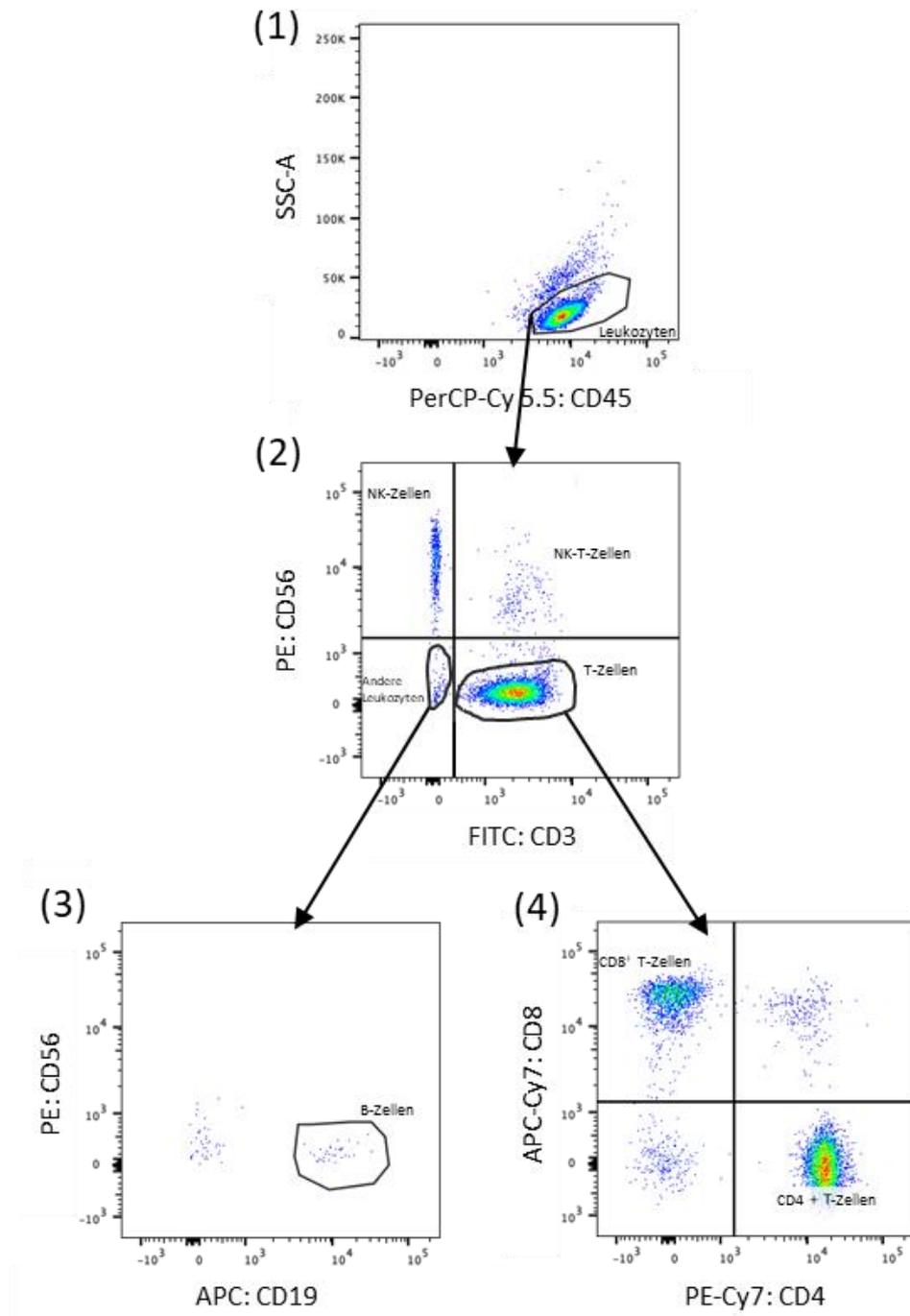


Abbildung 8: Gatingstrategie zur Identifizierung einzelner Zellpopulationen

(1) Die Zellen werden anhand ihrer CD45-Expression als Leukozyten identifiziert. (2) Die Region (das sog. Gate) „Leukozyten“ wird im nächsten Schritt genauer beurteilt und anhand der CD3- bzw. CD56-Expression der betrachteten Zellen weiter unterteilt. Es können CD56 exprimierende natürliche Killerzellen im oberen linken Quadranten identifiziert werden. Die CD56 negativen Zellen werden in (3) und (4) - aufgeteilt nach ihrer CD3-Expression - weiter subgruppiert. (3) Die CD3 und CD56 negativen Leukozyten im unteren linken Quadranten werden genauer betrachtet; anhand ihrer CD19-Expression können die Zellen als B-Zellen identifiziert werden. (4) Die CD3 exprimierenden Leukozyten werden anhand ihrer CD4- und CD8-Expression unterteilt. So können CD3 und CD4 exprimierende T-Helferzellen bzw. CD3 und CD8 exprimierende zytotoxische T-Zellen identifiziert werden.

APC = CD19-Antikörper; APC-Cy7 = CD8-Antikörper; FITC = CD3-Antikörper; PE = CD56-Antikörper; PE-Cy7 = CD4-Antikörper; PerCP-Cy 5.5 = CD45-Antikörper; SSC = Side scatter.

5-10 ml Liquor werden ca. 5 Minuten in einer Zentrifuge (1600 Umdrehungen/Minute, Zentrifugalkraft 544 g) in ihre Bestandteile getrennt. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen, das Zentrifugat wird in zwei Sarstedt-FACS-Röhrchen (Katalog-Nr. 55.1579) pipettiert: In ein Sarstedt-Röhrchen werden 50 µl Liquor sowie 20 µl Antikörper Multitest 6-Color TBNK (CE/IVD, Katalog-Nr. 337166) pipettiert. In das zweite Sarstedt-Röhrchen werden zu den 50 µl Liquor 20 µl Antikörper Multitest CD3 / CD8 / CD38 / HLA-DR (CE/IVD, Katalog-Nr. 333184) pipettiert. Beide Röhrchen werden in ein Vortex Schüttelgerät gegeben und der Inhalt wird jeweils durchmischt. Nach 20 Minuten Inkubationszeit in Dunkelheit bei Zimmertemperatur werden jedem Röhrchen 500 µl gebrauchsfertige Lyselösung (FACS Lysing Solution, Katalog-Nr. 349202, 1:10 mit aqua bidest verdünnt) zugegeben. Nach erneuter Durchmischung im Vortex Schüttelgerät erfolgt eine erneute 20-minütige Inkubation in Dunkelheit bei Zimmertemperatur.

Die aufbereiteten Gemische werden in einem Durchflusszytometer (CYTOMICS FC 500 Beckman Coulter) analysiert, indem sie in einer Pufferlösung (PBS) an einem Laser (488 nm) vorbeifließen.

2.5 Statistische Auswertung

Die Analyse der erhobenen Daten wurde mit IBM SPSS Statistics für Mac (Version 26.0) durchgeführt.

Die QST-Ergebnisse wurden gemäß den aktuellen Richtlinien analysiert und mit einer Referenzdatenbank von gesunden Kontrollen verglichen (Maier, Baron et al. 2010, Vollert, Attal et al. 2016).

Einzelne QST-Parameter der beiden Gruppen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests verglichen. Die intra-individuellen Vergleiche aus der ersten und zweiten Untersuchung wurden mit dem Wilcoxon-Test ausgewertet.

Mit dem Ziel, Zusammenhänge zwischen der Immunzellverteilung im Liquor und dem sensorischen Phänotyp zu finden, führten wir eine Spearman-Korrelationsanalyse durch. Für multiples Testen wurde nach Bonferroni korrigiert, wobei FACS-Daten, PDQ-Scores sowie QST-Marker für Schmerzchronifizierung (d.h. HPT, als Marker für periphere Sensibilisierung (LaMotte, Thalhammer et al. 1982); MPS, MPT und WUR, als Marker für zentrale Sensibilisierung (Baron, Hans et al. 2013) einbezogen wurden; p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

3 Ergebnisse

Die epidemiologischen Daten der Patienten mit Herpes Zoster und Polyneuropathie sind in **Tabelle 4** dargestellt.

		Herpes Zoster Patienten	PNP Patienten
Anzahl [n] (%)		10 (24)	31 (76)
Alter		63,2 Jahre (\pm 14,34)	65,19 Jahre (\pm 14,5)
Geschlecht	Weiblich [n] (%)	4 (40)	12 (39)
	Männlich [n] (%)	6 (60)	19 (61)
Erkrankungsdauer [\pm SD]		1,7 Monate (\pm 1,14)	48,98 Monate (\pm 79,62)
Betroffenes Areal	Gesicht [n] (%)	2 (20)	0 (0)
	Arm [n] (%)	2 (20)	0 (0)
	Hand [n] (%)	1 (10)	2* (6)
	Rumpf [n] (%)	4 (40)	0 (0)
	Fuß [n] (%)	0 (0)	29 (94)
	Kein Areal betroffen [n] (%)	1 (10)	0 (0)

Tabelle 4: Epidemiologische Daten von Patienten mit Herpes Zoster und Polyneuropathie

** Beide Patienten leiden an einer chronisch-entzündlichen demyelinisierenden Polyneuropathie (CIPD), in beiden Fällen sind die Hände deutlich stärker betroffen als die Füße.*

3.1 Schmerzintensität und Fragebogen-Scores bei Baseline und Follow-up

Die Schmerzwerte und Fragebogen-Scores sind in **Tabelle 5** dargestellt.

	Herpes Zoster Patienten		PNP Patienten	
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up
Schmerzintensität innerhalb der letzten 72 h	4,44 ± 3,36 [0-9], n= 9	2,33 ± 2,07 [0-5], n= 6	3,16 ± 3,53 [0-10], n= 31	2,9 ± 2,7 [0-8], n= 30
Schmerzminimum	3,8 ± 3,9 [0-9], n= 5	2,0 ± 2,45 [0-5], n= 6	1,0 ± 1,79 [0-7], n= 28	1,31 ± 2,04 [0-7], n= 26
Schmerzmaximum	6,4 ± 4,34 [0-10], n= 5	3,67 ± 3,39 [0-10], n= 6	4,21 ± 3,99 [0-10], n= 28	4,67 ± 3,79 [0-10], n= 30
PDQ Gesamtscore	14,89 ± 6,75 [4-22], n= 9	9,2 ± 4,09 [2-12], n= 5	10,52 ± 8,03 [0-26], n= 31	10,57 ± 7,5 [0-25], n= 28
PDQ-Auswertung: neuropathische Schmerzkomponente unwahrscheinlich / unsicher / wahrscheinlich [n](%)	3 (33) / 2 (22) / 4 (44)	5 (100) / 0 (0) / 0 (0)	19 (61) / 6 (19.5) / 6 (19.5)	17 (61) / 6 (21) / 5 (18)

Tabelle 5: Schmerz- und PDQ-Scores von Patienten mit Herpes Zoster und Polyneuropathie

Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung [Minimum-Maximum] dargestellt, Anzahl der Patienten.

Die beiden Patientengruppen unterschieden sich nicht signifikant in Bezug auf Schmerzparameter oder PDQ-Scores ($p > 0,1$ für alle Vergleiche). Es gab keine Unterschiede zwischen den Bewertungen der Schmerzen sowie den PDQ-Scores während der Baseline- und Follow-up-Untersuchung ($p > 0,5$ für alle Vergleiche).

3.2 Somatosensorische Profile

3.2.1 Vergleich der QST-Profile bei Baseline und Follow-up

Im **Abbildung 9** und **10** sind die QST-Ergebnisse der Patienten mit Polyneuropathie bzw. Herpes Zoster zum ersten Untersuchungszeitpunkt (Baseline) sowie bei der Nachuntersuchung (Follow-up) dargestellt.

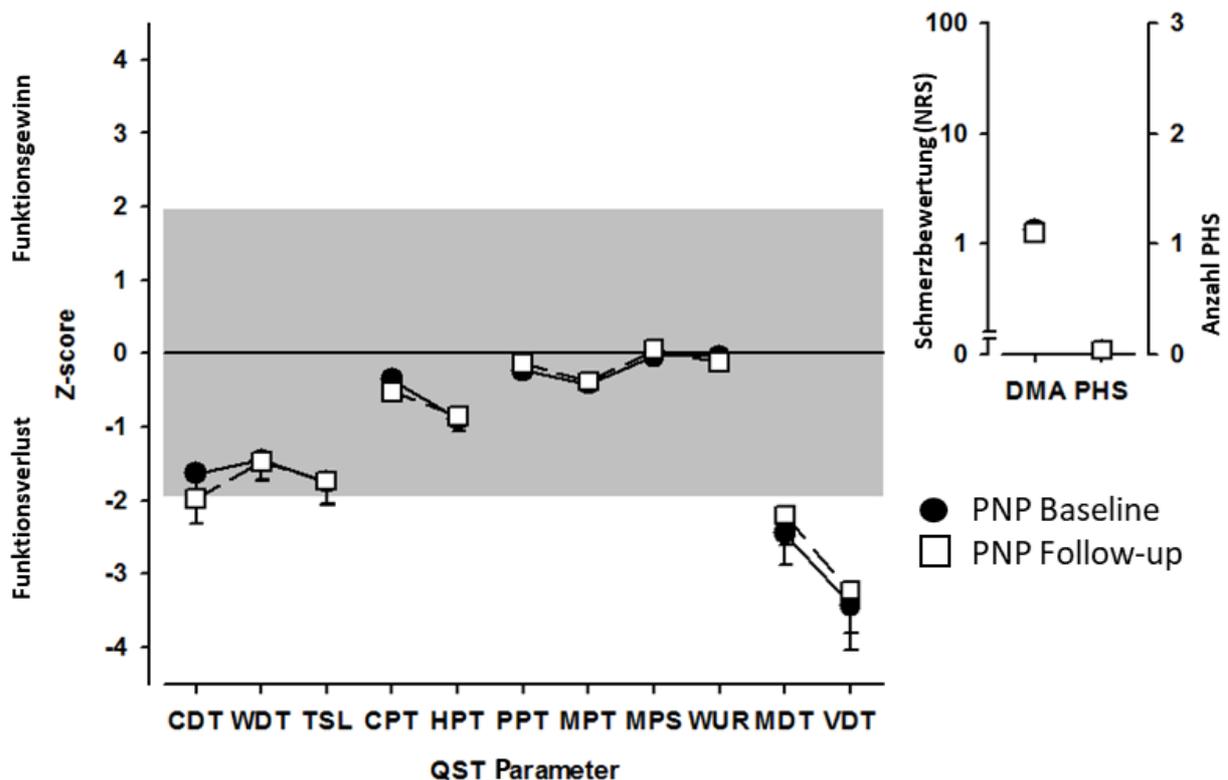


Abbildung 9: Vergleich der QST-Befunde der Patienten mit Polyneuropathie bei Baseline und Follow-up

Es sind die Z-Werte der 13 QST-Parameter angegeben. Der graue Bereich zeigt den Bereich der normativen Werte gemäß der Datenbank des deutschen DFNS. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

Z-Wert = jeder einzelne Parameter ist auf seinen areal-, alters- und geschlechtsspezifischen Referenzbereich bezogen und wird als Anzahl der Standardabweichungen über oder unter dem normalen Mittelwert dargestellt. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler.

CDT = Kälteerkennungsschwelle, WDT = Wärmeerkennungsschwelle, TSL = Temperatursensibilitäts-grenze, CPT = Kälteschmerzschwelle, HPT = Wärmeschmerzschwelle, PPT = Druckschmerzschwelle, MPT = Mechanische Schmerzschwelle, MPS = Mechanische Schmerzempfindlichkeit, WUR = temporäre Summation, MDT = Mechanische Erkennungsschwelle, VDT = Vibrationserkennungsschwelle, DMA = Dynamisch-mechanische Allodynie, PHS = Paradoxe Wärmeempfindung.

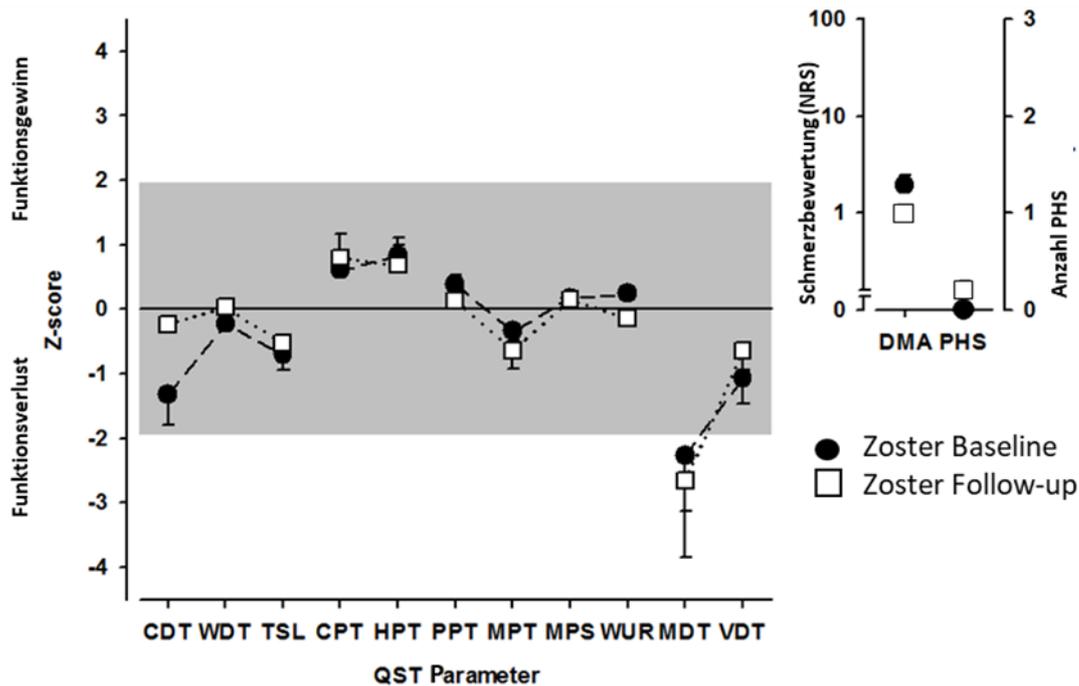


Abbildung 10: Vergleich der QST-Befunde der Patienten mit Herpes Zoster bei Baseline und Follow-up

Es sind die Z-Werte der 13 QST-Parameter angegeben. Der graue Bereich zeigt den Bereich der normativen Werte gemäß der Datenbank des deutschen DFNS. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

Z-Wert = jeder einzelne Parameter ist auf seinen areal-, alters- und geschlechtsspezifischen Referenzbereich bezogen und wird als Anzahl der Standardabweichungen über oder unter dem normalen Mittelwert dargestellt. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler.

CDT = Kälteerkennungsschwelle, WDT = Wärmeerkennungsschwelle, TSL = Temperatursensibilitäts-grenze, CPT = Kälteschmerzschwelle, HPT = Wärmeschmerzschwelle, PPT = Druckschmerzschwelle, MPT = Mechanische Schmerzschwelle, MPS = Mechanische Schmerzempfindlichkeit, WUR = temporäre Summation, MDT = Mechanische Erkennungsschwelle, VDT = Vibrationserkennungsschwelle, DMA = Dynamisch-mechanische Allodynie, PHS = Paradoxe Wärmeempfindung.

Beim Vergleich der Follow-up-Daten mit den Ausgangswerten wurden keine signifikanten Veränderungen der QST-Befunde festgestellt, weder bei den Patienten mit Herpes Zoster ($p > 0,05$ für alle Vergleiche) noch bei PNP-Patienten ($p > 0,1$ für alle Vergleiche).

3.2.2 Vergleich der QST-Profile der beiden Patientengruppen

In Bezug auf die QST-Parameter wurden Unterschiede zwischen den beiden Patientengruppen hinsichtlich der WDT (WDT Z-Werte Zoster: $-0,23 \pm 1,72$ vs. WDT Z-Werte PNP: $-1,63 \pm 1,34$; $p=0,03$), TSL (TSL Z-Werte Zoster: $-0,7 \pm 1,51$ vs. TSL Z-Werte PNP: $-1,75 \pm 1,15$; $p=0,025$), CPT (CPT Z-Werte Zoster: $0,6 \pm 1,04$ vs. CPT Z-Werte PNP: $-0,36 \pm 1,02$; $p=0,012$), HPT (HPT Z-Werte Zoster: $0,83 \pm 1,98$ vs. HPT Z-Werte PNP: $-0,89 \pm 1,17$; $p=0,004$), und VDT (VDT Z-Werte Zoster: $-1,07 \pm 2,33$ vs. VDT Z-Werte PNP: $-3,43 \pm 2,54$; $p=0,021$) gefunden (**Abbildung 11**), was auf einen ausgeprägten Funktionsverlust der temperatur-, berührungs- und vibrationsvermittelnden Fasern bei Patienten mit Polyneuropathie hinweist.

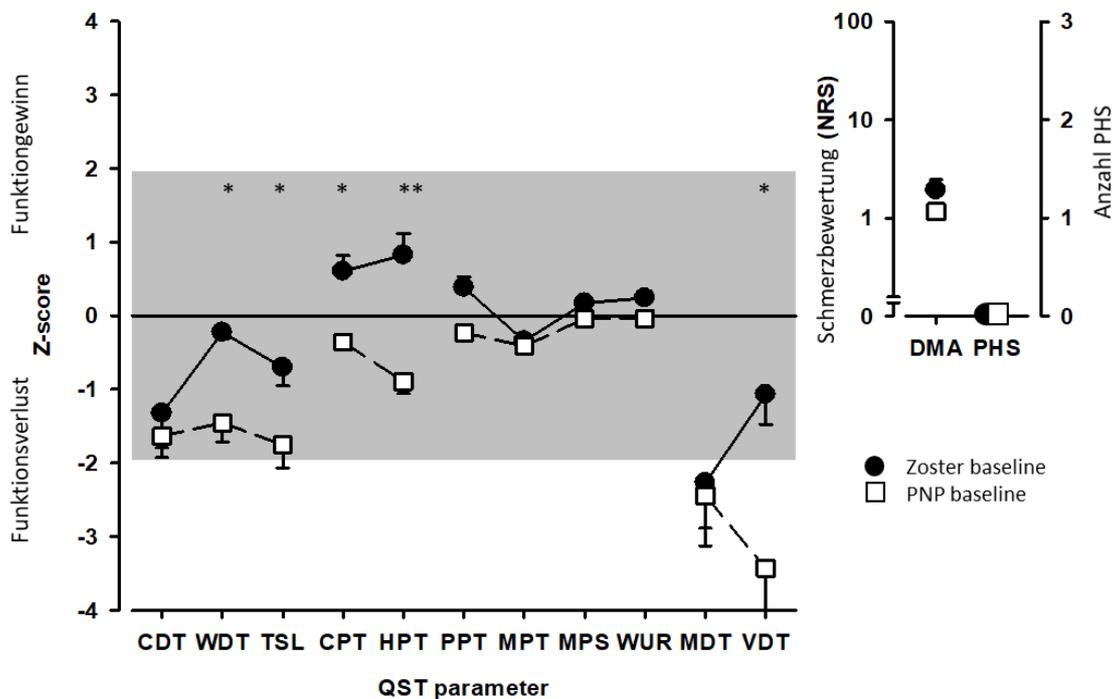


Abbildung 11: Vergleich der Baseline QST-Befunde von Patienten mit Herpes Zoster und Patienten mit Polyneuropathie

Es sind die Z-Werte der 13 QST-Parameter angegeben. Der graue Bereich zeigt den Bereich der normativen Werte gemäß der Datenbank des deutschen DFNS. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

Z-Wert = jeder einzelne Parameter ist auf seinen areal-, alters- und geschlechtsspezifischen Referenzbereich bezogen und wird als Anzahl der Standardabweichungen über oder unter dem normalen Mittelwert dargestellt. Die Fehlerindikatoren zeigen den Standardfehler.

* $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$

CDT = Kälteerkennungsschwelle, WDT = Wärmeerkennungsschwelle, TSL = Temperatursensibilitäts-grenze, CPT = Kälteschmerzschwelle, HPT = Wärmeschmerzschwelle, PPT = Druckschmerzschwelle, MPT = Mechanische Schmerzschwelle, MPS = Mechanische Schmerzempfindlichkeit, WUR = temporäre Summation, MDT = Mechanische Erkennungsschwelle, VDT = Vibrationserkennungsschwelle, DMA = Dynamisch-mechanische Allodynie, PHS = Paradoxe Wärmeempfindung.

3.3 Liquoranalyse

Die Liquorbefunde aller Patienten sind in **Tabelle 6** dargestellt.

	Einheit	Referenzbereich	Herpes Zoster	Polyneuropathie
Leukozytenzahl	/ μ l	< 5	5,46 \pm 13,69 [1-76], n= 10	3,61 \pm 8,19 [0-51], n= 31
Glukose	mmol/l	2,8 – 4,4	3,47 \pm 0,32 [3,04-3,89], n= 10	3,79 \pm 0,56 [2,96-5,72], n= 31
Glucosequotient L/S		> 0,5	0,66 \pm 0,06 [0,52-0,76], n= 9	3,85 \pm 17,84 [0,4-100], n= 31
Gesamteiweiß	mg/l	150 - 450	485 \pm 237,98 [255-963], n= 10	500,87 \pm 182,74 [229- 936], n= 31
Albumin	mg/l	35 - 53	297,1 \pm 207,76 [39,1-679], n= 10	308 \pm 118,19 [105-628], n= 31
Laktat	mmol/l	1,3 – 2,4	1,8 \pm 0,26 [1,46-2,25], n= 10	1,78 \pm 0,3 [1,34-2,71], n= 31
IgA Liquor	mg/l	0,7 – 4,0	4,6 \pm 2,68 [0,84-9,82], n= 10	5,32 \pm 7,14 [0,84-39,7], n= 31
IgG Liquor	mg/l	7 - 16	31,14 \pm 14,82 [16,7-57,9], n= 10	49,74 \pm 63,17 [10,1-294], n= 31
IgM Liquor	mg/l	0,4 – 2,3	0,87 \pm 1,73 [0-5,73], n= 10	0,94 \pm 0,45 [0,25-2,25], n= 31
Q Albumin	*10 ⁻³		7,68 \pm 4,28 [3,22-15,9], n= 10	7,76 \pm 3,37 [2,95-16,7], n= 31
Q IgG	*10 ⁻³		3,8 \pm 1,81 [1,76-7,2], N= 10	4,74 \pm 5 [1,26-23], N= 31
Q IgA	*10 ⁻³		2,27 \pm 1,27 [0,9-4,36], n= 10	2,04 \pm 1,2 [0,7-6,29], n= 31
Q IgM	*10 ⁻³		0,68 \pm 0,5 [0,16-1,41], n= 10	0,55 \pm 0,62 [0,09-2,81], n= 30

Tabelle 6: Liquorbefunde aller Patienten

Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung [Minimum - Maximum] dargestellt, Anzahl der Patienten.

Bis auf die Leukozytenzahl (gesamte Studienkohorte: 18,11/ μ l \pm 26,6/ μ l bei Zosterpatienten vs. 1,9/ μ l \pm 2,4/ μ l bei PNP-Patienten; $p= 0,000436$; FACS-Kohorte: 23,33/ μ l \pm 32,15/ μ l bei Zoster vs. 2,5/ μ l \pm 3,2/ μ l bei PNP; $p= 0,04$; **Abbildung 12**) unterschieden sich die Liquorbefunde nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen der Zoster- und PNP-Patienten ($p > 0,05$ für alle Vergleiche).

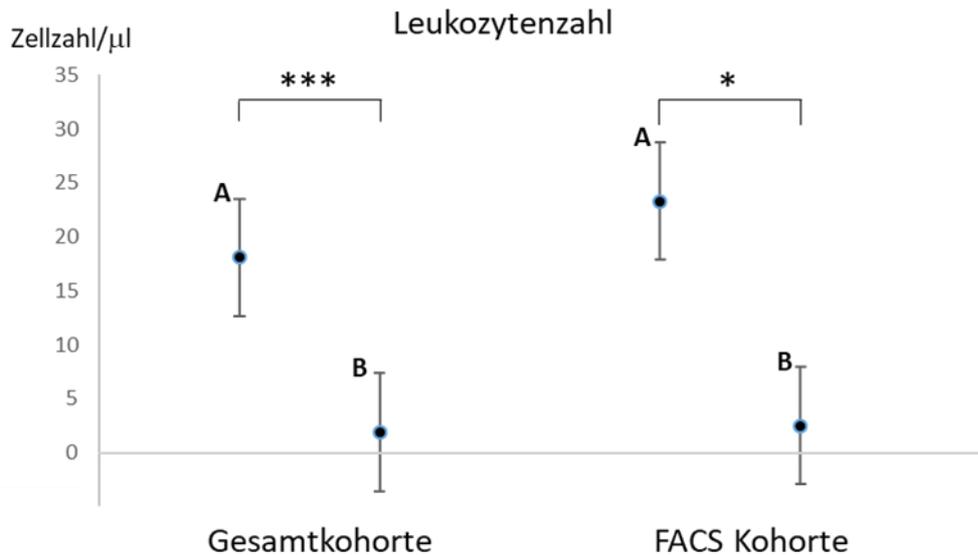


Abbildung 12: Vergleich der Leukozytenzahl von Patienten mit Herpes Zoster und Patienten mit Polyneuropathie

Dargestellt sind die Liquorergebnisse der gesamten Kohorte sowie der FACS Kohorte.

A) Patienten mit Herpes Zoster; B) Patienten mit PNP

$p_{ges.Kohorte} = 0,000436$; $p_{FACS-Kohorte} = 0,04$

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

3.4 Durchflusszytometrische Analyse

Zweiundzwanzig Liquorproben erfüllten das Kriterium von mindestens 500 Lymphozyten (definiert durch CD45+ Expression) und konnten in die nachfolgende Analyse einbezogen werden.

Die epidemiologischen Parameter sowie die Schmerzintensität innerhalb der letzten 72 Stunden, der minimale Schmerz und der maximale Schmerz der Patienten mit den FACS-Daten waren mit der gesamten Studienkohorte vergleichbar und sind in den **Tabellen 7** und **8** dargestellt.

		Herpes Zoster Patienten	PNP Patienten
Anzahl [n] (%)		6 (27)	16 (73)
Alter		58,5 Jahre (\pm 12,74)	58,63 Jahre (\pm 14,46)
Geschlecht	Weiblich [n] (%)	2 (33)	6 (38)
	Männlich [n] (%)	4 (67)	10 (62)
Erkrankungsdauer [\pm SD]		1,63 Monate (\pm 1,28)	45,02 Monate (\pm 70,06)
Betroffenes Areal	Arm & Schulter [n] (%)	2 (33)	0 (0)
	Rumpf [n] (%)	4 (67)	0 (0)
	Fuß [n] (%)	0 (0)	16 (100)

Tabelle 7: Epidemiologische Daten der Patienten mit validen FACS-Daten

	Herpes Zoster Patienten		PNP Patienten	
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up
Schmerzintensität innerhalb der letzten 72h	4,83 \pm 3,97 [0-9], n= 6	3 \pm 2,65 [0-5], n= 3	2,56 \pm 3,41 [0-10], n= 16	2,38 \pm 2,55 [0-8], n= 16
Schmerzminimum	3,80 \pm 3,90 [0-9], n= 5	2,33 \pm 2,52 [0-5], n= 3	0,86 \pm 1,56 [0-5], n= 14	0,94 \pm 1,69 [0-4], n= 16
Schmerzmaximum	6,40 \pm 4,34 [0-10], n= 5	4,67 \pm 5,03 [0-10], n= 3	4,2 \pm 2,09 [0-10], n= 15	4,25 \pm 3,82 [0-10], n= 16
PDQ Gesamtscore	17,2 \pm 6,02 [7-22], n= 9	6,5 \pm 6,36 [2-11], n= 5	8,63 \pm 7,75 [0-24], n= 16	9,79 \pm 8,66 [0-25], n= 14
PDQ-Auswertung: neuropathische Schmerzkomponente unwahrscheinlich / unsicher / wahrscheinlich [n] (%)	3 (33) / 2 (22) / 4 (44)	5 (100) / 0 (0) / 0 (0)	19 (62) / 6 (19) / 6 (19)	17 (61) / 6 (21) / 5 (18)

Tabelle 8: Schmerz- und PDQ-Scores der Patienten mit validen FACS-Daten

Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung [Minimum - Maximum] dargestellt, Anzahl der Patienten.

Die genaue Verteilung der verschiedenen Zellen im Liquor ist in **Tabelle 9** dargestellt.

	Herpes Zoster Patienten	PNP Patienten
CD 4 in %	58,56 ± 12,74 [36,72-71,82], n= 6	51,65 ± 18,92 [15,77-77,79], n= 16
CD 8 in %	14,4 ± 11,06 [1,07-31,16], n= 6	13,3 ± 9,05 [1,64-32,23], n= 16
CD 19 in %	3,54 ± 5,72 [0,32-15,14], n= 6	4,01 ± 7,2 [0,43-30,06], n= 16
CD 56 in %	7,11 ± 6,48 [2,2-19,4], n= 6	6,06 ± 4,56 [0,16-17,93], n= 16

Tabelle 9: Zellverteilung im Liquor

Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardabweichung [Minimum - Maximum] dargestellt, Anzahl der Patienten.

Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen Zoster- und PNP-Patienten hinsichtlich der Zellverteilung im Liquor ($p > 0,5$ für alle Vergleiche).

Der PDQ-Gesamtscore zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen Zoster- und PNP-Patienten (PDQ-Score Zoster: $17,2 \pm 6,02$ vs. PNP: $8,63 \pm 7,75$; $p = 0,04$); d.h. Zosterpatienten berichteten häufiger als PNP-Patienten über Symptome, die eine neuropathische Schmerzkomponente wahrscheinlich machten.

Ansonsten unterschieden sich die beiden Gruppen nicht in Bezug auf die Schmerzcharakteristika ($p > 0,1$ für alle Vergleiche). Auch gab es keine signifikanten Unterschiede der Schmerzparameter oder PDQ-Scores zwischen der ersten Messung und der Nachuntersuchung ($p > 0,5$ für alle Vergleiche).

3.5 Korrelationsanalysen

3.5.1 Immunzellhäufigkeiten und PDQ-Scores

Es gab keine signifikanten Korrelationen zwischen den FACS-Daten und den PDQ-Scores, weder für alle Patienten noch in einer der Untergruppen ($p > 0,05$ für alle Vergleiche).

3.5.2 Immunzellhäufigkeiten und somatosensorischen Parametern

Alle Patienten

Zytotoxische T-Zellen (CD8+) korrelierten positiv ($r = 0,482$, $p = 0,023$; nach Bonferroni-Korrektur $p = 0,207$; $n = 22$) mit der HPT, d.h. eine erhöhte CD8-Häufigkeit könnte mit Hitzehyperalgesie assoziiert sein, wobei dieser Zusammenhang nach der Bonferroni-Korrektur nicht mehr signifikant war.

Es gab eine negative Korrelation ($r = -0,596$, $p = 0,004$; nach Bonferroni-Korrektur $p = 0,036$; $n = 21$) zwischen mechanischer Schmerzempfindlichkeit (MPS) und der Häufigkeit der natürlichen Killerzellen: Eine erhöhte NK-Zellfrequenz korrelierte mit einer reduzierten mechanischen Schmerzempfindlichkeit. Dieses Ergebnis blieb nach Bonferroni-Korrektur robust (korrigiertes $p = 0,036$) (**Abbildung 13**).

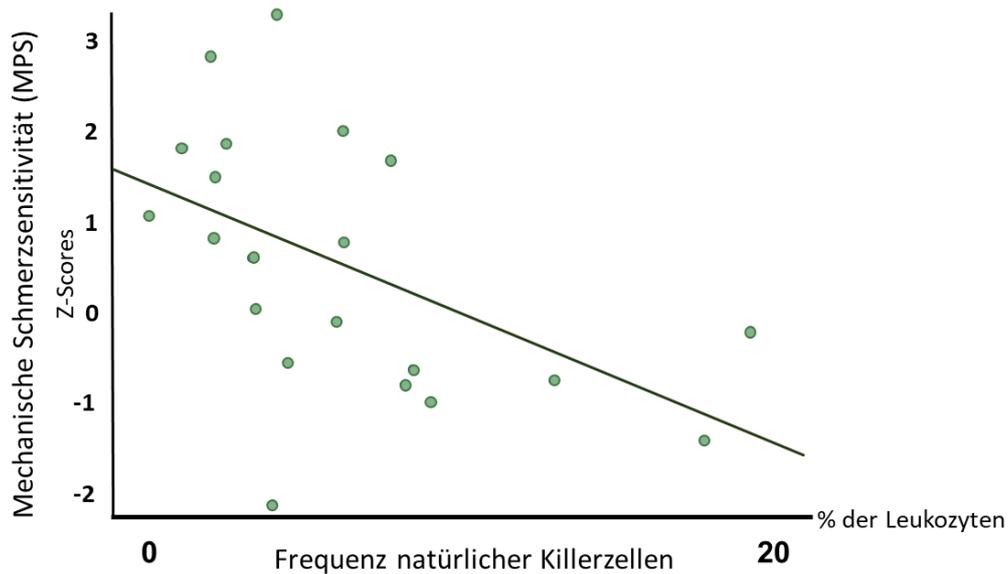


Abbildung 13: Signifikante Korrelation der mechanischen Schmerzempfindlichkeit und der Frequenz der natürlichen Killerzellen

Herpes Zoster Patienten

Es wurde eine positive Korrelation zwischen CD8+-Zellfrequenz und mechanischer Schmerzempfindlichkeit gefunden ($r = 0,990$, $p = 0,001$; nach Bonferroni-Korrektur $p = 0,009$; $n = 5$) (**Abbildung 14**). Dieses Ergebnis blieb nach Bonferroni-Korrektur robust (korrigiertes $p = 0,009$).

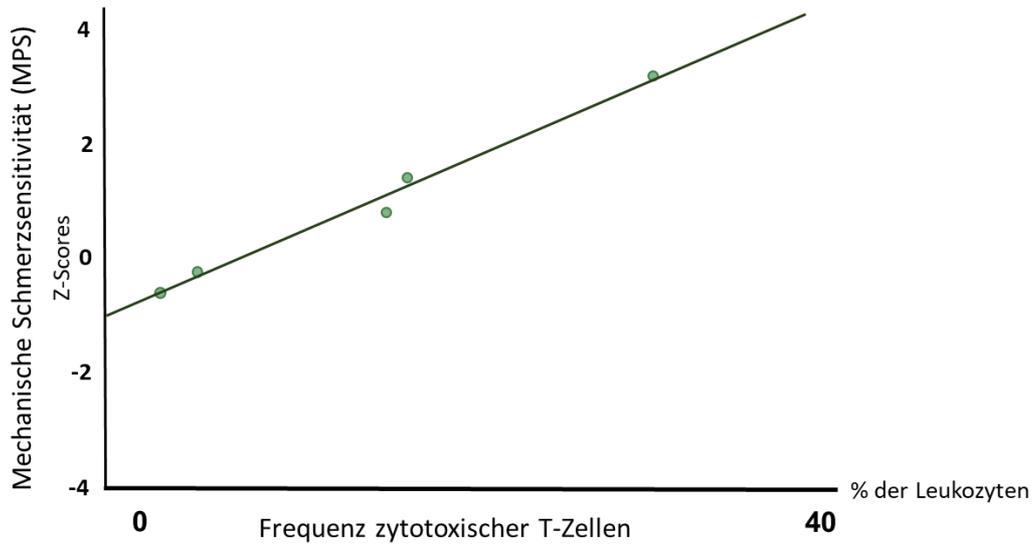


Abbildung 14: Signifikante Korrelation der mechanischen Schmerzsensitivität und der Frequenz zytotoxischer T-Zellen der Patienten mit Herpes Zoster

(*) N= 5, ein Patient mit Herpes Zoster beendete die Untersuchung vorzeitig.
Polyneuropathie-Patienten

Eine hohe CD8+-Zellfrequenz war mit einer reduzierten mechanischen Schmerzsensitivität ($r = -0,516$, $p = 0,041$, $n = 16$) sowie einer erhöhten Hitzehyperalgesie ($r = 0,551$, $p = 0,027$; nach Bonferroni-Korrektur $p = 0,243$, $n = 16$) assoziiert (**Abbildung 15**).

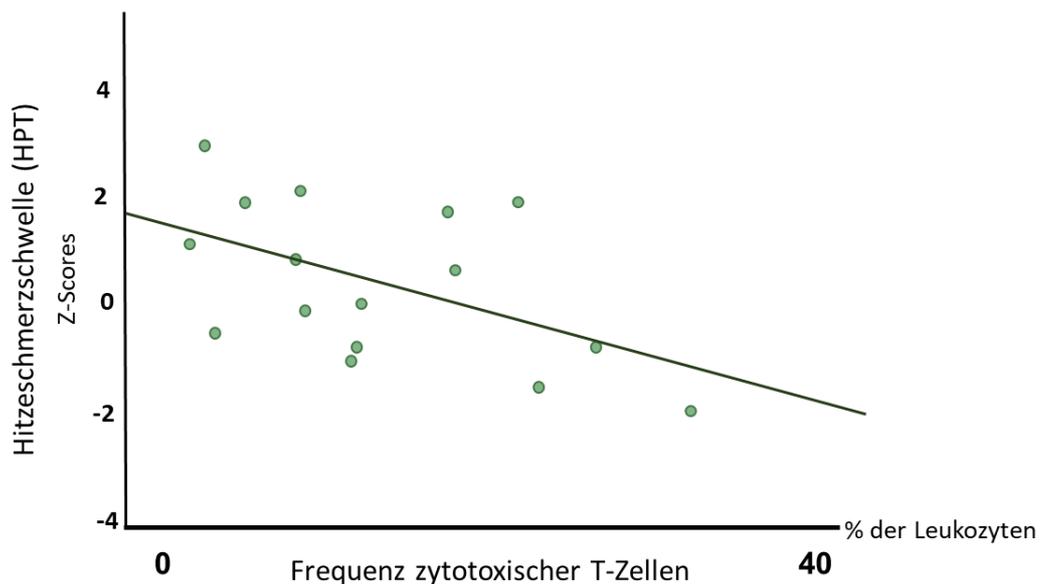


Abbildung 15: Signifikante Korrelation der Hitzeschmerzschwelle und der Frequenz der zytotoxischen T-Zellen der Patienten mit Polyneuropathie

Es bestand eine signifikante Korrelation ($r = -0,545$, $p = 0,029$; nach Bonferroni-Korrektur $p = 0,261$, $n = 16$) zwischen mechanischer Schmerzempfindlichkeit (MPS) und der Häufigkeit der natürlichen Killerzellen (**Abbildung 16**). Eine erhöhte NK-Zellfrequenz korrelierte mit einer reduzierten mechanischen Schmerzempfindlichkeit.

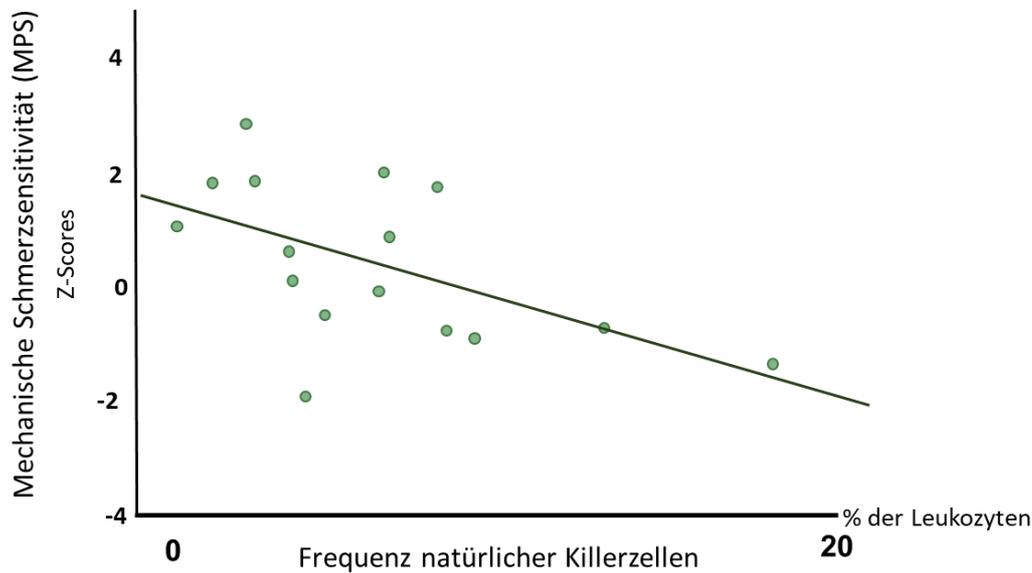


Abbildung 16: Signifikante Korrelation der mechanischen Schmerzempfindlichkeit und der Frequenz der natürlichen Killerzellen der Patienten mit Polyneuropathie

3.5.3 Immunezellhäufigkeiten und Schmerzentwicklung

Wir fanden keine signifikanten Korrelationen zwischen FACS-Daten und PDQ-Scores in der Nachuntersuchung ($p > 0,05$), es gab auch keine signifikante Veränderung der PDQ-Scores zwischen Baseline- und Follow-up-Untersuchung ($p > 0,1$).

Bei zwei Patienten zeigte der PDQ, dass eine neuropathische Schmerzkomponente zu Studienbeginn unwahrscheinlich, bei der Nachuntersuchung jedoch wahrscheinlich geworden war. Beide Patienten zeigten niedrige NK-Zellfrequenzen im Vergleich zum Mittelwert aller auswertbaren NK-Zellfrequenzen.

Zwei Patienten entwickelten bei der Follow-up-Untersuchung eine pathologische HPT, für beide Patienten liegen keine gültigen FACS-Ergebnisse vor.

Es gab vier Patienten, deren ursprünglich normale MPS-Werte im Verlauf pathologisch wurden. Zwei dieser Patienten hatten gültige FACS-Befunde und zeigten eine reduzierte NK-Zellfrequenz im Vergleich zum Mittelwert der gesamten Studienkohorte (**Abbildung 17**).

Ein Patient entwickelte eine pathologische WUR und zeigte eine reduzierte NK-Zell-Häufigkeit im Vergleich zum Mittelwert der gesamten Studienkohorte.

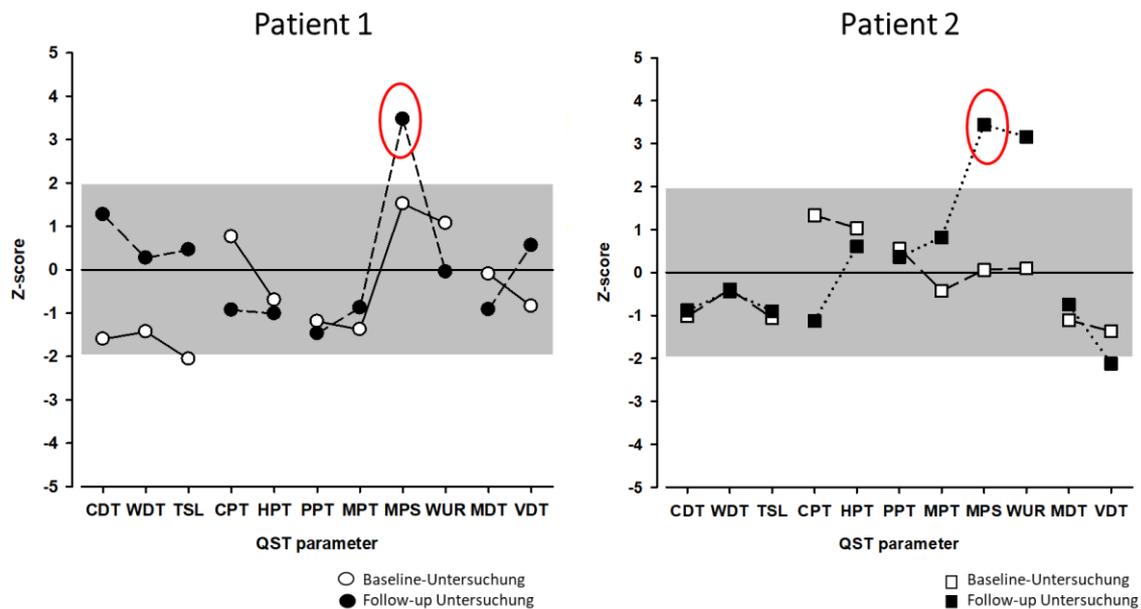


Abbildung 17: QST-Befunde der Patienten, die im Verlauf pathologische MPS-Werte entwickelten

Es sind die Z-Werte der 13 QST-Parameter angegeben. Der graue Bereich zeigt den Bereich der normativen Werte gemäß der Datenbank des deutschen DFNS. Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

Z-Wert = jeder einzelne Parameter ist auf seinen areal-, alters- und geschlechtsspezifischen Referenzbereich bezogen und wird als Anzahl der Standardabweichungen über oder unter dem normalen Mittelwert dargestellt.

Die MPS-Werte, die zu Untersuchungszeitpunkt zwei pathologisch waren, wurden rot umkreist.

CDT = Kälteerkennungsschwelle, WDT = Wärmeerkennungsschwelle, TSL = Temperatursensibilitäts-grenze, CPT = Kälteschmerzschwelle, HPT = Wärmeschmerzschwelle, PPT = Druckschmerzschwelle, MPT = Mechanische Schmerzschwelle, MPS = Mechanische Schmerzempfindlichkeit, WUR = temporäre Summation, MDT = Mechanische Erkennungsschwelle, VDT = Vibrationserkennungsschwelle, DMA = Dynamisch-mechanische Allodynie, PHS = Paradoxe Wärmeempfindung.

4 Diskussion

Ziel dieser Studie war es, spezifische Immunzellmuster im Liquor zu finden, die zur Chronifizierung von Schmerzen beitragen können.

Wir fanden eine signifikante Assoziation von NK-Zellhäufigkeit und mechanischer Schmerzsensitivität, einem wichtigen QST-Marker für zentrale Sensibilisierung und damit einem potenziellen Marker für chronische Schmerzen. Diese Ergebnisse deuten auf einen protektiven Effekt von NK-Zellen hinsichtlich der Schmerzchronifizierung hin. Wir fanden auch signifikante Korrelationen bezüglich der zytotoxischen T-Zellen, die auf den ersten Blick widersprüchlich erscheinen. Bei Patienten mit Herpes Zoster korrelierte die Häufigkeit von CD8+-Zellen mit der mechanischen Schmerzsensitivität (hohe Werte von CD8+-Zellen waren mit einer ausgeprägten zentralen Sensibilisierung verbunden). Bei Polyneuropathie-Patienten war die CD8+-Zellfrequenz jedoch mit einer reduzierten MPS assoziiert, was auf weniger Anzeichen einer zentralen Sensibilisierung hindeutet. Diese Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

4.1 Protektiver Effekt von NK-Zellen auf zentrale Sensibilisierung

Das interessanteste Ergebnis war eine signifikante inverse Korrelation zwischen mechanischer Schmerzsensitivität (MPS; als eines der relevantesten Merkmale für zentrale Sensibilisierung in der QST (Hullemann, Watfeh et al. 2015) und der Häufigkeit von natürlichen Killerzellen. Dies deutet darauf hin, dass NK-Zellen einen protektiven Effekt auf die Schmerzsensibilisierung haben könnten.

Natürliche Killerzellen gehören zum angeborenen Immunsystem. Ihre primäre Funktion ist die Zerstörung virusinfizierter Zellen oder Tumorzellen. Inzwischen häufen sich Nachweise einer Multifunktionalität der Zellen und ihrer Beteiligung an verschiedenen Immun- / Zellreaktionen nach Nervenläsionen. Einige Studien zeigen NK-Zellrekrutierung in der Peripherie nach Nervenläsionen: Ratten mit Nervenverletzungen zeigten eine signifikante Hochregulation von NK-Zellen in diesen Nerven im Vergleich zu scheinoperierten Kontrollen (Cui, Holmin et al. 2000). In einem weiteren Experiment an Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Verletzung von peripheren Nerven zur Rekrutierung von NK-Zellen in diese Nerven führte. Die Funktion der NK-Zellen korrelierte mit einem verminderten Auftreten von zentraler Sensibilisierung. Die Autoren betrachten diese selektive NK-Zell-vermittelte Zerstörung geschädigter Axone als

Ergänzung zur Wallerschen Degeneration und weisen auf ein mögliches therapeutisches Potenzial von NK-Zellen bei der schmerzhaften Neuropathie hin, indem NK-Zellen partiell geschädigte Nerven beseitigen (Davies, Kim et al. 2019). Darüber hinaus zeigten Gao et al., dass NK-Zellen nach elektrischer Stimulation von ligierten Ischiasnerven bei Ratten sowohl in ihrer Aktivität als auch in ihrer Anzahl in der Milz und im peripheren Blut erhöht waren. Durch wiederholte Elektroakupunktur wurden IL-2 und β -EP, zwei wirksame Aktivatoren von NK-Zellen, erhöht (Gao, Wang et al. 2014).

Die Infiltration von Immunzellen in das Zentralnervensystem während peripherer Neuroinflammation wird kontrovers diskutiert (Marchand, Perretti et al. 2005). Nach peripherer Nervenresektion wurde eine erhöhte spinale Aktivität von CD4- und MHC-II-Zellen bei persistierender mechanischer Allodynie beobachtet (Sweitzer, White et al. 2002), was auf eine konsekutive zentrale Neuroinflammation hinweist. Eine andere Studie zeigte die Infiltration von CD3+-T-Lymphozyten und MHC-II-Zellen ins Rückenmark, welche mit mechanischer Allodynie korrelierte (Sweitzer, Hickey et al. 2002). Rutkowski et al. wiesen eine Extravasation von Mikroglia im zentralen Nervensystem von Ratten mit neuropathischen Schmerzen nach peripherer L5 Nervenverletzung nach. Die Autoren vermuteten eine spezifische Rolle der infiltrierenden Zellen mit neuroprotektiven oder anti-hyperalgetischen Effekten (Rutkowski, Lambert et al. 2004).

Die von uns nachgewiesene Reduktion der mechanischen Schmerzempfindlichkeit in Kombination mit einer erhöhten NK-Zellfrequenz passt zu diesen Befunden und liefert die ersten Daten beim Menschen.

Die Ergebnisse legen nahe, dass NK-Zellen ein protektiver Faktor für Schmerzsensibilisierung sein könnten. Bekannte QST-Marker, die eine (periphere oder zentrale) Sensibilisierung anzeigen, sind HPT, MPS, WUR und MPT (LaMotte, Thalhammer et al. 1982, Baron, Hans et al. 2013). Es gab vier Patienten, die eine Sensibilisierung zeigten: Ihre anfänglich normalen MPS-Werte wurden mit der Zeit pathologisch. Zwei von ihnen hatten valide FACS-Befunde; beide zeigten in der FACS-Analyse erniedrigte NK-Zellfrequenzen im Vergleich zum Mittelwert der NK-Frequenzen der gesamten Studienkohorte. Ein Patient entwickelte eine pathologische WUR, er zeigte ebenfalls eine reduzierte NK-Zellfrequenz. Auch diese Befunde stützen die Vermutung, dass NK-Zellen einen protektiven Effekt auf die Schmerzsensibilisierung haben

könnten. Diese Beobachtungen sollten in einer größeren Kohorte von Probanden weiter untersucht werden.

Es gibt zahlreiche Hinweise, dass NK-Zellen an der Pathogenese des Herpes Zoster beteiligt sind (Biron, Byron et al. 1989, Wendland, Herren et al. 2000, Etzioni, Eidenschenk et al. 2005, Notarangelo and Mazzolari 2006). NK-Zellen zirkulieren im Blut, wandern als Teil der angeborenen Immunantwort in entzündetes Gewebe ein und reagieren so frühzeitig auf eine Infektion (Vivier, Tomasello et al. 2008). Es wird berichtet, dass NK-Zellen eine Herpes-Zoster-Infektion eindämmen können. Andererseits zeigten Campbell et al., dass das Varizella-Zoster-Virus spezifisch in gesunde NK-Zellen eindringt und damit zur Ausbreitung der Infektion beiträgt (Campbell, McSharry et al. 2018).

4.2 Zytotoxische T-Zellen und Sensibilisierung

Bei den Patienten mit Herpes Zoster waren hohe CD8+-Zellspiegel mit einer ausgeprägten zentralen Sensibilisierung (MPS) assoziiert, während bei Polyneuropathie-Patienten die CD8+-Zellhäufigkeit mit weniger Anzeichen einer zentralen Sensibilisierung verbunden war.

Diese Befunde legen nahe, dass im akuten Stadium einer neuropathischen Schmerzerkrankung (in unserer Studienkohorte trat die Postzosterische Neuralgie innerhalb der ersten drei Monate auf) zytotoxische T-Zellen eine zentrale Sensibilisierung fördern, wahrscheinlich als relevanter Faktor innerhalb der neuroinflammatorischen Kaskade.

Neuere Studien konnten CD8+-Zellen als eine der Hauptzellgruppen identifizieren, die Ganglien nach oder während einer Zoster-Infektion infiltrieren (Gowrishankar, Steain et al. 2010, Steain, Sutherland et al. 2014, Sutherland, Steain et al. 2019). Es ist heute bekannt, dass VZV-Antigene T-Zell-vermittelte Immunantworten induzieren (Kleemann, Distler et al. 2012, Sei, Cox et al. 2015). In einer Studie an Mäusen berichteten Cao et al., dass T-Lymphozyten-defiziente Mäuse eine Reduktion der verletzungsinduzierten Hypersensibilität aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass T-Lymphozyten ein wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen sind (Cao and DeLeo 2008).

Andererseits waren bei einer chronischen neuropathischen Schmerzerkrankung (in unserer Kohorte lag der Schmerzbeginn der Polyneuropathie-Patienten Jahre zurück) die CD8+-Zellspiegel mit einer reduzierten zentralen Sensibilisierung assoziiert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass CD8+-Zellen schützende Eigenschaften entwickeln, wenn neuropathische Schmerzen chronisch werden. Was diese Vermutung unterstreicht, ist das Ergebnis einer

Mausstudie zur chronischen Arthritis: Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass CD8+-Zellen durch die Freisetzung endogener Opioiden im chronischen Krankheitsstadium einen protektiven und analgetischen Effekt auf Entzündungsschmerzen haben (Baddack-Werncke, Busch-Dienstfertig et al. 2017). Darüber hinaus zeigte ein anderes Experiment an Mäusen, dass CD8+-Zellen für die Erholung von Paclitaxel- oder Cisplatin-induzierter mechanischer Allodynie notwendig sind und spontane Schmerzen und Taubheitsgefühle lindern (Laumet, Edralin et al. 2019).

Bei chronischen Schmerzzuständen wie dem komplexen regionalen Schmerzsyndrom und Fibromyalgie wurde eine Reduktion der zirkulierenden CD8+-T-Zellen im Blut festgestellt (Kaufmann, Eisner et al. 2007).

Dieser Wechsel vom Promotor zum Protektor ist für einige Zytokine und Immunzellen bekannt: Innerhalb der Immunantwort können sie sowohl einen fördernden als auch einen schützenden Charakter haben. Man weiß jedoch nicht, wann und warum dieser Wechsel stattfindet und was ihn verursacht.

4.3 Leukozyten-Einwanderung in das ZNS

Die Leukozytenzahl war bei den Patienten mit Herpes Zoster signifikant höher als bei PNP-Patienten. Dieses Ergebnis weist auf eine mögliche Leukozytenwanderung in das ZNS während der peripheren Entzündung innerhalb der Spinalnervenwurzel hin. Eine Erhöhung der Leukozytenzahl innerhalb des Rückenmarks aufgrund einer Varizella-Zoster-Infektion wurde bereits früher berichtet (Skripuletz, Pars et al. 2018). Die Autoren erklären diese Liquorveränderungen durch die anatomische Nähe der betroffenen Ganglien zum ZNS. Haanpää et al. schlugen auch eine direkte Ausbreitung des Varizella-Virus vom Spinalganglion in das zentrale Nervensystem vor (Haanpää, Attal et al. 2011). Das Einwandern von Leukozyten in das ZNS bleibt ein kontroverses Thema, über das bisher wenig bekannt ist.

4.4 Limitationen

Als Pilotstudie zur humanen Liquor-FACS-Analyse bei Herpes Zoster und PNP liegt die Hauptbeschränkung der Studie in der relativ geringen Patientenzahl. Da wir strenge Qualitätskriterien für die Aufnahme in die FACS-Analyse definierten, war die Anzahl der Fälle mit validen FACS-Ergebnissen deutlich kleiner als die ursprüngliche Gruppengröße. Außerdem

ist die Liquorentnahme bei Patienten ein invasiver Eingriff, der eine klare neurologische Indikation erfordert, was bei akutem Zoster oder Polyneuropathie nicht immer der Fall ist. Somit war die Liquorentnahme aus ethischen Gründen eingeschränkt und nur bei bestehender medizinischer Indikation möglich.

5 Zusammenfassung

Das Immunsystem hat einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung und Chronifizierung neuropathischer Schmerzen nach Schädigung des peripheren und/oder zentralen Nervensystems. Einzelne Zellpopulationen und deren Rolle bei der Schmerzentstehung und -chronifizierung im zentralen Nervensystem wurden bislang ausschließlich im Tiermodell untersucht. Dabei erwies sich die zentrale Neuroinflammation einerseits als Motor für zentrale Sensibilisierungsprozesse (und damit relevanter Faktor für die Schmerzchronifizierung), andererseits wurden schmerzprotektive Mechanismen im Rahmen der Neuroinflammation identifiziert.

Inwieweit sich diese Erkenntnisse auf den Menschen übertragen lassen, ist bisher nicht untersucht worden: Eine Untersuchung von Gewebeproben des zentralen Nervensystems ist beim Menschen nachvollziehbarerweise aufgrund medizinischer und ethischer Grundsätze unmöglich. Da der Liquor das zentrale Nervensystem vollständig umgibt, ermöglicht dessen Analyse am ehesten Einblicke in immunologische Abläufe des zentralen Nervensystems.

Ziel dieser Arbeit war, im Liquor von Patienten mit Postzosterischer Neuralgie und Polyneuropathie Immunezellmuster zu identifizieren, die möglicherweise zur Schmerzchronifizierung bei diesen neuropathischen Schmerzzuständen beitragen. Dafür wurde der Zusammenhang zwischen Immunezellprofilen und somatosensorischen Profilen untersucht.

Liquor von 41 Patienten wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert, es wurden Zellpopulationen der T-Helfer-Zellen, zytotoxische T-Zellen, B-Zellen und natürlichen Killerzellen identifiziert und quantifiziert. Eine somatosensorische Phänotypisierung erfolgte durch eine Quantitative Sensorische Testung; der Fokus lag dabei auf Parametern, die als Marker für Schmerzchronifizierung bzw. zentrale Sensibilisierung bekannt sind.

Es zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der Frequenz natürlicher Killerzellen und der mechanischen Schmerzsensitivität, einem der wichtigsten Marker für zentrale Sensibilisierung, in der Quantitativen Sensorischen Testung:

Eine hohe Frequenz der natürlichen Killerzellen korrelierte mit einer niedrigen mechanischen Schmerzsensitivität, während eine niedrige Frequenz natürlicher Killerzellen mit Anzeichen einer zentralen Sensibilisierung verbunden war.

Die vorliegende Studie ist die erste, die zeigt, dass eine hohe Frequenz natürlicher Killerzellen im menschlichen Liquor mit einer reduzierten zentralen Sensibilisierung bei neuropathischen

Schmerzerkrankungen einhergeht. Obwohl natürliche Killerzellen nur einen kleinen Teil der Immunzellen ausmachen, scheinen sie eine einzigartige Aufgabe im Sinne einer protektiven Funktion innerhalb der neuroinflammatorischen Kaskade zu besitzen.

Unsere Beobachtungen resultieren aus einer begrenzten Patientenzahl. Dennoch fanden wir vielversprechende Marker für Schmerzchronifizierung im Liquor, die einer Korrektur für multiples Testen standhielten und die es daher wert sind, in zukünftigen Liquor-Studien in einer größeren Kohorte (z.B. in multizentrischen Studien) eingehender betrachtet zu werden.

6 Literaturverzeichnis

- Austin, P. J. and G. Moalem-Taylor (2010). "The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines." *J Neuroimmunol* **229**(1-2): 26-50.
- Baddack-Werncke, U., M. Busch-Dienstfertig, S. Gonzalez-Rodriguez, S. C. Maddila, J. Grobe, M. Lipp, C. Stein and G. Muller (2017). "Cytotoxic T cells modulate inflammation and endogenous opioid analgesia in chronic arthritis." *J Neuroinflammation* **14**(1): 30.
- Baron, R., A. Binder and G. Wasner (2010). "Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment." *Lancet Neurol* **9**(8): 807-819.
- Baron, R., G. Hans and A. H. Dickenson (2013). "Peripheral input and its importance for central sensitization." *Ann Neurol* **74**(5): 630-636.
- Baron, R., C. Maier, N. Attal, A. Binder, D. Bouhassira, G. Cruccu, N. B. Finnerup, M. Haanpaa, P. Hansson, P. Hullemann, T. S. Jensen, R. Freynhagen, J. D. Kennedy, W. Magerl, T. Mainka, M. Reimer, A. S. C. Rice, M. Segerdahl, J. Serra, S. Sindrup, C. Sommer, T. Tolle, J. Vollert, R. D. Treede, N. German Neuropathic Pain Research, E. the and N. consortia (2017). "Peripheral neuropathic pain: a mechanism-related organizing principle based on sensory profiles." *Pain* **158**(2): 261-272.
- Biosciences, B. (2021). "E-learning courses." Retrieved 26.06.2021, 2021, from <http://www.bdbiosciences.com/en-us/learn/training/self-paced-courses#e-learning-courses>.
- Biron, C. A., K. S. Byron and J. L. Sullivan (1989). "Severe herpesvirus infections in an adolescent without natural killer cells." *N Engl J Med* **320**(26): 1731-1735.
- Bouhassira, D., M. Lanteri-Minet, N. Attal, B. Laurent and C. Touboul (2008). "Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population." *Pain* **136**(3): 380-387.
- Breivik, H., B. Collett, V. Ventafridda, R. Cohen and D. Gallacher (2006). "Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment." *Eur J Pain* **10**(4): 287-333.
- Calvo, M., J. M. Dawes and D. L. Bennett (2012). "The role of the immune system in the generation of neuropathic pain." *Lancet Neurol* **11**(7): 629-642.
- Campbell, T. M., B. P. McSharry, M. Steain, T. M. Ashurst, B. Slobedman and A. Abendroth (2018). "Varicella zoster virus productively infects human natural killer cells and manipulates phenotype." *PLoS Pathog* **14**(4): e1006999.
- Cao, L. and J. A. DeLeo (2008). "CNS-infiltrating CD4+ T lymphocytes contribute to murine spinal nerve transection-induced neuropathic pain." *Eur J Immunol* **38**(2): 448-458.
- Clatworthy, A. L., P. A. Illich, G. A. Castro and E. T. Walters (1995). "Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain." *Neurosci Lett* **184**(1): 5-8.
- Colloca, L., T. Ludman, D. Bouhassira, R. Baron, A. H. Dickenson, D. Yarnitsky, R. Freeman, A. Truini, N. Attal, N. B. Finnerup, C. Eccleston, E. Kalso, D. L. Bennett, R. H. Dworkin and S. N. Raja (2017). "Neuropathic pain." *Nat Rev Dis Primers* **3**: 17002.
- Cui, J. G., S. Holmin, T. Mathiesen, B. A. Meyerson and B. Linderoth (2000). "Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy." *Pain* **88**(3): 239-248.
- Davies, A. J., H. W. Kim, R. Gonzalez-Cano, J. Choi, S. K. Back, S. E. Roh, E. Johnson, M. Gabriac, M. S. Kim, J. Lee, J. E. Lee, Y. S. Kim, Y. C. Bae, S. J. Kim, K. M. Lee, H. S. Na, P. Riva, A. Latremoliere, S. Rinaldi, S. Ugolini, M. Costigan and S. B. Oh (2019). "Natural Killer Cells Degenerate Intact Sensory Afferents following Nerve Injury." *Cell* **176**(4): 716-728 e718.
- Davies, A. J., S. Rinaldi, M. Costigan and S. B. Oh (2020). "Cytotoxic Immunity in Peripheral Nerve Injury and Pain." *Front Neurosci* **14**: 142.
- Dickenson, A. H. (2014). "Commentary on: Opioid and noradrenergic contributions of tapentadol in experimental neuropathic pain." *Neurosci Lett* **562**: 90.
- Elman, I. and D. Borsook (2016). "Common Brain Mechanisms of Chronic Pain and Addiction." *Neuron* **89**(1): 11-36.
- Etzioni, A., C. Eidenschenk, R. Katz, R. Beck, J. L. Casanova and S. Pollack (2005). "Fatal varicella associated with selective natural killer cell deficiency." *J Pediatr* **146**(3): 423-425.
- Finnerup, N. B., S. Haroutounian, P. Kamerman, R. Baron, D. L. Bennett, D. Bouhassira, G. Cruccu, R. Freeman, P. Hansson, T. Nurmikko, S. N. Raja, A. S. Rice, J. Serra, B. H. Smith, R. D. Treede and T. S. Jensen (2016). "Neuropathic pain: an updated grading system for research and clinical practice." *Pain* **157**(8): 1599-1606.
- Freynhagen, R., R. Baron, U. Gockel and T. R. Tolle (2006). "painDETECT: a new screening questionnaire to identify neuropathic components in patients with back pain." *Curr Med Res Opin* **22**(10): 1911-1920.
- Gao, Y. H., J. Y. Wang, L. N. Qiao, S. P. Chen, L. H. Tan, Q. L. Xu and J. L. Liu (2014). "NK cells mediate the cumulative analgesic effect of electroacupuncture in a rat model of neuropathic pain." *BMC Complement Altern Med* **14**: 316.
- Geber, C., A. Scherens, D. Pfau, N. Nestler, M. Zenz, T. Tolle, R. Baron, R. D. Treede and C. Maier (2009). "[Procedure for certification of QST laboratories]." *Schmerz* **23**(1): 65-69.

Gilron, I., J. Bailey, D. F. Weaver and R. L. Houlden (2002). "Patients' attitudes and prior treatments in neuropathic pain: a pilot study." *Pain Res Manag* **7**(4): 199-203.

Goncalves, L., L. V. Friend and A. H. Dickenson (2015). "The influence of mu-opioid and noradrenaline reuptake inhibition in the modulation of pain responsive neurones in the central amygdala by tapentadol in rats with neuropathy." *Eur J Pharmacol* **749**: 151-160.

Gowrishankar, K., M. Steain, A. L. Cunningham, M. Rodriguez, P. Blumbergs, B. Slobedman and A. Abendroth (2010). "Characterization of the host immune response in human Ganglia after herpes zoster." *J Virol* **84**(17): 8861-8870.

Guan, Y., J. Borzan, R. A. Meyer and S. N. Raja (2006). "Windup in dorsal horn neurons is modulated by endogenous spinal mu-opioid mechanisms." *J Neurosci* **26**(16): 4298-4307.

Haanpaa, M., N. Attal, M. Backonja, R. Baron, M. Bennett, D. Bouhassira, G. Cruccu, P. Hansson, J. A. Haythornthwaite, G. D. Iannetti, T. S. Jensen, T. Kauppila, T. J. Nurmikko, A. S. Rice, M. Rowbotham, J. Serra, C. Sommer, B. H. Smith and R. D. Treede (2011). "NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment." *Pain* **152**(1): 14-27.

Hauser, W., G. Schmutzer, P. Henningsen and E. Braehler (2014). "[Chronic pain, pain disease, and satisfaction of patients with pain treatment in Germany. Results of a representative population survey]." *Schmerz* **28**(5): 483-492.

Hulleman, P., R. Wafteh, Y. Q. Shao, A. Nerdal, A. Binder and R. Baron (2015). "Peripheral sensitization reduces laser-evoked potential habituation." *Neurophysiol Clin* **45**(6): 457-467.

Kaufmann, I., C. Eisner, P. Richter, V. Hüge, A. Beyer, A. Chouker, G. Schelling and M. Thiel (2007). "Lymphocyte subsets and the role of TH1/TH2 balance in stressed chronic pain patients." *Neuroimmunomodulation* **14**(5): 272-280.

Kehlet, H., T. S. Jensen and C. J. Woolf (2006). "Persistent postsurgical pain: risk factors and prevention." *Lancet* **367**(9522): 1618-1625.

Kleemann, P., E. Distler, E. M. Wagner, S. Thomas, S. Klobuch, S. Aue, E. Schnurer, H. Schild, M. Theobald, B. Plachter, S. Tenzer, R. G. Meyer and W. Herr (2012). "Varicella-zoster virus glycoproteins B and E are major targets of CD4+ and CD8+ T cells reconstituting during zoster after allogeneic transplantation." *Haematologica* **97**(6): 874-882.

Kosek, E., M. Cohen, R. Baron, G. F. Gebhart, J. A. Mico, A. S. Rice, W. Rief and A. K. Sluka (2016). "Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states?" *Pain* **157**(7): 1382-1386.

Kosek, E. and G. Ordeberg (2000). "Lack of pressure pain modulation by heterotopic noxious conditioning stimulation in patients with painful osteoarthritis before, but not following, surgical pain relief." *Pain* **88**(1): 69-78.

LaMotte, R. H., J. G. Thalhammer, H. E. Torebjork and C. J. Robinson (1982). "Peripheral neural mechanisms of cutaneous hyperalgesia following mild injury by heat." *J Neurosci* **2**(6): 765-781.

Laument, G., J. D. Edralin, R. Dantzer, C. J. Heijnen and A. Kavelaars (2019). "Cisplatin educates CD8+ T cells to prevent and resolve chemotherapy-induced peripheral neuropathy in mice." *Pain* **160**(6): 1459-1468.

Maier, C., R. Baron, T. R. Tolle, A. Binder, N. Birbaumer, F. Birklein, J. Gierthmühlen, H. Flor, C. Geber, V. Hüge, E. K. Krumova, G. B. Landwehrmeyer, W. Magerl, C. Maihofner, H. Richter, R. Rolke, A. Scherrens, A. Schwarz, C. Sommer, V. Tronnier, N. Uceyler, M. Valet, G. Wasner and R. D. Treede (2010). "Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes." *Pain* **150**(3): 439-450.

Marchand, F., M. Perretti and S. B. McMahon (2005). "Role of the immune system in chronic pain." *Nat Rev Neurosci* **6**(7): 521-532.

Melzack, R. and P. D. Wall (1965). "Pain mechanisms: a new theory." *Science* **150**(3699): 971-979.

Moalem, G. and D. J. Tracey (2006). "Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain." *Brain Res Rev* **51**(2): 240-264.

Notarangelo, L. D. and E. Mazzolari (2006). "Natural killer cell deficiencies and severe varicella infection." *J Pediatr* **148**(4): 563-564; author reply 564.

Ossipov, M. H., K. Morimura and F. Porreca (2014). "Descending pain modulation and chronification of pain." *Curr Opin Support Palliat Care* **8**(2): 143-151.

Pschyrembel, W. (2013). *Klinisches Wörterbuch*, de Gruyter.

Raja, S. N., D. B. Carr, M. Cohen, N. B. Finnerup, H. Flor, S. Gibson, F. J. Keefe, J. S. Mogil, M. Ringkamp, K. A. Sluka, X. J. Song, B. Stevens, M. D. Sullivan, P. R. Tutelman, T. Ushida and K. Vader (2020). "The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises." *Pain* **161**(9): 1976-1982.

Ramond, A., C. Bouton, I. Richard, Y. Roquelaure, C. Baufreton, E. Legrand and J. F. Huez (2011). "Psychosocial risk factors for chronic low back pain in primary care--a systematic review." *Fam Pract* **28**(1): 12-21.

Raouf, R., H. Willemsen and N. Eijkelkamp (2018). "Divergent roles of immune cells and their mediators in pain." *Rheumatology (Oxford)* **57**(3): 429-440.

Ren, K. and R. Dubner (2010). "Interactions between the immune and nervous systems in pain." *Nat Med* **16**(11): 1267-1276.

Rolke, R., R. Baron, C. Maier, T. R. Tolle, R. D. Treede, A. Beyer, A. Binder, N. Birbaumer, F. Birklein, I. C. Botefur, S. Braune, H. Flor, V. Hugel, R. Klug, G. B. Landwehrmeyer, W. Magerl, C. Maihofner, C. Rolko, C. Schaub, A. Scherens, T. Sprenger, M. Valet and B. Wasserka (2006). "Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): standardized protocol and reference values." *Pain* **123**(3): 231-243.

Rothe, G. (2007). *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel, Sack U, Tárnok A, Rothe G.

Rutkowski, M. D., F. Lambert, V. Raghavendra and J. A. DeLeo (2004). "Presence of spinal B7.2 (CD86) but not B7.1 (CD80) co-stimulatory molecules following peripheral nerve injury: role of nondestructive immunity in neuropathic pain." *J Neuroimmunol* **146**(1-2): 94-98.

Sei, J. J., K. S. Cox, S. A. Dubey, J. M. Antonello, D. L. Krah, D. R. Casimiro and K. A. Vora (2015). "Effector and Central Memory Poly-Functional CD4(+) and CD8(+) T Cells are Boosted upon ZOSTAVAX((R)) Vaccination." *Front Immunol* **6**: 553.

Shaw, W. S., D. A. van der Windt, C. J. Main, P. Loisel, S. J. Linton and G. Decade of the Flags" Working (2009). "Early patient screening and intervention to address individual-level occupational factors ("blue flags") in back disability." *J Occup Rehabil* **19**(1): 64-80.

Skripuletz, T., K. Pars, A. Schulte, P. Schwenkenbecher, O. Yildiz, T. Ganzenmueller, M. Kuhn, A. Spreer, U. Wurster, R. Pul, M. Stangel, K. W. Suhs and C. Trebst (2018). "Varicella zoster virus infections in neurological patients: a clinical study." *BMC Infect Dis* **18**(1): 238.

Smith, B. H., G. J. Macfarlane and N. Torrance (2007). "Epidemiology of chronic pain, from the laboratory to the bus stop: time to add understanding of biological mechanisms to the study of risk factors in population-based research?" *Pain* **127**(1-2): 5-10.

Smith, B. H. and N. Torrance (2011). "Management of chronic pain in primary care." *Curr Opin Support Palliat Care* **5**(2): 137-142.

Sommer, C. (2003). "Painful neuropathies." *Curr Opin Neurol* **16**(5): 623-628.

Steain, M., J. P. Sutherland, M. Rodriguez, A. L. Cunningham, B. Slobedman and A. Abendroth (2014). "Analysis of T cell responses during active varicella-zoster virus reactivation in human ganglia." *J Virol* **88**(5): 2704-2716.

Sutherland, J. P., M. Steain, M. E. Buckland, M. Rodriguez, A. L. Cunningham, B. Slobedman and A. Abendroth (2019). "Persistence of a T Cell Infiltrate in Human Ganglia Years After Herpes Zoster and During Post-herpetic Neuralgia." *Front Microbiol* **10**: 2117.

Svenningsson, A., O. Andersen, M. Edsbacke and S. Stemme (1995). "Lymphocyte phenotype and subset distribution in normal cerebrospinal fluid." *J Neuroimmunol* **63**(1): 39-46.

Svenningsson, A., G. K. Hansson, O. Andersen, R. Andersson, M. Patarroyo and S. Stemme (1993). "Adhesion molecule expression on cerebrospinal fluid T lymphocytes: evidence for common recruitment mechanisms in multiple sclerosis, aseptic meningitis, and normal controls." *Ann Neurol* **34**(2): 155-161.

Sweitzer, S. M., W. F. Hickey, M. D. Rutkowski, J. L. Pahl and J. A. DeLeo (2002). "Focal peripheral nerve injury induces leukocyte trafficking into the central nervous system: potential relationship to neuropathic pain." *Pain* **100**(1-2): 163-170.

Sweitzer, S. M., K. A. White, C. Dutta and J. A. DeLeo (2002). "The differential role of spinal MHC class II and cellular adhesion molecules in peripheral inflammatory versus neuropathic pain in rodents." *J Neuroimmunol* **125**(1-2): 82-93.

Taylor, J. B., A. P. Goode, S. Z. George and C. E. Cook (2014). "Incidence and risk factors for first-time incident low back pain: a systematic review and meta-analysis." *Spine J* **14**(10): 2299-2319.

Totsch, S. K. and R. E. Sorge (2017). "Immune System Involvement in Specific Pain Conditions." *Mol Pain* **13**: 1744806917724559.

Trouvin, A. P. and S. Perrot (2019). "New concepts of pain." *Best Pract Res Clin Rheumatol* **33**(3): 101415.

Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer and S. Ugolini (2008). "Functions of natural killer cells." *Nat Immunol* **9**(5): 503-510.

Vollert, J., N. Attal, R. Baron, R. Freynhagen, M. Haanpaa, P. Hansson, T. S. Jensen, A. S. Rice, M. Segerdahl, J. Serra, S. H. Sindrup, T. R. Tolle, R. D. Treede and C. Maier (2016). "Quantitative sensory testing using DFNS protocol in Europe: an evaluation of heterogeneity across multiple centers in patients with peripheral neuropathic pain and healthy subjects." *Pain* **157**(3): 750-758.

Vollert, J., C. Maier, N. Attal, D. L. H. Bennett, D. Bouhassira, E. K. Enax-Krumova, N. B. Finnerup, R. Freynhagen, J. Gierthmuhlen, M. Haanpaa, P. Hansson, P. Hulleman, T. S. Jensen, W. Magerl, J. D. Ramirez, A. S. C. Rice, S. Schuh-Hofer, M. Segerdahl, J. Serra, P. R. Shillo, S. Sindrup, S. Tesfaye, A. C. Themistocleous, T. R. Tolle, R. D. Treede and R. Baron (2017). "Stratifying patients with peripheral neuropathic pain based on sensory profiles: algorithm and sample size recommendations." *Pain* **158**(8): 1446-1455.

Wendland, T., S. Herren, N. Yawalkar, A. Cerny and W. J. Pichler (2000). "Strong alpha beta and gamma delta TCR response in a patient with disseminated Mycobacterium avium infection and lack of NK cells and monocytopenia." *Immunol Lett* **72**(2): 75-82.

Wolfe, F. and K. Michaud (2007). "Assessment of pain in rheumatoid arthritis: minimal clinically significant difference, predictors, and the effect of anti-tumor necrosis factor therapy." *J Rheumatol* **34**(8): 1674-1683.

7 Anhang

7.1 Patientenaufklärung

Sektion Neurologische Schmerzforschung und –therapie

Leiter: Prof. Dr. R. Baron

Studienärzte: Prof. Dr. R. Baron, PD Dr. Andreas Binder, PD Dr. Janne Gierthmühlen, Dr. med. Ph. Hüllemann, Dr. med. Stefanie Rehm, Johanna Höper, Maren Reimer, Dr. med. Paul Möller Tel.: 0431-597-8510

Patientenaufklärung

Erforschung und Identifizierung unterschiedlicher Immunzellpopulationen und ihre Rolle bei der Entstehung chronischer Schmerzen

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

Wir möchten Sie bitten, an einer wissenschaftlichen Untersuchung teilzunehmen, mit Hilfe derer wir mögliche Marker für eine Schmerz-Chronifizierung identifizieren wollen.

1. Ziel der Untersuchung

Identifizierung von neuro-immunologischen Markern für die Entwicklung chronischer Schmerzen.

2. Ablauf der Untersuchung

Zur Teilnahme an der Studie sind keine Untersuchungen nötig, welche nicht ohnehin im Rahmen der klinischen Routine-Diagnostik durchgeführt würden. Die Analyse von Immunzellen wird aus Nervenwasser (Liquor) oder Material aus Hautbiopsien oder aus Blutserum durchgeführt, dabei wird nur jenes Material verwendet, was in der klinischen Praxis i.d.R. für spätere zusätzliche Bestimmungen zurückgelegt.

Um Ihren aktuellen Gesundheitszustand jetzt und zu einem späteren Zeitpunkt einschätzen zu können, würden wir Sie bitten einige Fragebögen zu beantworten (Sie erhalten von uns einen frankierten Rückumschlag, um uns die Bögen nach Beantwortung kostenfrei zurückschicken zu können).

Bei einigen Patienten sind Folgeuntersuchungen geplant (körperliche Untersuchung, nicht invasive Messung der Nervenfunktion mittels Quantitativ Sensorischer Testung und Fragebögen). Sollten Sie hierfür infrage kommen, werden Sie hierüber bereits heute informiert.

Sollten Sie jetzt noch Fragen zu der Untersuchung haben, wenden Sie sich bitte an den Studienarzt.

7.2 Einwilligungserklärung

Sektion Neurologische Schmerzforschung und –therapie

Leiter: Prof. Dr. R. Baron

Studienärzte: Prof. Dr. R. Baron, PD Dr. Andreas Binder, PD Dr. Janne Gierthmühlen, Dr. med. Ph. Hüllemann, Dr. med. Stefanie Rehm, Johanna Höper, Maren Reimer, Dr. med. Paul Möller Tel.: 0431-597-8510

Einwilligungserklärung

Erforschung und Identifizierung unterschiedlicher Immunzellpopulationen und ihre Rolle bei der Entstehung chronischer Schmerzen

Vor- und Nachname der Patientin/ des Patienten

Ich bin ausreichend in mündlicher und schriftlicher Form über die Ziele und Methoden, die möglichen Risiken und den Nutzen der Studie informiert worden. Ich habe die Patienten-/Probandeninformation gelesen und den Inhalt verstanden.

Ich hatte ausreichend Gelegenheit, die Studie mit meinem Arzt zu besprechen und Fragen zu stellen. Alle meine Fragen und Bedenken wurden zu meiner Zufriedenheit beantwortet.

Ich bin damit einverstanden, dass im Rahmen der Studie meine personenbezogenen Daten (Name, Geburtsdatum, Anschrift etc.) und meine medizinischen Daten aufgezeichnet und anonymisiert/pseudonymisiert (d.h. ohne Namensnennung verschlüsselt) zur Auswertung der Ergebnisse verwendet werden. Alle im Rahmen der Studie erhobenen Daten werden strikt vertraulich gemäß dem Datenschutz behandelt.

Einer wissenschaftlichen Auswertung der Daten und einer möglichen Veröffentlichung der vollständig anonymisierten Ergebnisse stimme ich zu.

Ich weiß, dass meine Studienteilnahme freiwillig ist und dass ich jederzeit ohne Angabe von Gründen meine Zusage zur Teilnahme widerrufen kann und mir daraus keine Nachteile entstehen. Beim Widerruf werden auf mein Verlangen alle erhobenen Daten gelöscht, soweit zuvor keine vollständige Anonymisierung erfolgte. Ich gebe hiermit meine freiwillige Zustimmung zur Teilnahme an dieser Studie. Eine Kopie dieser Einwilligung und eine Kopie der Patienten-Probandeninformationsschrift habe ich erhalten.

Ort, Datum

Unterschrift der Patientin/ des Patienten

Die Patientin/der Patient wurde von mir über Ziel, Bedeutung, Tragweite sowie etwaige Risiken der Studie aufgeklärt.

Ort, Datum

Unterschrift des Arztes

7.3 PainDETECT Fragebogen

painDETECT

SCHMERZ-FRAGEBOGEN

Datum: Patient: Name: Vorname:

Wie würden Sie Ihren Schmerz **jetzt** im Augenblick einschätzen?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

kein max

Wie stark war der **stärkste** Schmerz in den letzten 4 Wochen?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

kein max

Wie stark war der Schmerz in den letzten 4 Wochen im **Durchschnitt**?

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

kein max

Kreuzen Sie das Bild an, welches Ihren Schmerzverlauf am besten beschreibt:

	Dauerschmerzen mit leichten Schwankungen	<input type="checkbox"/>
	Dauerschmerzen mit Schmerzattacken	<input type="checkbox"/>
	Schmerzattacken dazwischen schmerzfrei	<input type="checkbox"/>
	Schmerzattacken dazwischen Schmerzen	<input type="checkbox"/>

Bitte kennzeichnen Sie Ihren Hauptschmerzbereich



Strahlt Ihr Schmerz in weitere Körperregionen aus? ja nein

wenn ja, dann zeichnen Sie bitte die Richtung ein, wohin der Schmerz ausstrahlt.

Leiden Sie in den eingezeichneten Bereichen an einem Brenngefühl (z.B. Brennnesseln)?						
nie <input type="checkbox"/>	kaum <input type="checkbox"/>	gering <input type="checkbox"/>	mittel <input type="checkbox"/>	stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>
Haben Sie im Bereich Ihrer Schmerzen ein Kribbel- oder Prickelgefühl (wie Ameisenlaufen, Stromkribbeln)?						
nie <input type="checkbox"/>	kaum <input type="checkbox"/>	gering <input type="checkbox"/>	mittel <input type="checkbox"/>	stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>
Ist leichte Berührung (Kleidung, Bettdecke) in diesem Bereich schmerzhaft?						
nie <input type="checkbox"/>	kaum <input type="checkbox"/>	gering <input type="checkbox"/>	mittel <input type="checkbox"/>	stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>
Haben Sie im Bereich Ihrer Schmerzen blitzartige, elektrisierende Schmerzattacken?						
nie <input type="checkbox"/>	kaum <input type="checkbox"/>	gering <input type="checkbox"/>	mittel <input type="checkbox"/>	stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>
Ist Kälte oder Wärme (Badewannenwasser) in diesem Bereich gelegentlich schmerzhaft?						
nie <input type="checkbox"/>	kaum <input type="checkbox"/>	gering <input type="checkbox"/>	mittel <input type="checkbox"/>	stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>
Leiden Sie in den von Ihnen eingezeichneten Bereichen unter Taubheitsgefühl?						
nie <input type="checkbox"/>	kaum <input type="checkbox"/>	gering <input type="checkbox"/>	mittel <input type="checkbox"/>	stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>
Löst ein leichter Druck z.B. mit dem Finger in diesem Bereich Schmerzen aus?						
nie <input type="checkbox"/>	kaum <input type="checkbox"/>	gering <input type="checkbox"/>	mittel <input type="checkbox"/>	stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>	sehr stark <input type="checkbox"/>

(vom Arzt auszufüllen)

nie	kaum	gering	mittel	stark	sehr stark
<input type="checkbox"/> x 0 = 0	<input type="checkbox"/> x 1 = <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> x 2 = <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> x 3 = <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> x 4 = <input type="text"/>	<input type="checkbox"/> x 5 = <input type="text"/>

Score-Gesamtsumme von 35

R. Freynhagen, R. Baron, U. Gockel, T.R. Tölle, CurrMed ResOpin Vol 22, 2006, 1911-1920

©Pfizer Pharma GmbH 2007

50

7.4 QST Dokumentationsbogen

Name: _____ Kontrollareal: _____
 Geburtsdatum: _____ Datum: _____ Testareal: _____
 Schmerzlokalisierung: _____ Schmerzstärke vor QST: _____ (0-100)
 Anzahl der Schmerzattacken in den letzten 24 Stunden 0 1-5 6-10 more than 10
 Intensität der Missempfindungen vor QST: keine Missempfindungen leicht stark nicht erfasst
 Intensität des Juckreizes vor QST kein Juckreiz leicht stark nicht erfasst
 Raumtemperatur: _____ °C Hauttemperatur Kontrollareal: _____ °C Testareal: _____ °C

Kontrollareal

CDT	WDT	TSL	CPT	HPT
°C	°C	°C	°C	°C
°C	°C	°C	°C	°C
°C	°C	°C	°C	°C

°C	°C
°C	°C
°C	°C

PHS
Anzahl paroxysmaler Hitzeempfindungen

Testareal

CDT	WDT	TSL	CPT	HPT
°C	°C	°C	°C	°C
°C	°C	°C	°C	°C
°C	°C	°C	°C	°C

°C	°C
°C	°C
°C	°C

PHS
Anzahl paroxysmaler Hitzeempfindungen

QST - Dokumentationsbogen

MDT; Mechanische Delektionsschwelle (von Frey Haare)

Kontrollareal	Testareal
nicht gespürt	nicht gespürt
gerippt	gerippt
mit	mit

MPT; Mechanische Schmerzschwelle (Pinprick)

Kontrollareal	Testareal
kein Schmerz	kein Schmerz
stumpf	stumpf
mit	mit

SR-Funktion; MPS: Pinprick; DMA: Pinsel (BR), Q-Tip (QT), Wattebausch (CW)^a

128	
CW	
32	
256	
BR	
8	
16	
QT	
512	
64	

CW	
256	
128	
8	
QT	
BR	
64	
16	
512	

32	
128	
BR	
CW	
16	
256	
512	
8	
64	
QT	

256	
8	
CW	
QT	
128	
64	
32	
512	
BR	
16	

BR	
32	
16	
128	
512	
CW	
64	
256	
QT	
8	

8	
QT	
256	
64	
CW	
512	
128	
16	
32	
BR	

16	
BR	
512	
32	
64	
128	
QT	
CW	
8	
256	

QT	
64	
8	
512	
256	
16	
CW	
BR	
128	
32	

512	
16	
64	
BR	
QT	
32	
8	
128	
256	
CW	

64	
512	
QT	
16	
8	
BR	
256	
32	
CW	
128	

WUR; Wind-up ratio (Serie 10 Reize/Einzelreiz)^b

Kontrollareal	Testareal
Einzelreiz	Reizserie

Reizintensität: _____ mit

Kontrollareal	Testareal
Einzelreiz	Reizserie

Reizintensität: _____ mit

VDT; Vibrationsdelektionsschwelle

Kontrollareal	Testareal
Knochenwirsprung:	
mit	mit
mit	mit
mit	mit

PPT; Druckschmerzschwelle

Kontrollareal	Testareal
Muskel:	

Der (die) Patient(-in) hat die Instruktionen verstanden und befolgt.
 ja nein unsicher

^a Sollte ein Reiz mit "100" gerätet werden, soll dieser Reiz im Laufe der weiteren Testung nicht wieder im betroffenen Areal angewandt und für jeden Reiz der betroffenen und höheren Stärke ein Rating von "100" eingetragen werden.
^b Falls die Verwendung des Nadelsreizstimulators der Stärke 256 mN (128 mN im Gesicht) nicht toleriert wird, kann auf eine niedrigere Reizstärke ausgewichen werden. Dies muss jedoch sowohl im Bogen als auch bei der Dateneingabe vermerkt werden. Ggf. muss im Kontrollareal die Testung mit der niedrigeren Reizintensität wiederholt werden, um eine einheitliche Messung zu gewährleisten.

8 Tabellenverzeichnis

8.1 Tabelle 1

Typische Symptome neuropathischer Schmerzen

8.2 Tabelle 2

Ein- und Ausschlusskriterien

8.3 Tabelle 3

Auflistung der verwendeten monoklonalen, murinen Antikörper

8.4 Tabelle 4

Epidemiologische Daten von Patienten mit Herpes Zoster und Polyneuropathie

8.5 Tabelle 5

Schmerz- und PDQ-Scores von Patienten mit Herpes Zoster und Polyneuropathie

8.6 Tabelle 6

Liquorbefunde aller Patienten

8.7 Tabelle 7

Epidemiologische Daten der Patienten mit validen FACS-Daten

8.8 Tabelle 8

Schmerz- und PDQ-Scores der Patienten mit validen FACS-Daten

8.9 Tabelle 9

Zellverteilung im Liquor

9 Abbildungsverzeichnis

9.1 Abbildung 1

Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie

9.2 Abbildung 2

Streudiagramm CD45 exprimierender Leukozyten

9.3 Abbildung 3

Prinzip des Gatings am Beispiel der Leukozyten-Subgruppierung

9.4 Abbildung 4

Schematische Darstellung des Doublettenausschluss

9.5 Abbildung 5

Schematische Darstellung des Live/Dead cell staining

9.6 Abbildung 6

Qualitätskontrolle Doublettenausschluss

9.7 Abbildung 7

Qualitätskontrolle apoptotische Zellen

9.8 Abbildung 8

Gatingstrategie zur Identifizierung einzelner Zellpopulationen

9.9 Abbildung 9

Vergleich der QST-Befunde von Patienten mit Polyneuropathie bei Baseline und Follow-up

9.10 Abbildung 10

Vergleich der QST-Befunde von Patienten mit Herpes Zoster bei Baseline und Follow-up

9.11 Abbildung11

Vergleich der Baseline QST-Befunde von Patienten mit Herpes Zoster und Patienten mit Polyneuropathie

9.12 Abbildung 12

Vergleich der Leukozytenzahl von Patienten mit Herpes Zoster und Patienten mit Polyneuropathie

9.13 Abbildung 13

Signifikante Korrelation der mechanischen Schmerzsensitivität und der Frequenz der natürlichen Killerzellen

9.14 Abbildung 14

Signifikante Korrelation der mechanischen Schmerzsensitivität und der Frequenz zytotoxischer T-Zellen der Patienten mit Herpes Zoster

9.15 Abbildung 15

Signifikante Korrelation der Hitzeschmerzschwelle und der Frequenz der zytotoxischen T-Zellen der Patienten mit Polyneuropathie

9.16 Abbildung 16

Signifikante Korrelation der mechanischen Schmerzsensitivität und der Frequenz der natürlichen Killerzellen der Patienten mit Polyneuropathie

9.17 Abbildung 17

QST-Befunde der Patienten, die im Verlauf pathologische MPS-Werte entwickelten

10 Danksagung

Ich möchte allen danken, die die Vollendung meiner Dissertation ermöglicht haben.

Frau Professor Dr. Daniela Berg danke ich für die optimalen Rahmenbedingungen, unter denen ich meine Dissertation in ihrer Klinik für Neurologie anfertigen durfte:

Herrn Professor Dr. Ralf Baron möchte ich danken, Teil seines Teams werden zu dürfen und meine Dissertation in seiner Abteilung ausarbeiten zu können. Professor Baron ist verantwortlich für einen Teamgeist, aus dem eine unterstützende, motivierende und inspirierende Atmosphäre für jeden, der dort arbeitet, erzeugt wird.

Ich danke dem gesamten Team der Sektion Neurologische Schmerzforschung und -therapie für das außergewöhnlich herzliche Arbeitsklima und die stets herrschende Hilfsbereitschaft.

Frau PD Dr. Klarissa Stürner danke ich für die Auswertung der Liquores und die geduldige Hilfe beim Verstehen der durchflusszytometrischen Analyse.

Den Mitarbeitern der durchflusszytometrischen Abteilung des Zentrallabors danke ich für die spontane und stets zuverlässige Durchführung der Durchflusszytometrie.

Den Mitarbeitern des Dr. Mildred-Scheel-Hauses mit den Schwerpunkten Hämatologie und Onkologie danke ich für die Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Philipp Hüllemann. Im klassischen Sinne eines Mentors hat er mir stets mit Rat und Tat zur Seite gestanden und mir Mut gemacht, wenn wieder einmal ein paar Zellen zu viel gestorben waren. Über die wissenschaftliche Hilfe und seinen unermüdlichen Einsatz hinaus erlebte ich bei ihm eine wohlwollende, warmherzige und freundschaftliche Zusammenarbeit auf Augenhöhe.

Für die finanzielle Unterstützung danken wir dem Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF). Außerdem danke ich allen Patienten, die bereit waren, an der Studie teilzunehmen.

Ich danke meinen Eltern und meinen Geschwistern; unser familiärer Zusammenhalt gab mir während meines Studiums und der Ausarbeitung dieser Dissertation stets Rückhalt und Vertrauen. Insbesondere danke ich meinem Papa, da er zu jeder Uhrzeit sprachliche Imponderabilien beseitigen konnte.

Meinem langjährigen Freund, dem Künstler Wolfi Defant, danke ich für die Möglichkeit, sein für diesen Zweck erstelltes Kunstwerk als Titelbild der Zeitschrift PAIN zu veröffentlichen.

Mein tiefster Dank gilt meinem Ehemann Philipp und meiner Tochter Ida Marie. Philipp, ich danke dir von ganzem Herzen für deine uneingeschränkte Unterstützung und dein Verständnis, welche mir Ruhe und Sicherheit beim Erstellen dieser Arbeit gegeben haben. Danke, dass ich von dir immer die Zeit bekommen habe, die ich brauchte.

Meine liebe Ida, ich bedanke mich bei dir für die Zeit, die du mich entbehren musstest. Du gibst mir Leichtigkeit und die entscheidenden Glücksmomente, die mein Leben reich machen.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Josephine Inés Lassen
E-mail: josephine.lassen@uksh.de
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Ausbildung:

Seit 01/2020 Assistenzärztin in der Sektion Neurologische Schmerzforschung und -therapie

2012 – 2019 Medizinstudium an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

2003 - 2012 Heinrich-Heine-Schule in Heikendorf

1999 - 2003 Grundschule „An der Bake“ Mönkeberg

Promotion:

2016 - 2021 Dissertationsthema:
„Erforschung und Identifizierung unterschiedlicher Immunzellpopulationen und ihre Rolle bei der Entstehung chronischer Schmerzen“

Publikationen:

- [5] CRPS: An Inflammatory Pain Condition? – A Case of Fluctuating Presence of CRPS
Josephine Lassen, Rainald Zeuner, Ralf Baron, Janne Gierthmühlen
Pain Medicine ahead of print **(2021)**
- [4] Protective role of natural killer cells in neuropathic pain conditions
Josephine Lassen*, Klarissa Hanja Stürner*, Janne Gierthmühlen, Justina Dargvainiene, Dorthe Kixmüller, Frank Leypoldt, Ralf Baron, Philipp Hüllemann
*geteilte Erstautorenschaft
PAIN (*angenommen*)
- [3] Rückenschmerz – neuropathisch, nozizeptiv oder beides?
Josephine Lassen, Janne Gierthmühlen, Ralf Baron
Nervenheilkunde **40, 97-216 (2021)**
- [2] Rheumatic diseases and neuropathic pain: Diagnosis and treatment
Lassen Josephine, Baron Ralf
Zeitschrift für Rheumatologie **80, 226-233 (2021)**
- [1] The early influence of COVID-19 pandemic-associated restrictions on pain, mood, and everyday life of patients with painful polyneuropathy
Dilara Kersebaum, Sophie-Charlotte Fabig, Manon Sendel, Juliane Sachau, **Josephine Lassen**, Stefanie Rehm, Philipp Hüllemann, Ralf Baron, Janne Gierthmühlen
Pain Reports **5, e858 (2020)**

Symposien:

- [1] „Neuroinflammation bei neurologischen Schmerzerkrankungen“
Josephine Lassen (Vorsitz), Klarissa Hanja Stürner, Franziska Denk
DGSS 2021, Mannheim
(*angenommen*)

Poster:

- [4] „Cold-evoked potentials in patients with polyneuropathy and Fabry disease“
Manon Sendel, **Josephine Lassen**, Sophie-Charlotte Fabig, Julia Forstenpointner, Dilara Kersebaum, Paul Möller, Maren Reimer, Sima Canaan-Kühl, Jens Gaedeke, Stefanie Rehm, Janne Gierthmühlen, Philipp Hüllemann, Ralf Baron
IASP Virtual World Congress on Pain (2021)
- [3] „Case Report - Entzündliche Triggerung und Perpetuierung eines CRPS“
Josephine Lassen, Rainald Zeuner, Ralf Baron, Janne Gierthmühlen
DGN (2020)
- [2] „Identifizierung und Untersuchung verschiedener Immunzellpopulationen und ihrer Rolle bei zentraler Sensibilisierung“
Josephine Lassen, Klarissa Stürner, Janne Gierthmühlen, Julia Forstenpointner, Frank Leypoldt, Ralf Baron, Philipp Hüllemann
DGSS (2020)
- [1] „Identification and study of different immune cell populations and their role in chronic pain“
Philipp Hüllemann*, **Josephine Lassen***, Julia Forstenpointner, Frank Leypoldt, Ralf Baron
**geteilte Erstautorenschaft*
IASP (2018)