

Aus dem Institut für experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neuropeptidausschüttung nach NO-Donator Infusion in der
Ratte

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jan Rodrigo Hoffmann

aus Weinheim

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. U. Reuter
2. Priv.-Doz. Dr. med. V. Limmroth
3. Priv.-Doz. Dr. med. G. Arnold

Datum der Promotion: 10.09.2007

Zusammenfassung

Aufgrund einer Vielzahl klinischer und experimenteller Studien wird die Aktivierung des trigeminalen Nervensystems als das pathophysiologische Korrelat der Migräne angesehen. Im experimentellen Tiermodell führt eine trigeminale Stimulation zu einer Sequenz von biochemischen Veränderungen in der Dura mater, einer der wenigen schmerz sensitiven intrakraniellen Strukturen, die in ihrer Gesamtheit als neurogene Inflammation zusammengefasst werden. Da Migräneattacken gelegentlich auch mit Symptomen wie Lakrimation und Rhinorrhoe einhergehen, ist davon auszugehen, dass zusätzlich eine Beteiligung des parasympathischen Nervensystems entstehen kann.

Das trigeminale Nervensystem lässt sich klinisch und experimentell zuverlässig mit NO-Donatoren aktivieren. Bei Migränepatienten lassen sich sowohl mit NO-Donatoren als auch durch die Gabe des Neurotransmitters *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) zuverlässig Migräneattacken auslösen. In welchem Zusammenhang NO-Donatoren und CGRP zueinander stehen, ist bislang allerdings unklar.

In dieser Arbeit wurde an einem in vivo Tiermodell an Ratten untersucht, ob die Infusion von NO-Donatoren wie *Glyceroltrinitrat* (GTN) einerseits über eine Aktivierung des trigeminalen Nervensystems zu einer Erhöhung der CGRP-Plasmakonzentration und andererseits über eine Aktivierung des parasympathischen Nervensystems zu einer Erhöhung der Plasmakonzentration des *vasoaktiven intestinalen Polypeptids* (VIP) im Blut der Vena jugularis führen.

Die NO-Donator-Infusion führte nicht zu einem Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration. Allerdings konnte ein Anstieg der VIP-Plasmakonzentration als Ausdruck einer Aktivierung des parasympathischen Nervensystems nachgewiesen werden. Damit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass NO-Donatoren in der Lage sind Kopfschmerzen über CGRP-unabhängige Mechanismen auszulösen.

Schlagworte: Migräne, Stickstoffmonoxid, Inflammation, Calcitonin gene-related peptide, Vasoaktives intestinales Polypeptid

Abstract

Activation of the trigeminal nerve system is the pathophysiological basis of migraine headache. In an experimental animal model this activation leads to several biochemical alterations which are mainly localized within the dura mater, one of the rare intracranial pain-sensitive structures, and are summarized as neurogenic inflammation. Neurogenic inflammation is seen today as the pathophysiological correlate of migraine attacks. As migraine attacks sometimes come along with parasympathetic symptoms it is feasible that, additionally, an activation of the parasympathetic system may occur in some migraine attacks.

NO-donors can efficiently activate the trigeminal system. Therefore, in migraine patients attacks can be triggered either by NO-donors or by the trigeminal neurotransmitter *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP). The way in which NO-donors and CGRP are related one to another is still unclear.

This study investigated on the basis of an in vivo animal model, if the infusion of NO-donors like *Glyceroltrinitrate* (GTN) can lead to an increase of the CGRP plasma concentration via the activation of the trigeminal system. Additionally, plasma concentrations of *vasoactive intestinal polypeptide* (VIP) were measured in the vena jugularis to determine if GTN leads to an activation of the parasympathetic nerve system.

The infusion of an NO-donor did not lead to an increase of the CGRP plasma concentration in the jugular vein, whereas as a result of parasympathetic activation it did lead to an increase of the VIP plasma concentration. In conclusion, the results of the investigation show that NO-donors are capable of inducing headache via a CGRP-independent mechanism.

Keywords: migraine, nitric oxide, inflammation, calcitonin gene-related peptide, vasoactive intestinal polypeptide

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Neuronale Versorgung der meningealen Gefäße	1
1.2	Pathophysiologie der Migräne - humane Befunde	3
1.3	Pathophysiologie der Migräne - tierexperimentelle Befunde	4
1.4	Stickstoffmonoxid (NO) und Migräne – humane Befunde	5
1.5	Stickstoffmonoxid (NO) und Migräne - tierexperimentelle Befunde	6
1.6	Stickstoffmonoxid (NO) und Cluster-Kopfschmerz	7
1.7	Fragestellungen	7
2	Material und Methoden	9
2.1	Tierpräparation	9
2.1.1	Präparation zur Messung der CGRP/VIP-Konzentration	9
2.1.2	Präparation zur Färbung der Dura mater und des Ganglion trigeminale	10
2.2	Medikamenteninfusion und Materialgewinnung	11
2.2.1	Gruppeneinteilung	11
2.2.2	Infusion und Probenentnahme	11
2.3	Analyse der CGRP-Konzentrationen	12
2.3.1	Bestimmung der CGRP-Plasmakonzentration	12
2.3.2	Immunhistochemische Analyse zur CGRP-Bestimmung in der Dura mater	13
2.4	Analyse der VIP-Konzentrationen	13
3	Ergebnisse	15
3.1	Physiologische Parameter der CGRP/VIP-Versuche	15
3.2	CGRP-Konzentrationen nach NO-Infusion	15
3.3	VIP-Messungen nach NO-Infusion	17
3.4	Immunhistochemische Analyse des CGRP in Dura mater	19
4	Diskussion	21
4.1	Anatomie des trigeminovaskulären Systems	22
4.2	Neurogene Inflammation	23
4.2.1	Plasmaproteinextravasation	23

4.2.2	Vasodilatation	24
4.3	Calcitonin gene-related peptide (CGRP)	26
4.4	NO und neurogene Inflammation	29
4.4.1	Humane Befunde	29
4.4.2	Tierexperimentelle Befunde	30
4.5	CGRP und neurogene Inflammation	31
4.5.1	Humane Befunde	31
4.5.2	Tierexperimentelle Befunde	32
4.6	Zusammenhang zwischen NO und CGRP	33
4.6.1	Humane Befunde	33
4.6.2	Tierexperimentelle Befunde	34
4.7	Zusammenhang zwischen NO und VIP	34
4.8	Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen anderer Studien	36
5	Zusammenfassung	45
	Tabellen	48
	Literaturverzeichnis	52
	Publikationen	60
	Erklärung an Eides Statt	61
	Danksagung	62
	Curriculum vitae	63

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Schematische Darstellung	8
Abbildung 2: CGRP-Plasmakonzentrationen in der Vena jugularis communis	17
Abbildung 3: VIP-Plasmakonzentrationen in der Vena jugularis communis	18
Abbildung 4: Präparat Dura mater 50µg GTN (x100)	19
Abbildung 5: Präparat Dura mater 50µg GTN (x250)	19
Abbildung 6: Präparat Dura mater 0,9% NaCl (x100)	20
Abbildung 7: Präparat Dura mater 0,9% NaCl (x250)	20
Abbildung 8: Präparat Dura mater 50µg GTN + 4µmol Capsaicin (x250)	20
Abbildung 9: Präparat Dura mater 0,9% NaCl + 4µmol Capsaicin (x250)	20
Tabelle 1: Physiologische Parameter CGRP-Versuche	48
Tabelle 2: Physiologische Parameter VIP-Versuche	48
Tabelle 3: CGRP-Plasmakonzentrationen	48
Tabelle 4: Vergleich innerhalb der CGRP-Gruppen	49
Tabelle 5: Vergleich zwischen den verschiedenen CGRP-Gruppen	49
Tabelle 6: VIP-Plasmakonzentrationen	50
Tabelle 7: Vergleich innerhalb der VIP-Gruppen	50
Tabelle 8: Vergleich zwischen den verschiedenen VIP-Gruppen	51

Abkürzungen und Begriffe:

ACh	Acetylcholin
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CL	Calcitonin receptor-like receptor
CSD	Cortical Spreading Depression
DEA-NONOate	Diethylamine-NONOate
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomographie
GTN	Glyceroltrinitrat
IHS	International Headache Society
L-NAME	L-Nitroarginin Methylester
m-CPP	meta-chlorophenylpiperazin
MABP	mittlerer arterieller Blutdruck (mean arterial blood pressure)
NaBH ₄	Natriumborhydrid
NK-1	Neurokinin-1
NKA	Neurokinin A
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NPY	Neuropeptid Y
PACAP	Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide
PBS	Phosphate Buffered Saline
PET	Positronen Emissions Tomographie
PKA	Proteinkinase A
RAMP	receptor activity modifying protein
RIA	Radioimmunoassay
SP	Substanz P
SPG	Ganglion sphenopalatinum
SSN	Nucleus salivatorius superior
TNC	Nucleus caudalis trigeminalis
VIP	vasoaktives intestinales Polypeptid
VR-1	Vanilloid-Rezeptor-1

1 Einleitung

Die Migräne ist eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen. Die 1-Jahres Prävalenz der Migräne liegt bei 10-12 % der Gesamtbevölkerung, wobei diese in der weiblichen Bevölkerung mit 15-18% deutlich höher liegt als in der männlichen, bei der sie ungefähr 6% beträgt (Rasmussen, 2001).

Klinisch zeigt sich die Migräne als ein attackenförmig auftretendes primäres Kopfschmerzsyndrom, das typischerweise mit autonomen Begleitsymptomen einhergeht. Ein wichtiges diagnostisches Kriterium der Migräne stellt der 4 bis 72 Stunden dauernde, unilaterale pulsierende Kopfschmerz starker Intensität dar, der durch körperliche Belastung akzentuiert wird. Zudem treten neben dem Kopfschmerz autonome Begleiterscheinungen in Form von Nausea und Vomitus auf. Darüber hinaus besteht während der Kopfschmerzepisoden zumeist eine Photo- und/oder Phonophobie, seltener auch eine Osmophobie (Headache Classification of the International Headache Society, 2004).

Nahezu ein Drittel der Patienten leidet zudem unter vorübergehenden fokal neurologischen Defiziten, der sog. Migräne-Aura (Launer, 1999). Die Migräne-Aura tritt meist unmittelbar vor dem Kopfschmerz auf und persistiert über einen Zeitraum von 5-60 Minuten. Unter den verschiedenen Typen der Migräne-Aura, ist die visuelle Aura, die in ca. 90% der Fälle besteht, am weitesten verbreitet (Rasmussen, 1992).

1.1 Neuronale Versorgung der meningealen Gefäße

Aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes der Migräne wird dem Nervus trigeminus eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie der Migräne zugeschrieben. Der Nervus trigeminus innerviert die Dura mater und die meningealen Blutgefäße strikt unilateral mit einem dichten Netz von schmerzempfindlichen unmyelinisierten C-Fasern und A δ -Fasern und macht diese so zu einer der wenigen schmerzempfindlichen intrakraniellen Strukturen. Die Zellkörper dieser primären trigeminalen Neurone liegen im ipsilateralen Ganglion trigeminale. Neurotransmitter dieses Systems sind *Calcitonin*

gene-related peptide (CGRP), *Substanz P* (SP) und *Neurokinin A* (NKA). Diese drei Neuropeptide besitzen stark vasodilatierende Eigenschaften, wobei CGRP mit einer vasodilatatorischen Potenz, die diejenige von SP um das 100-1000 -fache übersteigt, mit Abstand das wirksamste bekannte gefäßerweiternde Neuropeptid des Menschen ist (Gulbenkian, 2001; Edvinsson, 2004).

Bei Aktivierung des trigeminalen Systems kommt es zur Freisetzung von CGRP in die meningealen Gefäße und damit zu einer ausgeprägten Vasodilatation. Darüber hinaus kommt es zur Signalweiterleitung an sekundäre Neurone im gleichseitigen trigeminalen nucleus caudatus des Hirnstamms. Von dort aus wird das Signal auf Neurone höheren Grades übertragen, die zum Thalamus und dem primären sensorischen Kortex ziehen. Damit kommt der sensorischen Innervation eine besondere Rolle zu, da diese nozizeptive Signale in Richtung Hirnstamm weiterleiten und gleichzeitig vaskuläre Reaktionen hervorrufen kann. Aufgrund der neuronalen und vaskulären Effekte wird zur Beschreibung dieses Zusammenspiels in jüngster Zeit der Begriff des trigeminovaskulären Systems verwendet. Diesem System wird eine ursächliche Bedeutung bei der Entstehung des Migränekopfschmerzes zugeschrieben.

Neben dem trigeminalen System stellt das parasympathische System einen wichtigen Teil der neuronalen Versorgung der Meningen dar. Dieses hat seinen Ursprung in Zellkörpern, die im Hirnstamm, z.B. im Nucleus salivatorius superior, liegen. Von dort verlaufen die Neurone mit dem Nervus facialis zum Ganglion sphenopalatinum, sowie zum Ganglion oticum, in denen sie umgeschaltet werden, um dann, wie das trigeminale System, im perivaskulären Nervengeflecht der großen meningealen Blutgefäße zu enden. Der bedeutendste Neurotransmitter dieses Systems ist das *vasoaktive intestinale Polypeptid* (VIP). Weitere parasympathische Neurotransmitter sind *Acetylcholin* (ACh) und *Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide* (PACAP). Zudem ist hier eine Aktivität der *NO-Synthase* (NOS) nachgewiesen worden (Edvinsson, 1994; Gulbenkian, 2001). Das parasympathische System besitzt ebenfalls vasodilatierende Eigenschaften und ist maßgeblich an der Entstehung des Cluster-Kopfschmerzes beteiligt. Seine Rolle in der Pathophysiologie der Migräne ist bislang weitgehend unklar.

Das sympathische Nervensystem stellt einen weiteren Teil der neuronalen Versorgung der Meningen. Für die Pathophysiologie der Migräne ist *Neuropeptid Y* (NPY) der wichtigste Neurotransmitter in diesem System. Das sympathische Nervensystem besitzt

vasokonstriktorische Eigenschaften und hat damit, physiologisch gesehen, die Aufgabe, den Funktionen des trigeminalen und des parasympathischen Nervensystems entgegenzuwirken.

1.2 Pathophysiologie der Migräne - humane Befunde

Erste klinisch-experimentelle Hinweise für die Schlüsselrolle des trigeminalen Nervensystems lieferte die Erkenntnis, dass während einer Migräneattacke die Konzentration des trigeminalen Neurotransmitters CGRP im Jugularvenenblut erhöht ist (Goadsby, 1990). Der Serotonin-Agonist ($5HT_{1B/1D}$) Sumatriptan, der seit einigen Jahren erfolgreich in der Therapie der Migräne eingesetzt wird, führt parallel zur Remission der Kopfschmerzen zu einer Normalisierung der erhöhten CGRP-Plasmakonzentration (Goadsby, 1993).

Andererseits löst die Infusion von CGRP sowohl bei Migränepatienten als auch bei gesunden Probanden Kopfschmerzen aus. Allerdings zeigen diese in beiden Gruppen unterschiedliche Verhaltensmuster auf. In beiden Gruppen löst CGRP innerhalb von 40 Minuten nach Beginn der CGRP-Infusion einen leichten Kopfschmerz (sofortiger Kopfschmerz) aus, der im Mittel 30 Minuten anhält. Bei Migränepatienten zeigt sich darüber hinaus innerhalb von 12 Stunden nach Beginn der CGRP-Infusion ein intensiverer Kopfschmerz (verzögerter Kopfschmerz), der die Charakteristika der Migräne ohne Aura erfüllt (Lassen, 2002; Headache Classification of the International Headache Society, 2004). Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Erhöhung von CGRP nicht nur für eine begleitende Gefäßreaktion verantwortlich ist, sondern direkt mit der Entstehung des Migränekopfschmerzes zusammenhängen muss.

Die große Bedeutung von CGRP in der Pathophysiologie der Migräne wird aber vor allem durch die Wirksamkeit des neuen CGRP-Rezeptorantagonisten BIBN4096BS verdeutlicht. Die Infusion dieser Substanz führte bei 66% der behandelten Patienten zu einer Unterdrückung des Migränekopfschmerzes (Olesen, 2004). Damit konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass CGRP eine Schlüsselrolle in der Schmerzentstehung bei Migräne zukommt.

1.3 Pathophysiologie der Migräne - tierexperimentelle Befunde

Im Rahmen einer experimentellen Stimulation trigeminaler Neurone, kommt es zur Aktivierung des Ganglion trigeminale und dessen Efferenzen, die zu den perivaskulären Nervenendigungen der großen Hirnhautgefäße führen. Diese Aktivierung führt zur Freisetzung von vasoaktiven Neuropeptiden in das Gefäßlumen der Hirnhautgefäße. Das bedeutendste Neuropeptid in diesen experimentellen Untersuchungen ist *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP). CGRP führt über die Bindung an den CGRP-1-Rezeptor über noch nicht vollständig aufgeklärte Mechanismen zu einer ausgeprägten Vasodilatation. Daneben befinden sich CGRP-Rezeptoren auf trigeminalen C-Fasern, womit CGRP in der Lage ist trigeminale Fasern direkt zu aktivieren.

Substanz P (SP), die ebenfalls aus Nerven des trigeminalen Systems ausgeschüttet wird, führt über Bindung an den *Neurokinin-1-Rezeptor* (NK-1-Rezeptor), genau wie *Neurokinin A* (NKA), zu einer Plasmaproteinextravasation in die umliegende Dura mater (Markowitz, 1987). Beide Phänomene sind Bestandteile der *neurogenen Inflammation*. Als Zeichen einer akuten und verzögerten inflammatorischen Reaktion in der Dura mater treten eine Reihe morphologischer Veränderungen, wie eine Mastzellaktivierung und eine Blutplättchenaggregation, auf (Dimitriadou, 1991, 1992). Auf molekularbiologischer Ebene zeigt sich eine vermehrte Expression von c-fos, einem Marker für neuronale Aktivierung im trigeminalen nucleus caudalis des Hirnstamms (Mitsikostas, 2001) sowie eine Hochregulation von nNOS, der neuronalen Form der NO-Synthase, im Ganglion trigeminale. (Knyihár-Csillik, 1999)

Zur Aufklärung dieser Zusammenhänge führte eine Reihe verschiedener experimenteller Ansätze. Eines dieser Verfahren ist die elektrische Stimulation des Ganglion trigeminale. Dabei wird über eine bipolare Elektrode, die in das Ganglion trigeminale eingebracht wird, das Ganglion stimuliert. An experimentellen Tiermodellen konnte mit dieser Methode nachgewiesen werden, dass nach der elektrischen Stimulation CGRP aus trigeminalen Afferenzen (Goadsby, 1988) sowie aus meningealen Strukturen (Ebersberger, 1999) freigesetzt wird, wodurch es zu einem Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration im Jugularvenenblut kommt (Limmroth, 2001). Im Zuge der elektrischen Stimulation des Ganglion trigeminale kommt es zu einer Dilatation von meningealen Gefäßen (Wei, 1992; Williamson, 1997), welche durch den peptidergen CGRP-Antagonisten CGRP₍₈₋₃₇₎ teilweise antagonisiert werden kann (Wei,

1992; Kurosawa, 1995). Daraus folgt, dass die Vasodilatation nach elektrischer Stimulation des Ganglion trigeminale zumindest partiell über CGRP vermittelt wird.

Die Infusion von Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) stellt eine Möglichkeit zur chemischen Aktivierung des trigeminalen Systems dar. Capsaicin aktiviert den hitzesensiblen *Vanilloid-Typ-1-Rezeptor* (VR-1-Rezeptor) der sich auf unmyelinisierten trigeminalen C-Fasern oder dünn myelinisierten A δ -Fasern kleiner und mittlerer Größe befindet. Durch diese Aktivierung kommt es zur Freisetzung von CGRP, die letzten Endes zu einer Vasodilatation meningealer Gefäße führt. Neben der CGRP-Freisetzung kommt es zur Ausschüttung von proinflammatorischen Neuropeptiden, wie SP und NKA, die ihrerseits eine Extravasation von Plasmaproteinen in der Dura mater bewirken (Akerman, 2003; Markowitz, 1987).

1.4 Stickstoffmonoxid (NO) und Migräne – humane Befunde

Seit vielen Jahren ist bekannt, dass Stickstoffmonoxid (NO) Migräneattacken auslösen kann. Dieser Zusammenhang wurde erstmals vor mehr als 100 Jahren an Arbeiterinnen beobachtet, die in Sprengstoff produzierenden Unternehmen mit Nitroglyzerin, einem NO-Donator, arbeiteten. Im Vergleich zur Normalbevölkerung zeigte sich bei den Arbeiterinnen ein vermehrtes Auftreten von Kopfschmerzen und Migräne (Trainor, 1966).

Da NO durch seine vasodilatatorische Funktion einen wichtigen stabilisierenden Einfluss auf die Durchblutung hat und unter bestimmten pathologischen Umständen, wie Entzündung oder Ischämie, u.a. vermehrt im Endothel synthetisiert wird, erscheint ein Zusammenhang zwischen NO und den vaskulären Veränderungen während einer Migräneattacke durchaus wahrscheinlich.

Der Zusammenhang zwischen NO und Migräne wurde erstmals von Olesen et al. systematisch untersucht. In diesen Studien wurde gezeigt, dass die Infusion des NO-Donators *Glyceroltrinitrat* (GTN) im Menschen eine Kopfschmerzattacke auslöst. Diese weist eine große Ähnlichkeit zu der CGRP-induzierten Kopfschmerzattacke auf. Sie

zeigt sich ebenfalls zweiphasig mit einer ersten Phase (sofortiger Kopfschmerz) nach ca. 30 Minuten, die sowohl bei Migränepatienten als auch bei gesunden Probanden der Kontrollgruppe auftritt. Hierbei handelt es sich um einen leichten Kopfschmerz, der nicht die IHS-Kriterien für Migräne erfüllt. Diese erste Phase dauert im Mittel 30 Minuten. Die zweite Phase (verzögerter Kopfschmerz) setzt nach etwa vier Stunden ein, hält einige Stunden an und erfüllt die IHS-Kriterien einer Migräne ohne Aura (Olesen, 1993; 1994). Diese Migräneattacke ereignet sich im Vergleich zum sofortigen Kopfschmerz nur bei Migränepatienten, nicht bei gesunden Probanden der Kontrollgruppe.

1.5 Stickstoffmonoxid (NO) und Migräne - tierexperimentelle Befunde

Eine Möglichkeit zur tierexperimentellen Untersuchung der Pathophysiologie der Migräne, insbesondere des Zusammenhangs zwischen Stickstoffmonoxid (NO) und Migräne, stellt die chemische Stimulation des trigeminalen Systems mit NO-Donatoren dar. Der NO-Donator *Glyceroltrinitrat* (GTN), sowie der synthetische NO-Donator *Diethylamin-NONOate* (DEA-NONOate) haben sich in verschiedenen gut etablierten tierexperimentellen Modellen für diese Fragestellung als besonders geeignet erwiesen. In einer Reihe von in-vitro Experimenten wurde auf die Dura mater von hemikraniektomierten Rattenschädeln ein NO-Donator (GTN, DEA-NONOate) in hohen Dosen lokal appliziert. Diese chemische Stimulation der Dura mater führte über eine Freisetzung von CGRP zu einer Vasodilatation (Strecker, 2002). Bei Tieren die einseitig einer trigeminalen Ganglionektomie unterzogen wurden, zeigte sich nach NO-Donator-Infusion eine signifikant abgeschwächte Vasodilatation im Vergleich zur innervierten Seite (Wei, 1992). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass die CGRP-Ausschüttung mit einer Aktivierung des trigeminalen Systems verbunden ist. Wie bei der elektrischen Stimulation blockiert auch bei der chemischen Stimulation der peptiderge CGRP-Antagonist CGRP₍₈₋₃₇₎ die chemisch induzierte Vasodilatation (Wei, 1992). Daneben konnte in der gleichen Versuchsserie nachgewiesen werden, dass CGRP im Vergleich zu NO keine Bedeutung für die Erhaltung des Ruhe-Blutflusses hat, da die alleinige Infusion von CGRP₍₈₋₃₇₎ zu keiner Veränderung des Gefäßdurchmessers führt. (Wei, 1992; Strecker, 2002; Brain, 2004; Storer, 2004). Der neue CGRP-Rezeptorantagonist

BIBN4096BS besitzt experimentell eine gleichartige Wirkung wie CGRP₍₈₋₃₇₎, wobei er im Vergleich zu dem peptidergen CGRP-Antagonisten nicht nur eine größere Affinität zum CGRP-1-Rezeptor und damit eine größere inhibitorische Potenz als dieser aufweist, sondern sich durch seine nicht peptiderge Struktur auch zum Einsatz am Menschen eignet.

1.6 Stickstoffmonoxid (NO) und Cluster-Kopfschmerz

NO-Donatoren sind nicht nur in der Lage typische Migräneattacken bei Migränepatienten, sondern auch typische Cluster-Attacken bei Cluster-Patienten auszulösen (Costa, 2003). Analog zum CGRP bei Migränekopfschmerz ist der Nachweis von erhöhten Plasmakonzentrationen des *vasoaktiven intestinalen Polypeptids* (VIP) im Blut der Vena jugularis bei Cluster-Attacken gelungen (Goadsby, 1994; Edvinsson, 1998), was für eine Aktivierung des parasympathischen Nervensystems spricht, zumal die GTN-induzierte, genau wie die spontane Cluster-Attacke, mit typischen autonomen Symptomen wie Rhinorrhoe, erhöhter Lakrimation und konjunktivaler Injektion einhergeht. Damit ist GTN nicht nur in der Lage das trigeminale, sondern auch das parasympathische Nervensystem zu aktivieren.

1.7 Fragestellungen

In der nachfolgenden Forschungsarbeit wurde versucht, relevante Fragen zum Verständnis der Pathophysiologie der Migräne zu klären. In mehreren Publikationen ist ein möglicher Zusammenhang zwischen *Stickstoffmonoxid* (NO) und Migränekopfschmerz sowie zwischen *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) und Migränekopfschmerz beschrieben worden. Trotz der sich mehrenden Hinweise, dass beide Substanzen in der Pathophysiologie der Migräne eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen ist bislang unklar, in welchem Verhältnis NO und CGRP zueinander stehen.

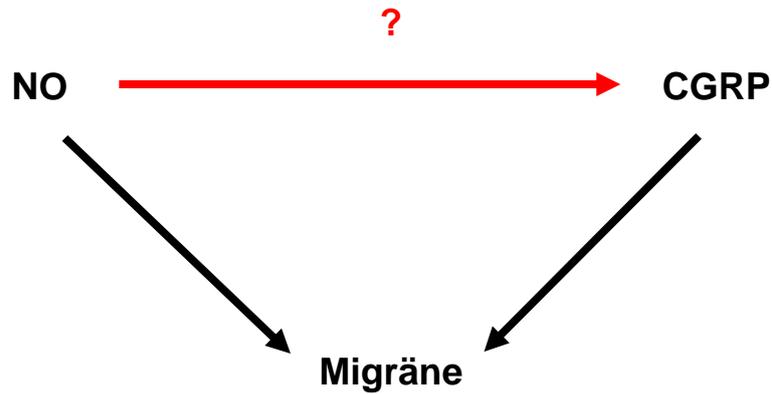


Abb.1: Schematische Darstellung der bekannten Zusammenhänge zwischen NO, CGRP und Migränekopfschmerz

Zur Klärung dieser Zusammenhänge sollen in der nachfolgenden Arbeit folgende Fragestellungen beantwortet werden:

- 1. Führt die über einen NO-Donator hervorgerufene chemische Stimulation des trigeminalen Nervensystems zu einer Ausschüttung von Neuropeptiden aus den perivaskulären Nervenendigungen und damit zu einem signifikanten Anstieg von *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) im Jugularvenenblut?**
- 2. Sind NO-Donatoren in der Lage, eine Aktivierung des parasympathischen Nervensystems hervorzurufen und damit zu einem signifikanten Anstieg des *vasoaktiven intestinalen Polypeptids* (VIP) im Jugularvenenblut zu führen?**

2 Material und Methoden

2.1 Tierpräparation

2.1.1 Präparation zur Messung der CGRP/VIP-Konzentration

Alle Experimente wurden zuvor vom Landesamt für Gesundheitsschutz und Tierschutz in Berlin genehmigt (G0265/01). Insgesamt wurden für die vorliegende Studie 41 Ratten verwendet.

Für die Versuche wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Deutschland) mit einem Gewicht von 250-350g verwendet. Die Tiere wurden nach einer kurzen Isoflurannarkose mit einer intraperitonealen Gabe von 60mg/kg Körpergewicht Thiopental-Natrium (Trapanal[®], Altana) anästhesiert. Während der Versuche wurden bei Bedarf (Reaktion auf Schmerzreize in der Schwanzspitze) geringe Dosen nachappliziert.

Nach dem Auflegen der Tiere auf ein Heizkissen wurde die Körpertemperatur kontinuierlich rektal gemessen und auf $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Temperaturdaten wurden mit Hilfe eines Dateneinzugsprogramms über den ganzen Versuch hinweg aufgezeichnet.

Sobald die Tiere ausreichend anästhesiert waren, wurden sie tracheotomiert und mechanisch beatmet. Der inspiratorischen Luft wurde O_2 zugefügt, so dass der arterielle Sauerstoffpartialdruck in physiologischen Bereichen gehalten wurde. Darüber hinaus wurde die endexpiratorische CO_2 -Konzentration kontinuierlich überwacht.

Nachdem die Tiere vollständig anästhesiert und beatmet waren, wurde die Haut an der jeweiligen Schnittstelle mit 5% iodhaltiger Lösung desinfiziert. Nach einem gezielten Hautschnitt parallel zum Leistenband wurde die Arteria femoralis sowie die Vena femoralis freipräpariert. Im Anschluss wurde den Tieren jeweils ein Katheter (Portex Polythene Tubing PE 0,58 mm ID, neoLab GmbH) in die rechte Femoralarterie sowie in die rechte Femoralvene eingeführt. Über den arteriellen Zugang wurde die kontinuierliche Messung und Aufzeichnung des arteriellen Blutdrucks durchgeführt. Die Substitution von Flüssigkeit erfolgte über den venösen Zugang.

Darüber hinaus erhielten die Tiere einen Katheter in die linke Femoralarterie um zwischenzeitlich eine Entnahme von arteriellem Blut zur Blutgasanalyse (AVL

Compact I) durchführen zu können, ohne die Aufzeichnung des arteriellen Blutdrucks unterbrechen zu müssen. Nach dem Einsetzen der Polyethylenkatheter wurde der Hautschnitt zugenäht, um Wärme- sowie Feuchtigkeitsverluste auf ein Minimum zu reduzieren.

Für die Entnahme der Blutproben zur Analyse auf CGRP und VIP wurde die linke Vena jugularis communis freipräpariert. Nach der Freilegung wurde das Gefäß mit einem Katheter kanüliert (Portex Polythene Tubing PE 0,86 mm ID, neoLab GmbH). Um die Durchgängigkeit des Zugangs über den gesamten Versuchsablauf hinweg zu garantieren, wurde der Schlauch mit 10 % heparinhaltiger Kochsalzlösung gefüllt.

In einem letzten Schritt wurde zur Verabreichung des GTN, DEA-NONOate, Capsaicin oder Kochsalzlösung die linke Arteria carotis communis kanüliert (Portex Polythene Tubing PE 0,58 mm ID, neoLab GmbH).

2.1.2 Präparation zur Färbung der Dura mater und des Ganglion trigeminale

Nach Abschluss der Blutentnahmen wurde die Anästhesie der Tiere auf die sublethale Dosis von 100mg/kg Körpergewicht Thiopental-Natrium (Trapanal[®], Altana) inkrementiert.

Im Anschluss wurde durch einen gezielten Schnitt, der unterhalb des Diaphragmas ansetzte und bis in beide Axillarregionen geführt wurde, der gesamte Brustkorb eröffnet. Nach Einsetzen eines Katheters durch die linke Herzkammer in die Aorta ascendens wurde die Ratte zunächst mit 50 ml NaCl 0,9%, dann mit 350 ml Paraformaldehyd transkardial perfundiert. Nach Abschluss der transkardialen Perfusion wurde die Dura mater sowie das linke und rechte Ganglion trigeminale entnommen und dann in Paraformaldehyd bei +4°C bis zur immunhistochemischen Färbung gelagert.

2.2 Medikamenteninfusion und Materialgewinnung

2.2.1 Gruppeneinteilung

Die Tiere wurden zur Behandlung und Analyse in mehrere Gruppen eingeteilt. Zur CGRP-Messung wurden vier Gruppen gebildet. In der ersten Gruppe wurde GTN in einer Dosis von $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ($n=7$), in der zweiten wurde GTN in einer Dosis von $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ($n=7$), in der dritten wurde DEA-NONOate in einer Dosis von $25\text{nmol}/\text{kg}$ ($n=4$) und in der vierten Gruppe wurde NaCl 0,9% (Vehikel) ($n=8$) über 30 Minuten über den entsprechenden Katheter in die linke Arteria carotis infundiert.

Zur VIP-Messung wurden die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt. Die erste Gruppe erhielt GTN in einer Dosis von $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ($n=8$), die zweite Gruppe erhielt Glucose 5% (Vehikel) ($n=7$) über 30 Minuten über den entsprechenden Katheter in die linke Arteria carotis.

Als Positivkontrolle wurde einigen Tieren aus jeder Gruppe (CGRP: Gruppe 1 $n=3$, Gruppe 2 $n=2$, Gruppe 3 $n=4$, Gruppe 4 $n=2$; VIP: Gruppe 1 $n=3$, Gruppe 2 $n=3$) nach der 35-Minuten-Blutentnahme ein Bolus Capsaicin in einer Dosis von $4\mu\text{mol}/\text{kg}$ über den Katheter der linken Arteria carotis injiziert.

2.2.2 Infusion und Probenentnahme

30 Minuten nach Abschluss der Tierpräparation wurde mit der kontinuierlichen Aufzeichnung der Temperatur bzw. des arteriellen Blutdrucks begonnen. Zwei Minuten später wurde der Ausgangswert (Baseline) von CGRP bzw. VIP bestimmt. Dafür wurde Blut aus der linken Vena jugularis communis in ein bei -20°C gelagertes Eppendorf-Gefäß gefüllt, welches EDTA ($1\text{mg}/\text{ml}$ Blut) sowie den Proteaseinhibitor Aprotinin ($0,55\text{ TIU}/\text{ml}$ Blut) enthielt. Nach Abnahme von 1-1,5 ml Blut wurde dieses bei 3°C und 3330 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Plasma entnommen und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

15 Minuten nach Abnahme des Baseline Wertes wurde die Infusion des Medikamentes (GTN $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, GTN $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ oder DEA-NONOate $25\text{nmol}/\text{kg}$) oder des Vehikels gestartet und über 30 Minuten aufrechterhalten. Blutproben wurden dann 2, 15 und 35 Minuten nach Beginn der Infusion, wie zuvor beschrieben, entnommen und gelagert.

Um den Effekt des Volumenverlusts möglichst gering zu halten, wurde nach den ersten zwei Blutentnahmen jeweils 1 ml NaCl 0,9% verabreicht.

Bei einigen Tieren jeder Gruppe wurde als Positivkontrolle nach der letzten Blutentnahme über die Arteria carotis ein Bolus Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide, Sigma) in einer Dosis von 4 $\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht verabreicht und unmittelbar danach eine Blutprobe entnommen.

Im Anschluss wurden die Tiere, wie oben beschrieben, transkardial perfundiert und das gewonnene Material bei +4°C gelagert.

2.3 Analyse der CGRP-Konzentrationen

2.3.1 Bestimmung der CGRP-Plasmakonzentration

Am Tag der Analyse wurden die Proben mit 1% Trifluoressigsäure angesäuert um dann mit Hilfe der Sep-Pak-C18-Kartusche (Waters) extrahiert zu werden. Das Eluat wurde dann über eine Gefriertrocknung konzentriert und dann in Radioimmunoassay-Buffer gelöst. Die CGRP-Konzentrationen wurden anschließend mit einem ^{125}I -Radioimmunoassay (Bachem) nach der Anleitung des Herstellers bestimmt. Die Radioaktivität und damit die CGRP-Konzentration wurde anhand eines Gamma Counters ermittelt (Wallac Gamma master 1277, PerkinElmer Life and Analytical Sciences).

Die CGRP-Plasmakonzentration wurde in fmol/ml bestimmt. Zur statistischen Auswertung wurden die Daten in ein Statistikprogramm (SPSS 11.5, SPSS Inc.) übertragen. Zunächst wurden die Daten anhand des Kolmogorov-Smirnov-Tests auf ihre Normalverteilung überprüft. Für keine der Experimentalbedingungen konnte eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung nachgewiesen werden ($p \geq 0,541$). Zum Vergleich der CGRP-Plasmakonzentrationen innerhalb einer Behandlungsgruppe erfolgte die analytische Statistik daher über einen T-Test bei gepaarten Stichproben. Zum Vergleich zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen wurde die analytische Statistik über einen T-Test für unabhängige Stichproben (T-Test nach Student) durchgeführt.

2.3.2 Immunhistochemische Analyse zur CGRP-Bestimmung in der Dura mater

Zur immunhistochemischen Färbung von CGRP wurde die in Paraformaldehyd bei 4°C gelagerte Dura mater aus ihrer Konservierungsflüssigkeit entnommen. Daraufhin wurde sie zunächst vom Schädelknochen entfernt und dann 30 Minuten mit 0,1 molarem PBS, pH 7,4 (*Dulbecco's Phosphate Buffered Saline*, Sigma) gewaschen. In einem nächsten Schritt wurde sie 30 Minuten in 0,3% H₂O₂ gelegt, um dann erneut mit 0,1 molarem PBS über 20 Minuten gewaschen zu werden. Im Anschluss wurde das Präparat 15 Minuten lang mit 0,1% *Natriumborhydrid* (NaBH₄) in PBS behandelt. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde die Dura mater in 0,05% Phenylhydrazin, 10% Serum, 0,3% Triton-x-100 und PBS gelegt. Danach wurde ein weiteres Mal mit PBS gewaschen, um dann mit 10% Serum und 0,3% Triton-x-100 in 0,1 molarem PBS für 2 Stunden bei 4°C blockiert zu werden. Anschließend wurde der 1. Antikörper (Rabbit Anti-CGRP, Sigma C8198) in einer Konzentration von 1:200 mit 3% Serum und 0,3% Triton-x-100 in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde der ungebundene Antikörper über 30 Minuten mit 0,1 molarem PBS ausgewaschen, damit im Anschluss der 2. Antikörper (FITC Donkey Anti-Rabbit, Jackson Immuno Research 771-095-152) in einer Konzentration von 1:300 zusammen mit 3% Serum und 0,3% Triton-x-100 in 0,1 molarem PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert werden konnte. Als letztes wurde der ungebundene Antikörper erneut mit 0,1 molarem PBS über 30 Minuten ausgewaschen. Nach dem Auftragen der Dura mater auf einen Objektträger wurde das Fluoreszeinthiocyanat (FITC) mit Blaulicht (492 nm) angeregt, um dann das gebundene CGRP im Fluoreszenzmikroskop identifizieren zu können.

2.4 Analyse der VIP-Konzentrationen

Die Analyse der VIP-Konzentrationen im Serum erfolgte anhand eines Radioimmunoassays (Phoenix Pharmaceuticals), die Durchführung nach dem gleichen Verfahren der CGRP-Analyse. Die Detektionsgrenze für VIP lag bei 4,3 pg/tube.

Die statistische Auswertung wurde analog zur Auswertung der CGRP-Konzentrationen vorgenommen. Auch hier konnte über den Kolmogorov-Smirnov-Test in keiner der

Behandlungsgruppen eine signifikante Abweichung von der Normalverteilung nachgewiesen werden ($p \geq 0,440$). Die analytische Statistik zwecks Vergleichs innerhalb der Gruppen sowie zwecks Vergleichs unter den Gruppen wurde ebenfalls über den T-Test bei gepaarten Stichproben bzw. den T-Test für unabhängige Stichproben (T-Test nach Student) erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Physiologische Parameter der CGRP/VIP-Versuche

Aufgrund der hämodynamischen Auswirkungen von GTN wurden während des gesamten Versuchsablaufs der systemische arterielle Blutdruck konstant sowie die arteriellen Blutgase in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Die Mittelwerte der einzelnen physiologischen Parameter sind in den im Anhang aufgeführten Tabellen (Tabelle 1, Tabelle 2) dargestellt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der *systemische arterielle Blutdruck* (MABP) sowohl bei der mit GTN 2µg/kg/min behandelten Gruppe, als auch bei der mit DEA-NONOate behandelten Gruppe im Normbereich lag. Bei der mit GTN 50µg/kg/min behandelten Gruppe kam es mit Ausnahme der Infusionszeit nur zu geringen Abnahmen des Blutdrucks. Lediglich während der Blutentnahmen kam es in allen Gruppen aufgrund des Flüssigkeitsverlustes zu einem transienten Abfall des MABP, der sich nach wenigen Minuten selbständig wieder ausgeglichen hatte. Körpertemperatur, pCO₂, pO₂ und pH lagen in allen Gruppen über den ganzen Versuch hinweg im Normbereich.

3.2 CGRP-Konzentrationen nach NO-Infusion

Nach Infusion eines NO-Donators (GTN bzw. DEA-NONOate) in den verschiedenen Dosierungen über jeweils 30 Minuten wurde nach 2, 15 und 35 Minuten aus der Vena jugularis Blut entnommen und auf seine CGRP-Konzentration analysiert. Die Kontrollgruppe erhielt anstelle eines NO-Donators eine 0,9% NaCl Infusion über 30 Minuten.

Innerhalb der mit GTN behandelten Gruppen war im zeitlichen Verlauf zu keinem der erfassten Zeitpunkte ein signifikanter CGRP-Anstieg im Vergleich zum Ausgangswert vor NO-Donator-Infusion (Baseline) nachweisbar (siehe Abbildung 2, Tabelle 4). In der mit DEA-NONOate behandelten Gruppe zeigte sich im Vergleich zum Ausgangswert sowohl nach 15 Minuten als auch nach 35 Minuten ein statistisch signifikanter Abfall der

CGRP-Konzentration (6,46 fmol/ml vs. 4,89 fmol/ml [15 min; n=4; p=0,027] bzw. 5,24 fmol/ml [35 min; n=4; p=0,020]). Auch in der mit NaCl 0,9% behandelten Kontrollgruppe zeigte sich eine im zeitlichen Verlauf auftretende Abnahme der CGRP-Plasmakonzentration (7,36 fmol/ml vs. 6,04 fmol/ml [2 min; n=8; p=0,008] bzw. 6,10 fmol/ml [15 min; n=8; p=0,006] bzw. 5,76 fmol/ml [35 min; n=8; p=0,015]). Diese Konzentrationsabnahmen sind vermutlich auf Verdünnungseffekte zurückzuführen, so dass sich zusammenfassend festhalten lässt, dass bei keiner der mit NO-Donatoren behandelten Gruppen ein signifikanter Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration nachweisbar war.

Gleiches gilt für den direkten Vergleich der einzelnen Abnahmezeitpunkte der verschiedenen Behandlungsgruppen, d.h. zwischen NO-Donator behandelten Tieren und NaCl behandelten Kontroll-Tieren. Auch hier ließen sich zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen nachweisen (siehe Abbildung 2, Tabelle 5).

Um den korrekten Sitz des Katheters der Vena jugularis sowie die Funktionsfähigkeit und die korrekte Anwendung des Radioimmunoassay Kits zu überprüfen (Positivkontrolle), wurden in einige Ratten aus jeder Gruppe Capsaicin in die Arteria carotis injiziert, da dieses über den VR-1-Rezeptor einen CGRP-Anstieg in der Vena jugularis auslöst (Akerman, 2003). In der sofort im Anschluss durchgeführten Blutentnahme zeigte sich ein deutlicher Anstieg des CGRP-Spiegels im Jugularvenenblut (Abb. 2; Tabellen 3 und 4) ($7,80 \pm 2,43$ fmol/ml [GTN $2\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$; n=7; p=0,006] bzw. $6,94 \pm 2,33$ fmol/ml [GTN $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$; n=7; p=0,004] vs. $34,75 \pm 15,64$ fmol/ml [Capsaicin, n=11]). Damit wurde ausgeschlossen, dass die Ergebnisse durch einen inkorrekten Sitz des Katheters in der Vena jugularis oder auch eine fehlerhafte Anwendung bzw. eine mangelnde Funktionsfähigkeit des Radioimmunoassay Kits verfälscht wurden.

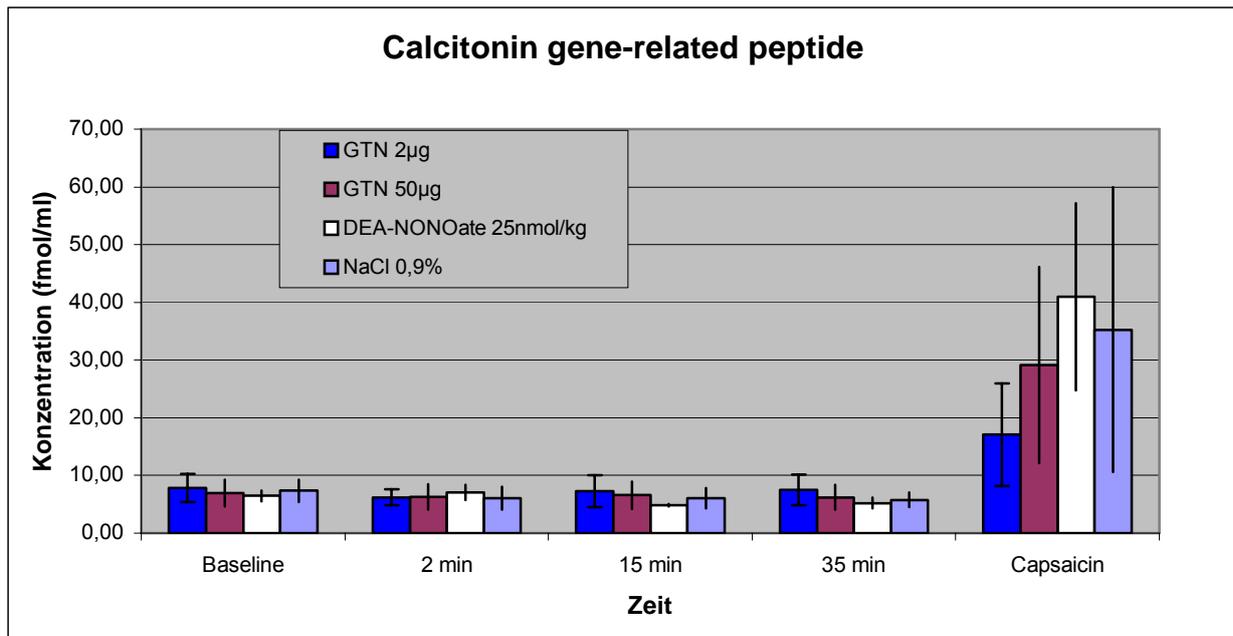


Abb.2: CGRP-Plasmakonzentrationen in der Vena jugularis communis (Angaben in fmol/ml)

3.3 VIP-Messungen nach NO-Infusion

Um den Effekt von NO auf das parasympathische Nervensystem näher zu untersuchen, wurde nach Beginn der Infusion eines NO-Donators (GTN 50µg/kg/min über 30 Minuten) bzw. einer 5% Glucoselösung (Kontrollgruppe) zum Zeitpunkt von 2, 15 und 35 Minuten Blut aus der Vena jugularis entnommen. Zunächst zeigte sich innerhalb der NO-Donator-Gruppe ein kontinuierlicher Abfall der VIP-Plasmakonzentration, der zum Zeitpunkt von 15 Minuten im Vergleich zum Ausgangswert (Baseline) statistisch signifikant ist (9,38 fmol/ml vs. 5,83 fmol/ml, n=8; p=0,010). Nach diesem anfänglichen Abfall zeigte sich nach 35 Minuten ein leichter Anstieg des VIP. Damit war zu diesem Zeitpunkt kein statistisch signifikanter Unterschied zum Ausgangswert mehr nachweisbar (9,38 fmol/ml vs. 6,64 fmol/ml, n=8; p=0,092).

Im Vergleich dazu nahm in der Kontrollgruppe die VIP-Plasmakonzentration bis zum Zeitpunkt von 35 Minuten kontinuierlich ab, so dass in dieser Gruppe sowohl nach 15 als auch nach 35 Minuten ein statistisch signifikanter Unterschied zum Ausgangswert nachweisbar war (7,82 fmol/ml vs. 4,93 fmol/ml [15 min; n=7; p=0,029] bzw. 4,20 fmol/ml [35 min; n=7; p=0,041]) (Abbildung 3, Tabellen 6 und 7).

Der direkte Vergleich der einzelnen Zeitpunkte der Verumgruppe mit den jeweils entsprechenden Zeitpunkten der Kontrollgruppe zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abbildung 3, Tabelle 8).

Um zu überprüfen, ob Capsaicin ebenfalls in der Lage ist das parasympathische Nervensystem zu aktivieren, injizierten wir analog zur CGRP-Bestimmung nach der letzten Blutentnahme Capsaicin ($4\mu\text{mol/kg}$ als Bolus) in die Arteria carotis. In diesem Falle war im Jugularvenenblut nach Capsaicin-Injektion im Vergleich zum Ausgangswert kein signifikanter Anstieg des VIP zu den gegebenen Zeitpunkten zu verzeichnen. Vielmehr fand sich in beiden Gruppen ein signifikant reduzierter VIP-Plasmaspiegel, was am ehesten dem verdünnungsbedingten Konzentrationsabfall entspricht ($9,38\text{ fmol/ml}$ [GTN $50\mu\text{g/kg/min}$; $n=8$; $p=0,019$] bzw. $7,82\text{ fmol/ml}$ [Glucose 5%; $n=7$; $p=0,014$] vs. $5,09\text{ fmol/ml}$ [Capsaicin, $n=6$]). Somit scheint Capsaicin, wie erwartet, zu keiner nennenswerten Aktivierung des parasympathischen Nervensystems zu führen.

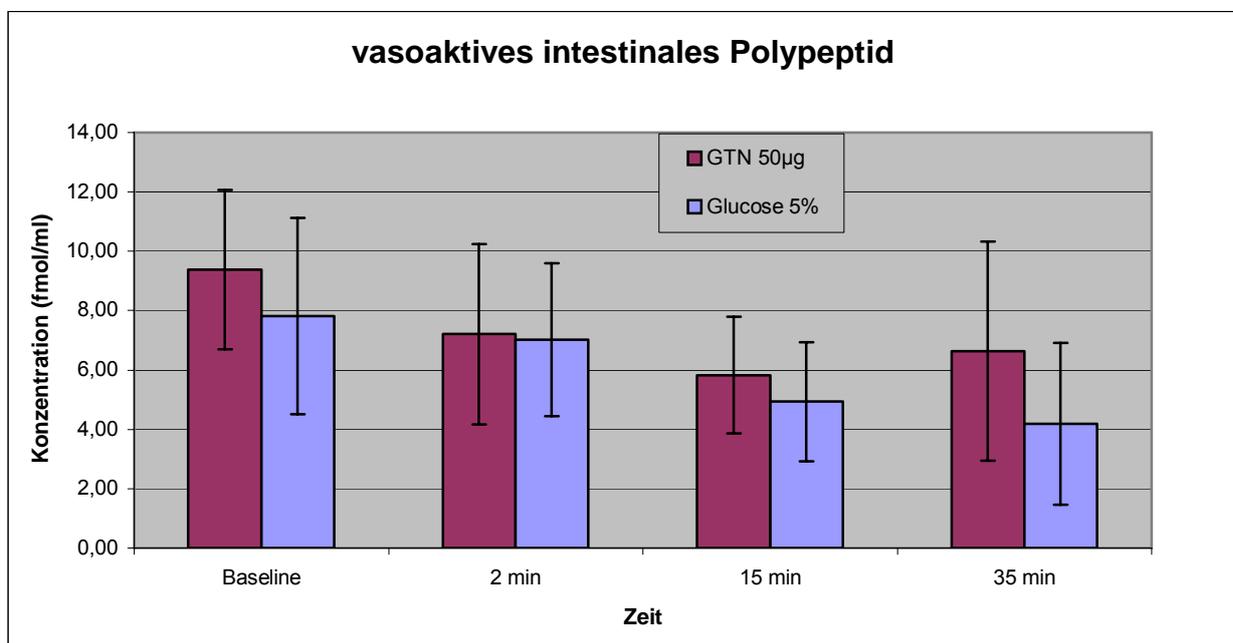


Abb.3: VIP-Plasmakonzentrationen in der Vena jugularis communis (Angaben in fmol/ml)

3.4 Immunhistochemische Analyse des CGRP in Dura mater

Für diese Analyse wurde die Dura mater am Ende der Versuche mit Hilfe einer transkardialen Perfusion mit Paraformaldehyd fixiert, dann entnommen und in Paraformaldehyd bei 4°C gelagert. Anschließend wurden sie, wie bereits beschrieben, mit einem Antikörper gegen CGRP und FITC als Marker immunhistochemisch angefärbt. Anhand dieser Methode können CGRP-immunoreaktive perivaskuläre Nervenendigungen dargestellt werden. Aus einer Abnahme der Immunoreaktivität lässt sich indirekt eine Ausschüttung von CGRP in die benachbarten meningealen Gefäße nachweisen.

Es zeigte sich, dass die CGRP-Immunoreaktivität der perivaskulären Gefäße der mit NaCl-behandelten Tiere im Vergleich zu denen, die mit GTN (50µg/kg/min) behandelt wurden, nahezu identisch war (Abb. 4 und Abb. 5 vs. Abb. 6 und Abb. 7). Damit ist auch immunhistochemisch nach einer NO-Donator-Infusion keine nennenswerte Freisetzung von CGRP in die Gefäße der Dura mater nachweisbar. Im Gegensatz dazu hat bei den Tieren die mit Capsaicin behandelt wurden eine deutliche Abnahme der CGRP-Immunoreaktivität stattgefunden, woraus geschlossen werden kann, dass durch diese Behandlung eine CGRP-Ausschüttung erfolgt ist (Abb. 8 und Abb. 9).

Diese Ergebnisse decken sich eindeutig mit denen aus dem Radioimmunoassay. Dort zeigte sich bei den Capsaicin-behandelten Ratten ein Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration im Blut der Vena jugularis.

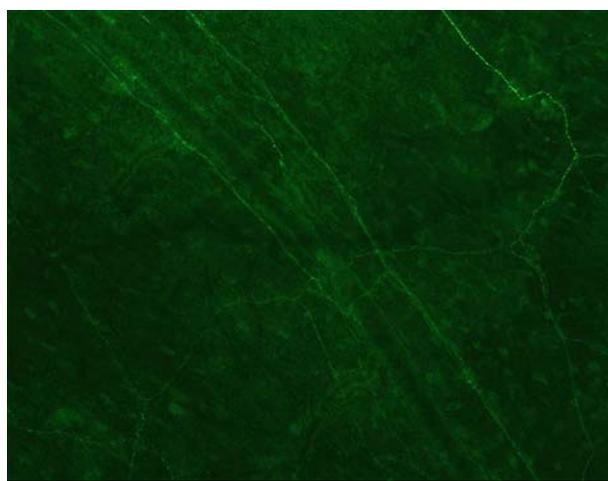


Abb. 4: 50 µg GTN (x100)

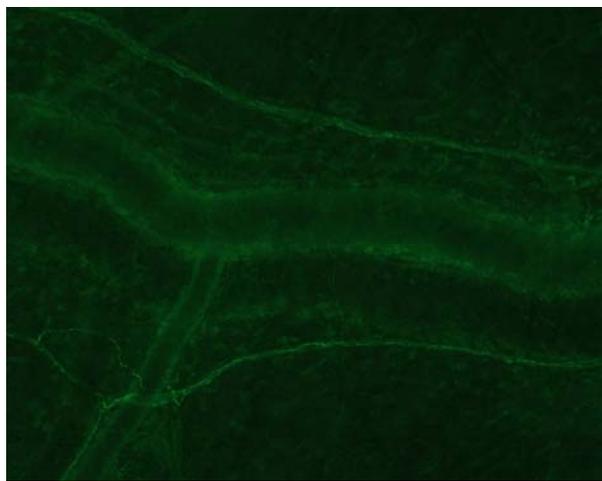


Abb. 5: 50 µg GTN (x250)



Abb. 6: 0,9% NaCl (x100)

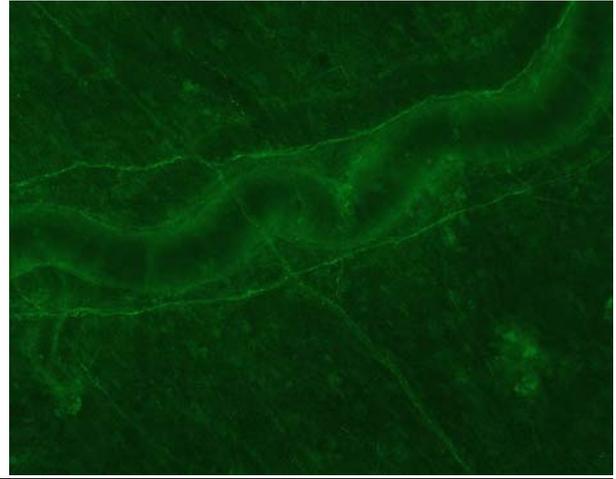


Abb. 7: 0,9% NaCl (x250)

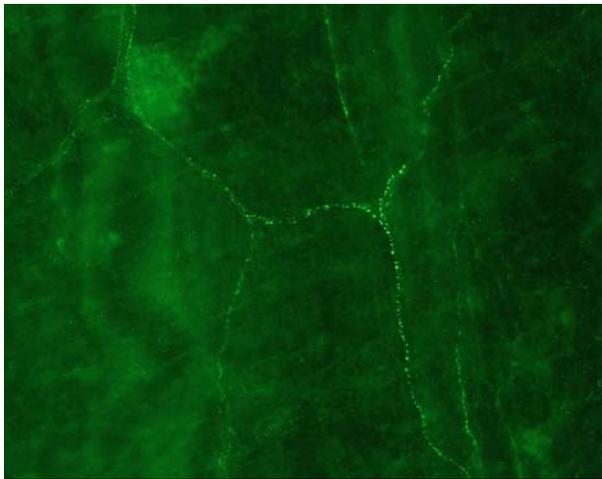


Abb. 8: 50 µg GTN + 4 µmol Capsaicin (x250)

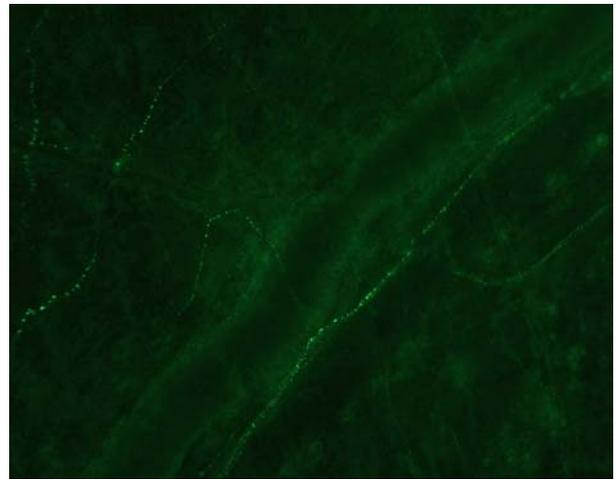


Abb. 9: 0,9% NaCl + 4 µmol Capsaicin (x250)

Abb. 4-9: Immunhistochemisch gefärbte Präparate der Dura mater. In den Abb. 4 und 5 sowie 6 und 7 weisen die perivaskulären Nervenendigungen der duralen Blutgefäße der GTN- bzw. der NaCl-behandelten Tiere eine gleichermaßen hohe CGRP-Immunoreaktivität auf. Im Gegensatz dazu zeigt sich in den Präparaten der Capsaicin-behandelten Tiere (Abb. 8 und 9) als Folge der CGRP-Ausschüttung eine deutlich reduzierte Immunoreaktivität der perivaskulären Nervenendigungen.

4 Diskussion

In der hier vorgestellten Arbeit wurde die Interaktion zwischen *Stickstoffmonoxid* (NO) und dem trigeminovaskulären System untersucht. Insbesondere sollte aufgeklärt werden, inwiefern NO über eine Aktivierung des trigeminovaskulären Systems zu einer Ausschüttung von *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) aus den perivaskulären Nervenendigungen in die meningealen Gefäße und darüber in die Vena jugularis führt. Darüber hinaus wurde untersucht, ob und in welcher Form das parasympathische Nervensystem an der Entstehung von NO-induziertem Kopfschmerz beteiligt sein kann. Zu diesem Zweck wurde überprüft, ob NO-Donatoren eine Ausschüttung parasympathischer Neuropeptide in meningeale Gefäße und infolgedessen eine signifikante Zunahme der Plasmakonzentration dieser Neuropeptide in der Vena jugularis hervorrufen können.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde ein experimentelles in vivo Tiermodell verwendet, in dem an anästhesierten Ratten über einen Katheter in einer Arteria carotis verschiedene NO-Donatoren in unterschiedlichen Konzentrationen infundiert wurden. Zu definierten Zeitpunkten wurde Blut aus der ipsilateralen Vena jugularis entnommen, um im Anschluss die Plasmakonzentrationen des trigeminalen Neuropeptids CGRP sowie des parasympathischen Neuropeptids VIP zu bestimmen. Als Positivkontrolle der CGRP-Ausschüttung wurde Capsaicin verwendet, von dem bekannt ist, dass es zuverlässig einen Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration hervorruft.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die unilaterale Infusion des NO-Donators GTN und des synthetischen NO-Donators DEA-NONOate in die Arteria carotis nach 2, 15 und 35 Minuten zu keinem signifikanten Anstieg der CGRP Plasmakonzentration im Blut der ipsilateralen Vena jugularis führt. Dies gilt sowohl für den Vergleich zwischen dem Ausgangswert mit den einzelnen Entnahmezeitpunkten, dem Vergleich zwischen den einzelnen Entnahmezeitpunkten sowie für den Vergleich zwischen Verum- und Kontrolltieren. Die Infusion von Capsaicin führte hingegen zu einem deutlichen Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration in der ipsilateralen Vena jugularis.

Um die Ergebnisse über einen zweiten methodischen Ansatz zu bestätigen, wurde CGRP in der Dura mater mittels immunhistochemischer Methoden gefärbt. Die

immunohistochemische Analyse zeigte keinen Unterschied in der CGRP-Immunoreaktivität der perivaskulären Nervenendigungen zwischen NO-Donator-behandelten Tieren und Vehikel-behandelten Kontrolltieren. Dagegen zeigte sich eine deutliche Abnahme der CGRP-Immunoreaktivität bei den Capsaicin-behandelten Tieren, wodurch die Capsaicin-induzierte Freisetzung von CGRP bestätigt werden konnte.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Analyse der VIP Plasmakonzentration zunächst ein kontinuierlicher Abfall von VIP, auf den 35 Minuten nach Beginn der NO-Donator-Infusion ein erneuter Konzentrationsanstieg folgte. Die Infusion von Capsaicin führte zu keiner signifikanten Zunahme der VIP-Plasmakonzentration.

4.1 Anatomie des trigeminovaskulären Systems

Das trigeminale System der Ratte weist große strukturelle und anatomische Gemeinsamkeiten mit dem des Menschen auf. Aus diesem Grund eignen sich Nagetiere, z.B. die Ratte, in besonderem Maße als Versuchstier für verschiedenste experimentelle Ansätze zur Untersuchung des trigeminovaskulären Systems.

Sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte ist die Dura mater von einem dichten Netz schmerzsensitiver C-Fasern durchzogen. Damit stellt diese eine der wenigen schmerzsensitiven intrakraniellen Strukturen dar. Bei diesen Neuronen handelt es sich um pseudounipolare Neurone, die sich in der Hirnhaut, vor allem um die großen meningealen Gefäße, befinden, und dort ein perivaskuläres Nervengeflecht bilden. Das Perikaryon dieser trigeminalen Neurone liegt im ipsilateralen Ganglion trigeminale. Bei Aktivierung dieses neuronalen Systems kommt es zur Freisetzung einer Reihe von Neuropeptiden (CGRP, Substanz P und Neurokinin A) aus den perivaskulären Nervenendigungen der Dura mater. Neben den Verbindungen zur Hirnhaut sind die Perikarya über entsprechende Neurite mit dem ipsilateralen Nucleus caudalis Nervus trigemini, dem Hirnstammkern des Nervus trigeminus, verbunden. Die experimentelle Aktivierung dieses neurovaskulären Systems und die daraus resultierenden

Folgeerscheinungen werden in ihrer Gesamtheit als neurogene Inflammation bezeichnet.

4.2 Neurogene Inflammation

Die neurogene Inflammation ist nach heutigem Kenntnisstand Kernbestandteil der Pathophysiologie der Migräne. Sie ist vermutlich Folge einer *Cortical Spreading Depression* (CSD) und setzt sich offenbar vorwiegend aus zwei Prozessen zusammen: Zum einen möglicherweise aus einer Plasmaproteinextravasation aus den meningealen Gefäßen in das umliegende Gewebe, zum anderen aus einer ausgeprägten Vasodilatation (Williamson, 2001). Die Plasmaproteinextravasation ist bislang allerdings ausschließlich in tierexperimentellen Untersuchungen und nie am Menschen klar nachgewiesen worden. Neben diesen zwei Phänomenen kommt es noch zu einer Reihe morphologischer Veränderungen, von denen am bedeutendsten die Mastzellaktivierung und die Thrombozytenaggregation sind (Dimitriadou, 1991; Buzzi, 1992).

4.2.1 Plasmaproteinextravasation

In experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch eine *Cortical Spreading Depression* (CSD), eine gezielte elektrische Stimulation des Ganglion trigeminale oder eine intraarterielle Capsaicin-Infusion eine Plasmaproteinextravasation in der Dura mater ausgelöst werden kann (Bolay, 2002; Markowitz, 1987). Eine zuvor durchgeführte trigeminale Denervierung oder eine bei neugeborenen Ratten durchgeführte Capsaicin-Behandlung, die einen Großteil (>90%) der Capsaicin-sensitiven sensiblen Nervenfasern zerstört, kann die CSD-induzierte oder die über eine elektrische Ganglionstimulation ausgelöste Plasmaproteinextravasation deutlich reduzieren. Damit ist die über die genannten Mechanismen ausgelöste Plasmaproteinextravasation neurogen über das trigeminale Nervensystem vermittelt. Markowitz et al. konnten darüber hinaus erstmals zeigen, dass die systemische Applikation von *Substanz P* (SP), welches in trigeminalen Nervenfasern häufig mit CGRP kolokalisiert vorkommt, eine Plasmaproteinextravasation auslösen kann, die vom

Ausmaß her mit der elektrisch induzierten vergleichbar ist. Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass Substanz P eine bedeutende Rolle in der Vermittlung der Plasmaproteinextravasation spielt. Inzwischen konnte nachgewiesen werden, dass SP über eine Bindung an Neurokininrezeptoren, insbesondere NK-1-Rezeptoren, zu einer neurogenen Plasmaproteinextravasation aus postkapillären Venolen der Dura mater führt (Holzer, 1988; Polley, 1997). Erwartungsgemäß konnten NK-1-Rezeptorantagonisten die SP-induzierte Plasmaproteinextravasation im experimentellen Tiermodell deutlich reduzieren, wodurch der NK-1-Rezeptor-vermittelte Mechanismus bestätigt werden konnte (Phebus, 1997; Shephard, 1993).

Die pathophysiologische Bedeutung der Plasmaproteinextravasation bei der Migräne ist dennoch unklar, denn NK-1-Antagonisten, welche die Wirkung von Substanz P antagonisieren und damit im Tierversuch die Plasmaproteinextravasation reduzieren, zeigten in mehreren klinischen Studien keine signifikante Wirkung auf den Kopfschmerz (Goldstein, 1997; Williamson, 2001).

4.2.2 Vasodilatation

Die neurogene Vasodilatation der duralen Blutgefäße wird hauptsächlich durch die Wirkung von CGRP hervorgerufen. Die Vasodilatation allein kann aber ebenfalls keine hinreichende Erklärung für die Pathophysiologie der Migräne geben, da einige der Medikamente, die erfolgreich in der Akuttherapie einer Migräneattacke eingesetzt werden, zum Beispiel die nicht-steroidalen Antirheumatika Ketorolac und Acetylsalicylsäure, oder auch intravenös verabreichtes Valproat, welches im Rahmen der Behandlung eines Status migraenosus eingesetzt wird, die neurogene durale Vasodilatation nicht blockieren können.

Grundsätzlich haben nicht-steroidale Antirheumatika nur einen sehr geringen Einfluss auf eine Vasodilatation, da sie die Prostaglandin-Produktion hemmen und damit lediglich der Prostaglandin-induzierten Vasodilatation entgegen wirken können (Strecker, 2003; Williamson, 2001). Vielmehr scheint im Falle der Migräne die schmerzlindernde Wirkung dieser Substanzgruppe auf der Inhibition anderer Prostaglandin-vermittelter Reaktionen zu beruhen. So wird bei diesen Medikamenten in

erster Linie von einem direkten inhibitorischen Effekt auf trigeminale Afferenzen und Neurone höherer Ordnung ausgegangen (Ellrich, 1999; Strecker, 2003), da die neuronale Hyperexzitabilität, die im Rahmen einer Migräneattacke auftritt und bei 60% der Migränepatienten zu einer kutanen Überempfindlichkeit, der so genannten Allodynie, führt, in erster Linie Prostaglandin-vermittelt ist (Jakubowski, 2005). Ähnliches gilt für Medikamente, die für die Migräneprophylaxe eingesetzt werden. Auch diese Medikamente, wie die Antiepileptika Valproat, Topiramate oder auch Pestwurzextrakt, wirken unabhängig von der Gefäßreaktion, da sie in der Schmerzbeseitigung und Schmerzvorbereitung zwar gute Ergebnisse erzielen, allerdings auf die Vasodilatation keine Wirkung zeigen (Williamson, 2001). Gleiches gilt für den neuen CGRP-Rezeptorantagonisten BIBN4096BS. Diese Substanz zeigte in ersten klinischen Untersuchungen eine Reduktion der Kopfschmerzintensität bei 66% der Migränepatienten (Olesen, 2004). Dennoch kommt es bei der Infusion trotz guter klinischer Wirksamkeit zu keinen vaskulären Nebenwirkungen, wie dies beispielsweise bei Serotoninrezeptorantagonisten der Fall ist, da CGRP nicht an der Erhaltung des arteriellen Ruhetonus beteiligt ist.

Neben den genannten Medikamenten, die auf postsynaptischer Ebene in die neurogene Vasodilatation eingreifen, gibt es eine große Gruppe von Medikamenten, die auf präsynaptischer Ebene wirken, die so genannten Triptane. Die trigeminalen C-Fasern exprimieren auf ihrer Oberfläche Serotoninrezeptoren, über welche die neuronale Aktivität moduliert werden kann. Inzwischen sind verschiedene Serotoninrezeptoren bekannt, von denen die Typen 5HT_{1B}, 5HT_{1D} und 5HT_{1F} klinische Relevanz für die Behandlung der Migräne aufweisen. Die Triptane bewirken über die Bindung an die Serotoninrezeptoren eine verminderte Ausschüttung von Neuropeptiden. Dies wurde anhand von Untersuchungen belegt, in denen gezeigt werden konnte, dass während einer spontanen Migräneattacke die Konzentration von CGRP im Jugularvenenblut erhöht ist, diese sich allerdings nach Verabreichung von Sumatriptan parallel zur Remission der Kopfschmerzen wieder normalisiert (Goadsby, 1993). Eine neuere Untersuchung bestätigt diese Erkenntnisse für den GTN-induzierten Kopfschmerz (Juhász, 2005). Der vasokonstriktive Effekt der Triptane, der überwiegend über 5-HT_{1B}-Rezeptoren vermittelt ist, scheint keine Wirkung auf den Kopfschmerz zu haben, da der Kopfschmerz und die zerebrale Vasodilatation bei der Migräne häufig zeitlich nicht miteinander korrelieren (Moskowitz, 1992). Darüber hinaus konnte in einigen

Untersuchungen mit Hilfe der transkraniellen Doppler-Sonographie gezeigt werden, dass Sumatriptan, der Prototyp der Triptane, den zerebralen Blutfluss bereits vor der Abschwächung des Kopfschmerzes beeinflusst (Limmroth, 1996). Studien mit *Positronen Emissions Tomographie* (PET) und *funktioneller Magnetresonanztomographie* (fMRT) konnten diese Ergebnisse bestätigen, da auch bei diesen Untersuchungen keine Korrelation zwischen Schmerz und Blutfluss erkennbar war (Woods, 1994; Welch, 1998). Aufgrund dieser Datenlage geht man heute davon aus, dass zwischen den im Rahmen einer Migräneattacke auftretenden Blutflussveränderungen und der Kopfschmerzentstehung kein Zusammenhang besteht. Vielmehr scheint es sich bei den migräneassoziierten Blutflussveränderungen lediglich um ein schmerzunabhängiges Epiphänomen zu handeln.

4.3 Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

Die Vasodilatation im Rahmen der neurogenen Inflammation wird in erster Linie durch CGRP hervorgerufen. CGRP, ein 37 Aminosäuren langes Neuropeptid, ist das stärkste bisher bekannte vasodilatatorische Neuropeptid im Menschen (Goadsby, 1990; Gulbenkian, 2001; Edvinsson, 2004). Es befindet sich in erster Linie in unmyelinisierten C-Fasern und myelinisierten A δ -Fasern, die das perivaskuläre Nervengeflecht bilden, und ist dort häufig mit SP oder auch mit NKA kolokalisiert (Gulbenkian, 2001).

Unter experimentellen Bedingungen kann eine Freisetzung von CGRP auf verschiedene Arten ausgelöst werden. Am zuverlässigsten gelingt dies mit Hilfe von Capsaicin (Akerman, 2003; Brain, 2004). Capsaicin (8-methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) wirkt über den hitzesensiblen Vanilloid-Typ-1-Rezeptor (VR-1-Rezeptor), der sich sowohl auf den C- als auch auf den A δ -Fasern befindet. Die Bindung von Capsaicin an den VR-1-Rezeptor bewirkt eine Zunahme der Permeabilität für Kationen, was letztendlich zu einer Depolarisation mit darauf folgender Freisetzung des Neuropeptids führt (Caterina, 1997). Dass die Capsaicin-induzierte Vasodilatation CGRP-vermittelt sein muss, zeigt die Tatsache, dass der peptiderge CGRP-Rezeptorantagonist CGRP₈₋₃₇ den vasodilatatorischen Effekt von Capsaicin aufhebt (Akerman, 2003). Neben Capsaicin kann der Capsaicin-Rezeptor auch durch niedrige pH-Werte sowie

Hitze aktiviert werden um dann zur CGRP-Freisetzung zu führen (Geppetti, 1991; Caterina, 1997).

Neben der Möglichkeit der chemischen Stimulation zur Freisetzung von CGRP gibt es sehr gut etablierte Modelle, bei denen z.B. durch die Einführung einer Elektrode in das Ganglion trigeminale gezielt unilateral elektrisch stimuliert werden kann. Diese Stimulation führt dann zur ipsilateralen Freisetzung von CGRP und infolgedessen zu einem Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration in der Vena jugularis externa (Goadsby, 1988; 1993; Limmroth, 2001). Eine weitere Möglichkeit der elektrischen Stimulation, die darüber hinaus der pathophysiologischen Realität näher kommt als der verhältnismäßig starke Reiz der Stimulation über eine Elektrode, ist die Stimulation über die Auslösung einer *Cortical Spreading Depression* (CSD). Bei der CSD handelt es sich um eine Depolarisation von Neuronen und Gliazellen, die sich gleichmäßig mit einer Geschwindigkeit von 3-5 mm pro Minute in alle Richtungen über den Kortex ausbreitet. Tierexperimentell ist eine CSD unter anderem über einen kortikalen Nadelstich, elektrisch oder die lokale Applikation von K^+ auslösbar. Im Rahmen einer CSD werden mehrere Metabolite, wie zum Beispiel NO , H^+ , K^+ , Glutamat und Adenosin ausgeschüttet, die einerseits die weitere wellenförmige Entladung kortikaler Neurone und Gliazellen bewirken, was nachfolgend zu einer temporären Untererregbarkeit der betroffenen Zellen führt, und andererseits über eine Diffusion zu umliegenden perivaskulären trigeminalen Nervenendigungen eine Aktivierung des Ganglion trigeminale auslösen (Somjen, 2001; Bolay, 2002; Iadecola, 2002). Letzten Endes führt die CSD-induzierte Aktivierung des ipsilateralen Ganglion trigeminale unter anderem zu einer CGRP-vermittelten neurogenen Vasodilatation (Reuter, 1998).

CGRP entfaltet seine Wirkung durch Bindung an den CGRP-Rezeptor. Der bisher bekannte CGRP-Rezeptor besteht aus zwei Bausteinen. Einerseits aus einem sieben Transmembrandomänen aufweisenden G-Protein gebundenen *Calcitonin receptor-like receptor* (CL) und andererseits aus einem *receptor activity modifying protein* (RAMP). Erst die Verbindung beider bildet den funktionsfähigen CGRP-Rezeptor (Brain, 2004). Der CGRP-Rezeptor wird in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Innerhalb des trigeminovaskulären Systems ist er in erster Linie in den intrakraniellen arteriellen Blutgefäßen sowie möglicherweise in den Hinterwurzelganglia lokalisiert (Fischer, 2005). Die Wirkung des CGRP-Rezeptors kann einerseits mit dem peptidergen CGRP-Antagonisten CGRP₈₋₃₇ sowie mit dem neueren nicht-peptidergen CGRP-Antagonisten

BIBN4096BS antagonisiert werden. BIBN4096BS besitzt gegenüber CGRP₈₋₃₇ nicht nur den Vorteil der erheblich höheren Affinität und damit größeren Wirksamkeit am CGRP-Rezeptor, sondern vor allem ermöglicht seine nicht peptiderge Natur den Einsatz in vivo, wodurch er sich auch zur Behandlung der Migräne anbietet.

Der Wirkmechanismus von CGRP über den CGRP-Rezeptor ist nicht vollständig geklärt. Man geht allerdings von der Existenz zweier verschiedener Wege aus, die durchaus parallel vorkommen können: Einerseits einem Endothelium-unabhängigen und andererseits einem Endothelium-abhängigen Weg.

Im Rahmen der Endothelium-unabhängigen Aktivierung bindet CGRP an CGRP-Rezeptoren, die sich auf glatten Muskelzellen befinden. Dadurch kommt es zur Aktivierung einer Adenylatcyclase, die eine Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration hervorruft. Diese wiederum stimuliert eine *Proteinkinase A* (PKA), die zu einer Öffnung von Kalium-Kanälen und letztendlich zu einer Calcium-Abnahme führt, wodurch es zur Relaxation der glatten Muskulatur kommt.

Bei dem Endothelium-abhängigen Mechanismus bindet CGRP an CGRP-Rezeptoren auf Endothelzellen, welches dann über einen cAMP-vermittelten Mechanismus die Produktion von NO über die endotheliale Form der NO-Synthase (eNOS) stimuliert. NO diffundiert in benachbarte glatte Muskelzellen, in denen es die Guanylatcyclase aktiviert, was dann über eine cGMP-Erhöhung zu einer Eröffnung von Kalium-Kanälen und einer Calcium-Abnahme führt und damit eine Relaxation des glatten Muskels hervorruft (Brain, 2004).

Die physiologische Aufgabe von CGRP im Organismus ist nicht eindeutig geklärt. Eine Reihe Untersuchungen deuten darauf hin, dass CGRP nicht, wie etwa NO, an der Erhaltung des Ruhe-Blutflusses beteiligt ist, da die alleinige Infusion des peptidergen CGRP-Antagonisten CGRP₈₋₃₇ zu keiner Veränderung des Gefäßdurchmessers führt (Wei, 1992; Strecker, 2002; Brain, 2004; Storer, 2004).

Nach heutiger Datenlage scheint die physiologische Aufgabe des trigeminalen Systems auch nicht die Zunahme des zerebralen Blutflusses zu sein, vielmehr scheint seine Funktion darin zu liegen, exzessive Vasokonstriktionen zu verhindern. Darüber hinaus ist unklar, inwiefern CGRP eine direkte nozizeptive Wirkung haben könnte. Allerdings gibt es erste Hinweise darauf, dass CGRP einen modulierenden Einfluss auf die nozizeptive Transmission besitzt (Storer, 2004).

Im Falle der Freisetzung in die meningealen Gefäße besitzt CGRP eine Plasma-Halbwertszeit von 7-10 Minuten (Brain, 2004). Auf welche Art und Weise CGRP in der Blutzirkulation abgebaut wird, ist nicht vollständig geklärt. Vermutet wird aber, dass mehrere Abbaewege möglich sind. Sowohl in vivo als auch in vitro konnte nachgewiesen werden, dass CGRP über eine Mastzelltryptase in mehrere Fragmente zerlegt und auf diese Weise inaktiviert werden kann (Brain, 1989). Daneben scheint es einen Weg zu geben, über den möglicherweise auch eine Matrix-Metalloproteinase II in der Lage ist CGRP abzubauen (Fernandez-Patron, 2000).

4.4 NO und neurogene Inflammation

Erste Vermutungen, dass NO eine Rolle in der Pathogenese der Migräne spielen könnte, gibt es bereits seit vielen Jahren. Erstmals beschrieben wurde diese Vermutung, nachdem in der Belegschaft einer Sprengstofffabrik auffiel, dass bei den Arbeitern die vielfach den NO-Donator Nitroglycerin zur Sprengstoffherstellung verarbeiteten, eine deutliche Häufung von Kopfschmerz und insbesondere von Migräne auftrat (Trainor, 1966).

4.4.1 Humane Befunde

Erste systematische Untersuchungen zum Zusammenhang von NO und Migräne am Menschen wurden erst viele Jahre später durch Olesen et al. durchgeführt. Hierbei wurde Migränepatienten und gesunden Kontrollpersonen der NO-Donator GTN intravenös appliziert. Dabei fiel auf, dass sowohl bei Migränepatienten als auch bei gesunden Kontrollpersonen ca. 30 Minuten nach Beginn der Infusion ein Kopfschmerz einsetzte, der ungefähr 30 Minuten anhielt und nicht die Kriterien der Internationalen Kopfschmerzgesellschaft (IHS) für Migräne erfüllte. Nach einem beschwerdefreien Intervall, das im Mittel 4 Stunden anhielt, entwickelten nur die Migränepatienten eine Migräneattacke, die die Kriterien für Migräne ohne Aura der IHS erfüllte (Olesen, 1993; 1994). Dieser GTN-induzierte Kopfschmerz kann mit dem in der Migränetherapie

erfolgreich eingesetzten Sumatriptan erfolgreich behandelt werden (Iversen, 1996; Juhasz, 2005).

Eine weitere Studie, die diesen Zusammenhang näher untersucht, ist eine doppelblinde, placebokontrollierte Medikamentenstudie, bei der ein unspezifischer Inhibitor der *NO-Synthase* (NOS) zur Behandlung spontaner Migräneattacken verabreicht wurde. Die Gabe des NOS-Inhibitors L-NMMA (L-N^G Methylarginin hydrochlorid – 546C88) während einer spontanen Migräneattacke führte in 67% der Fälle zu einer deutlichen Besserung des Migränekopfschmerzes (Lassen, 1997; 1998).

4.4.2 Tierexperimentelle Befunde

Neben diesen Untersuchungen am Menschen gibt es eine Reihe tierexperimenteller Untersuchungen, die den Zusammenhang zwischen NO und der neurogenen Inflammation näher untersuchen. Die durch GTN bewirkte Aktivierung des trigeminalen Systems lässt sich histologisch gut an der Expression des neuronalen Markers c-fos messen. Das Proto-Onkogen c-fos ist ein gut erforschter sensibler Marker für neuronale Aktivität, insbesondere bei extrazellulärer Stimulation (Mitsikostas, 2001). Die Expression von c-fos lässt sich sowohl chemisch als auch elektrisch induzieren. Eine Möglichkeit der chemischen Aktivierung ist die Stimulation durch GTN. Die subkutane Injektion einer hohen Dosis GTN bewirkte in der Ratte eine deutliche Zunahme der c-fos-Immunoreaktivität in verschiedenen Bereichen des zentralen Nervensystems. Unter anderem zeigte sich eine solche Zunahme der Immunoreaktivität im spinalen nucleus caudalis und zwar sowohl in Lamina I, in der Afferenzen aus unmyelinisierten nozizeptiven Fasern zusammenlaufen, als auch in Lamina II, von der diese Impulse an zentrale Strukturen weitergeleitet werden. Diese Tatsache deutet auf eine Aktivierung von Neuronen hin, die an der Schmerzempfindung der Hirnhaut beteiligt sind (Tassorelli, 1995).

In einer Studie, in der die Immunoreaktivität von c-fos nach elektrischer Stimulation des Sinus sagittalis superior untersucht wurde, konnte die stimulusinduzierte Immunoreaktivität im trigeminalen nucleus caudalis durch den unselektiven NOS-Inhibitor *L-Nitroarginin Methylester* (L-NAME) deutlich reduziert werden (Hoskin, 1999).

An dieser NO-vermittelten c-fos-Aktivierung nach elektrischer Stimulation ist die neuronale Form der NO-Synthase (nNOS) maßgeblich beteiligt (Akerman, 2002).

Ein weiteres Beispiel dafür, dass GTN in der Lage ist, das trigeminale System zu aktivieren, zeigt sich bei den Untersuchungen von Lambert et al. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in die Arteria carotis infundiertes GTN in einer Dosis von 100µg/kg/min in der Lage war, trigeminale Neurone die ihre Afferenzen aus dem Gebiet des Sinus sagittalis superior erhielten, nicht nur gegenüber elektrischen Stimulationen zu sensibilisieren, sondern in ihnen auch eine erhöhte Entladungsrate hervorzurufen (Lambert, 2000).

Johnson et al. konnten zeigen, dass auch ein weiterer Bestandteil der neurogenen Inflammation, die Plasmaproteinextravasation, NO vermittelt sein kann, da eine durch *meta-chlorophenylpiperazin* (m-CPP) induzierte Plasmaproteinextravasation durch die Gabe des unselektiven NOS-Inhibitors L-NAME unterdrückt werden kann (Johnson, 2003).

4.5 CGRP und neurogene Inflammation

4.5.1 Humane Befunde

In einer klinischen Studie gelang es Goadsby et al. erstmals nachzuweisen, dass während einer spontanen Migräneattacke die CGRP-Plasmakonzentration in der zum Kopfschmerz ipsilateralen Vena jugularis erhöht war. Die Plasmakonzentration von *Substanz P* (SP), dem klassischen Auslöser der Plasmaproteinextravasation, war in diesen Untersuchungen allerdings nicht erhöht (Goadsby, 1990).

Die intravenöse Verabreichung von CGRP bewirkt am Menschen ein ähnliches Phänomen wie die Applikation von NO; d.h. es bildet sich sowohl bei Migränepatienten als auch bei gesunden Kontrollpersonen ein vorübergehender Kopfschmerz aus, der die Kriterien der IHS für Migräne nicht erfüllt. Analog zur NO-Donator-Infusion zeigt sich auch hier bei der Gruppe der Migränepatienten nach einem schmerzfreien Intervall eine Migräneattacke, die die IHS-Kriterien einer Migräne ohne Aura erfüllt (Lassen, 2002).

4.5.2 Tierexperimentelle Befunde

Neben der Möglichkeit im Tierexperiment mit Hilfe von NO eine neurogene Inflammation auszulösen, besteht die Möglichkeit über eine intravenöse Verabreichung von CGRP ein vergleichbares Phänomen hervorzurufen. Hierbei löst die intravenöse CGRP-Gabe vor allem eine ausgeprägte Vasodilatation aus, die durch den peptidergen CGRP-Antagonisten CGRP₈₋₃₇ antagonisiert werden kann, und damit indiziert, dass die vasodilatatorische Wirkung von CGRP über den CGRP-Rezeptor vermittelt ist (Williamson, 1997). Sumatriptan ist hingegen nicht in der Lage die CGRP-induzierte Vasodilatation zu unterbrechen, da dieses über einen präsynaptischen Mechanismus (5-HT_{1B/1D} Rezeptoren) wirkt, der die Ausschüttung von CGRP unterdrückt (Williamson, 1997).

Die elektrische Stimulation des Ganglion trigeminale löst eine ausgeprägte Vasodilatation aus. Hierbei konnten auf der gleichen Seite der Stimulation sowohl eine erhöhte Immunreaktivität für CGRP (Goadsby, 1988) als auch eine erhöhte CGRP-Konzentration im Blut der Vena jugularis festgestellt werden, was eindeutig dafür spricht, dass die Vasodilatation CGRP-vermittelt ist. Diese Reaktion konnte durch die Gabe von Sumatriptan verhindert werden (Goadsby, 1993; Limmroth, 2001).

Interessanterweise war bei den Untersuchungen, in denen das Ganglion trigeminale auf elektrischem Wege stimuliert wurde, im Vergleich zu denen, in denen das Ganglion trigeminale spontan oder über Capsaicin aktiviert wurde, sowohl die Konzentration für CGRP, als auch die für SP erhöht (Goadsby, 1988; Goadsby, 1990; Akerman, 2003). Die Tatsache das es während einer spontanen Migräneattacke zur isolierten Konzentrationszunahme von CGRP kommt, wird dadurch erklärt, dass A δ -Fasern, welche nur CGRP enthalten, bereits bei geringeren Reizen aktiviert werden, so dass erst ein starker Reiz, wie die elektrische Reizung über eine Elektrode, zu einer C-Faser-Aktivierung mit konsekutiver Ausschüttung von CGRP und SP führt (Williamson, 2001).

4.6 Zusammenhang zwischen NO und CGRP

Nach heutigem Kenntnisstand ist evident, dass NO und CGRP im pathophysiologischen Geschehen der Migräne keine voneinander unabhängigen Akteure sind. Welche Funktionen jede einzelne der beiden Substanzen hat und vor allem in welcher Beziehung sie zueinander stehen, ist allerdings nicht vollständig aufgeklärt.

4.6.1 *Humane Befunde*

In den Untersuchungen von Juhasz et al. wurde GTN in einer Dosis von 0,5µg sublingual appliziert. Blutproben zur CGRP-Bestimmung wurden 60 Minuten vor und 60 Minuten nach der Applikation von GTN sowie 60 und 120 Minuten nach Einsetzen der Migräneattacke aus der Vena radialis entnommen. Nach Einsetzen der Migräneattacke konnten für beide Zeitpunkte (60 und 120 Minuten) signifikant erhöhte CGRP-Plasmakonzentrationen nachgewiesen werden. Nach Abklingen der Attacke lag die CGRP-Konzentration wieder im Normbereich. Zum Zeitpunkt des sofortigen Kopfschmerzes konnte bei diesen Untersuchungen keine erhöhte CGRP-Plasmakonzentration festgestellt werden (Juhasz, 2003).

Damit bestätigten sich in Bezug auf den sofortigen Kopfschmerz die Ergebnisse von Ashina et al. an Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz. Auch bei diesen Patienten kommt es nach GTN-Infusion initial zur Ausbildung eines sofortigen Kopfschmerzes, auf den im Anschluss der bekannte Spannungskopfschmerz folgt. In diesen Untersuchungen wurde GTN in einer Dosis von 0,5µg/kg/min über 20 Minuten intravenös appliziert. Im Anschluss wurden die CGRP-Plasmakonzentrationen 10, 20 und 60 Minuten nach Infusionsbeginn aus der Vena radialis bestimmt. Zu allen drei Zeitpunkten, d.h. während des sofortigen Kopfschmerzes zeigte sich auch hier kein signifikanter Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration (Ashina, 2001).

4.6.2 Tierexperimentelle Befunde

Wei et al. demonstrierten erstmals, dass sowohl die unilaterale Ganglionektomie als auch die lokale Applikation des peptidergen CGRP-Antagonisten CGRP₈₋₃₇ die durch eine lokale Applikation von GTN hervorgerufenen Veränderungen im kortikalen Blutfluss abzuschwächen vermag. Das Ausmaß der Abschwächung der vaskulären Reaktion durch CGRP₈₋₃₇ entsprach dem der Denervation des Ganglion trigeminale (Wei, 1992). Hieraus kann gefolgert werden, dass nicht nur die durch eine elektrische, sondern auch die durch eine chemische Stimulation des Ganglion trigeminale hervorgerufenen vaskulären Reaktionen CGRP-vermittelt sein könnten.

In einer Arbeit von Strecker et al. konnten diese Ergebnisse anhand eines in vitro Modells bestätigt werden, indem das trigeminovaskuläre System durch den synthetischen NO-Donator *Diethylamin-NONOate* (DEA-NONOate) aktiviert wurde. DEA-NONOate wurde bei diesen Untersuchungen in Dosen von 10^{-3} , 10^{-4} und 10^{-5} M direkt auf die Dura mater appliziert und die CGRP-Konzentration aus dem auf die Dura mater applizierten Eluat bestimmt. Dabei wurde ein konzentrationsabhängiger CGRP-Anstieg beobachtet. Diese Konzentrationszunahme konnte durch die Applikation von CGRP₈₋₃₇ abgeschwächt werden (Strecker, 2002).

Einen weiteren Beitrag zur Aufklärung des Zusammenhangs zwischen NO und CGRP leisteten die Untersuchungen von Akerman et. al., in denen mit Hilfe von selektiven NOS-Inhibitoren gezeigt wurde, dass eNOS die CGRP-induzierte Vasodilatation vermittelt. (Akerman, 2002).

4.7 Zusammenhang zwischen NO und VIP

Der in den Untersuchungen dieser Arbeit als Folge einer NO-Donator-Infusion nachgewiesene Anstieg der VIP-Konzentration ist ein Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen NO und VIP. Da VIP einen Neurotransmitter des parasympathischen Nervensystems darstellt, ist durchaus denkbar, dass der VIP-Anstieg Ausdruck einer NO-induzierten Aktivierung des parasympathischen Nervensystems ist.

Eine Vielzahl von Gemeinsamkeiten zwischen dem Migräne- und dem Clusterkopfschmerz lassen vermuten, dass die Rollen des trigeminalen und des parasympathischen Nervensystems in der Pathophysiologie dieser beiden Erkrankungen nicht strikt zu trennen sind. Klinische Untersuchungen ergaben, dass beide Phänomene durch NO-Donatoren auslösbar sind. So führt die Infusion bzw. die orale Aufnahme von GTN in Migränepatienten zu einer Migräneattacke (Olesen, 1993; 1994) und in Cluster-Patienten zu einer Cluster-Attacke, einschließlich der für den Cluster-Kopfschmerz typischen autonomen Symptome (Ekbom, 1968; Costa, 2003). Neben den Gemeinsamkeiten bei der Auslösung dieser Kopfschmerzattacken zeigen sich auch Gemeinsamkeiten bei deren Behandlung. So sind beide Erkrankungen beispielsweise mit Sumatriptan gut behandelbar. Untersuchungen der Neuropeptidkonzentrationen ergaben einerseits einen Anstieg von CGRP während einer Migräneattacke und andererseits von CGRP und VIP während einer Cluster-Attacke (Goadsby, 1990; 1994; Edvinsson, 1994). Darüber hinaus zeigte sich allerdings in einer der Studien, dass VIP-Konzentrationsanstiege vereinzelt auch bei Migränepatienten vorkamen (Goadsby, 1990). Auch in diesen Untersuchungen zeigt sich damit, dass bei Migräne- und Cluster-Kopfschmerz eine Verbindung zwischen dem trigeminalen und parasympathischen Nervensystem besteht.

Experimentelle Studien, in denen molekularbiologische oder histologische Verfahren angewandt wurden, liefern Hinweise für ein Zusammenspiel der beiden Nervensysteme. Wegweisend in diesem Zusammenhang sind Untersuchungen zur Funktion der NO-Synthase. Der NOS kommt nach heutigem Wissensstand eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie des Migräne- und Cluster-Kopfschmerzes zu, da sie maßgeblich an der neuronalen Aktivierung und der Plasmaproteinextravasation, zwei Kernbestandteilen der neurogenen Inflammation, beteiligt ist (Hoskin, 1999; Reuter, 2001; Akerman, 2002). Untersuchungen zur Lokalisation der NOS zeigten allerdings, dass die NO-Synthase neben einem geringen Vorkommen im trigeminalen Nervensystem in erster Linie im parasympathischen Nervensystem lokalisiert ist (Goadsby, 1996; Gulbenkian, 2001). Trotz der überwiegenden Lokalisation im parasympathischen Nervensystem ist der unspezifische NOS-Inhibitor L-NAME in der Lage Migränekopfschmerz in 67% der Fälle zu mindern (Lassen, 1997). Experimentelle Studien zur Lokalisation der Neurotransmitter zeigten eine Koloakalisation von VIP und PACAP im parasympathischen und von CGRP und PACAP im trigeminalen System.

Damit scheint PACAP in beiden Systemen eine Rolle zu spielen. Darüber hinaus konnte im Ganglion trigeminale mRNA eines VIP-Rezeptors nachgewiesen werden. Somit scheint auch dieses Neuropeptid keine ausschließlich parasymphatische Aktivität zu besitzen. Auch die NOS zeigt eine Koloalisation mit Neurotransmittern der verschiedenen Nervensysteme. So ist die NOS im trigeminalen Nervensystem in CGRP enthaltenen Zellkörpern und im parasymphatischen Nervensystem in VIP und PACAP enthaltenen Zellkörpern vorhanden.

4.8 Vergleich der Ergebnisse dieser Arbeit mit denen anderer Studien

Das Resultat der Untersuchungen dieser Arbeit steht zunächst im Gegensatz zu einer Reihe von Publikationen, die vermuten lassen, dass die Auswirkungen einer NO-Donator-Applikation CGRP-vermittelt sein könnten. In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die elektrische Stimulation des Ganglion trigeminale einen Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration im Jugularvenenblut bewirkt (Goadsby, 1988; Limmroth, 2001). Hieraus konnte die Hypothese abgeleitet werden, dass die chemische Stimulation des Ganglion trigeminale einen ähnlichen Effekt auslösen könnte und infolgedessen auch die nach NO-Applikation beobachteten vaskulären Effekte CGRP-vermittelt sein könnten.

Studien, die eine mögliche Beziehung zwischen NO und CGRP näher untersuchten, zeigen allerdings auch häufig widersprüchliche Ergebnisse, so dass die Frage, ob und auf welche Weise NO und CGRP pathophysiologisch verbunden sind, bislang unklar ist. Die zunächst widersprüchlichen Studienergebnisse sind jedoch nicht immer miteinander unvereinbar. Vielmehr muss sorgfältig verglichen werden, inwiefern sich die einzelnen Studien hinsichtlich Applikationsweg der aktivierenden Substanz, den verabreichten Dosen und den Zeitpunkten der Datenerhebungen unterscheiden und somit möglicherweise doch ein zusammenhängendes Bild ergeben können.

Die Infusion von NO-Donatoren bewirkt bei Migränepatienten eine zweizeitige Kopfschmerzreaktion. In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde durch das gewählte

Zeitfenster der Blutentnahmen der sofortige Kopfschmerz untersucht. Möglicherweise liegen den beiden Schmerzreaktionen, dem sofortigen und dem verzögerten Kopfschmerz, unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen zugrunde. Folglich wäre denkbar, dass nur eine der beiden Schmerzreaktionen CGRP-vermittelt ist.

Für die Vermutung, dass es sich bei sofortigem und verzögertem Kopfschmerz um zwei pathophysiologisch unterschiedliche Phänomene handelt, spricht, dass sich beide zeitlich eindeutig voneinander abgrenzen lassen. Neben dem zeitlichen Ablauf ist von großer Bedeutung, dass der durch NO ausgelöste sofortige Kopfschmerz sowohl bei Migränepatienten als auch bei gesunden Probanden auszulösen ist, wohingegen der verzögerte Kopfschmerz nur bei Migränepatienten auslösbar ist (Olesen, 1993; 1994). In diesem Zusammenhang scheint auch eine genetische Komponente von Bedeutung zu sein. Die klinischen Studien von Juhasz et al. bekräftigen die Vermutung zweier unterschiedlicher Mechanismen. Während des sofortigen Kopfschmerzes, der in diesen Untersuchungen durch eine sublinguale Applikation von GTN ausgelöst wurde, konnte kein signifikanter Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration in der Vena radialis nachgewiesen werden (Juhasz, 2003). Untersuchungen an Patienten mit chronischem Spannungskopfschmerz zeigen ein ähnliches Ergebnis. Auch bei dieser Kopfschmerzart folgt auf die Infusion eines NO-Donators die typische zweizeitige Schmerzreaktion und die Patienten erleben den verzögerten Kopfschmerz in Form ihres bekannten Kopfschmerzes, in diesem Falle als typischen Spannungskopfschmerz. Analog zu den Untersuchungen von Juhasz et al. an Migränepatienten, lässt sich auch bei dieser Kopfschmerzform während des sofortigen Kopfschmerzes keine erhöhte CGRP-Plasmakonzentration nachweisen, so dass möglicherweise auch in diesem Fall NO in der Lage ist, Kopfschmerz über CGRP-unabhängige Mechanismen auszulösen (Ashina, 2001). Da bislang bei einem durch NO-Donatoren induzierten sofortigen Kopfschmerz ein Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration weder in den in vivo Untersuchungen dieser Arbeit noch in den oben genannten klinischen Studien nachweisbar war, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen zwei Kopfschmerzphasen um zwei unterschiedliche pathophysiologische Mechanismen handelt. Im Falle des sofortigen Kopfschmerzes scheint die Freisetzung von CGRP nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, denn vermutlich wird der sofortige Kopfschmerz durch eine direkte Wirkung von NO an den perivaskulären Nervenendigungen der meningealen Gefäße ausgelöst. Hingegen wird der verzögerte Kopfschmerz, nicht

zuletzt auch aufgrund der kurzen Halbwertszeit von NO, über andere, zeitlich aufwändigere und möglicherweise CGRP-vermittelte Mechanismen ausgelöst. Zentraler Bestandteil dieser Mechanismen ist die Aktivierung des trigeminovaskulären Systems.

Eine weitere Ursache für den im Vergleich zu anderen Studien fehlenden Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration im Blut der Vena jugularis, könnte der in den Untersuchungen dieser Arbeit gewählte Zugangsweg für die Applikation des NO-Donators sein. Im Vergleich zu bisherigen tierexperimentellen Studien (Wei, 1992; Strecker, 2002) wurden in diesem Modell die das trigeminale Ganglion aktivierenden Substanzen auf intravenösem Weg verabreicht. Jedoch ist unwahrscheinlich, dass die Zugangsform als solche eine Rolle spielen könnte, da NO frei durch biologische Membranen diffundieren kann. Von größerer Bedeutung ist in diesem Zusammenhang, dass bei diesem Zugangsweg verdünnungsbedingt bei weitem nicht so hohe NO-Donator-Konzentrationen im Ganglion trigeminale oder an den meningealen Gefäßen der Dura mater realisierbar sind, wie dies in einem in vitro Modell möglich ist, da bei diesem eine lokale Applikationsform angewendet wird. Intravenös verabreichte Dosen, bei denen im Ganglion trigeminale oder an den meningealen Gefäßen vergleichbar hohe NO-Donator-Konzentrationen wirksam werden, wie dies bei der lokalen Applikation der Fall ist, sind nicht praktikabel, da die hämodynamischen Auswirkungen von NO zu groß wären, als dass die Versuche noch zu verwerten wären. In den in vitro Modellen, die eine direkte Applikation der NO-Donatoren auf die Dura mater wählen (Strecker, 2002), kann somit das Ausmaß der Stimulation des trigeminalen Systems erheblich größer sein, als dies im Modell dieser Arbeit der Fall ist. Allerdings führt dies zwangsläufig dazu, dass die Stimulation aufgrund des unphysiologischen und extrem starken Stimulus erheblich unspezifischer ist. Insofern kommt das in vivo Modell dieser Arbeit der Realität wesentlich näher. Folglich ist damit eine Übertragung der Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit auf die physiologischen Gegebenheiten des Menschen deutlich haltbarer als in einem in vitro Modell. Darüber hinaus ist die im vorliegenden Modell intravenös verabreichte Dosis von zunächst 2µg/kg/min keineswegs wirkungslos. Vielmehr handelt es sich um eine übliche Dosis, die sich in einer Reihe sowohl tierexperimenteller als auch klinischer Studien von NO-Donator-induziertem Kopfschmerz als praktikabel erwiesen hat, da bei dieser Dosierung bereits eine stabile Wirkung erzielt wird, ohne dass nennenswerte hämodynamische Auswirkungen das Ergebnis verfälschen (Iversen, 1989; Read, 1999; Reuter, 2001;

Akerman, 2002). Daher kann man davon ausgehen, dass die Stimulation trigeminaler Neurone sowie meningealer Strukturen auch für diese Untersuchungen ausreichend sein müsste.

Bei der Applikation der hohen Dosis von 50µg/kg/min GTN wurden die unvermeidbaren hämodynamischen Auswirkungen bewusst in Kauf genommen, um zu überprüfen, ob hier eine dosisabhängige Beziehung vorliegt. Dennoch zeigten sich trotz der hohen GTN-Konzentration keine Unterschiede in der CGRP-Ausschüttung. Damit scheint in diesem Modell ein Zusammenhang zwischen NO und CGRP im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung keine Rolle zu spielen.

Diese Studiendaten zeigen eindrucksvoll, dass die Mechanismen der Freisetzung sowie die pathophysiologische Bedeutung von CGRP bislang noch in weiten Teilen unklar sind. Zunächst könnte man aus den Resultaten dieser Untersuchungen schließen, dass CGRP keine bedeutsame Rolle in der Pathophysiologie der Migräne spielt. Trotz allem kann man aufgrund dieser Ergebnisse nicht grundsätzlich an der Bedeutung von CGRP bei diesem Krankheitsbild zweifeln. Das vorliegende Modell vermag nicht auszuschließen, dass hohe NO-Dosen in der Lage sind, eine CGRP-Ausschüttung hervorzurufen. Darüber hinaus sprechen die Tatsachen, dass einerseits die CGRP-Plasmakonzentration in der Vena jugularis während spontaner Kopfschmerzattacken in einigen Studien erhöht ist und andererseits, dass CGRP in der Lage ist, Migräneattacken auszulösen, sehr wohl dafür, dass dem trigeminalen System und damit vermutlich auch CGRP eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie der Migräne zukommt, auch wenn dies im Tiermodell dieser Arbeit experimentell nicht reproduzierbar war. Einen wichtigen Beweis für die Bedeutung von CGRP liefert eine klinische Studie der Arbeitsgruppe um Olesen et al., die die Wirkung des nicht-peptidergen CGRP-Rezeptorantagonisten BIBN4096BS untersuchte. Diese klinische Studie konnte zeigen, dass BIBN4096BS in der Lage ist, bei einer verabreichten Dosis von 2,5mg in 66% der Fälle den Migränekopfschmerz schwerer oder mittlerer Intensität nach 2 Stunden zu einem Kopfschmerz leichter Intensität zu reduzieren oder gar vollständig zu beseitigen. Darüber hinaus zeigte sich auch bei den sekundären Zielparametern, d.h. der Ansprechrate nach 30 Minuten, der Wirksamkeit über einen Zeitraum von 24 Stunden, der Besserung von Übelkeit, Photo- und Phonophobie sowie

dem Gebrauch von Schmerzmitteln zur Attackenunterbrechung (rescue medication), eine signifikante Überlegenheit gegenüber Placebo (Olesen, 2004).

Aufgrund der damit nachgewiesenen Wirksamkeit von CGRP-Rezeptorantagonisten zur Behandlung von Migräneattacken ist die Bedeutung von CGRP in der Pathophysiologie der Migräne nicht mehr von der Hand zu weisen. Dennoch steht das Ergebnis der Untersuchung dieser Arbeit keineswegs im Widerspruch zu dieser Tatsache. Vielmehr ist denkbar, dass die CGRP-Plasmakonzentration im Rahmen einer Migräneattacke, und möglicherweise auch im Modell dieser Arbeit über eine NO-induzierte Simulation des Ganglion trigeminale durchaus ansteigt, dass dieser Anstieg jedoch so gering und lokal begrenzt ist, dass er mit einem gängigen Radioimmunoassay Kit nicht zuverlässig erfassbar ist, da die ohnehin geringe Konzentrationszunahme von CGRP bis zur Abnahmestelle in der Vena jugularis durch Verdünnung bereits weitgehend aufgehoben ist. Für die Relevanz eines solchen Verdünnungsmechanismus spricht auch, dass bereits bei den ersten Untersuchungen, die einen Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration nachweisen konnten, dieser Nachweis lediglich in der Vena jugularis externa gelang. In derselben Studie konnte dieser Konzentrationsanstieg bereits in der Vena radialis nicht mehr nachgewiesen werden. Denkbar wäre auch, dass ausgeschüttetes CGRP nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren kann. Dies könnte erklären, weshalb auf der einen Seite CGRP-Rezeptorantagonisten effektive Migränetherapeutika darstellen, was eindeutig für die pathophysiologische Bedeutung von CGRP spricht, auf der anderen Seite aber ein Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration in der extrakraniellen Zirkulation nur bedingt nachweisbar ist. In den Studien, in denen solch ein Nachweis während einer Migräneattacke gelungen ist, beruht dies möglicherweise darauf, dass während dieser Attacke die Blut-Hirn-Schranke durchlässig geworden ist. Neben dieser diagnostischen Problematik, die vermutlich auf einer sehr geringen und nur lokal begrenzten Konzentrationsänderung beruht, kommt erschwerend hinzu, dass eine hohe interindividuelle Variabilität der CGRP-Plasmakonzentration zwischen den einzelnen Versuchstieren besteht, wodurch die niedrige Detektionsgrenze, die den Radioimmunoassay zu einer der sensitivsten Möglichkeiten der Analyse von CGRP-Plasmakonzentrationen macht, wieder relativiert wird.

Vor dem Hintergrund dieser Datenlage wäre allerdings denkbar, dass nicht nur lokal begrenzte Ausschüttung, Verdünnungsmechanismen, interindividuelle Variabilität und die Existenz der Blut-Hirn-Schranke den Nachweis eines CGRP-vermittelten Mechanismus erschweren, sondern dass neben diesem möglicherweise auch andere Wege von Bedeutung sind, die letzten Endes zum Kopfschmerz führen. Für die mögliche Existenz solcher Mechanismen spricht in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass der Nachweis einer erhöhten CGRP-Plasmakonzentration bislang, wenn überhaupt, meist anhand von in vitro Versuchen oder bis auf einige wenige Ausnahmen gar nicht gelungen ist. Dazu kommt, dass einige der Untersuchungen deutliche methodische Unzulänglichkeiten aufweisen. Die Arbeitsgruppe um Goadsby et al. führte einige der ersten richtungsweisenden Studien in Bezug auf den Zusammenhang zwischen CGRP und Migränekopfschmerz durch (Goadsby 1990, 1993). Nach wie vor sind diese Ergebnisse eine der wenigen, die überhaupt einen solchen Zusammenhang aufzeigen. Dennoch sind gerade diese Untersuchungen nicht unproblematisch, vielmehr sind sie exemplarisch für die methodischen Unzulänglichkeiten, die in einigen dieser Studien auftreten und die die Schwierigkeit des konstanten, zuverlässigen Nachweises eines Anstiegs der CGRP-Plasmakonzentration sehr verdeutlichen. In erster Linie ist in den genannten Studien von Goadsby et al. die Wahl der Kontrollgruppe sehr problematisch. Verglichen wurden Blutproben von Migränepatienten, die sich in der neurologischen Universitätsklinik in Sydney (Australien) vorstellten mit Blutproben einer nicht näher spezifizierten Kontrollgruppe aus Schweden (Goadsby, 1990; Tvedskov, 2005). Somit ist eine direkte Vergleichbarkeit beider Gruppen keineswegs gegeben. Hinzu kommt, dass für eine dieser Studien lediglich 8 Patienten untersucht wurden, wobei davon einige Migräne mit Aura, andere Migräne ohne Aura hatten. Unter den Patienten befanden sich sowohl Männer als auch Frauen. Damit wird nicht berücksichtigt, dass die CGRP-Plasmakonzentration nicht nur geschlechtsspezifisch variieren kann, sondern dass vor allem Schwangerschaft und die Verwendung oraler Antikonceptiva große Auswirkungen auf die Plasmakonzentration haben und somit die Ergebnisse deutlich verfälschen können (Valdemarsson, 1990; Stevenson, 1986). Auch ist bei lediglich 8 Patienten die hohe interindividuelle Variabilität der CGRP-Plasmakonzentrationen keinesfalls in ausreichendem Maße berücksichtigt worden. Die Kopfschmerzen hatten bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten eine Dauer von 2 Stunden bis zu 3 Wochen. Diese lange Schmerzdauer lässt nicht nur an der richtigen Diagnose zweifeln, sondern

vernachlässigt, dass möglicherweise die lange Schmerzdauer als solche für einen Konzentrationsanstieg von CGRP verantwortlich gewesen sein kann. Sumatriptan hat in diesen Untersuchungen die CGRP-Konzentration reduziert. In diesem Zusammenhang ist allerdings denkbar, dass Sumatriptan lediglich eine normale oder stressinduzierte erhöhte CGRP-Plasmakonzentration reduziert hat, wobei dieser Effekt migräneunspezifisch wäre. In diesem Falle würde das Ergebnis mehr auf einer Sumatriptan-bedingten Reduktion, als auf einer Migräne-induzierten Elevation der CGRP-Plasmakonzentration beruhen. Wenn nun noch berücksichtigt wird, dass sich die Patienten nach Beginn ihrer Attacke zur Untersuchung ins Krankenhaus begeben mussten, und dabei bedenkt, dass körperliche Aktivität und Stress die CGRP-Plasmakonzentration erhöhen können, so ist vor allem vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl das Ergebnis sehr zu relativieren. Hinzu kommt, dass arterieller Hypertonus und möglicherweise auch das Alter einen bedeutenden Einfluss auf die CGRP-Plasmakonzentration haben können (Lind, 1996).

Eine neuere Studie der dänischen Arbeitsgruppe um Jes Olesen hat versucht, genau diese Faktoren, die die ohnehin hohe interindividuelle Variabilität der CGRP-Plasmakonzentration sehr beeinflussen können, auszuschalten. So wurden die Patienten unter standardisierteren Bedingungen zu Hause aufgesucht, um die Blutentnahmen aus der Vena jugularis externa sowie der Vena radialis zu definierten Zeitpunkten durchzuführen. Auch wurden zwei verschiedene Assays verwendet, um technische Probleme beim Nachweis von CGRP auszuschließen. Verglichen wurde die CGRP-Plasmakonzentration während einer Migräneattacke mit der Konzentration, die außerhalb einer Attacke gemessen wurde. Interessanterweise konnte diese Studie trotz der erheblich höheren Fallzahl keinen signifikanten Unterschied der CGRP-Plasmakonzentration nachweisen (Tvedskov, 2005).

Auch bei den tierexperimentellen Untersuchungen dieser Arbeit wurde versucht, technische Faktoren, die Einfluss auf das Ergebnis haben könnten, auszuschließen. Daher wurde bei einigen Tieren jeder Gruppe das Ganglion trigeminale mit Capsaicin aktiviert, von dem bekannt ist, dass es zuverlässig CGRP-Ausschüttungen hervorruft (Akerman, 2003; Brain, 2004). Die Applikation von 4µmol/kg Capsaicin führte zu einem signifikanten Anstieg der CGRP-Konzentrationen im Blut der Vena jugularis. Damit konnte bewiesen werden, dass nicht nur die operative Technik und die Platzierung des

Katheters in der Vena jugularis korrekt war, sondern mit dem verwendeten Kit zuverlässig CGRP-Konzentrationen aus dem Jugularvenenblut zu bestimmen sind, wie dies bereits in anderen Studien erfolgt ist, die u.a. unilaterale elektrische Stimulationen des Ganglion trigeminale vorgenommen hatten, um CGRP-Veränderungen nachzuweisen (Limmroth, 2001). Auch eine fehlerhafte Anwendung des Radioimmunoassay Kits ist aufgrund dieses Resultats ausgeschlossen.

Diese Resultate zeigen, dass selbst wenn einige der in der Literatur beschriebenen Studienergebnisse auf eine Beteiligung des trigeminalen Nervensystems und einer daraus resultierenden CGRP-Ausschüttung in der Migräne hindeuten, so ist nicht ausgeschlossen, dass neben diesem noch weitere Mechanismen ablaufen, die den Migränekopfschmerz auslösen und unterhalten können. Möglicherweise sind diese unter anderem dafür verantwortlich, dass der CGRP-Rezeptorantagonist BIBN4096BS bei 33% der Patienten keine Wirkung zeigt. In dieser Patientengruppe ist durchaus denkbar, dass zumindest zusätzlich, wenn nicht gar ausschließlich, andere Mechanismen der Kopfschmerzentstehung von Bedeutung sind.

Bei einigen Migränepatienten treten neben dem Kopfschmerz, der Übelkeit sowie der Licht und Geräuschempfindlichkeit gelegentlich auch parasympathische Symptome auf, wobei von denen die Lakrimation und die Rhinorrhoe am häufigsten auftreten. Demzufolge liegt nahe, dass eine Aktivierung des parasympathischen Nervensystems ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Pathophysiologie der Migräne spielt. Um dieser Vermutung nachzugehen wurden analog zu den CGRP-Untersuchungen zu den gleichen Zeitpunkten die Plasmakonzentrationen von VIP, dem in diesem Zusammenhang wichtigsten Neurotransmitter des parasympathischen Nervensystems, bestimmt. Die Ergebnisse der Analyse der VIP-Konzentrationen nach NO-induzierter Stimulation des trigeminovaskulären Systems, zeigen auf, dass neben der trigeminalen Aktivierung eine parasympathische Aktivierung durchaus von Bedeutung zu sein scheint. Diese Vermutung ergibt sich nicht nur dadurch, dass die VIP-Konzentration 35 Minuten nach Beginn der NO-Donator-Infusion zunimmt, sondern vor allem dadurch, dass dieser Zeitpunkt mit dem klinisch beobachteten Einsetzen der Kopfschmerzen korreliert.

Damit reiht sich der in dieser Studie nachgewiesene VIP-Anstieg in eine Vielzahl von Studienergebnissen ein, die darlegen, dass trigeminales und parasympathisches Nervensystem eng miteinander vernetzt sind und somit die Wirkung beider nicht immer exakt voneinander abgrenzbar ist. In den Untersuchungen von Goadsby et al., in denen Neuropeptide während einer Migräneattacke bestimmt wurden, zeigte sich in erster Linie ein Zusammenhang zwischen CGRP und Migräne. Darüber hinaus zeigte sich aber bei zwei der in die Studie eingeschlossenen Patienten, die unter Migräne mit Aura litten und deren Symptomatik mit Rhinorrhoe und Lakrimation einherging, ein deutlicher Anstieg der VIP-Plasmakonzentration in der Vena jugularis externa. Vor diesem Hintergrund scheinen sich beide Nervensysteme im Falle der Migräne zu ergänzen. Ein eindrucksvolles Beispiel für die Vernetzung ist die bereits aufgeführte Co-Lokalisation einiger Neurotransmitter bzw. deren Rezeptoren in beiden Nervensystemen. Die Co-Lokalisation jener Neurotransmitter, denen offensichtlich eine bedeutende Rolle in der Auslösung primärer Kopfschmerzsyndrome zukommt, sowie das Auftreten parasympathischer Symptome während einer Migräneattacke legen die Vermutung nahe, dass eine isolierte trigeminale Aktivierung für die pathophysiologischen Abläufe dieser Erkrankung unwahrscheinlich ist und somit keine vollständige Erklärung für die pathophysiologischen Zusammenhänge der Migräne geben kann. Vielmehr erscheint es aufgrund der Resultate dieser Untersuchungen sowie der aktuellen Studienlage viel wahrscheinlicher, dass NO in der Lage ist, Kopfschmerz über CGRP-unabhängige Mechanismen auszulösen. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei diesen um VIP-abhängige Mechanismen handeln könnte, wodurch auch dem parasympathischen Nervensystem eine bedeutende Rolle in der Auslösung und Unterhaltung der Migräne zukommt.

5 Zusammenfassung

Als Grundlage der Pathophysiologie der Migräne wird die Aktivierung des trigeminovaskulären Systems angesehen. In tierexperimentellen Untersuchungen führt diese zu einer ausgeprägten Vasodilatation, einer Plasmaproteinextravasation sowie einer Reihe weiterer Veränderungen in der Dura mater, die in ihrer Gesamtheit als *neurogene Inflammation* bezeichnet werden.

Das trigeminale System kann mit dem NO-Donator *Glyceroltrinitrat* (GTN) zuverlässig aktiviert werden. GTN ist in der Lage sowohl bei Menschen eine typische Migräneattacke auszulösen (Olesen, 1993; 1994) als auch im Tierexperiment eine Reihe von Veränderungen zu induzieren (Reuter 2001; 2002), die mit der Genese eines Migränekopfschmerzes vereinbar sind. Der trigeminale Neurotransmitter *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) ist in der Lage, ebenso wie GTN, eine Kopfschmerzattacke auszulösen, die die IHS-Kriterien einer Migräne erfüllt (Lassen, 2002). Der zeitliche Verlauf der Kopfschmerzreaktion ist dabei bei beiden Auslösern sehr ähnlich. Hingegen führt BIBN4096BS, ein neuer nicht-peptiderger CGRP-Rezeptorantagonist, in 66% der Fälle zu einer deutlichen Reduktion der Intensität des Migränekopfschmerzes.

Zusammengefasst gibt es damit eine hohe Evidenz, dass die GTN-induzierte Kopfschmerzattacke CGRP-vermittelt sein könnte. Über welche Mechanismen GTN das trigeminovaskuläre System aktivieren kann und welche Schritte dieser Aktivierung folgen könnten, um letztendlich den Kopfschmerz hervorzurufen, ist allerdings bislang weitgehend unklar.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zu untersuchen, ob GTN über eine Aktivierung des trigeminalen Nervensystems zu einer Ausschüttung des trigeminalen Neuropeptids *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) führt. Damit wäre nicht nur eine Aktivierung des trigeminalen Nervensystems nachgewiesen, sondern es wäre ein weiterer Schritt in Richtung Schmerzentstehung als Folge der trigeminalen Aktivierung aufgezeigt.

Die Aktivierung des *trigeminalen nucleus caudalis* (TNC) führt in einigen Fällen zur Aktivierung des ipsilateralen *Nucleus salivatorius superior* (SSN) und des *Ganglion*

sphenopalatinum (SPG), was eine Ausschüttung parasymphischer Neurotransmitter in die Blutgefäße der Dura mater zur Folge haben könnte (trigemino-parasymphischer Reflex). Dieser Ablauf könnte erklären, weshalb in einigen Fällen die Migräne mit typischen parasymphischen Phänomenen wie einer Lakrimation und einer Rhinorrhoe einhergeht. Aus diesem Grund bestand ein weiteres Ziel der Untersuchungen darin, zu klären, ob sich mit NO-Donatoren das parasymphische Nervensystem aktivieren lässt, wodurch ein Anstieg der Plasmakonzentration des *vasoaktiven intestinalen Polypeptids* (VIP), dem bedeutendsten parasymphischen Neuropeptid, nachweisbar sein müsste (Bolay, 2002).

In den Untersuchungen dieser Arbeit wurde zur Aktivierung des trigeminalen und des parasymphischen Nervensystems ein NO-Donator (GTN bzw. DEA-NONOate) intravenös verabreicht. Im Anschluss wurde Blut aus der ipsilateralen Vena jugularis entnommen und die Plasmakonzentration von CGRP (trigeminal) und VIP (parasymphisch) bestimmt.

Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte konnte nach NO-Donator-Infusion ein statistisch signifikanter Anstieg der CGRP-Plasmakonzentration nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu führt die NO-Donator-Infusion nach 35 Minuten zu einem Anstieg der VIP-Plasmakonzentration. Dieser Zeitpunkt entspricht dem klinischen Einsetzen des sofortigen Kopfschmerzes nach GTN-Infusion.

Das Ergebnis deutet darauf hin, dass NO-Donatoren in der Lage sind Kopfschmerzen bzw. deren vermutlich pathophysiologisches Korrelat im Tiermodell über CGRP-unabhängige Mechanismen auszulösen. Aus den Untersuchungen geht ebenfalls hervor, dass in diesem Zusammenhang dem parasymphischen Nervensystem mit VIP als dem wichtigsten Neurotransmitter vermutlich eine bedeutende Rolle zukommt.

Der tierexperimentelle Nachweis der Bedeutung von CGRP in der Pathophysiologie der Migräne ist grundsätzlich sehr problematisch. Die bisher existenten tierexperimentellen Untersuchungen, die CGRP mit der Kopfschmerzentstehung in Zusammenhang bringen sind vielfältig aber häufig nur schwer auf den Menschen zu übertragen. Aus meinen Untersuchungen und aufgrund weiterer Ergebnisse aus der Literatur muss gefolgert werden, dass weitere CGRP-unabhängige Mechanismen im GTN-Migräne-Modell zur Entwicklung der Kopfschmerzattacke beitragen. Klinisch konnte der Zusammenhang

zwischen CGRP und Migräne hingegen deutlich belegt werden, auch wenn der Nachweis erhöhter CGRP-Konzentrationen während der Migräneattacke bisher nicht eindeutig nachgewiesen wurde. Jedoch konnten Olesen et al. in einer klinischen Studie die Wirksamkeit des CGRP-Rezeptorantagonisten BIBN4096BS in der Behandlung von Migräneattacken nachweisen (Olesen, 2004). Damit ist davon auszugehen, dass CGRP ein bedeutendes Element in der Pathophysiologie der Migräne darstellt.

Die Schwierigkeit Veränderungen der CGRP-Plasmakonzentration im Tiermodell zu erfassen beruht möglicherweise darauf, dass die Konzentrationsveränderungen nur sehr gering und lokal begrenzt erfolgen und vor dem Hintergrund einer relativ hohen interindividuellen Variation der CGRP-Plasmakonzentration den zuverlässigen Nachweis sehr erschweren. Auch ist in diesem Zusammenhang zu berücksichtigen, dass es sich bei dem klinisch nachgewiesenen GTN-induzierten Kopfschmerz um ein zweiphasiges Ereignis handelt, von dem nur der verzögerte Kopfschmerz die IHS-Kriterien einer Migräne erfüllt. Ob diese zwei Kopfschmerzepisoden zwei verschiedene pathophysiologische Phänomene darstellen, konnte objektiv weder experimentell noch klinisch eindeutig geklärt werden. Somit ist denkbar, dass der sofortige Kopfschmerz, der in dieser Arbeit vorwiegend untersucht wurde, über CGRP-unabhängige Mechanismen ausgelöst wird.

Der in dieser Arbeit nachgewiesene Anstieg der VIP-Plasmakonzentration belegt die Aktivierung des parasympathischen Nervensystems. Diese Aktivierung könnte das Auftreten parasympathischer Symptome bei einigen der Migränepatienten erklären.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass beim GTN-induzierten Kopfschmerz vermutlich ein Zusammenspiel des trigeminalen und des parasympathischen Nervensystems stattfindet. Der sofortige Kopfschmerz kommt möglicherweise durch eine direkte sensibilisierende Wirkung des NO und eine Aktivierung parasympathischer Neurone zustande. In Bezug auf den verzögerten Kopfschmerz, d.h. die eigentliche Migräneattacke, erscheint dies allerdings aufgrund der kurzen Halbwertszeit von NO sehr unwahrscheinlich. In diesem Falle deutet vieles darauf hin, dass NO die Migräneattacken über eine CGRP-assoziierte Aktivierung des trigeminovaskulären Systems auslöst.

Tabellen

Tab. 1: Physiologische Parameter CGRP-Versuche

	GTN <i>2 µg/kg/min</i>	GTN <i>50 µg/kg/min</i>	DEA-NONOate <i>25nmol/kg</i>	NaCl <i>0,9%</i>
Temperatur	36,98 ± 0,46	36,91 ± 0,45	37,06 ± 0,51	37,17 ± 0,47
pCO₂	41,01 ± 3,35	37,38 ± 2,98	40,94 ± 6,40	39,56 ± 5,53
pO₂	129,96 ± 28,64	130,36 ± 29,15	104,26 ± 7,71	134,51 ± 24,49
PH	7,41 ± 0,02	7,40 ± 0,04	7,44 ± 0,02	7,43 ± 0,03
Blutdruck	85,01 ± 31,59	74,39 ± 28,65	81,25 ± 25,57	94,24 ± 33,34

Tab. 2: Physiologische Parameter VIP-Versuche

	GTN <i>50 µg/kg/min</i>	Glucose <i>5%</i>
Temperatur	36,92 ± 0,67	37,01 ± 0,63
pCO₂	31,78 ± 2,68	33,33 ± 4,89
pO₂	122,79 ± 15,48	126,76 ± 32,12
pH	7,44 ± 0,03	7,42 ± 0,04
Blutdruck	66,84 ± 25,26	87,00 ± 20,24

Tab. 3: CGRP-Plasmakonzentrationen (Angaben in fmol/ml)

	GTN <i>2 µg/kg/min</i> <i>(n=7)</i>	GTN <i>50 µg/kg/min</i> <i>(n=7)</i>	DEA-NONOate <i>25nmol/kg</i> <i>(n=4)</i>	NaCl <i>0,9%</i> <i>(n=8)</i>
Baseline	7,80 ± 2,43	6,94 ± 2,33	6,46 ± 0,89	7,36 ± 1,96
2 min	6,22 ± 1,36	6,29 ± 2,25	7,09 ± 1,36	6,04 ± 1,97
15 min	7,30 ± 2,74	6,58 ± 2,34	4,89 ± 0,24	6,10 ± 1,78
35 min	7,48 ± 2,64	6,22 ± 2,15	5,24 ± 0,98	5,76 ± 1,28
Capsaicin	17,07 ± 8,91	29,13 ± 16,97	40,96 ± 16,21	35,27 ± 24,65

Tab. 4: Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte der CGRP-Bestimmung innerhalb der Gruppen (T-Test bei gepaarten Stichproben)

	GTN <i>2 µg/kg/min</i> (n=7)	GTN <i>50 µg/kg/min</i> (n=7)	DEA- NONOate <i>25nmol/kg</i> (n=4)	NaCl <i>0,9%</i> (n=8)
Base vs. 2 Min	p = 0,129	p = 0,396	p = 0,603	p = 0,008
Base vs. 15 Min	p = 0,574	p = 0,709	p = 0,027	p = 0,006
Base vs. 35 Min	p = 0,394	p = 0,359	p = 0,020	p = 0,015
2 Min vs. 15 Min	p = 0,280	p = 0,682	p = 0,051	p = 0,859
2 Min vs. 35 Min	p = 0,209	p = 0,940	p = 0,164	p = 0,635
15 Min vs. 35 Min	p = 0,823	p = 0,748	p = 0,483	p = 0,387
Base vs. Capsaicin	p = 0,006	p = 0,004	p = 0,010	p = 0,001
2 Min vs. Capsaicin	p = 0,002	p = 0,002	p = 0,007	p = 0,001
15 Min vs. Capsaicin	p = 0,007	p = 0,001	p = 0,005	p = 0,001
35 Min vs. Capsaicin	p = 0,007	p = 0,003	p = 0,010	p = 0,0001

Tab. 5: Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen der CGRP-Bestimmung (T-Test bei unabhängigen Stichproben)

	GTN <i>2µg/kg/min</i> vs. NaCl 0,9%	GTN <i>50µg/kg/min</i> vs. NaCl 0,9%	DEA-NONOate <i>25nmol/kg</i> vs. NaCl 0,9%
Baseline	p = 0,560	p = 0,764	p = 0,171
2 Min	p = 0,505	p = 0,416	p = 0,550
15 Min	p = 0,342	p = 0,470	p = 0,059
35 Min	p = 0,056	p = 0,092	p = 0,788

Tab. 6: VIP-Plasmakonzentrationen (Angaben in fmol/ml)

	GTN <i>50 µg/kg/min</i> (n=8)	Glucose <i>5%</i> (n=7)
Baseline	9,38 ± 2,69	7,82 ± 3,31
2 min	7,20 ± 3,05	7,03 ± 2,57
15 min	5,83 ± 1,97	4,93 ± 2,01
35 min	6,64 ± 3,69	4,20 ± 2,73
Capsaicin	6,34 ± 3,08	3,83 ± 0,98

Tab. 7: Vergleich der Zeitpunkte innerhalb der Gruppen der VIP-Bestimmung (T-Test bei gepaarten Stichproben)

	GTN <i>50 µg/kg/min</i> (n=8)	Glucose <i>5%</i> (n=7)
Base vs. 2 Min	p = 0,100	p = 0,449
Base vs. 15 Min	p = 0,010	p = 0,029
Base vs. 35 Min	p = 0,092	p = 0,041
2 Min vs. 15 Min	p = 0,059	p = 0,065
2 Min vs. 35 Min	p = 0,483	p = 0,077
15 Min vs. 35 Min	p = 0,336	p = 0,330
Base vs. Capsaicin	p = 0,019	p = 0,014
2 Min vs. Capsaicin	p = 0,013	p = 0,051
15 Min vs. Capsaicin	p = 0,048	p = 0,811
35 Min vs. Capsaicin	p = 0,062	p = 0,711

Tab. 8: Vergleich der verschiedenen Gruppen der VIP-Bestimmung (T-Test bei unabhängigen Stichproben)

	GTN <i>50µg/kg/min</i> vs. Glucose 5%
Baseline	p = 0,410
2 Min	p = 0,730
15 Min	p = 0,621
35 Min	p = 0,752

Literaturverzeichnis

Akerman S, Williamson DJ, Kaube H et al. Nitric oxide synthase inhibitors can antagonize neurogenic and calcitonin gene-related peptide induced dilation of dural meningeal vessels. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 62-68

Akerman S, Kaube H, Goadsby PJ. Vanilloid type 1 receptors (VR1) on trigeminal sensory nerve fibres play a minor role in neurogenic dural vasodilatation, and are involved in capsaicin-induced dural dilation. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 718-724

Ashina M, Bendtsen L, Jensen R et al. Calcitonin gene-related peptide levels during nitric oxide-induced headache in patients with chronic tension-type headache. *Eur J Neurol* 2001; 8: 173-178

Bolay H, Reuter U, Dunn AK. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 2002; 8: 136-142

Brain SD, Williams TJ. Interactions between the tachykinins and calcitonin gene-related peptide lead to the modulation of oedema formation and blood flow in rat skin. *Br J Pharmacol* 1989; 97: 77-82

Buzzi MG, Dimitriadou V, Theoharides TC et al. 5-Hydroxytryptamine receptor agonists for the abortive treatment of vascular headaches block mast cell, endothelial and platelet activation within the rat dura mater after trigeminal stimulation. *Brain Res.* 1992; 583: 137-49.

Brain SD, Grant AD. Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin. *Physiol Rev* 2004; 84: 903-934

Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389: 816-824

Costa A, Ravaglia S, Sances G et al. Nitric oxide pathway and response to nitroglycerin in cluster headache patients: plasma nitrite and citrulline levels. *Cephalalgia* 2003; 23: 407-413

Dimitriadou V, Buzzi MG, Moskowitz MA et al. Trigeminal sensory fiber stimulation induces morphological changes reflecting secretion in rat dura mater mast cells. *Neuroscience* 1991; 44: 97-112

Dimitriadou V, Buzzi MG, Theoharides TC et al. Ultrastructural evidence for neurogenically mediated changes in blood vessels of the rat dura mater and tongue following antidromic trigeminal stimulation. *Neuroscience* 1992; 48: 187-203

Ebersberger A, Averbeck B, Messlinger K et al. Release of substance P, calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E₂ from rat dura mater encephali following electrical and chemical stimulation in vitro. *Neuroscience* 1999; 89: 901-907

Edvinsson L, Goadsby PJ. Neuropeptides in migraine and cluster headache. *Cephalalgia* 1994; 14: 320-7

Edvinsson L, Goadsby PJ. Neuropeptides in headache. *Eur J Neurol* 1998; 5: 329-341

Edvinsson L. Blockade of CGRP receptors in the intracranial vasculature: a new target in the treatment of headache. *Cephalalgia* 2004; 24: 611-622

Ekbom K. Nitroglycerin as a provocative agent in cluster headache. *Arch Neurol* 1968; 19: 487-93

Ellrich J, Schepelmann K, Pawlak M et al. Acetylsalicylic acid inhibits meningeal nociception in rat. *Pain* 1999; 81: 7-14

Fernandez-Patron C, Stewart KG, Zhang Y et al. Vascular matrix metalloproteinase-2-dependent cleavage of calcitonin gene-related peptide promotes vasoconstriction. *Circ Res* 2000; 87: 670-676

Fischer MJ, Koulchitsky S, Messlinger K. The nonpeptide calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN4096BS lowers the activity of neurons with meningeal input in the rat spinal trigeminal nucleus. *J Neurosci* 2005; 25: 5877-83

Geppetti P, Del Bianco E, Patacchini R et al. Low pH-induced release of calcitonin gene-related peptide from capsaicin-sensitive sensory nerves: mechanism of action and biological response. *Neuroscience* 1991; 41: 295-301

Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Release of vasoactive peptides in the extracerebral circulation of humans and the cat during activation of the trigeminovascular system. *Ann Neurol* 1988; 23: 193-196

Goadsby PJ, Edvinsson L, Ekman R. Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache. *Ann Neurol* 1990; 28: 183-187

Goadsby PJ, Edvinsson L. The trigeminovascular system and migraine: studies characterizing cerebrovascular and neuropeptide changes seen in humans and cats. *Ann Neurol* 1993; 33: 48-56

Goadsby PJ, Edvinsson L. Human in vivo evidence for trigeminovascular activation in cluster headache. Neuropeptide changes and effects of acute attacks therapies. *Brain* 1994; 117: 427-34

Goadsby PJ, Uddman R, Edvinsson L. Cerebral vasodilatation in the cat involves nitric oxide from parasympathetic nerves. *Brain Res* 1996; 707: 110-118

Goldstein DJ, Wang O, Saper JR et al. Ineffectiveness of neurokinin-1 antagonist in acute migraine: a crossover study. *Cephalalgia* 1997; 17: 785-90

Gulbenkian S, Uddman R, Edvinsson L. Neuronal messengers in the human cerebral circulation. *Peptides* 2001; 22: 995-1007

Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society. The international classification of headache disorders. *Cephalalgia* 2004; 24 Suppl 1: 1-151

Holzer P. Local effector functions of Capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins and other neuropeptides, *Neuroscience* 1988; 24:739-768

Hoskin KL, Bulmer DCE, Goadsby PJ. Fos expression in the trigeminocervical complex of the cat after stimulation of the superior sagittal sinus is reduced by L-NAME. *Neurosc Lett* 1999; 266: 173-176

Iadecola C. From CSD to headache: A long and winding road. *Nat Med* 2002; 8: 110-112

Iversen HK, Olesen J, Tfelt-Hansen P. Intravenous nitroglycerin as an experimental model of vascular headache. Basic characteristics. *Pain* 1989; 38: 17-24

Iversen HK, Olesen J. Headache induced by a nitric oxide donor (nitroglycerin) responds to sumatriptan. A human model for development of migraine drugs. *Cephalalgia* 1996; 16: 412-418.

Jakubowski M, Levy D, Goor-Aryeh I et al. Terminating migraine with allodynia and ongoing central sensitization using parenteral administration of COX1/COX2 inhibitors. *Headache* 2005; 45: 850-861

Johnson KW, Nelson DL, Dieckman DK. Neurogenic dural protein extravasation induced by meta-chlorophenylpiperazine (mCPP) involves nitric oxide and 5-HT_{2B} receptor activation. *Cephalalgia* 2003; 23: 117-123

Juhasz G, Zsombok T, Modos EA et al. NO-induced migraine attack: strong increase in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and negative correlation with platelet serotonin release. *Pain* 2003; 106: 461-470

Juhasz G, Zsombok T, Jakab B et al. Sumatriptan causes parallel decrease in plasma calcitonin gene-related peptide (CGRP) concentration and migraine headache during nitroglycerin induced migraine attack. *Cephalalgia* 2005; 25: 179-83

Knyihár-Csillik E, Vécsei L. Effect of a nitric oxide donor on nitroergic nerve fibers in the rat dura mater. *Neurosc Lett* 1999; 260: 97-100

Kurosawa M, Messlinger K, Pawlak M et al. Increase of meningeal blood flow after electrical stimulation of rat dura mater encephali: mediation by calcitonin gene-related peptide. *Br J Pharmacol* 1995; 114: 1397-1402

Lambert GA, Donaldson C, Boers PM et al. Activation of trigeminovascular neurons by glyceryl trinitrate. *Brain Res* 2000; 887: 203-210

Lassen LH, Ashina M, Christiansen I et al. Nitric oxide synthase inhibition in migraine. *Lancet* 1997; 349: 401-2

Lassen LH, Ashina M, Christiansen I et al. Nitric oxide synthase inhibition: a new principle in the treatment of migraine attacks. *Cephalalgia* 1998; 18: 27-32

Lassen LH, Haderslev PA, Jacobsen VB et al. CGRP may play a causative role in migraine. *Cephalalgia* 2002; 22: 54-61

Launer LJ, Terwindt GM, Ferrari MD. The prevalence and characteristics of migraine in a population-based cohort: The GEM study. *Neurology* 1999; 53: 537-542

Limmroth V, May A, Auerbach P et al. Changes in cerebral blood flow velocity after treatment with sumatriptan or placebo and implications for the pathophysiology of migraine. *J Neurol Sci* 1996; 138: 60-5

Limmroth V, Katsarava Z, Liedert B et al. An in vivo rat model to study Calcitonin gene related peptide release following activation of the trigeminal vascular system. *Pain* 2001; 92: 101-106

Lind H, Brudin L, Lindholm L et al. Different levels of sensory neuropeptides (calcitonin gene-related peptide and substance P) during and after exercise in man. *Clin Physiol* 1996; 16: 73-82

Markowitz S, Saito K, Moskowitz MA. Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain. *J Neurosci* 1987; 7: 4129-4136

Mitsikostas DD, Sanchez del Rio M. Receptor systems mediating c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis in animal models of migraine. *Brain Res Rev* 2001 ; 35 : 20-35

Moskowitz MA. Interpreting vessel diameter changes in vascular headaches. *Cephalalgia.* 1992; 12: 5-7

Olesen J, Iversen H, Thomsen LL. Nitric oxide supersensitivity: a possible molecular mechanism of migraine pain. *Neuroreport* 1993; 4: 1027-1030

Olesen J, Thomsen LL, Iversen H. Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches. *TiPS* 1994; 15: 149-153

Olesen J, Diener HC, Husstedt IW et al. Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN4096BS for the acute treatment of migraine. *N Engl J Med* 2004; 350: 1104-10

Phebus LA, Johnson KW, Stengel PW, et al. The non-peptide NK-1 receptor antagonist LY303870 inhibits neurogenic dural inflammation in guinea pigs. *Life Sci.* 1997; 60: 1553-1561

Polley JS, Gaskin PJ, Perren MJ, et al. The activity of GR205171, a potent non-peptide tachykinin NK1 receptor antagonist in the trigeminovascular system. *Regul Pept.* 1997; 68: 23-29

Rasmussen BK, Olesen J. Migraine with aura and migraine without aura: an epidemiological study. *Cephalalgia* 1992; 12: 221-8

Rasmussen BK. Epidemiology of headache. *Cephalalgia* 2001; 21: 774-777

Read S, Manning P, McNeil CJ et al. Effects of sumatriptan on nitric oxide and superoxide balance during glyceryl trinitrate infusion in the rat. Implications for antimigraine mechanisms. *Brain Res* 1999; 847: 1-8

Reuter U, Bolay H, Jansen-Olesen I et al. Delayed inflammation in rat meninges: implications for migraine pathophysiology. *Brain* 1998; 124: 2490-2502

Reuter U, Bolay H, Jansen-Olesen I et al. Delayed inflammation in rat meninges: implications for migraine pathophysiology. *Brain* 2001; 124: 2490-2502

Shepherd SL, Williamson DJ, Hill RG, et al. The non-peptide Neurokinin 1 receptor antagonist, RP67580, blocks neurogenic plasma extravasation in the dura mater of rats, *Br J Pharmacol.* 1993;108: 11-12

Somjen GG. Mechanisms of spreading depression and hypoxic spreading depression-like depolarization. *Physiol Rev.* 2001; 81: 1065-1096

Stevenson JC, Macdonald DW, Warren RC et al. Increased concentration of circulating calcitonin gene-related peptide during normal human pregnancy. *Br Med J (Clin Res Ed)* 1986; 293: 1329-1330

Storer RJ, Akerman S, Goadsby PJ. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) modulates nociceptive trigeminovascular transmission in the cat. *B J Pharmacol* 2004; 142: 1171-1181

Strecker T, Dux M, Messlinger K. Increase in meningeal blood flow by nitric oxide – interaction with calcitonin gene-related peptide receptor and prostaglandin synthesis inhibition. *Cephalalgia* 2002; 22: 233-241

Strecker T, Dux M, Messlinger K. Nitric oxide releases calcitonin gene-related peptide from rat dura mater encephali promoting increases in meningeal blood flow. *J Vasc Res* 2002; 39: 489-496

Strecker T, Messlinger K. Neuropeptidfreisetzung in den Hirnhäuten durch Stickstoffmonoxid – Bedeutung für die Entstehung vaskulärer Kopfschmerzen. *Schmerz* 2003; 17: 179-184

Tassorelli C, Joseph SA. Systemic nitroglycerin induces fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat. *Brain Res* 1995; 682: 167-181

Trainor DC, Jones RC. Headaches in explosive magazine workers. *Arch Environ Health* 1966; 12: 231-4

Tvedskov JF, Lipka K, Ashina M et al. No increase of calcitonin gene-related peptide in jugular blood during migraine. *Ann Neurol* 2005; 58: 561-568

Valdemarsson S, Edvinsson L, Hedner P et al. Hormonal influence on calcitonin gene-related peptide in man: effects of sex difference and contraceptive pills. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50: 385-8

Wei EP, Moskowitz MA, Boccalini P et al. Calcitonin gene-related peptide mediates nitroglycerin and sodium nitroprusside-induced vasodilation in feline cerebral arterioles. *Circ Res* 1992; 70: 1313-9

Welch KMA, Cao Y, Aurora S et al. MRI of the occipital cortex, red nucleus, and substantia nigra during visual aura of migraine. *Neurology*. 1998; 51: 1465-1469

Williamson DJ, Hargreaves RJ, Hill RG et al. Sumatriptan inhibits neurogenic vasodilation of dural blood vessels in the anaesthetized rat – intravital microscope studies. *Cephalalgia* 1997; 17: 525-31

Williamson DJ, Hargreaves RJ. Neurogenic inflammation in the context of migraine. *Microsc Res Tech* 2001; 53: 167-178

Woods RP, Iacoboni M, Mazziotta JC. Bilateral spreading cerebral hypoperfusion during spontaneous migraine headache. *N Engl J Med*. 1994; 331: 1689-1692

Publikationen

N. Offenhauser, T. Zinck, J. Hoffmann, K. Schiemann, S. Schuh-Hofer, W. Rohde, G. Arnold, U. Dirnagl, I. Jansen-Olesen, U. Reuter

CGRP release and C-fos expression within trigeminal nucleus caudalis of the rat following glyceryltrinitrate infusion

Cephalalgia, March 2005; 25 (3):225-36

U. Reuter, N. Offenhauser, T. Zinck, J. Hoffmann, K. Schiemann, S. Schuh-Hofer, C. Böhnke, G. Arnold, U. Dirnagl

Nitroglycerin infusion does not cause CGRP release in the rat and attenuates capsaicin-induced c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis

Cephalalgia, September 2003; 23 (7): 654

Erklärung an Eides Statt

Ich, Jan Rodrigo Hoffmann, erkläre, dass die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Neuropeptidausschüttung nach NO-Donator Infusion in der Ratte

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den 10.02.2007

Jan Rodrigo Hoffmann

Danksagung

Herrn PD Dr. med. Uwe Reuter möchte ich für die konstruktive und kritische Begleitung dieser Arbeit sowie für das entgegengebrachte Vertrauen und die Unterstützung meines bisherigen klinischen Werdeganges sehr herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. med. Karl M. Einhäupl sowie Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Dirnagl möchte ich für die wissenschaftliche Zusammenarbeit, konstruktive Unterstützung und intellektuelle Begleitung sehr danken.

Allen Mitarbeitern der Klinik für Neurologie der Charité sowie der Abteilung für experimentelle Neurologie danke ich für ihre freundliche Aufnahme und Zusammenarbeit. Mein besonderer Dank gilt Frau Sonja Blumenau für ihre tatkräftige Unterstützung.

Herrn Dr. rer. pol. Ulrich Mösta möchte ich für seine langjährige emotionale und intellektuelle Unterstützung und seine konstruktiven Anmerkungen sehr herzlich danken.

Meiner Verlobten Maria de los Angeles danke ich von ganzem Herzen für ihre jahrelange liebevolle emotionale Begleitung, Geduld und tatkräftige Unterstützung. Max und Felix danke ich für ihre Begleitung, die mir insbesondere in schwierigen Momenten von großer Bedeutung war.

Meinen Eltern Manfred und Marisa möchte ich für ihre großzügige Förderung und emotionale Begleitung sehr danken. Sie haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Meinem Bruder Björn möchte ich an dieser Stelle für seine emotionale Begleitung, sein entgegengebrachtes Verständnis und seine tatkräftige Unterstützung von ganzem Herzen danken. Ohne Dich, mein lieber Björn, wäre mein bisheriger persönlicher und akademischer Werdegang in dieser Form nicht möglich gewesen.

Curriculum vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht

