

Aus der Klinik für Neurologie,
Abteilung für Experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Bedeutung primärer und sekundärer trigeminaler Neurone
für die Ausschüttung von Calcitonin Gene-Related Peptide
in einem tierexperimentellen Migräne-Modell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sascha Wecker

aus Wuppertal

Gutachter: 1. Priv. Doz. Dr. med. U. Reuter
2. Priv. Doz. Dr. med. O. Hoffmann
3. Priv. Doz. Dr. med. S. Schuh-Hofer

Datum der Promotion: 25.10.2013

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Migräne – eine primäre Kopfschmerzerkrankung	1
1.2 Anatomische Grundlagen der neuronalen Innervation der Dura mater und meningealer Gefäße	2
1.3 Pathophysiologie der Migräne	3
1.3.1 Cortical spreading depression	4
1.3.2 Aktivierung des trigeminovaskulären Systems	4
1.3.3 Neurogene Inflammation im Rahmen d. trigeminovaskulären Aktivierung	5
1.3.4 Sensibilisierung im Kontext der Migränepathologie	6
1.4 Der Neurotransmitter CGRP in der Pathophysiologie der Migräne	6
1.4.1 CGRP: Experimenteller Surrogatmarker und Auslöser der trigeminalen Aktivierung	7
1.4.2 CGRP im Kontext der peripheren neurogenen Inflammation	8
1.4.3 CGRP im Kontext der Sensibilisierung trigeminaler Neurone	8
1.5 NO in der Pathophysiologie primärer Kopfschmerzerkrankungen und die Bedeutung von Inhibitoren der NO-Synthese	9
1.6 Serotonin-Rezeptoren in der Pathophysiologie von Kopfschmerzerkrankungen und die Bedeutung der Triptane in der Migränetherapie	10
2 Fragestellung der Arbeit	11
3 Materialien und Methoden	13
3.1 Tierpräparation	13
3.1.1 Präparation der rechten V. jugularis externa	14
3.1.2 Präparation der rechten Arteria- und Vena femoralis.....	14
3.1.3 Präparation der Arteria carotis communis	14
3.1.4 Herstellung des intracisternalen Zugangs	15
3.2 Neonatale Applikation von Capsaicin	16
3.3 Experimentelles Design und zeitlicher Ablauf	17
3.3.1 Injektion der Inflammatory Soup.....	18
3.3.2 Blutentnahme aus der Vena jugularis externa	19
3.3.3 Gewinnung der Proben des Liquor cerebrospinalis.....	19
3.3.4 Bestimmung der CGRP-Konzentration im Plasma und Liquor	19

3.4 Herstellung der histologischen Schnitte	20
3.4.1 Immunhistochemische CGRP-Färbung des Ganglion trigeminale	21
3.4.2 Immunhistochemische Doppelfärbung für CGRP und Neurofilament-200.....	21
3.4.3 CGRP-Färbung der Dura mater encephali.....	22
3.4.4 Mikroskopie.....	23
3.5 Quantifizierung CGRP-kodierender messenger-RNA (mRNA) aus Proben des Ganglion trigeminale und des Nucleus caudalis trigeminalis	23
3.5.1 Probeentnahme und Aufbewahrung	23
3.5.2 Bestimmung CGRP-spezifischer messenger-RNA (mRNA).....	23
3.6 Einteilung der Versuchsgruppen	27
3.7 Statistische Auswertung.....	28
4 Ergebnisse.....	29
4.1 CGRP-Konzentration naiver Ratten nach IS-Gabe.....	29
4.2 IS-induzierte CGRP-Ausschüttung in die Vena jugularis nach neonataler Exposition mit Capsaicin.....	30
4.3 CGRP-Konzentration im Liquor cerebrospinalis naiver Tiere und nach neonataler Capsaicin-Applikation.....	31
4.4 Expression von CGRP-mRNA im Ganglion trigeminale u. dem Nucleus caudalis trigeminalis	33
4.5 CGRP-Ausschüttung nach peripherer IS-Applikation in die Arteria carotis communis	34
4.6 Dosis-Wirkungs-Beziehung und der Effekt von Zolmitriptan auf die CGRP- Konzentration nach Stimulation mit 10-fach konzentrierter IS	35
4.7 Einfluss von L-NAME auf die CGRP-Konzentration in der V. jugularis externa vor und nach IS-Stimulation.....	38
4.8 Histologische Darstellung des Ganglion trigeminale nach neonataler Capsaicin- Exposition und naiver Tiere.....	40
4.9 Histologische Darstellung trigeminaler Neurone der Dura mater encephali.....	41
4.10 Histologische Darstellung spinaler Kerngebiete des N. trigeminus.....	42
4.11 Darstellung der Messwerte des systemischen Blutdrucks nach IS-Stimulation..	43
5 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	45

6 Diskussion	46
6.1 Jugularvenöse CGRP-Konzentrationen im Rahmen einer Aktivierung des trigeminalen Nervensystems im Tierexperiment	46
6.2 CGRP als Aktivator des trigeminalen Nervensystems in klinisch experimentellen Studien	47
6.3 Untersuchungen zu den CGRP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis	48
6.3.1 Physiologische Grundlagen der Liquorproduktion.....	49
6.3.2 Basale CGRP-Konzentration im Liquor cerebrospinalis.....	49
6.3.3 Vergleich der basalen CGRP-Konzentrationen beider Kompartimente.....	50
6.3.4 CGRP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis nach IS-Stimulation	51
6.3.5 Vergleich der CGRP-Konzentrationen beider Kompartimente nach IS-Stimulation.....	51
6.3.6 Bedeutung der CGRP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis im Kontext der Migränepathophysiologie.....	52
6.4 Integrität des trigeminalen Nervensystems und Ort der CGRP-Freisetzung nach Stimulation.....	53
6.4.1 Vergleich der Expressionsraten CGRP-kodierender mRNA in peripheren und zentralen Anteilen des trigeminalen Nervensystems	53
6.4.2 Auswirkungen der Capsaicin-Applikation auf struktureller Ebene - Neuroanatomische Charakteristika	54
6.4.3 Auswirkungen der Capsaicin-Applikation auf funktioneller Ebene - CGRP-Konzentrationen im jugularvenösen Blut und Liquor cerebrospinalis	55
6.4.4 Untersuchung der Expressionsraten CGRP-kodierender mRNA nach neonataler Capsaicin-Exposition	57
6.5 Inflammatory soup im experimentellen Modell neuronaler Sensibilisierung	58
6.6 Dosis-Wirkungs-Beziehung der applizierten IS-Konzentration.....	59
6.7 Pharmakologische Inhibition der CGRP-Freisetzung.....	59
6.7.1 Auswirkungen von L-NAME auf die CGRP-Konzentration im Jugularvenenblut.....	59
6.7.2 Effekt von Zolmitriptan auf die basalen CGRP-Spiegel im Liquor und in der V.jugularis.....	61
6.7.3 Auswirkungen von Zolmitriptan auf die durch IS-Stimulation induzierten Konzentrationsanstiege von CGRP.....	62
6.8 Diskussion der verwendeten Methoden	63
6.8.1 Applikation der Inflammatory soup	63
6.8.2 Zusammensetzung und Konzentration der IS.....	63
6.8.3 Verwendeter Applikationsmodus	64

6.8.4 Neonatale Capsaicin-Exposition.....	65
6.8.5 Konzentrationsbestimmungen von CGRP im Blut und Liquor cerebrospinalis.....	66
6.8.6 Messung der physiologischen Parameter	67
7 Zusammenfassung.....	68
8 Versuchsparameter und Messwerte.....	70
9 Literaturverzeichnis	75
Erklärung an Eides statt.....	86
Danksagung.....	87
Lebenslauf	88
Publikationen	89

Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abbildung 1: Schematische Darstellung des trigeminalen Nervensystems	3
Abbildung 2: Präparation der A. carotis communis	15
Abbildung 3: Lage des intracisternalen Katheters	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Versuchsablaufes	18
Abbildung 5: CGRP-Plasmakonzentrationen in der Vena jugularis externa	29
Abbildung 6: CGRP-Plasmakonzentrationen nach neonataler Capsaicin-Applikation	31
Abbildung 7: CGRP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis	32
Abbildung 8: Expressionsraten CGRP-kodierender mRNA im Ganglion trigeminale und Nucleus caudalis trigeminalis.....	33
Abbildung 9: CGRP-Konzentrationen nach peripherer IS-Applikation	35
Abbildung 10: Relative Steigerungsraten der CGRP-Konzentration nach Stimulation mit 10-fach konzentrierter IS	37
Abbildung 11: CGRP-Konzentration im Liquor nach Zolmitriptan-Gabe	38
Abbildung 12: CGRP-Plasmakonzentrationen nach Verabreichung von L-NAME.....	39
Abbildung 13: Histologische DAB-Entwicklung des Ganglion trigeminale	40
Abbildung 14: Doppelfärbung von CGRP und NF200 des Ganglion trigeminale	41
Abbildung 15: Histologische DAB-Entwicklung der Dura mater encephali	42
Abbildung 16: Histologische DAB-Entwicklung des Hirnstammes in Höhe C1	42
Abbildung 17A: Darstellung des systemischen Blutdruckverlaufs nach Stimulation	43
Abbildung 17B: Darstellung des systemischen Blutdruckverlaufs nach Stimulation.....	44
Tabelle 1: Physiologische Parameter der Versuchsgruppen vor IS-Gabe.....	70
Tabelle 2: CGRP-Konzentration im Plasma	70
Tabelle 3: CGRP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis	71
Tabelle 4: Vergleich der Werte der qRT-PCR	71
Tabelle 5: Vergleich der Zeitpunkte innerhalb der Versuchsgruppen	72
Tabelle 6: Vergleich der Stichproben der CGRP-Konzentrationen im Serum	73
Tabelle 7: Vergleich der Stichproben der CGRP-Konzentrationen im Liquor	74

Verzeichnis der Abkürzungen

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
AChE	Acetylcholinesterase
cDNA	komplementäre DNA
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CGRP	Calzitonin Gene-related peptide
CSD	Cortical spreading depression
CPS	Capsaicin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
dNTP	Deoxynucleotid-Mix
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ELISA	enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
GT	Ganglion trigeminale
i.d.	innerer Durchmesser
NCT	Nucleus caudalis trigeminalis
NDS	normal-Esel-Serum
NGS	normal-Ziege-Serum
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
i.c.	intracisternal
IHS	Internationale-Kopfschmerz-Gesellschaft
IS	Inflammatory soup
i.v.	intravenös
KG	Körpergewicht
Kontr.	Kontrolle
L-NAME	Nomega-Nitro-L-arginine-Methyl-Ester
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
NF200	Neurofilament-200
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pCO ₂ /O ₂	Partialdruck Kohlenstoffdioxid/Sauerstoff
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
RT	reverse Transkriptase
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
TIU	Trypsin-inhibitorische Einheit
TRPV	Vanilloid-Rezeptor-Unterfamilie
VIP	Vasoaktives intestinales Peptid
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Migräne – eine primäre Kopfschmerzzerkrankung

Die Migräne wird von der internationalen Kopfschmerz-Gesellschaft (IHS) als primäre Kopfschmerzzerkrankung klassifiziert. Mit einer Prävalenz von 10 bis 12 % in Deutschland ist sie eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen. Nach aktuellem WHO-Ranking liegt die Migräne auf dem 19. Platz aller Erkrankungen, die zu höhergradigen Einschränkungen und Behinderungen der normalen Lebensweise führen [1]. Der Anteil weiblicher Patienten ist mit 15 bis 18 % etwa drei Mal höher als der von männlichen Patienten. Neben den geschlechtsspezifischen Unterschieden zeigt sich ein altersspezifisches Maximum der 1-Jahres-Prävalenz bei jungen Erwachsenen (18-29 Jahre) von ca. 15 %, das mit zunehmendem Alter stetig abnimmt (über 70-jährige: < 3 %) [2]. Neben den individuellen Leiden und damit verbundener Einschränkungen des Privat- und Berufslebens der Patienten sind die sozioökonomischen Aspekte von Kopfschmerzzerkrankungen und speziell der Migräne nicht zu unterschätzen. Aktuelle Untersuchungen gehen von jährlichen direkten und indirekten, speziell mit der Migräne assoziierten, gesamtwirtschaftlichen Kosten in Höhe von ca. 18,5 Mrd. Euro in ganz Europa aus [3].

Klinisch kann die Migräne entsprechend der aktuellen Klassifikation der IHS nach ICHD-II in zwei Untergruppen differenziert werden - der Migräne ohne Aura und der Migräne mit Aura. Die Migräne ohne Aura zeichnet sich insbesondere durch wiederkehrende, attackenförmige, 4 bis 72 Stunden andauernde, unilaterale Kopfschmerzsyndrome moderater oder schwererer Intensität aus, die durch körperliche Belastung ausgelöst bzw. verstärkt werden können. Autonome Begleitsymptome wie Nausea, Vertigo und Vomit bis hin zu Photo- und Phonophobie während einer Attacke gehören ebenfalls zu den Diagnosekriterien [4]. Darüber hinaus zeigten klinische Untersuchungen, dass bei zwei Drittel der Migränepatienten eine kutane Überempfindlichkeit bestimmter Gesichtsbereiche und der Kopfhaut während der Attacke, die sog. Allodynie und Hyperalgesie, auftreten kann [5].

Die klassische Migräne mit Aura ist durch das wiederkehrende Auftreten fokal neurologischer transients Defizite charakterisiert, die meist unmittelbar vor Einsetzen des Kopfschmerzes auftreten und über einen Zeitraum von ca. 5 bis 60 Minuten, jedoch auch länger, anhalten können. Diese als Aura bekannten Symptome treten bei ca. 20 bis 30 % der unter Migräne leidenden Patienten auf. Die Migräneaura lässt sich in verschiedene Typen differenzieren, wobei das Spektrum von uni- bzw. kontralateralen visuellen Störungen, aufgrund ihres Musters auch

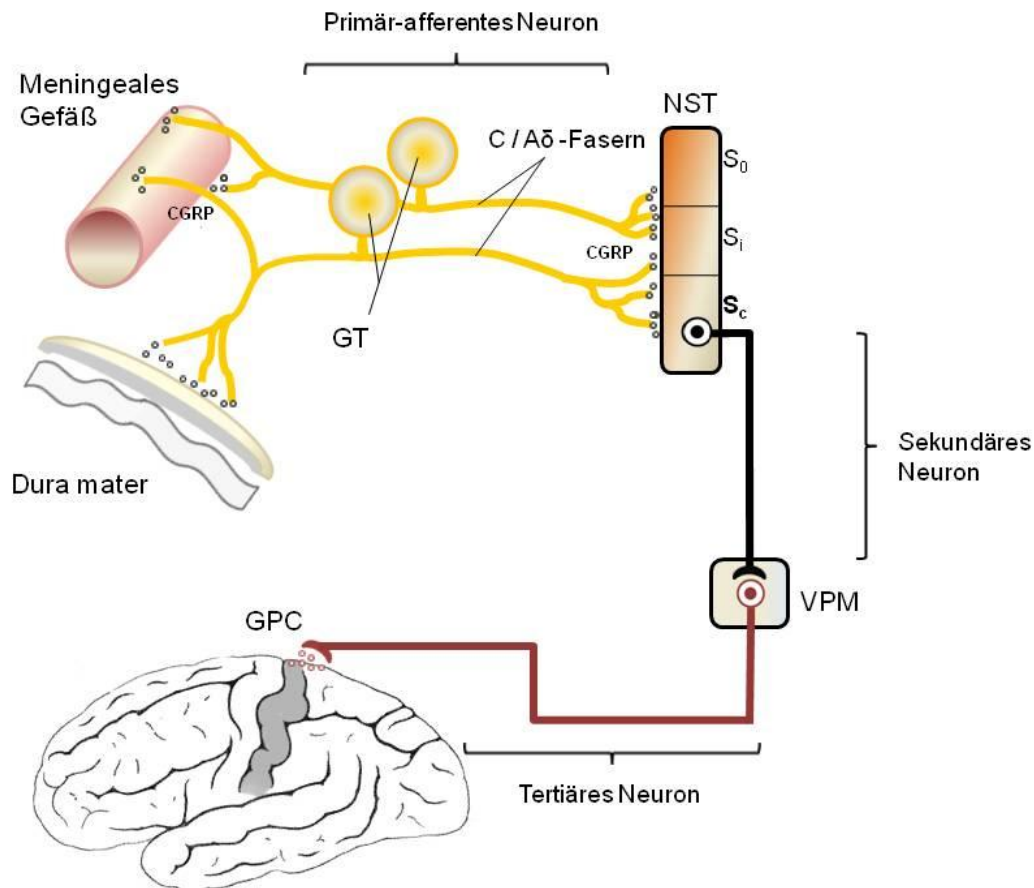
als Fortifikationen bezeichnet, bis hin zu Sprach-, sensorischen und motorischen Störungen reichen kann, die definitionsgemäß einer graduellen Entwicklung folgen und stets reversibel sind [6]. Visuelle Erscheinungen sind mit 86 bis 90 % die am häufigsten auftretenden Typen der Migräne-Aura [4].

1.2 Anatomische Grundlagen der neuronalen Innervation der Dura mater und meningealer Gefäße

Die Innervation der Dura mater und ihrer Gefäße erfolgt strikt unilateral über die drei Äste des Nervus trigeminus, dessen pseudounipolaren Zellkörper im ipsilateralen Ganglion trigeminale (GT) lokalisiert sind. Okzipitale Areale werden zusätzlich über sensible Afferenzen der oberen zervikalen Hinterhornzellen innerviert [7]. Die einzelnen Axone lassen jeweils einen peripheren und einen zentralen Ast unterscheiden. Dabei bilden die peripheren Anteile ein sehr dichtes Netz aus A δ - und C-Fasern, die die Dura mater und Gefäße innervieren und somit zur Sensation viszeraler Schmerzen in diesem, eigentlich empfindungslosen, intrakraniellen Areal essentiell beitragen. C-Fasern bestehen aus unmyelinisierten Axonen mit einer Fortleitungsgeschwindigkeit von ca. 1,4 m/s und haben Zellkörper mit kleinem Durchmesser (<30 μ m). A δ -Fasern werden durch dickere Axone mit einer dünnen Myelinschicht und einer schnelleren Fortleitungsgeschwindigkeit von 2,2-8 m/s und größeren Zellkörpern charakterisiert [8, 9]. Die Axone leiten primäre nozizeptive Afferenzen zu den zentralen spinalen Anteilen des Nucleus spinalis nervi trigemini. Im Nucleus caudalis trigeminalis (NCT), der sich von der dorsolateralen Medulla oblongata bis auf die Höhe des ersten bzw. zweiten zervikalen Spinalnervs erstreckt, erfolgt im Falle von nozizeptiven Fasern die Umschaltung des Signals auf sekundäre Neurone, die ihre Afferenzen überwiegend an kontralaterale ventroposteriomediale Thalamuskerngebiete übermitteln. Diese sekundären trigeminalen Neurone stehen unter dem zumeist hemmenden Einfluss von Neuronen aus der ventrolateralen periaquäduktalen grauen Substanz [10]. Tertiäre Neurone führen schließlich zum primären sensorischen Cortex im Gyrus postcentralis (siehe Abb.1). Neben dem trigeminalen System werden die Hirnhäute ebenfalls autonom durch Para- und Sympathikus innerviert. So finden parasymphatische Nervenbahnen der Pars cephalica ihren Ursprung in Kerngebieten des Hirnstamms und ziehen insbesondere mit Anteilen den Nervus facialis über verschiedene Anastomosen zu den parasymphatischen Ganglien sphenopalatinum et oticum. Dort erfolgt eine Umschaltung auf das zweite Neuron, dessen Enden in den Meningen ein perivaskuläres Nervengeflecht bilden. Dem parasymphatischen System wird im Gegensatz zum Sympathikus, dessen Fasern ihren Ursprung

1. Einleitung

aus dem Ganglion cervicale superior nehmen, v.a. eine gefäßdilatorische Funktion zugesprochen [11]. Dieses die Gefäße innervierende Nervengeflecht aus vegetativen und trigeminalen Anteilen hat neben seiner vasomotorischen und nozizeptiven Funktionen auch modulierende Wirkungen auf die endotheliale Integrität der Gefäßwände.



Die **Abbildung 1** zeigt vereinfacht die nozizeptive trigeminale Innervation meningealer Gefäße und der Dura mater.

GT: Ganglion trigeminale, **NST:** Nucleus spinalis nervi trigemini (**S_o:** Subnucleus oralis, **S_i:** Subnucleus interpolaris, **S_c:** Subnucleus caudalis), **VPM:** Nucleus ventralis posteromedialis thalami, **GPC:** Gyrus postcentralis

1.3 Pathophysiologie der Migräne

Die verschiedenen klinischen Ausprägungen der Migräne lassen Rückschlüsse auf die pathophysiologischen Prozesse zu. Dabei werden verschiedene Hypothesen eines kausalen Erklärungsansatzes der klinischen Symptomatik diskutiert. Sowohl vaskuläre als auch neuronale Mechanismen sowie seit einigen Jahren auch genetische Faktoren stehen im Fokus der

Diskussion um eine eindeutig zu definierende Pathogenese. V.a. in jüngerer Zeit ergaben sich Fragen zum Ort der Auslösung von Migränesymptomen sowie zur Initialisierung des Migräneschmerzes [12]. Im Fokus der Diskussionen steht nicht zuletzt die Frage, inwieweit ein das periphere Nervensystem, im speziellen ein die meningealen Afferenzen betreffender Prozess oder eine zentrale, die Hirnnervenkerne oder Thalamuskernere betreffende Genese als ursächlich zu betrachten ist. Die wissenschaftlich anerkannten Hypothesen sollen daher kurz erläutert werden.

1.3.1 Cortical spreading depression

Schon lange bekannt ist das Phänomen der kortikalen Streudepolarisierung (engl.: Cortical spreading depression, CSD), das als pathophysiologisches Korrelat zur Migräneaura angesehen wird. Die Arbeitsgruppe um Olesen et al. konnte in klinischen Studien zeigen, dass während der Aurasymptomatik ein biphasischer Wechsel der kortikalen Durchblutung mit Vasokonstriktion und Dilatation der Gefäße, gefolgt von einer regionären Hyperämie und längeren Oligämie meningealer Gefäße, die sich vom okzipitalen Cortex nach ventral ausbreitet, zu beobachten ist [13]. Charakteristischerweise erfolgt die Ausbreitung dieser Welle in einer Geschwindigkeit von ca. 2-6 mm/Min., einhergehend mit einer neuronalen Hyperpolarisation sowie durch Hypoperfusion bedingte metabolische Veränderungen [14]. Funktionelle MRT-Untersuchungen von Patienten während einer Aura-Symptomatik durch Hadjikhani et al. konnten die Hypothese der CSD durch bildgebende Verfahren untermauern [15]. Ausgehend von der klinischen Beobachtung, dass nur 30 % der Migränepatienten eine Aurasymptomatik entwickeln, kann insbesondere die Migräne ohne Aura durch dieses Konzept nicht kausal erklärt werden. Es ist wahrscheinlich, dass weitere Mechanismen an der Generierung des Symptoms Kopfschmerz beteiligt sind. Nicht nur wegen des anatomischen Innervationsmusters der Meningen durch den Nervus trigeminus scheint das trigeminale Nervensystem eine Schlüsselrolle bei der Entstehung und Modulation von Schmerzen bei der Migräne und anderer Kopfschmerztypen zu spielen. Bolay et al. konnten in diesem Zusammenhang eine Verbindung zwischen dem Phänomen der CSD und der Aktivierung intrinsischer Areale des Hirnstammes, speziell der zentralen trigeminalen Kerngebiete und der duralen Blutgefäße herleiten [16].

1.3.2 Aktivierung des trigeminovaskulären Systems

Das trigeminale Nervensystem fungiert als wichtiges Bindeglied der Schmerzweiterleitung zwischen intrakraniellen meningealen Gefäßen und dem ZNS als Ebene der

Schmerzverarbeitung. Durch tierexperimentelle Studien konnte bewiesen werden, dass die Stimulation des Ganglion trigeminale zu einer ipsilateralen Dilation mit einhergehender gesteigerter Perfusion meningealer Gefäße führt [17].

In humanen Studien konnte ein bilateral erhöhter Blutfluss nach einseitiger intraoperativer Stimulation bei Thermokoagulation des Ganglion trigeminale aufgezeigt werden [18]. Die Depolarisation trigeminaler Afferenzen führte dabei zur Aktivierung eines efferenten, mitunter auch parasympathisch vermittelten Reflexbogens, der durch die Ausschüttung verschiedener Neurotransmitter entscheidend zur Dilation intrakranieller Gefäße beiträgt. Das Konzept der trigeminovaskulären Aktivierung unterliegt demnach dem Paradigma, dass meningeale Gefäße im Prozess der Schmerzentstehung über primäre Afferenzen zum Ganglion trigeminale und zum Hirnstamm als Sensor, über efferente, mitunter auch parasympathische Bahnen, gleichzeitig als Effektor wirken. Die Folge wäre eine sich selbst aufrecht erhaltende Rückkopplungsschleife trigeminovaskulärer Aktivierung zwischen peripheren und zentralen Anteilen [19]. Dieser Prozess resultiert in einer antidromischen Ausschüttung von Neuropeptiden, wie Substanz P (SP), Neurokininen und Calcitonin-Gen related peptide (CGRP). Die bei der CSD zu beobachtenden vasomotorischen Prozesse könnten als Folge dieser neuropeptidergen Aktivierung angesehen werden. Die Vasodilation selbst kann wiederum einen depolarisierenden Effekt auf afferente Fasern ausüben, was zu einer positiven Verstärkung der Rückkopplungsschleife und klinisch zur Schmerzverstärkung führen könnte. Auch werden in diesem dynamischen Prozess in der Dura mater lokalisierte Mastzellen aktiviert und degranulieren [20].

1.3.3 Neurogene Inflammation im Rahmen der trigeminovaskulären Aktivierung

Im pathophysiologischen Prozess der Migräne werden erhöhte Mengen von Neuropeptiden an den trigeminalen Nervenendigungen ausgeschüttet, was eine perivaskuläre neurogene Inflammation provoziert. So führt die perivaskuläre CGRP-Ausschüttung zu einer Dilation duraler Gefäße. Simultan ist eine Ausschüttung von SP zu beobachten, was zu einer Permeabilisierung der Gefäßwand und Proteinextravasation in die Meningen führt [20]. Weiterhin werden Zytokine wie Interleukin-1 und Interleukin-6, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF freigesetzt, die zu den proinflammatorischen Mediatoren zählen. Mastzellen setzen inflammatorische Mediatoren frei, die einerseits meningeale Neurone sensibilisieren und andererseits zu einer Vasodilation bzw. Vasokonstriktion führen. Zu den neurosensibilisierenden Mediatoren zählen u.a. Bradykinin, Histamin, Prostaglandine, SP und TNF- α . TNF- α scheint selbst eine CGRP-Sekretion und

Transkription zu induzieren, was anhand einer Stimulation isolierter Zellen in Kulturen beobachtet werden konnte [21].

Die Ausschüttung von Neuropeptiden aus den perivaskulären Nervenendigungen führt zu einer neurogenen Entzündung. Diesen Mechanismus sahen Levy et al. im Zusammenhang mit einer Aktivierung und Sensibilisierung primär afferenter, die Dura mater innervierender, trigeminaler Neurone [22].

1.3.4 Sensibilisierung im Kontext der Migränepathologie

Das Phänomen der Sensibilisierung von Neuronen wird vornehmlich mit klinischen Symptomen, wie der postherpetischen Neuralgie, dem komplexen regionalen Schmerzsyndrom (CRPS) oder orofazialen Schmerzen assoziiert. Strassmann et al. beschrieben den Zusammenhang zwischen der Sensibilisierung trigeminaler meningealer Neurone und dem Auftreten von Kopfschmerzen [23]. Im Rahmen dieser Hypothese könnte der Migränekopfschmerz als Folge einer pathologischen Übermittlung nozizeptiver Signale peripherer Neurone bei deutlich gesenkter Schmerzschwelle erklärt werden. Die Sensibilisierung eines Neuron beschreibt ein Phänomen, bei dem ein in seiner Stärke abnehmender Stimulus zu einer höheren Amplitude der Schmerzantwort führt. Daraus kann das subjektive Empfinden einer Hyperalgesie oder Allodynie resultieren [24]. Es wird postuliert, dass sensibilisierte primäre und sekundäre Neurone des N. trigeminus zur Entstehung und Aufrechterhaltung des Migränekopfschmerzes beitragen könnten [25]. Durch die zentrale Sensibilisierung sekundärer Schmerzfasern ließen sich die gleichzeitig zum Kopfschmerz auftretenden Symptome, wie die Allodynie und die Hyperalgesie ophthalmischer und fazialer Areale erklären, da im Nucleus caudalis trigeminalis (NCT) ebenfalls Afferenzen dieser Areale auf sekundäre Neurone umschalten [26].

1.4 Der Neurotransmitter CGRP in der Pathophysiologie der Migräne

Eine Vielzahl von Neurotransmittern und Mediatoren sind an der Innervation der Hirnhäute und ihrer Gefäße beteiligt. Sie sind in den perivaskulären Nervenendigungen lokalisiert und werden dort ausgeschüttet. Im Zusammenhang mit Kopfschmerzen spielt neben den vasodilatierenden Peptiden Substanz P (SP), dem Vasointestinalen Polypeptid (VIP) und Neuropeptid Y (NPY) besonders Calcitonin Gene-related Peptide eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung und Modulation des trigeminovaskulären Systems [27].

Calzitonin Gene-related Peptide (CGRP) ist ein multifunktionales Neuropeptid, das in unterschiedlichen Organsystemen exprimiert wird. Es besteht aus 37 Aminosäuren und wird durch dasselbe Gen wie Calzitonin kodiert, das sich auf dem kurzen Arm des Chromosoms 11 (11p14) befindet. Während die C-Zellen der Schilddrüse v.a. Calzitonin exprimieren, werden durch alternatives „Splicing“ der mRNA zwei Unterformen gebildet: α -CGRP v.a. im peripheren und zentralen Nervensystem und β -CGRP im enterischen Nervensystem [28]. Bis zu 50 % der trigeminalen Neurone enthalten α -CGRP [29]. Seine Wirkung vermittelt das Neuropeptid über den membranständigen multimeren Calzitonin-like-Rezeptor (CLR), der mit Hilfe des transmembranären aktivierenden Proteins RAMP1 und der intrazellulären Komponente eine G-Protein-gekoppelte intrazelluläre Kaskade auslöst [30].

1.4.1 CGRP: Experimenteller Surrogatmarker und Auslöser der trigeminalen Aktivierung

In den letzten 20 Jahren konnte in klinischen Studien ein Anstieg der CGRP-Plasmakonzentrationen in der V. jugularis während einer spontanen oder experimentell induzierten Migräneattacke beobachtet werden [31, 32]. Weiterhin ließen sich erhöhte CGRP-Konzentrationen in Speichelproben von Migränepatienten messen und konnten als Vorhersageindikator einer erfolgreichen therapeutischen Intervention mittels Rizatriptan eingesetzt werden [33]. Bei Migränepatienten führte die i.v. Infusion von CGRP in 75 % der Fälle zur Ausbildung einer klinisch manifesten Kopfschmerzsymptomatik. [34]. In jüngerer Zeit konnte der Zusammenhang zwischen CGRP als Neurotransmitter und pathophysiologischen Prozessen der Migräne durch den klinisch-experimentellen Einsatz direkter CGRP-Rezeptor-Antagonisten wie Telcagepant (MK-0974), Olcegepant (BIBN 2096) sowie BI 44370 TA untermauert werden. In einer multizentrisch angelegten Studie führte Olcegepant zu einer deutlichen Minderung der Kopfschmerzsymptomatik sowie autonomer Begleiterscheinungen. Schon geringe Mengen wiesen in einer klinischen Phase II-Studie eine hohe therapeutische Potenz auf [35]. Der oral verfügbare CGRP Rezeptor-Antagonist Telcagepant zeigte positive Wirkungen insbesondere hinsichtlich der mit Migräne assoziierten Symptome Nausea, Phono- und Photophobie [36]. In klinisch-experimentellen Studien führte die Applikation von Triptanen zu reduzierten CGRP-Plasmaspiegeln. Die Senkung der CGRP-Spiegel ging gleichzeitig mit einer signifikanten Abnahme der Migränesymptomatik nach experimentell induzierten Migräneattacken einher [37].

1.4.2 CGRP im Kontext der peripheren neurogenen Inflammation

An den in den Gefäßwänden lokalisierten peripheren Nervenendungen wirkt das Neuropeptid als einer der potentesten Vasodilatoren und übertrifft die gefäßerweiternden Eigenschaften von SP, mit der es häufig kolokalisiert ist, um das 100- bis 1000-fache [38, 39]. Neben peripheren Schwann-Zellen konnten CGRP-Rezeptoren auf in der Dura lokalisierten Mastzellen identifiziert werden, die unabhängig von Immunglobulin-E (IgE) durch CGRP aktiviert werden und proinflammatorische sowie inflammatorische Mediatoren freisetzen [40]. Funktionelle CGRP-Rezeptoren konnten darüber hinaus auf Gliazellen des Ganglion trigeminale identifiziert werden [29]. Eine Stimulation mit CGRP führte in Kulturen muriner trigeminaler Ganglienzellen zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und zur Hochregulation proinflammatorischer Gene [41].

1.4.3 CGRP im Kontext der Sensibilisierung trigeminaler Neurone

Burstein und Strassmann et al. bewiesen im Tierexperiment, dass eine chemische Stimulation der Dura mater zu einer Sensibilisierung peripherer nozizeptiver trigeminaler Neurone führt. Durch topische Applikation eines inflammatorisch wirkenden Agens, die sogenannte „Inflammatory soup“ (IS), auf die eröffnete Dura mater konnte eine Sensibilisierung primärer und sekundärer Neurone des trigeminalen Nervensystems induziert werden. Die direkte Applikation von CGRP auf die Dura mater führte erstaunlicherweise nicht zu einer Aktivierung nukleärer Anteile des trigeminalen Nervensystems [23, 42, 43]. Andere experimentelle Arbeiten hingegen zeigen, dass CGRP durch Senkung des Schwellenwertes neuronaler Reizübertragung modulierende Effekte an primären und sekundären Schmerzbahnen vermittelt [44]. Ferner wurde beschrieben, dass CGRP die Entladungsfrequenz glutamatergischer, via AMPA-Rezeptor (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isooxazol-propionat) aktivierter, Neurone erhöht [45]. Dieser Effekt konnte durch die Gabe des direkten Antagonisten CGRP₈₋₃₇ aufgehoben werden [46]. Die direkte mikroiontophoretische Applikation der CGRP-Rezeptor-Antagonisten BIBN4096BS und CGRP₈₋₃₇ reduzierte die Entladungspotentiale nozizeptiver trigeminaler Neurone [47]. An den zentralen Endigungen des Nervus trigeminus scheint das Peptid als Neuromodulator an sekundären Schmerzfasern im NCT zu fungieren [48]. Entsprechend dieser Beobachtungen könnte die genauere Kenntnis über den Ausschüttungsort des Neuropeptids Hinweise zur Rolle des CGRP als zentral wirkendes Neuropeptid im trigeminalen Nervensystem in der Migränepathophysiologie liefern.

1.5 NO in der Pathophysiologie primärer Kopfschmerzerkrankungen und die Bedeutung von Inhibitoren der NO-Synthese

NO wird eine bedeutende Rolle bei der Genese primärer Kopfschmerzerkrankungen zugeschrieben. Die biologische Wirkung von NO wird via intrazellulärer Signalkaskaden durch den second messenger cGMP vermittelt [49]. Es sind drei Isoformen des Enzyms NO-Synthase (NOS) bekannt, das die Synthese von NO aus dem Guanidinostickstoff von L-Arginin zu NO und L-Citrullin katalysiert. Es werden die in den Endothelzellen exprimierte eNOS von der neuronal exprimierten nNOS und der induzierbaren iNOS unterschieden [50]. Während die nNOS-Expression im trigeminalen System eher gering ist, [51] zeigten Distributionsstudien vermehrte eNOS-Expressionsraten in meningealen Gefäßen [52].

Dass ein Zusammenhang zwischen der CGRP-Freisetzung und NO besteht, belegen multiple in-vivo und in-vitro Studien. Durch Aktivierung des trigeminovaskulären Systems mit verschiedenen NO-Donatoren dokumentierten Strecker et al. einen NO-abhängigen CGRP-Anstieg an isolierten Duren von Ratten. Der durch CGRP induzierte Anstieg des meningealen Blutflusses ließ sich mit dem CGRP-Rezeptor-Antagonisten CGRP₈₋₃₇ hemmen [53]. In-vitro-Untersuchungen von Eberhardt et al. [54] und Bellamy et al. [55] zeigten, dass NO die CGRP-Ausschüttung und CGRP-Synthese isolierter trigeminaler Ganglienzellen in der Zellkultur evoziert. Tierexperimentell wurde beobachtet, dass NO-Donatoren neuronale Aktivitätssteigerungen auf verschiedenen Ebenen des trigeminovaskulären Systems induzieren können [56, 57]. Dies beinhaltet auch eine Expression des unspezifischen Markers neuronaler Aktivierung c-fos im NCT nach Infusion von Glyzeroltrinitrat [58].

In klinischen Studien konnten durch Infusion von NO-Donatoren, wie z.B. Glyzeroltrinitrat oder Nitroprussid-Natrium, dosisabhängige, zweiphasige Kopfschmerzsyndrome ausgelöst werden. Die bei Migränepatienten verzögert auftretende Schmerzphase erfüllte dabei die klinischen Kriterien der IHS einer Migräne [59]. Anamnestisch positive Migränepatienten zeigten neben einer im Vergleich zur Kontrollgruppe höheren Sensitivität gegenüber NO-Donatoren auch Anzeichen prodromaler Migränesymptome [60-62].

NG-nitro-L-arginin-methyl-ester (L-NAME) ist ein Analogon der nicht essentiellen Aminosäure L-Arginin und bewirkt eine kompetitive Blockade der drei NO-Synthase-Unterformen [63]. In Placebo-kontrollierten klinischen Studien zeigten sich L-NAME und andere Inhibitoren der NO-Synthese effektiv bei der Behandlung spontaner Migräneattacken [64, 65]. Im Tierexperiment reduzierte die Verabreichung von L-NAME eine durch Stimulation des Sinus sagittalis superior induzierte c-fos-Expression im Nucleus caudalis trigeminalis von

Katzen [66]. Ein ähnlicher Effekt konnte bei Ratten nach Capsaicin-Stimulation beobachtet werden [67]. Daten elektrophysiologischer Untersuchungen aus der Ratte von De Col et al. belegen, dass L-NAME zu einer reduzierten Impulsaktivität trigeminaler Neurone des NCT führt [68] und zeigen damit einen Einfluss von L-NAME auf die Aktivität trigeminaler Neurone auf. Da L-NAME unspezifisch alle drei Isoformen der NO-Synthase inhibiert, lässt insbesondere die Hemmung der konstitutiv exprimierten nNOS und eNOS vermuten, dass NO-Spiegel im relevanten Maße gesenkt werden. Dies könnte sich evtl. auch auf die CGRP-Freisetzung und auf daraus resultierende Konzentrationen des Neuropeptids auswirken.

1.6 Serotonin-Rezeptoren in der Pathophysiologie von Kopfschmerzerkrankungen und die Bedeutung der Triptane in der Migränetherapie

Die Klasse der Triptane gehört zu den Serotonin-Rezeptor-Agonisten. Bei der Behandlung der akuten Migräne stellen sie die bisher effektivste pharmakologische Behandlungsoption dar [69]. Sie weisen eine hohe Spezifität für den 5-HT_{1B/1D}- sowie den 5-HT_{1F}-Rezeptor auf und vermitteln ihre biologische Wirkung durch eine G-Protein-gekoppelte intrazelluläre Kaskade. Neben ihrer potentiellen vasokonstriktorisches Wirkung an meningealen Gefäßen [70] und einer partiellen Hemmung der CGRP-Freisetzung peripherer Neurone, scheinen Triptane ihre Wirkung auch an in den NCT projizierenden Terminalen primärer trigeminaler Afferenzen zu vermitteln. Goadsby et al. zeigten beispielsweise für Zolmitriptan in einer autoradiographischen Studie eine Bindungsstelle im NCT [71]. Zusätzlich zu den peripheren Effekten wird ihnen eine via 5-HT_{1F}-Rezeptor vermittelte Hemmung der CGRP-Ausschüttung an zentralen trigeminalen Neuronen zugesprochen [72]. Im Tiermodell hemmen Triptane zudem die Plasmaproteinextravasation sowie die Freisetzung vasoaktiver Neuropeptide v.a. durch präsynaptische Wirkung an 5-HT_{1B/1D}-Rezeptoren und 5-HT_{1F}-Rezeptoren [73].

Zolmitriptan ist ein 5-HT_{1B/1D}-Agonist, der seine Wirkung an peripheren und zentralen Terminalen des trigeminovaskulären Systems vermittelt [71, 74]. Neben den vaskulären Effekten wird angenommen, dass Zolmitriptan seine Wirkung auch zentral, direkt in Trigeminskerngebieten und übergeordneten Schmerzzentren entfaltet [75]. Es weist aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften eine von Sumatriptan divergierende Pharmakodynamik auf und ist in der Lage die Blut-Hirnschranke gut zu passieren, [76] wobei es in Ratten im Liquor nach i.v. Applikation detektiert werden kann [77].

2 Fragestellung der Arbeit

In der komplexen Pathophysiologie der Migräne scheint die Ausschüttung von CGRP, die eine Serie von pathophysiologischen Ereignissen in der Dura mater, den Blutgefäßen und im Hirnstamm (neuronale Aktivierung) zur direkten Folge hat, eine zentrale, übergeordnete Rolle einzunehmen. Tierexperimentell konnte in vorangegangenen Arbeiten ein Anstieg der CGRP-Konzentration durch Stimulation mittels einer „inflammatory soup“, einem Agens, das weitläufig zur Sensibilisierung trigeminaler Neurone eingesetzt wird, induziert werden. Dieser Stimulus wird auch in den hier durchgeführten Experimenten verwendet.

CGRP ist in vielen Regionen des Gehirns lokalisiert (Ganglion trigeminale, Nucleus caudalis trigeminalis etc.). Wenngleich eine Freisetzung aus primären trigeminalen Afferenzen im Rahmen einer trigeminalen Aktivierung sehr wahrscheinlich ist, konnte dieses jedoch bisher weder im Tierexperiment, noch beim Menschen während einer Migräne eindeutig gezeigt werden. Die anatomischen Strukturen aus denen CGRP freigesetzt wird sind jedoch hinsichtlich des möglichen Wirkungsortes der klinisch effektiven CGRP-Antagonisten sehr interessant. Hieraus ergibt sich die Frage, ob sekundär-zentrale oder peripher-primäre trigeminale Neurone an der CGRP-Ausschüttung beteiligt sind.

Zur Klärung dieser Frage habe ich ein Model verwendet, das eine chemische trigeminale Aktivierung mittels IS verursacht. Durch die neonatale subkutane Applikation von Capsaicin (CPS) wurde, in Anlehnung an Studien von Jancso et al. [78] der überwiegende Anteil primärer neuronaler nozizeptiver C-Fasern in neugeborenen Ratten zerstört. Nun freigesetztes CGRP muss aus anderen, ggf. sekundären trigeminalen oder weiteren CGRP enthaltenden Strukturen des ZNS stammen. In der vorliegenden Studie wird die basale und Stimulus-induzierte CGRP-Konzentration in Liquor und im Blut der V. jugularis externa von Tieren nach neonataler CPS-Exposition evaluiert und mit der naiver Tiere verglichen. In der Gesamtschau kann so ein Rückschluss auf den anatomischen Ort der CGRP-Freisetzung gezogen werden. Neben der intracisternalen Applikation wurde IS ebenfalls in die A. carotis appliziert. Dieser Applikationsmodus berücksichtigt zudem die anatomischen Verhältnisse hinsichtlich der meningealen Gefäßinnervation.

Ergänzend wird im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob die Blockade der NO-Synthetase einen Einfluss auf die experimentell induzierte CGRP-Ausschüttung hat, um damit einen möglichen Zusammenhang zwischen NO und CGRP dar zu legen. Ferner sollte untersucht werden, ob die Aktivierung von 5-HT_{1B/D}-Rezeptoren durch Zolmitriptan die CGRP-Ausschüttung in dem in

dieser Arbeit verwendeten Modell inhibiert. Auch wurde der Effekt eines Triptans auf die CGRP-Konzentration im Liquor bisher nicht untersucht.

Folgende Fragen sollen im Rahmen dieser Forschungsarbeit geklärt werden:

- 1. Ist die Integrität des trigeminalen Nervensystems eine essentielle Voraussetzung für die durch „Inflammatory soup“ induzierte CGRP-Ausschüttung?**
- 2. Beeinflusst die neonatale Zerstörung von trigeminalen C- und A δ -Fasern mittels Capsaicin die basale und Stimulus-induzierte CGRP-Konzentration?**
- 3. Kann als Folge der Gabe von Capsaicin in neonatale Ratten der anatomische Ort der CGRP-Ausschüttung nach Stimulation bestimmt und zwischen dem Beitrag primärer und sekundärer trigeminaler Neurone differenziert werden?**
- 4. Kann die CGRP-Konzentration im Liquor cerebrospinalis bestimmt werden? Wie verhält sich die CGRP-Konzentration im Liquor zu derjenigen im Blut der V. jugularis externa?**
- 5. Führen die periphere und intrathekale Gabe von IS zu einer gleichartigen CGRP-Freisetzung?**
- 6. Kann die IS-induzierte Ausschüttung von CGRP durch einen 5-HT_{1D/B}-Rezeptor-Agonisten (Zolmitriptan) oder durch eine pharmakologische Blockade der NOS durch L-NAME inhibiert werden?**

3 Materialien und Methoden

3.1 Tierpräparation

Alle hier durchgeführten Experimente wurden vom Landesamt für Gesundheitsschutz und Tierschutz in Berlin unter den Versuchsanträgen G0265/05 und G317/09 genehmigt. Alle Versuche wurden mit männlichen Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld Deutschland) mit einem Gewicht von 280-330g durchgeführt. Insgesamt wurden 61 Tiere verwendet. Die Tiere wurden während einer Isofluran-Narkose mit einer intraperitonealen Gabe von 60 mg/kg Körpergewicht Thiopental-Natrium (Trapanal, Altana, Deutschland) anästhesiert. Die Narkosetiefe wurde in regelmäßigen Abständen durch Schmerzreize in der Schwanzspitze während des gesamten Versuchs überprüft. Bei Bedarf wurden geringe Dosen Thiopental-Natrium (10 bis 20 mg/kg Körpergewicht) nachappliziert. Damit wurde sichergestellt, dass das Tier zu keinem Zeitpunkt des Experiments Schmerzen empfunden hat. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur von 37°C wurde eine Heizplatte (Homeothermic Blanket Control Unit, Harvard Apparatus, USA) verwendet, die über eine rektal gelegene Sonde kontrolliert wurde. Die Temperatur konnte zu jeder Zeit abgelesen und aufgezeichnet werden und entsprach stets $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5$. Das Tier wurde für die anstehende Präparation, zu Beginn auf dem Rücken liegend, auf der Heizplatte gelagert. Nach erfolgreicher Einleitung der Anästhesie, wurden die zur Präparation vorgesehenen Körperstellen der Tiere mit einer 5%igen Iod-haltigen Lösung desinfiziert. Um eine optimale Atmung der Tiere während der gesamten Dauer des Experimentes und der Operation zu gewährleisten, wurden die Tiere nach vorsichtiger Präparation, über ein in die Trachea eingeführten Tubus (Portex Polythene Tubing, 3 mm i.d., neoLab GmbH, Deutschland) mittels Beatmungsgerät beatmet (Klaus Effenberger Med.Tech. Gerätebau, Pfaffing, Deutschland). Die Trachea wurde hierzu mit einem medianen Längsschnitt und nachfolgender Retraktion der Muskulatur freigelegt und eröffnet. Zur Wahrung eines optimalen arteriellen Sauerstoffpartialdruckes wurde der Inspirationsluft zusätzlicher Sauerstoff beigefügt. Je nach Größe und Gewicht des Tieres wurde das Atemzugvolumen bei 2-3 ml und einer Atemfrequenz von 90/Min. eingestellt und den jeweiligen pH bzw. pCO₂-Werten der Blutgasanalysen sowie der endexpiratorischen CO₂-Konzentration angepasst. Durchschnittlich konnte ein optimaler pH-Wert von 7,4 bzw. pCO₂-Wert von 30-40 mmHg erzielt werden.

3.1.1 Präparation der rechten V. jugularis externa

Bei stabilen physiologischen Werten wurde mit der Präparation der jeweils rechten V. jugularis externa begonnen. Dabei wurden zuerst die oberflächlich liegenden Muskelgruppen gespalten und die rechte Unterkieferspeicheldrüse mit Hilfe einer Klemme nach lateral fixiert, so dass die V. jugularis frei präpariert und dargestellt werden konnte. Mit einer feinen Federschere (Spring Scissors, 5 mm Blade, FST, Heidelberg, Deutschland) wurde eine halbkreisförmige Inzision der Vene geschaffen, so dass ein Katheterschlauch (Portex Polythene Tubing, 0,86 mm i.d., neoLab GmbH, Deutschland) in die Vene eingeführt werden konnte. Um eine Koagulation bis zur Blutabnahme zu verhindern, wurde eine verdünnte Heparinlösung (5000 I.E./ml, Hoffman-La Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) in den Katheter appliziert. Nach Überprüfung des Blutflusses wurde der Katheter an den proximalen und distalen Enden mit Fäden fixiert und das Präparationsgebiet zugenäht.

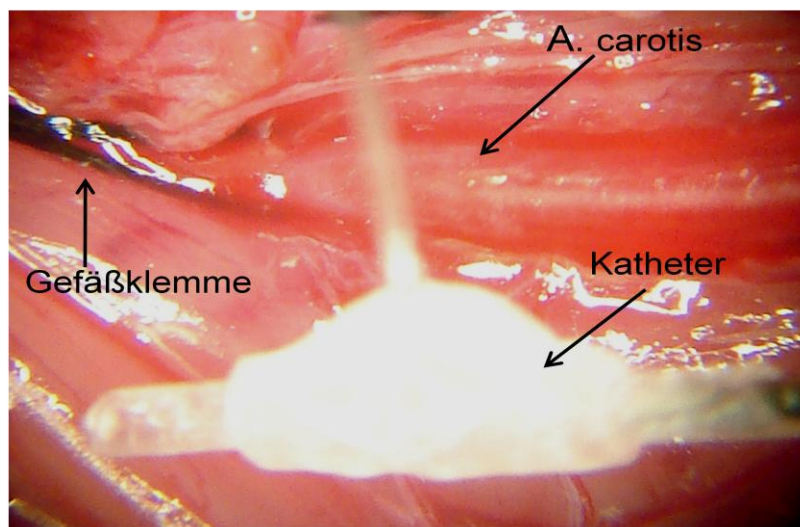
3.1.2 Präparation der rechten Arteria- und Vena femoralis

In Höhe des Leistenbandes wurde die Arteria- sowie die V. femoralis nach vorsichtiger Präparation und Abtrennung des Nervus femoralis etwa 2 cm in ihrem proximalen Verlauf bis zum Ligamentum femorale dargestellt. Mit einer feinen Federschere (Spring Scissors, 5 mm Blade, FST, Heidelberg, Deutschland) wurde eine kleine Inzision in das Gefäß hergestellt und ein bereits mit 0,9%iger NaCl-Lösung versehener Schlauch (Portex Polythene Tubing, 0,58 mm i.d., neoLab GmbH, Deutschland) in die Arterie bis zur Höhe des Leistenbandes eingeführt. Dieser wurde fixiert und die Präparation der Vene in gleicher Weise durchgeführt. Nach Überprüfung beider Zugänge wurde das Präparationsgebiet mittels subkutaner Einzelknopfnähte verschlossen und beide Schläuche am rechten Oberschenkel fixiert. Kontinuierlich wurden insgesamt 3 bis 4 ml 0,9%ige NaCl-Lösung zur Flüssigkeitskompensation i.v. infundiert.

3.1.3 Präparation der Arteria carotis communis

Für die periphere Stimulation mit Inflammatory soup (IS) wurde ein Katheter in die jeweils rechte Arteria carotis communis eingesetzt. Um die zerebrale Durchblutung über die Arteria carotis während des Experiments aufrecht zu erhalten, wurde aus Polyethylenschläuchen ein T-Stück-artiger Katheter (Portex Polythene Tubing, 0,58 mm & 0,86 mm i.d., neoLab GmbH, Deutschland) hergestellt, der durch eine Kanüle (äußerer Durchmesser: 0,3 mm) über einen feinen Schlauch mit einer Präzisionspritze (1700 Series, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) verbunden wurde. Die Arterie wurde distal und proximal kurzzeitig mit einer Gefäßklemme

(Dietrich Bulldog Clamp, FST, Heidelberg, Deutschland) verschlossen. Zwei Inzisionen wurden entsprechend der Länge des Katheters in das Gefäß geschnitten. Die leicht angespitzten Enden des Katheters konnten mit dem proximalen und distalen Ende des Gefäßes verbunden und mit bereits vorher unterlegten Fäden fixiert werden. Nach Entfernung der Gefäßklemmen wurde die Durchblutung der Arteria carotis communis wieder hergestellt. Die Okklusionszeit der Arterie betrug während der Präparation weniger als 10 Minuten. Um eine Koagulation bis zur Gabe von IS zu verhindern, wurde eine mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnte Heparinlösung in den Schlauch appliziert.

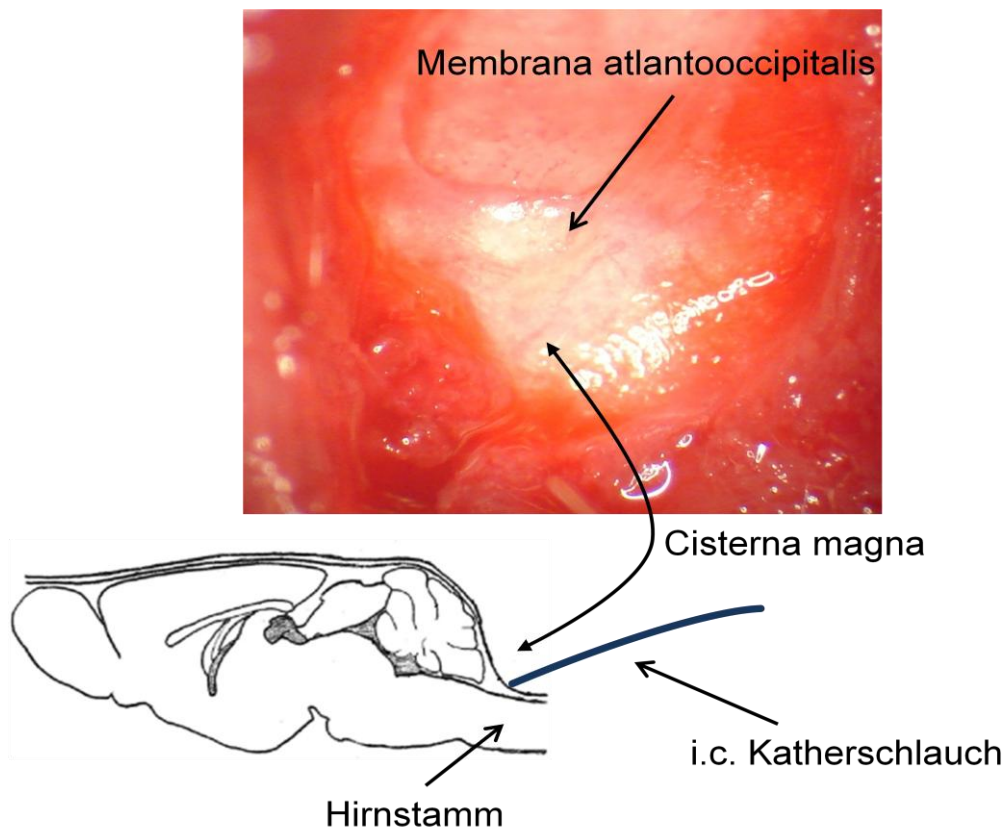


Die **Abbildung 2** zeigt den in die A. carotis communis einzuführenden Katheterschlauch

3.1.4 Herstellung des intracisternalen Zugangs

Zunächst wurden die Tiere auf den Bauch gelagert. Bei stabilen physiologischen Werten wurde, in Anlehnung an Mitsikostas et al. [79], im Bereich der okzipitalen Schädelkalotte ein 1 cm langer Schnitt nach distal gesetzt. Nach Präparation des subkutanen Gewebes und der paarigen Muskeln M. biventer cervicis und M. rectus capitis dorsalis major wurden die paarigen Anteile mittels Klemmen nach lateral fixiert. Mit einem Skalpell wurde die Dura mater über der Cisterna magna frei präpariert. Mit einem sterilen Tupfer wurde die Dura von Blut gereinigt und ca. 2-3 mm distal der Protuberantia okzipitalis externa mit einer sterilen Kanüle (äußerer Durchmesser: 0,6 mm) punktiert. Sofort wurde der flexible, mit 0,9%iger NaCl-Lösung versehene, Polyethylenkatheter (Portex Polythene Tubing, 0,28 mm i.d., neoLab GmbH, Deutschland)

intracisternal eingeführt und mittels Cyanoacrylate-Kleber (Contact VA100, Weicon, Münster, Deutschland) fixiert. Um Wärme- sowie Feuchtigkeitsverluste auf ein Minimum zu reduzieren, wurden die oberflächlich liegenden Muskelschichten repositioniert und der Hautschnitt mittels Einzelknopfnähten verschlossen. Damit war die Instrumentierung der Tiere beendet.



Die **Abbildung 3** zeigt die Lage des intracisternal angelegten Katheters

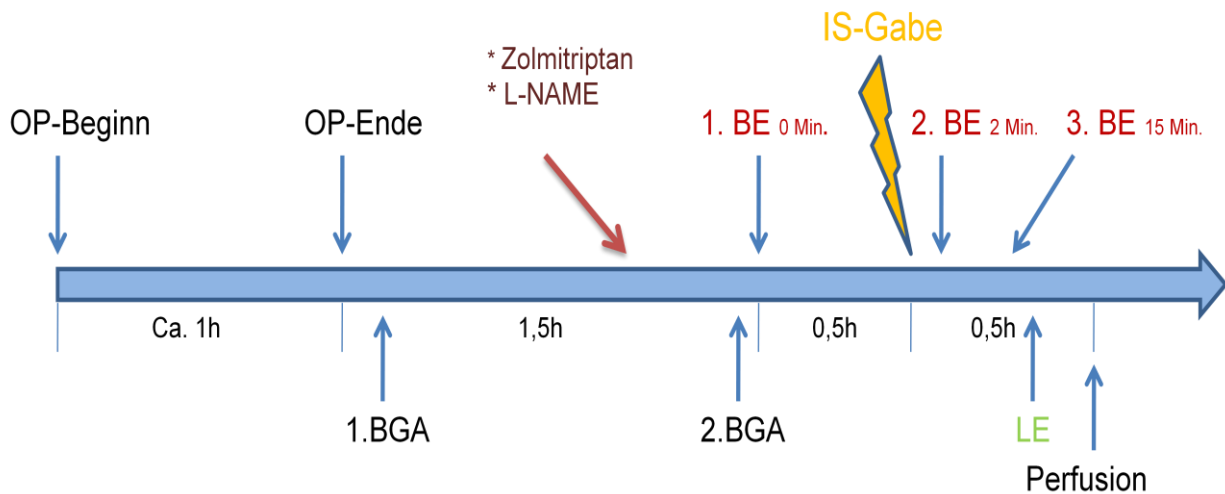
3.2 Neonatale Applikation von Capsaicin

In Versuchen, in denen Capsaicin appliziert wurde, erhielten neonatale männliche Ratten analog zu Jancso et al. [78] im Alter von drei Tagen eine subkutane Gabe Capsaicin (CPS, 8-methyl-N-vallinyl-6-noneamid, Sigma Aldrich, München, Deutschland). Die Tiere wogen am Tag der Intervention 7 bis 8 Gramm. CPS wurde im Trägermedium, bestehend aus dem Polysorbat Tween (20 %, Sigma Aldrich, München, Deutschland), 10 % Ethanol und 70 % physiologischer NaCl-Lösung, in einem Ultraschallbad (Sonorex Super RK 514, Bandelin electronic GmbH, Berlin, Deutschland) gelöst. Die verwendete Konzentration von CPS entsprach 50 mg/kg KG. Jeweils 100 µl wurden den Tieren subkutan im Bereich des Abdomens verabreicht. Während der

Prozedur befanden sich die Jungtiere in einer durch Sauerstoff und zum Zwecke der Narkotisierung mit Isofluran angereicherten Umgebung. Nach erfolgter Injektion wurden die Tiere einer vaporisierten Isoproterenol-Lösung, bestehend aus Isoproterenol (0,2 %, Sigma Aldrich, München, Deutschland) und NaCl (0,9 %) ausgesetzt. Dies steigerte die Überlebensrate auf ca. 90 %. Sechs bis acht Jungtiere wurden den säugenden Muttertieren entsprechend zugeordnet. Nach ihrer Entwöhnung im Alter von 24 Tagen wurden die Tiere auf separate Käfige aufgeteilt.

3.3 Experimentelles Design und zeitlicher Ablauf

Wenige Minuten nach erfolgreicher Präparation (siehe 3.1) wurden ca. 100 µl arterielles Blut in einer Mikrokapillare aus der A. femoralis für die erste Blutgasuntersuchung (BGA) gewonnen. Die Analyse der arteriellen pH-, pCO₂,- pO₂-Werte sowie der Basenabweichung erfolgte durch ein vollautomatisiertes Blutgasanalysegerät (AVL, Compact-2, Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland). Anschließend wurde mit der Aufzeichnung des arteriellen Blutdrucks durch einen an den arteriellen Zugang angeschlossenen Druckaufnehmer begonnen. Um die Effekte einer durch die Operation hervorgerufenen unspezifischen Aktivierung zu minimieren und die Versuche zu standardisieren, wurde genau 1,5 Stunden bis zur ersten Blutentnahme (0 Min.) aus dem Jugularvenenblut gewartet. Um den physiologischen Status des Tieres zu beurteilen, erfolgte zuvor eine zweite BGA. 30 Min. nach der ersten Blutentnahme wurde IS intracisternal (i.c.) oder in die Arteria carotis appliziert. 2 und 15 Min. nach IS-Gabe wurden 2 weitere Blutproben aus dem Jugularvenenkatheter gewonnen. 20 Min. nach IS-Gabe wurde die Liquorprobe entnommen, wobei danach bestimmte Tiere für die Anfertigung histologischer Schnitte sofort eine Thiopental-Überdosierung erhielten und mit PBS 0.1M (4°C) und nachfolgend mit Paraformaldehyd (4 %, bei 4°C, Sigma-Aldrich, München, Deutschland) perfundiert wurden. (siehe **Abb. 4**)



Die **Abbildung 4** illustriert den zeitlichen Ablauf der durchgeführten Experimente. Abkürzungen: **BE**=Blutentnahme; **LE**=Liquorentnahme; **BGA**=Blutgasanalyse

3.3.1 Injektion der Inflammatory Soup

Je nach Versuchsgruppe wurde IS in 1-facher bzw. 10-facher Konzentration oder 0,9%ige NaCl-Lösung in der Kontrollgruppe verwendet. 1-fach konzentrierte IS setzt sich in Anlehnung an die Arbeiten von Burstein et al. [42] und Jakubowski et al. [80] aus folgenden Substanzen zusammen:

Prostaglandin E₂: 0,1mM (Sigma Aldrich, München, Deutschland)

Histamin: 1mM (Sigma Aldrich, München, Deutschland)

Serotonin: 1mM (Sigma Aldrich, München, Deutschland)

Bradykinin: 1mM (Sigma Aldrich, München, Deutschland)

Der pH-Wert wurde stets auf 5,5 eingestellt. Die Lösung wurde in 0,2 ml Eppendorfgläsern bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt und erst wenige Minuten vor Applikation der Raumtemperatur ausgesetzt. Über eine mit dem Katheterschlauch verbundene Präzisionspritze (1700 Series, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) wurden 70 µl IS über exakt 5 Min. kontinuierlich verabreicht. Bei der peripheren IS-Applikation wurden über den in die A. carotis communis implantierten Katheter 200µl IS-Lösung über 5 Min. appliziert.

3.3.2 Blutentnahme aus der Vena jugularis externa

Für die Untersuchung der CGRP-Konzentration wurde 1,5 ml Blut ohne Aspiration aus dem Jugularvenenkatheter in einem bei -20°C vorgekühlten Eppendorfgesäß gewonnen. Alle verwendeten Eppendorfgesäße wurden mit dem Serin-Protease-Inhibitor Aprotinin (Sigma Aldrich, München, Deutschland) 0,55 trypsin inhibitor units (TIU) pro ml Blut und EDTA 0,5M (Sigma Aldrich, München, Deutschland) vorbehandelt. Jede Probe wurde sofort nach der Abnahme auf Eis gekühlt und anschließend bei 3000 rpm für 20 Min. bei 3°C Umgebungstemperatur zentrifugiert (Hettich Universal, 30 RF, Tuttlingen, Deutschland).

Ca. 0,5-0,6 ml des überstehenden Plasmas wurden entnommen und bei -80°C zur weiteren Untersuchung aufbewahrt.

3.3.3 Gewinnung der Proben des Liquor cerebrospinalis

20 Min. nach intracisternaler Gabe von IS bzw. Vehikel wurde der Liquor mit einer 100 µl fassenden Präzisionspritze (1700 Series, Hamilton, Bonaduz, Schweiz) unter leichter Aspiration gewonnen. Die Entnahme des Liquors erfolgte dabei sehr vorsichtig über einen Zeitraum von 2 Min., um einen nicht mit Blutbestandteilen kontaminierten Liquor zu gewinnen. Es wurden jeweils 50 µl Liquor in einem mit Aprotinin 0,55 TIU/ml (Sigma Aldrich, München, Deutschland) vorbehandelten, gekühlten 0,2 ml Eppendorfgesäß gesammelt. Die Proben wurden sofort bei -80°C gelagert. Es wurden ausnahmslos die Proben zur Untersuchung auf CGRP verwendet, die eindeutig durchsichtig und klar erschienen und keine makroskopischen Anzeichen einer Kontamination mit Blut aufwiesen. Zur Analyse mussten die Proben auf 200 µl mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) verdünnt werden.

3.3.4 Bestimmung der CGRP-Konzentration im Plasma und Liquor

Die Konzentrationsbestimmung von CGRP aus Plasma- und Liquorproben erfolgte mit einem enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (Enzyme-linked Immunosorbent Essay, ELISA) nach „Double-Antibody-Sandwich-Methode“ (Rat-CGRP-EIA, SPI Bio, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich) nach den Angaben des Herstellers. Hierfür wurden die Proben langsam in einem eisgekühlten Behälter bei Raumtemperatur aufgetaut und jeweils 100 µl in die mit spezifischen monoklonalen Antikörpern vorbeschichteten Wells gegeben. 200 µl Probenmaterial wurden jeweils einer Doppelbestimmung unterzogen und zusätzlich neben den zu bestimmenden Proben acht Leerproben und acht Standardproben à zwei Wells mit absteigender halbiertes

Konzentration von S1 = 500 pg/ml bis S8 = 3,91 pg/ml analysiert. Weiterhin wurden 8 Wells nur mit dem AChE-Tracer und der chromogen wirksamen Substanz Ellman's Reagent versehen um eine unspezifische Bindung des Antikörpers auszuschließen. Nach Zugabe des spezifischen Anti-CGRP-AChE-Tracers zur Bindung an ein differentes CGRP spezifisches Epitop wurde das 96-Well-Plate bei 4°C über 16 bis 20 Stunden inkubiert. Nach drei Waschschrritten mit PBS wurde Ellman's Reagent zugegesetzt und 30 Min. unter Lichtabschluss inkubiert. Bei 405 bis 414 nm angeregt, konnte die Extinktion in einem Platerreader (Tecan, infinite M200, Software SW Magellan v.6.3, Männedorf, Schweiz) analysiert und die Standardkurve ermittelt werden. Alle Ergebnisse wurden als Datentabelle gespeichert und die Extinktion (Y-Achse) gegen die Konzentration in pg/ml (X-Achse) aufgetragen.

3.3.5 Pharmakologische Intervention

In den Versuchen, bei denen die CGRP-Ausschüttung blockiert werden sollte, erfolgte die Infusion der jeweiligen Substanz durch einen in der rechten V. femoralis eingelegten Katheter, dosiert über einen Perfusor. (Perfusor compact, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) Die Infusion erfolgte jeweils über 30 Min. vor der ersten Blutentnahme (Ausgangswert, 0 Min.) in den folgenden Dosierungen:

Zolmitriptan: 3mg/kg KG gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung (AstraZeneca GmbH, Wedel, Deutschland)

Nomega-Nitro-L-arginine-Methyl-Ester (L-NAME): 40 mg/kg KG gelöst in 0,9%iger NaCl-Lösung (Sigma Aldrich, München, Deutschland)

3.4 Herstellung der histologischen Schnitte

Zur Anfertigung histologischer Schnitte wurden die Tiere, nach subletaler Gabe von Thiopental-Natrium, in tiefer Narkose transkardial, mit 50 ml kalter 0,9%iger NaCl-Lösung gefolgt von 300 ml PFA-Lösung (4 %), perfundiert. Einer 24 stündigen Postfixationsphase folgend wurden Hirnstamm, Cortex sowie das linke und rechte Ganglion trigeminale isoliert und anschließend bei 4°C in einer Saccharose-Lösungen (5 %) aufbewahrt. Für die Anfertigung histologischer Färbungen der Dura wurde diese samt Schädelkalotte für 24 Stunden postfixiert und danach in PBS bei 4°C aufbewahrt. Zwecks Anfertigung der Histologie wurden Techniken der indirekten

Immunhistochemie angewendet. Um eine unspezifische Bindung der verwendeten sekundären Antikörper auszuschließen, wurden in jeder Serie zusätzlich Kontrollschnitte nur mit dem sekundären Antikörper behandelt und mit den positiven Schnitten verglichen. Durch diese im Labor bereits etablierte Methodik ließ sich eine unspezifische Bindung ausschließen.

3.4.1 Immunhistochemische CGRP-Färbung des Ganglion trigeminale

Zur Anfertigung histologischer Schnitte des Ganglion trigeminale wurden in einem Kryostat-Mikrotom (Kryostat HM 500 OM Microm/Zeiss, Walldorf, Deutschland) bei -20°C , $20\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte hergestellt. Die Schnitte wurden mit einer 0,3%igen H_2O_2 -Verdünnung (Sigma Aldrich, München, Deutschland) für 30 Min. zwecks Blockierung der endogenen Peroxidase vorbehandelt. Anschließend erfolgten Waschschrte mit PBS (0,1M, pH 7,4). Die Schnitte wurden danach in einer 0,01%igen Triton X-100-Lösung (Sigma Aldrich, München, Deutschland) inkubiert und in einer Lösung, bestehend aus 4 % Normal-Ziege-Serum (NGS, Chemicon, Schwalbach, Deutschland) und 0,3 % Triton X-100, für einen Zeitraum von 2 Std. bei 4°C geblockt, um Hintergrundsignale zu reduzieren. Für jeden spezifischen Antikörper-Mix wurde eine allgemeine Verdünnung von 1 % Normal-Ziege-Serum und 0,2 % Thimerosal gelöst in PBS (0,1M, pH 7,4) verwendet. Als erster Antikörper wurde ein polyklonaler anti-CGRP (anti-Ratte-IgG aus Hase (C8198 Sigma Aldrich, St.Louis, USA) in einer Verdünnung von 1:1000, gelöst in 3 % NGS und 0,3 % Triton X-100, über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Entwicklung erfolgte nach mehreren Waschschrten mit PBS und Inkubation des zweiten biotinierten Antikörpers (anti-Hase-IgG aus Pferd, W0308, Vector Labs Burlingame, CA, USA) für 2 Std. in 3 % NGS und 0,3 % Triton X-100. Zur DAB-Visualisierung wurde der Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (ABC-Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) verwendet. Die mittels DAB (3,3'-Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid, Sigma Aldrich, München, Deutschland) entwickelten Schnitte wurden mit Kresylviolett (Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt, in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %) dehydriert und schließlich mit Rotihistolkit (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit einem Deckplättchen versehen.

3.4.2 Immunhistochemische Doppelfärbung für CGRP und Neurofilament-200

Für die Doppelfärbung von CGRP und Neurofilament-200 (NF200) der Schnitte des Ganglion trigeminale wurden ebenfalls $20\ \mu\text{m}$ dicke auf Objektträgern aufgetragene Schnitte verwendet. Zur Reduktion unspezifischer Hintergrundsignale wurde eine Lösung bestehend aus 10 %

Normal-Esel-Serum (Chemicon, Schwalbach, Deutschland) und 0,3 % Triton-X100 verwendet. Für die CGRP-Färbung wurde der polyklonale Antikörper gegen CGRP (anti-Ratte-IgG aus Hase, C8198, Sigma Aldrich, St.Louis, USA) in einer Konzentration von 1:1000 verwendet. Für die NF200-Färbung wurden die Schnitte mit einem monoklonalen Antikörper gegen NF200 (anti-Ratte-IgG aus Maus, N-0142, Sigma Aldrich, St.Louis, USA) in einer Konzentration von 1:600 inkubiert. Die Schnitte wurden mit beiden primären Antikörpern gelöst in PBS (0,1M, pH 7,4), 3 % NDS und 0,3 % Triton X-100 für jeweils 24 Std. inkubiert. Nach weiteren Waschschrritten erfolgte die Inkubation der sekundären Antikörper Alexa Fluor 594 (anti Hase aus Esel, rot, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) und Alexa Fluor 488 (anti-Maus aus Esel, grün, Sigma Aldrich, St. Louis, USA) für jeweils 90 Min. Die Schnitte wurden anschließend mit Mowiol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckelt und unter Lichtabschirmung bei 4°C aufbewahrt.

3.4.3 CGRP-Färbung der Dura mater encephali

Die für die histologische CRGP-DAB-Entwicklung vorgesehenen Präparate der Dura wurden aus der Schädelkalotte vorsichtig isoliert. Um eine möglichst große Angriffsfläche für den primären Antikörper zu schaffen, wurde die immunhistochemische Färbung als „free-floating Technik“ durchgeführt. Dabei wurde die Hirnschnittserie in ein frei schwimmendes Netz überführt und in die für die Färbung benötigten Lösungen eingeführt. Die Aktivität der endogenen Gewebeperoxidase wurde mittels 0,3%iger H₂O₂-Lösung gesenkt. Zur Reduzierung autofluoreszierender Hintergrundsignale erfolgte eine 15-minütige Behandlung mit 1 % Natriumborhydrat (NaBH₄, Sigma Aldrich, München, Deutschland) und weitere Waschschrritte mit PBS. Es folgte eine 30-minütige Inkubation in einer Lösung aus Phenylhydrazin (Sigma Aldrich, München, Deutschland) 1:5000, 10 % NDS, 0,3 % Triton-X100. Nach weiteren Waschschrritten erfolgte die Applikation des primären polyklonalen Antikörpers gegen CGRP (anti-Ratte aus Hase, C8198, Sigma Aldrich, St.Louis, USA) in einer Konzentration von 1:1000 gelöst in 3 % NDS und 0,3 % Triton X-100 für 24 Std. bei 4°C. Die DAB-Entwicklung erfolgte mittels polyklonalen biotinilierten Antikörpern (anti-Hase IgG aus Pferd, W0308, Vector Labs Burlingame, CA, USA) und Visualisierung durch den Avidin-Biotin-Meerretich-Peroxidase Komplex (ABC-Elite Kit) und DAB.

3.4.4 Mikroskopie

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bilder wurden mit einem Mikroskop mit Fluoreszenz (Leica DMRA2, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) in 100- und 200-facher Vergrößerung mikroskopiert und mit der integrierten digitalen Kamera (Leica DFC450, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) aufgenommen und als JPEG-Dateiformat gespeichert. Die verwendeten Skalen (in μm) wurden entsprechend der Vergrößerung eingefügt. Alle Grafiken wurden mit dem Programm MS PowerPoint (Microsoft Corporation, Redmond, USA) formatiert und skaliert.

3.5 Quantifizierung CGRP-kodierender messenger-RNA (mRNA) aus Proben des Ganglion trigeminale und des Nucleus caudalis trigeminalis

3.5.1 Probeentnahme und Aufbewahrung

Zur Gewebegewinnung für die qRT-PCR wurden die Tiere in tiefer Thiopental-Narkose transkardial mit 350 ml 0,9%iger NaCl-Lösung (1-3°C) perfundiert. Die Ganglien wurden nach rascher Präparation isoliert und sofort in einem Safe-Lock Eppendorf-Tube in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt. Um die Vergleichbarkeit der Proben des Nucleus caudalis trigeminalis zu wahren, erfolgte die Entnahme von dorsalen Anteilen jeweils in Höhe des Spinalnervs C1.

3.5.2 Bestimmung CGRP-spezifischer messenger-RNA (mRNA)

1. Extraktion

Die zelluläre RNA wurde durch Extraktion mittels Trizol (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) aus dem eingefrorenen Gewebe isoliert. Um Kontaminationen in RNA-Extrakten und DNA zu vermeiden, wurden ausschließlich mit Diethylpyrocarbonat (DEPC, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) behandelte RNase-freie Lösungen verwendet. Proteine wurden aus dem Gewebelysat mittels Chloroform-Extraktion entfernt. Nach Inkubation und Zentrifugation (15 Min. bei 11500 rpm) des mit Chloroform versetzten Lysat wurde die obere, wässrige Phase entnommen und zur Nukleinsäurefällung mit Isopropanol in ein neues Gefäß überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 Min. bei 11500 rpm) setzten sich enthaltene Nukleinsäuren als Pellets ab, die daraufhin mit 75 % Ethanol-Lösung in DEPC-H₂O gewaschen und zentrifugiert wurden (3 Min. bei 7300 rpm). Der Überstand wurde entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet, in 20 μl DEPC-H₂O gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2. DNA-Verdau

Um die Kontamination mit Fremd-DNA zu vermeiden, wurden die Proben mit RQ1 DNase angesetzt und mittels Phenol/Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Der DNA-Verdau erfolgte bei 37°C im Thermoblock (Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland). Anschließend wurden die Proben auf 4°C abgekühlt.

RQ1-Ansatz:

20 µl-Total-RNA (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
3,5 µl RQ1-Puffer (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
3,0 µl RQ1-DNase (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
8,5 µl DEPC-H₂O

3. cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase (RT)

Zur Synthese von cDNA wurde eine Mäuse-Leukämie-Virus Reverse Transkriptase (M-MLV-[H-]-RT) verwendet. Die Proben wurden in zwei Proben aufgeteilt, wobei eine nicht mit RT versetzte Probe (-RT) als Qualitätskontrolle diente und auf DNA-Kontamination untersucht wurde. Die Proben wurden jeweils mit Random-Primern in DEPC-H₂O versetzt und über 10 Min. bei 70°C in einem PCR-Gerät inkubiert, um eine Primer-RNA-Bindung zu erzeugen und anschließend auf 4°C gekühlt. Die reverse Transkription wurde in einem PCR-Gerät (Hybaid PCRexpress, Bonn, Deutschland) durchgeführt.

M-MuLV [H-] RT-Ansatz:

6 µl 5x M-MLV-Puffer (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
3 µl dNTP (jedes NTP 2,5 mM) (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
1 µl M-MLV (H-) RT (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
5 µl / (6 µl*) DEPC-H₂O

* im Ansatz der Kontrolle ohne M-MLV (H-) RT

Folgendes Protokoll wurde hierzu verwendet:

1. 21°C 5 Min.
2. 37°C 60 Min. (Arbeitstemperatur der M-MLV [H-] RT)
3. 95°C 5 Min.
4. 4°C bis Programmabbruch

Nach Ablauf des Programms enthielten alle +RT-Proben eine mit der Template-RNA verbundene cDNA. Diese Proben wurden bis zur weiteren Verwendung für die qRT-PCR bei -20°C gelagert.

4. Quantitative RT-PCR

In allen Versuchen wurde das LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) verwendet. Der in dem Kit enthaltene Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green-I bindet an doppelsträngige DNA und ermöglicht eine Quantifizierung der während der PCR gewonnenen DNA anhand einer Fluoreszenz-Messung. In allen Versuchen diente das "housekeeping-Gen" β -Actin als Referenz. Anhand einer nach Ablauf der PCR durchgeführten Schmelzkurvenanalyse konnte zwischen einer solchen Bindung und der Bindung spezifischer PCR-Produkte unterschieden werden. Die hier verwendete Schmelzkurvenanalyse bestand in einer schrittweisen Erhöhung der Temperatur von 70°C auf 95°C, wobei allen 0,2°C-Schritten die Fluoreszenz gemessen wurde.

5. Reaktionsansatz

Jede der verwendeten Proben wurde einer Doppelbestimmung unterzogen. In jedem Lauf wurden sowohl eine Negativ-Kontrolle zum Ausschluss von DNA-Verunreinigungen des Reaktionsansatzes als auch eine Positivkontrolle mitgeführt. Die Negativkontrolle enthielt 2 μ l H₂O. Die Positiv-Kontrolle enthielt 2 μ l einer beliebigen cDNA-Probe. Folgender Reaktionsansatz wurde angesetzt, wobei ein der Probenanzahl entsprechender Master-Mix auf die einzelnen Kapillaren verteilt wurde. Die Kapillaren wurden in einer LightCycler-Karousel-Zentrifuge (LightCycler Carousel Centrifuge, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) bei 3000 rpm anzentrifugiert und danach in den LightCycler überführt.

Light-Cycler-Ansatz:

0,5 μ l Primer forward (20 pmol/ μ l)
0,5 μ l Primer reverse (20 pmol/ μ l)
2 μ l LightCycler FastStart-Mix 10x
1,6 μ l MgCl₂
13,4 μ l H₂O
2 μ l cDNA

3. Materialien und Methoden

6. Verwendete LightCycler-Programme

Es wurde zunächst das housekeeping-Gen β -Actin in einem Lauf untersucht. Dazu wurde ein Primer für β -Actin (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland) mit folgender Sequenz verwendet:

β -Actin_forward: 5'-ACC CAC ACT GTG CCC ATC TA-3'

β -Actin_reverse: 5'-GCC ACA GGA TTC CAT ACC CA-3'

Das entsprechende LightCycler Programm beinhaltete die Schritte:

Präinkubation:

Schritt-Nr.	Temperatur	Dauer [sec]	Transitionsrate [°C/s]	Messung
1	95°C	600	20	Keine

Amplifikation

Schritt-Nr.	Temperatur	Dauer [s]	Transitionsrate [°C/s]	Messung
1	95 °C	15	20	Keine
2	68°C	10	20	Keine
3	72°C	15	20	Keine
4	86°C	0	20	Einzel
38 Zyklen				

Anschließend wurde das Zielgen CGRP mit folgenden Primer (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg, Deutschland) in einem Lauf untersucht.

CGRP_forward: 5'- AAG TTC TCC CCT TTC CTG GT-3'

CGRP_reverse: 5'- GGT GGG CAC AAA GTT GTC CT-3'

Das Programm der cDNA-Quantifizierung für CGRP bestand aus folgenden Schritten:

Präinkubation

Schritt-Nr.	Temperatur	Dauer [sec]	Transitionsrate [°C/s]	Messung
1	95°C	600	20	keine

Amplifikation

Schritt-Nr.	Temperatur	Dauer [s]	Transitionsrate [°C/s]	Messung
1	95 °C	15	20	keine
2	66°C	10	20	keine
3	72°C	15	20	keine
4	88°C	0	20	einzel
40 Zyklen				

7. Relative Quantifizierung

Die cDNA der Proben wurde jeweils in Doppelbestimmung einer quantitativen Echtzeit-PCR unterzogen und der entsprechende crossing-point bestimmt. Die Expressionsergebnisse der PCR des Zielgens wurden gegen die des Referenzgens β -Actin normalisiert, um unterschiedliche cDNA-Konzentrationen der einzelnen Proben zu relativieren. Die Expressionsrate des CGRP-Gens der Proben der jeweiligen Gruppe konnte nun nach Bustin et al. [81], unter Berücksichtigung und Annahme einer gleichen Amplifikationseffizienz sowie der gemessenen crossing-points, berechnet werden und die Expressionsraten von CGRP teststatistisch ausgewertet werden. Die hier verwendeten Primer wurden in derselben Arbeitsgruppe bereits zu PCR-Analysen von Kulturen trigeminaler Ganglienzellen verwendet. Die zur Überprüfung durchgeführte Sequenzierung des Reaktionsproduktes stimmte dabei mit dem CGRP-Gen aus Ratten überein.

3.6 Einteilung der Versuchsgruppen

Zur Sicherung der statistischen Aussagekraft wurden 10 Versuchsgruppen mit jeweils genügender Anzahl von Versuchstieren, die in das jeweilige Experiment eingeschlossen wurden, gebildet. Die Zahlen berücksichtigen dabei keine während der Experimente aufgetretenen Ausfälle, die nicht zur Ergebnisberechnung herangezogen wurden.

Einteilung der Versuchsgruppen

1. IS: IS intracisternal, n=10
2. Kontr.: NaCl intracisternal, n=5
3. IS-CPS: Neonatale Capsaicin-Applikation + IS intracisternal, n=12
4. Kontr.-CPS: Neonatale Capsaicin-Applikation + NaCl intracisternal, n=5
5. IS-L-NAME: L-NAME intravenös + IS intracisternal, n=5
6. IS-10X: 10X-IS intracisternal, n=6
7. IS-10X-Zolmitriptan: Zolmitriptan i.v. + 10-fach konzentrierte-IS intracisternal, n=5
8. Kontr.-Zolmitriptan.: Zolmitriptan intravenös + Kontr. intracisternal, n=5
9. IS-peripher: IS-intracarotidal, n=4
10. Kontr.-peripher: NaCl-intracarotidal, n=4

3.7 Statistische Auswertung

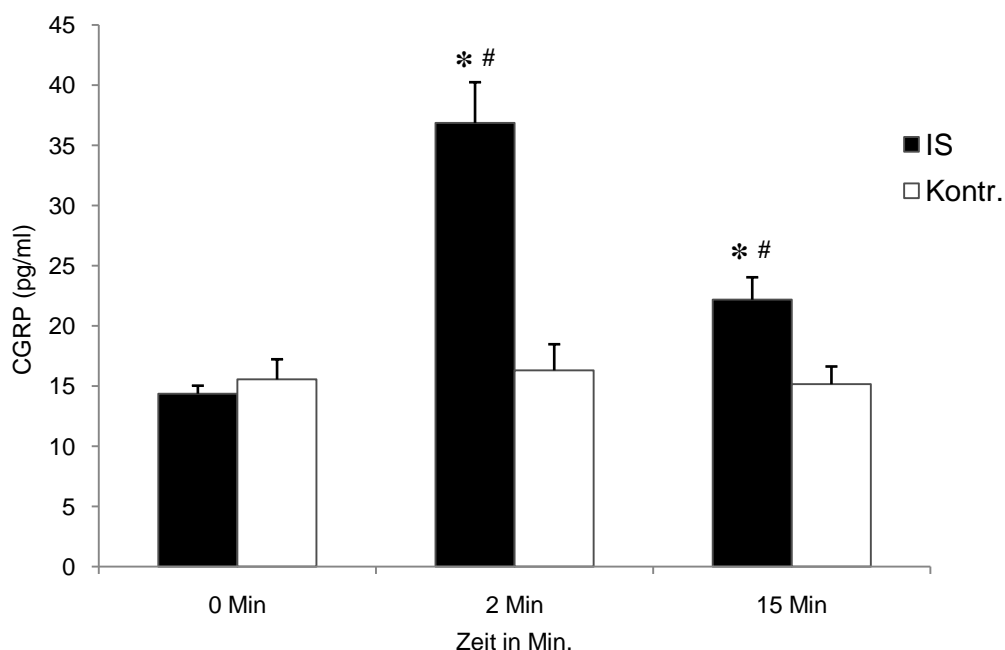
Alle gemessenen Werte wurden innerhalb der Gruppen mittels Shapiro Wilk-Test auf Normalverteilung überprüft. Zum Vergleich der Werte der unterschiedlichen Zeitpunkte der Probegewinnung (0 Min., 2 Min. und 15 Min.) innerhalb einer Behandlungsgruppe wurde der verbundene T-Test nach Student verwendet. Werte verschiedener Behandlungsgruppen wurden mittels Levene-Test auf Gleichheit der Varianzen und unverbundenen T-Test nach Student verglichen. Alle Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) ausgedrückt. Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert $<0,05$ angenommen. Die gesamte statistische Auswertung erfolgte mit SPSS-Statistics (Version 19.0 IBM, Armonk, USA).

4 Ergebnisse

4.1 CGRP-Konzentration naiver Ratten nach IS-Gabe

In einem ersten Schritt habe ich einer Gruppe naiver Tiere IS intracisternal (i.c.) injiziert (n=10). Den Kontrollen wurde dahingegen ein identisches Volumen einer 0,9%igen NaCl-Lösung verabreicht (n=5).

Die basale CGRP Konzentration vor Verabreichung von IS oder Vehikel (0 Min.) war nicht signifikant verschieden. Während sich in der IS Gruppe (*IS*) eine CGRP-Konzentration von $14,36 \pm 0,67$ pg/ml zeigte, wiesen im Vergleich die Kontrollen (*Kontr.*) eine Konzentration von $15,55 \pm 1,67$ pg/ml im Blut der V. jugularis auf ($p=0,447$). Die Gabe von IS führte nach 2 Min. im Vergleich zum Ausgangswert zu einem Anstieg der CGRP-Konzentration auf $36,85 \pm 3,40$ pg/ml ($p=0,0001$) und nach 15 Min. auf $22,17 \pm 1,87$ pg/ml ($p=0,001$). In der Kontrollgruppe zeigte sich dagegen kein Anstieg der CGRP Konzentration [2 Min: $16,31 \pm 2,17$ pg/ml ($p=0,345$) und 15 Min: $15,16 \pm 1,47$ pg/ml ($p=0,225$)]. Die CGRP-Konzentration war in der IS-Gruppe gegenüber den Kontrollen nach 2 Min. [*IS*: $36,86 \pm 3,40$ pg/ml vs. *Kontr.*: $16,31 \pm 2,17$; ($p=0,001$)] und ebenso nach 15 Min. signifikant erhöht [*IS*: $22,17 \pm 1,87$ pg/ml vs. *Kontr.*: $15,16 \pm 1,47$ pg/ml ($p=0,026$)]. Der Anstieg der CGRP-Konzentration im Blut der V. jugularis kennzeichnet die Aktivierung des trigeminalen Nervensystems durch die Stimulation mittels Inflammatory soup. (siehe **Abb. 5**)



Die **Abbildung 5** zeigt den Anstieg der CGRP-Konzentration 2 und 15 Min. nach i.c. IS-Gabe (**IS**: schwarze Balken) verglichen mit dem Ausgangswert (* $p<0,05$) und im Vergleich nach Gabe der Kontrolllösung (**Kontr.**: weiße Balken, # $p<0,05$).

4.2 IS-induzierte CGRP-Ausschüttung in die Vena jugularis nach neonataler Exposition mit Capsaicin

Zur Eliminierung CGRP-haltiger C- und A δ -Fasern wurde einer Gruppe von Tieren (*IS-CPS*, n=12) innerhalb von 24-72 Std. nach der Geburt Capsaicin intraperitoneal verabreicht.

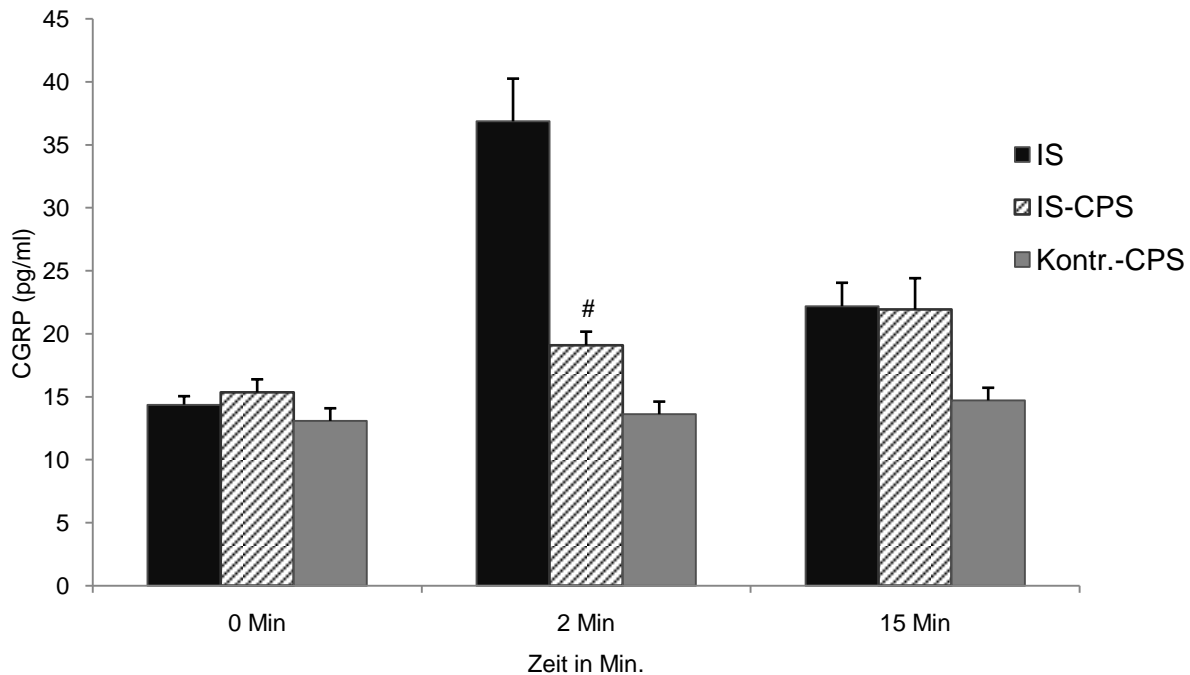
Die Ausgangswerte (0 Min.) aller Gruppen (*IS* vs. *IS-CPS* vs. *CPS-Kontr.*) zeigten keine signifikanten Unterschiede. In der *CPS*-Gruppe führte die Stimulation mittels IS i.c. nur zu einem sehr geringen Anstieg des CGRP-Wertes nach 2 Min. [2 min: 19,08 \pm 1,08 pg/ml vs. 0 Min.: 15,33 \pm 1,04 pg/ml, (p=0,005)] und ebenso nach 15 Min. [15 Min.: 21,93 \pm 2,48 vs. 0 Min.: 15,33 \pm 1,04 pg/ml, (p=0,021)].

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Vehikel i.c., *Kontr.-CPS*) ließen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede nach 2 und 15 Min. beobachten. Die CGRP-Konzentration betrug nach 2 Min.: [*IS-CPS*: 19,08 \pm 1,08 pg/ml vs. *CPS-Kontr.*: 13,61 \pm 0,84 pg/ml, (p=0,082)] und nach 15 Min.: [*IS-CPS*: 21,93 \pm 2,48 pg/ml vs. *CPS-Kontr.*: 14,71 \pm 0,4 pg/ml, (p=0,210)].

Die *CPS*-Gruppe zeigte jedoch im Vergleich zu naiven mit IS stimulierten Ratten eine signifikant geringere Ausschüttung von CGRP (*IS-CPS* vs. *IS*) bei 2 Min. [2 Min.: *IS-CPS*: 19,08 \pm 1,08 pg/ml vs. *IS*: 36,85 \pm 3,40 pg/ml, (p=0,001)]. Nach 15 Min konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen festgestellt werden. Die CGRP-Konzentrationen näherten sich wieder den Ausgangswerten (0 Min.) an [*IS-CPS*: 21,93 \pm 2,48 pg/ml vs. *IS*: 22,17 \pm 1,87 pg/ml, (p=0,941)]. (siehe **Abb. 6**)

Der relative Anstieg der CGRP-Ausschüttung, ausgehend vom Basiswert (0 Min.) beider Gruppen verdeutlicht den Unterschied. In der *CPS* Gruppe (*CPS*) beträgt diese nur 28,04 \pm 27,45 %, wohingegen naive Tiere (*IS*) im Vergleich einen Anstieg um 156,51 \pm 8,19 % (p=0,001) nach 2 Minuten zeigen. Nach 15 Min. beträgt die Steigerungsrate in der *CPS*-Gruppe 47,23 \pm 5,24 %. Im Vergleich zu naiven Tieren misst diese 54,36 \pm 12,34 %, (p=0,740)

Diese Resultate belegen, dass die CGRP-Ausschüttung an die Intaktheit des trigeminalen Systems gebunden ist. Der Großteil der CGRP-haltigen Nervenfasern scheint als Folge der neonatalen *CPS*-Applikation zerstört worden zu sein (siehe auch Abschnitt 4.4, 4.8 und 4.9), was sich in der geringen CGRP-Konzentration nach IS-Stimulation widerspiegelt, jedoch nicht die Ausgangswerte (0 Min.) betrifft.



Die **Abbildung 6** zeigt die CGRP-Konzentration im Blut der V. jugularis externa nach intracisternaler Stimulation in naiven Ratten (**IS**: schwarze Balken) und Tieren, deren C-Fasern im neonatalen Alter zerstört wurden (**IS-CPS**: schraffierte Balken; **Kontr.-CPS**: graue Balken). IS-Stimulation führt bei CPS-Tieren nach 2 Min. zu einer signifikant verringerten CGRP-Ausschüttung in die V. jugularis externa im Vergleich zu naiven Ratten (# $p < 0,01$).

4.3 CGRP-Konzentration im Liquor cerebrospinalis naiver Tiere und nach neonataler Capsaicin-Applikation

Zur Bestimmung der CGRP-Konzentration in den Liquorräumen wurde den Tieren, 20 Min. nach intracisternaler Verabreichung von IS bzw. Vehikel, Liquor cerebrospinalis entnommen.

Zur Bestimmung der Basiswerte wurde Vehikel-Lösung appliziert. Dabei zeigten naive Tiere (*Kontr.*, $n=5$) CGRP-Konzentration von $125,44 \pm 11,57$ pg/ml.

Neonatal mit CPS-exponierte Tiere (*Kontr.-CPS*, $n=5$) wiesen eine CGRP-Konzentration von $100,95 \pm 5,89$ pg/ml auf.

Der Vergleich der Basiswerte naiver und mit CPS vorbehandelter Tiere (*Kontr.* vs. *Kontr.-CPS*) zeigt reduzierte CGRP-Konzentrationen in der CPS-Gruppe, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichten [*Kontr.CPS*: $100,95 \pm 5,89$ pg/ml vs. *Kontr.*: $125,44 \pm 11,57$ pg/ml, ($p=0,96$)].

Nach IS-Applikation (*IS*, $n=5$) wurde dahingegen in naiven Tieren eine CGRP-Konzentration von $222,06 \pm 13,34$ pg/ml gemessen. Die i.c. IS-Verabreichung führte zu einem statistisch

4. Ergebnisse

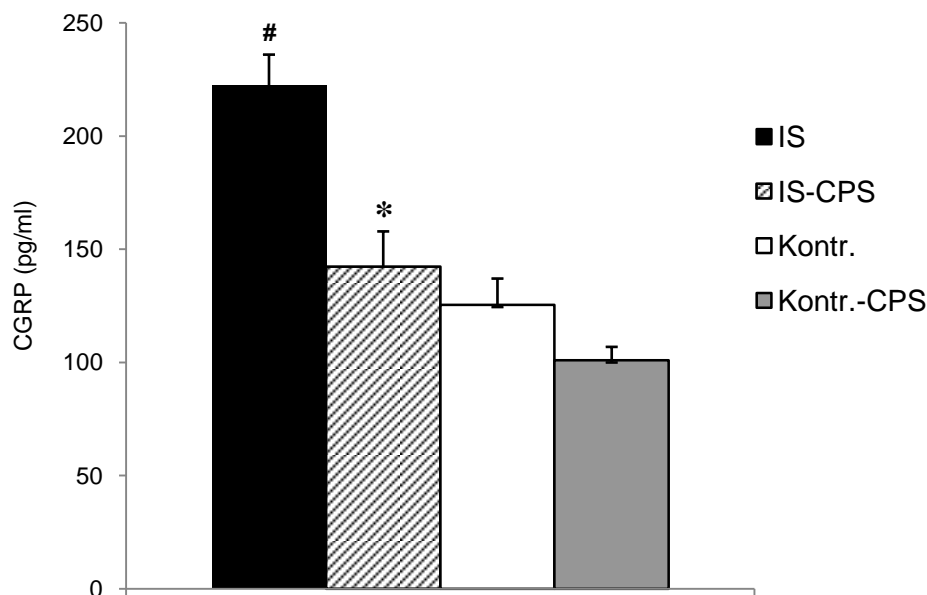
signifikanten Anstieg der CGRP-Konzentration im Liquor verglichen zum Basiswert [*IS*: $222,06 \pm 13,34$ pg/ml vs. *Kontr.*: $100,95 \pm 5,89$ pg/ml, ($p=0,001$)].

Tiere der CPS-Gruppe, denen *IS* i.c. verabreicht wurde (*IS-CPS*, $n=5$), wiesen dahingegen nur einen geringen, statistisch nicht signifikanten, CGRP-Anstieg im Liquor auf. (*IS-CPS*: $142,21 \pm 15,63$ pg/ml vs. *Kontr.-CPS*: $100,95 \pm 13,17$, $p=0,200$).

Der Vergleich naiver Tiere und der CPS-Gruppe zeigt nach *IS*-Applikation (*IS* vs. *IS-CPS*) eine signifikant reduzierte Ausschüttung von CGRP in der Gruppe der CPS ausgesetzten Tiere. [*IS*: $222,60 \pm 13,34$ pg/ml vs. *IS-CPS*: $142,21 \pm 15,63$ pg/ml, ($p=0,004$)].

Ausgehend von den Basiswerten lässt sich die relative Steigerungsrate der CGRP Ausschüttung berechnen. Nach *IS*-Applikation naiver Tiere liegt diese bei $77,45 \pm 10,64$ % und in der CPS-Gruppe bei nur $44,88 \pm 5,42$ %.

Die Ergebnisse zeigen auf, dass die Zerstörung von C-Fasern des trigeminalen Nervensystems ebenfalls zu verringerten CGRP-Konzentrationen im Liquor führt. (siehe **Abb. 7**)



In der **Abbildung 7** sind die CGRP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis dargestellt. *IS*-Gabe (**IS**: schwarze Balken) führt zu einer signifikanten Erhöhung der CGRP-Konzentration im Vergleich zur Applikation der Kontrolllösung (**Kontr.**: weiße Balken, # $p<0,05$). Die neonatale Gabe von CPS führt zu einer signifikanten Reduktion von CGRP im Liquor nach *IS*-Stimulation im Vergleich zu naiven Tieren. (**IS-CPS**: fein schraffierte Balken, * $p<0,05$). Nach Applikation der Kontrolllösung sind tendenziell verminderte Konzentrationen festzustellen (**Kontr.-CPS**: graue Balken).

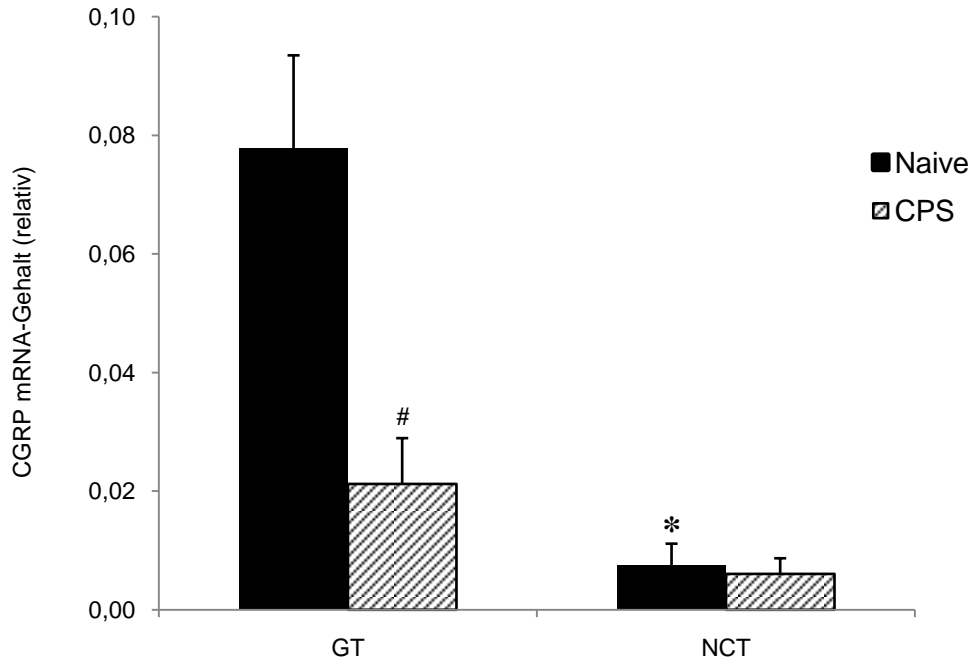
4.4 Expression von CGRP-mRNA im Ganglion trigeminale und dem Nucleus caudalis trigeminalis

Um die Auswirkung der neonatalen CPS-Applikation auf die Expression CGRP-kodierende mRNA genauer zu untersuchen, wurden eine qRT-PCR-Analyse aus Proben des trigeminalen Nervensystems durchgeführt. Es wurden Gewebeproben des Ganglion trigeminale (GT) und des Nucleus caudalis trigeminalis (NCT) der CPS-Gruppe und von naiven Tieren verwendet. In allen untersuchten Proben ließ sich mRNA für CGRP nachweisen.

Die Proben der trigeminalen Kerngebiete naiver Tiere wiesen im Vergleich zu Proben der Ganglien erwartungsgemäß eine deutlich erniedrigte mRNA-Expression auf [GT: $0,078 \pm 0,002$ vs. NCT: $0,007 \pm 0,003$ ($n=5$, $p=0,011$)].

Die Untersuchung des Ganglion trigeminale ergab eine signifikant verminderte Expression CGRP-kodierender mRNA in der CPS-Gruppe im Vergleich zu Proben naiver Tiere [CPS: $0,021 \pm 0,008$, vs. *Naive*: $0,078 \pm 0,016$ ($n=5$, $p=0,012$)].

Der Vergleich des CGRP-mRNA-Gehalts der Hirnstammproben zwischen der CPS-Gruppe und der naiver Tiere erbrachte jedoch keinen signifikanten Unterschied bzgl. der mRNA-Expression [CPS: $0,006 \pm 0,003$, vs. *Naive*: $0,007 \pm 0,004$, ($n=5$, $p=0,554$)]. (siehe **Abb. 8**)



In der **Abbildung 8** sind die Expressionsraten CGRP-kodierender mRNA des Ganglion trigeminale und im trigeminalen Kerngebiet (NCT) dargestellt. Der CGRP-mRNA-Gehalt des NCT naiver Tiere (**Naive**: schwarze Balken) und nach neonataler CPS-Vorbehandlung (**CPS**: schraffierte Balken) ist gegenüber dem des GT vermindert. (* $p<0,05$) Die neonatale CPS-Gabe führt zur signifikanten Reduktion des mRNA-Gehalts im GT (# $p<0,05$), jedoch nicht im NCT.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass die Zerstörung von C- und A δ -Fasern durch neonatale CPS-Exposition den Gehalt CGRP-kodierender mRNA im Ganglion trigeminale stark reduziert, während Kerngebiete des N.trigeminus im Hirnstamm (NCT) nicht betroffen sind. Diese Resultate sind kongruent zu den Stimulationsstudien: Hier wurde bei der CGRP-Bestimmung nach IS in der V. jugularis, nicht jedoch im Liquor, eine massiv verminderte Ausschüttung von CGRP nach neonataler CPS-Gabe gefunden.

4.5 CGRP-Ausschüttung nach peripherer IS-Applikation in die Arteria carotis communis

Nachdem sich im intracisternalen Injektionsparadigma signifikante Unterschiede zwischen stimulierten und mit Vehikel behandelten Tieren zeigten, habe ich nun auch die Konsequenzen einer peripheren IS Gabe auf die CGRP Ausschüttung untersucht. Dazu wurde einer Versuchsgruppe IS in eine Arteria carotis communis infundiert. Einer Kontrollgruppe wurde eine 0,9%ige NaCl-Lösung gleichen Volumens infundiert. Anschließend wurde wiederum die CGRP-Konzentration aus dem Blut der V. jugularis bestimmt.

Vor der peripheren IS-Applikation (0 Min., *IS peripher*, n=4) bzw. dem identischen Volumen der Vehikel-Lösung (*Kontr.-peripher*, n=4) zeigten sich in beiden Gruppen annähernd gleiche CGRP-Konzentrationen [*IS peripher*: $8,37 \pm 0,55$ pg/ml vs. *Kontr.-peripher*: $7,17 \pm 0,30$ pg/ml (p=0,105)].

Die periphere Verabreichung von IS führte nach 2 Min. zu einem signifikanten Anstieg der CGRP-Konzentrationen in der V. jugularis im Vergleich zum Ausgangswert [*IS peripher*, 0 Min.: $8,37 \pm 0,55$ pg/ml vs. 2 Min. $61,00 \pm 3,48$ pg/ml, (p=0,0001)].

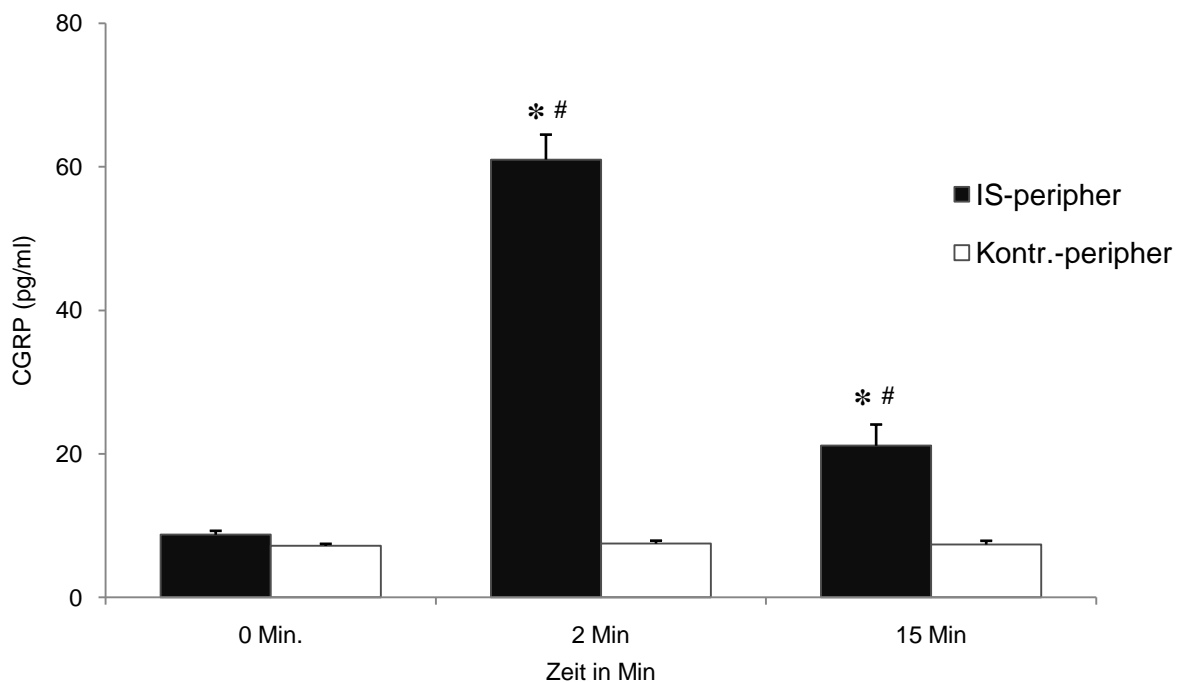
Nach 15 Min. war ebenfalls eine gegenüber dem Ausgangswert signifikant erhöhte CGRP-Konzentration zu beobachten [*IS peripher*, 0 Min.: $8,37 \pm 0,55$ pg/ml vs. 15 Min.: $21,13 \pm 2,96$ pg/ml (p=0,02)].

In der Kontrollgruppe konnten nach 2 und 15 Min. im Vergleich zum Ausgangswert (0 Min.) keine Unterschiede der CGRP-Werte festgestellt werden [*Kontr.-peripher*, 2 Min.: $7,50 \pm 0,41$ pg/ml, vs. 0 Min.: $7,17 \pm 0,30$ pg/ml (p=0,367)] und [*Kontr.-peripher*, 15 Min.: $7,47 \pm 0,51$ pg/ml vs. 0 Min.: $7,17 \pm 0,30$ pg/ml (p=0,136)].

Vergleicht man die CGRP-Konzentrationen der Gruppen *IS-peripher* vs. *Kontr.peripher*, lässt sich zum Zeitpunkt nach 2 Min bei IS stimulierten Tieren eine signifikant erhöhte CGRP-Konzentration feststellen. [*IS-peripher*, 2 Min.: $61,00 \pm 3,48$ pg/ml vs. *Kontr.peripher*, 2 Min.:

7,50 ± 0,42 pg/ml (p=0,001)]. Nach 15 Min. lässt sich ebenfalls eine signifikant erhöhte CGRP-Konzentration in der IS-Gruppe beobachten [*IS-peripher*, 15 Min.: 21,13 ± 2,96 pg/ml vs. *Kontr.-peripher*, 15 Min.: 7,47 ± 0,51 pg/ml (p=0,004)].

Die Verabreichung von IS in eine Arteria carotis führt zu einer deutlichen Konzentrationszunahme des Neuropeptids im Jugularvenenblut nach 2 und 15 Minuten, was als Hinweis für eine hauptsächlich periphere trigeminale Aktivierung gedeutet werden kann. (Siehe **Abb. 9**)



Die **Abbildung 9** zeigt die CGRP-Konzentration im Jugularvenenblut nach peripherer IS-Applikation und Gabe einer Kontrolllösung. Die periphere IS-Gabe (schwarze Balken) führt zu einem signifikanten Anstieg der CGRP-Konzentration in der V. jugularis (* p<0,05) im Vergleich zum Ausgangswert (0 Min.) und zur Applikation einer Kontrolllösung (weiße Balken, # p<0,05).

4.6 Dosis-Wirkungs-Beziehung und der Effekt von Zolmitriptan auf die CGRP-Konzentration nach Stimulation mit 10-fach konzentrierter IS

Um eine Dosisabhängigkeit der CGRP-Ausschüttung im Bezug zur Konzentration der IS zu zeigen, habe ich neben der i.c. Applikation von IS in 1-facher Konzentration (*IS*, n=10) auch eine Stimulation mit der 10-fachen Konzentration (*IS-10X*, n=5) durchgeführt.

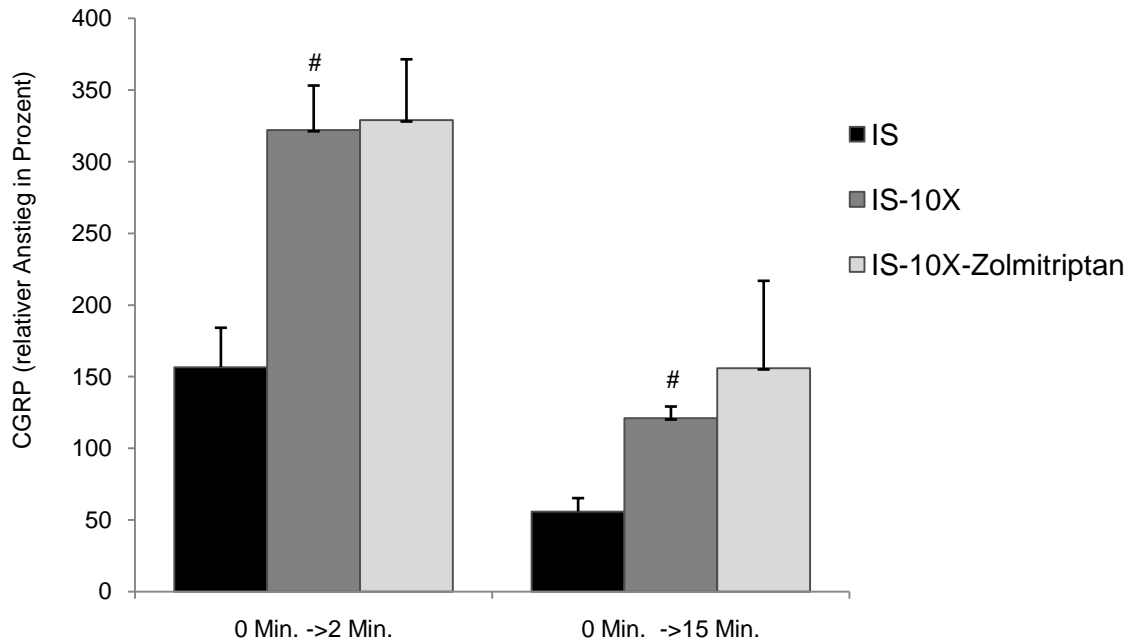
Bei gleichen Ausgangswerten (0 Min.) wurden in der V.jugularis bei i.c. Applikation 10-fach konzentrierter IS signifikant höhere Konzentrationen des Neuropeptids nach 2 und 15 Min. im

Vergleich zur i.c. Applikation einer 1-fach konzentrierten IS gemessen. Der relative Anstieg der CGRP-Konzentration, verglichen zum Ausgangswert (0 Min.), betrug bei 10-facher IS-Gabe (*IS-10X*) nach 2 Min. $322,45 \pm 30,96$ % im Vergleich zur Stimulation mit 1-fach konzentrierter IS (*IS*) $156,51 \pm 8,19$ % ($p=0,003$). Nach 15 Min. betrug die Steigerungsrate bei 10-facher IS-Gabe (*IS-10X*) $123,13 \pm 8,11$ % im Vergleich zur 1-fachen IS-Gabe (*IS*) $54,36 \pm 12,34$ % ($p=0,0001$).

Da es sich bei der 10-fachen IS-Konzentration um einen sehr starken Reiz handelt, habe ich die Auswirkung einer mutmaßlichen Blockade der CGRP-Ausschüttung durch vorherige Gabe von Zolmitriptan ($n=5$) in diesem Paradigma untersucht. Die Verabreichung von Zolmitriptan (3 mg/kg KG) führte zu keiner signifikanten Änderung der CGRP-Konzentration der Basiswerte (0 Min.) im Vergleich zur Kontrollgruppe. [*IS-10X-Zolmitriptan*, 0 Min.: $18,07 \pm 0,88$ pg/ml vs. *IS-10X*, 0 Min.: $13,89 \pm 1,23$ pg/ml ($p=0,22$)]

In der Gruppe der mit Zolmitriptan vorbehandelten Tiere wurde 2 Min. nach Stimulation eine Steigerungsrate der CGRP-Ausschüttung von $329,02 \pm 42,39$ % gemessen. Diese ist vergleichbar mit der nicht vorbehandelter Tiere, die ebenfalls mit 10-fach konzentrierter IS stimuliert wurden [*IS-10X-Zolmitriptan*: $329,02 \pm 42,39$ % vs. *IS-10X*: $322,16 \pm 30,96$ %, ($p=0,904$)]. Auch nach 15 Min. zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den mit Zolmitriptan vorbehandelten Tieren [*IS-10X-Zolmitriptan*: $155,96 \pm 60,85$ % vs. *IS-10X*: $123,12 \pm 8,11$ %, ($p=0,584$)]

Diese Ergebnisse zeigen, dass ein stärkerer Stimulus, induziert durch eine Konzentrationserhöhung der IS, zu einer erhöhten Zunahme der CRGP-Konzentration im Jugularvenenblut führt. Nach Applikation von 10-fach konzentrierter IS wurde eine um den Faktor 2,1 erhöhte Steigerungsrate der CGRP-Konzentration gemessen. Die CGRP-Antwort konnte sowohl nach 2 als auch nach 15 Min. nicht signifikant durch eine Vorbehandlung mit Zolmitriptan beeinflusst werden. (siehe **Abb.10**)

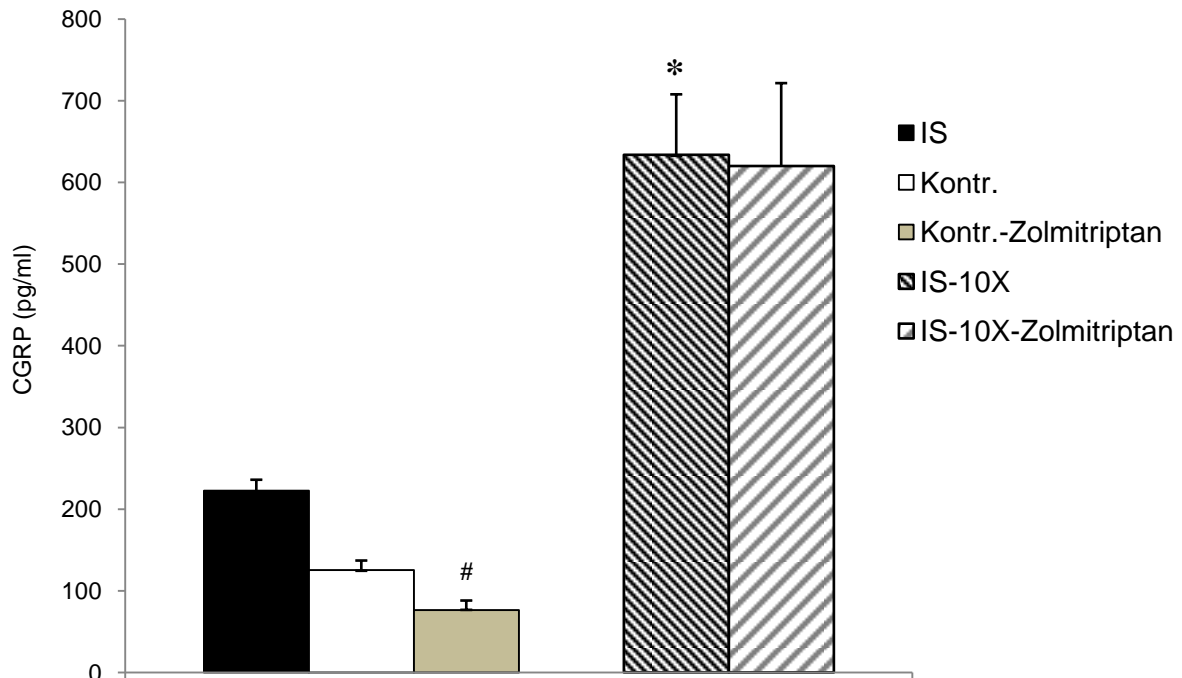


In der **Abbildung 10** sind die relativen Steigerungsraten der CGRP-Konzentration im Blut der V.jugularis externa im Vergleich zum Ausgangswert (0 Min.) nach Gabe unterschiedlich konzentrierter IS aufgezeigt. 10-fach konzentrierte IS (**IS-10X**: dunkelgraue Balken) führt zu einer signifikant erhöhten CGRP-Ausschüttung verglichen zur Stimulation mit 1-fach konzentrierter IS (**IS**: schwarze Balken, # $p < 0,05$). Die Applikation von Zolmitriptan zeigt keinen signifikanten Effekt hinsichtlich der CGRP-Ausschüttung. (**IS-10X-Zolmitriptan**: hellgraue Balken)

Die Untersuchungen des Liquor ergaben nach intracisternaler Stimulation mit 10-fach konzentrierter IS (*IS-10X*, $n=6$) ebenfalls signifikant höhere CGRP-Werte im Vergleich zur 1-fach konzentrierten IS [*IS-10X*: $633,62 \pm 72,21$ pg/ml vs. *IS*: $222,60 \pm 13,34$ pg/ml, ($p=0,004$)].

Ich habe zudem die Auswirkungen von Zolmitriptan auf die CGRP-Konzentration im Liquor untersucht. Die Verabreichung von Zolmitriptan ($n=5$) führte bei den Basiswerten (Applikation von Vehikel-Lösung; siehe Kapitel 4.3) zu einer signifikanten Reduktion der CGRP-Konzentration im Liquor cerebrospinalis im Vergleich zu naiven Tieren [*Kontr.*: $125,44 \pm 11,57$ pg/ml vs. *Kontr.-Zolmitriptan*: $76,60 \pm 11,42$ pg/ml, ($p=0,017$)].

Nach i.c. Stimulation mit 10-fach konzentrierter IS konnte eine leichte Erhöhung der CGRP-Konzentration im Liquor im Vergleich zu den mit Zolmitriptan vorbehandelten Tieren festgestellt werden. Der Vergleich der absoluten Werte nach maximaler IS Stimulation war statistisch jedoch nicht signifikant [*IS-10X-Zolmitriptan*: $620,19 \pm 94,49$ pg/ml vs. *IS-10X*: $633,62 \pm 72,21$ pg/ml, ($p=0,804$)]. (siehe **Abb.11**)



In der **Abbildung 11** sind die CGRP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis nach IS-Stimulation (10- bzw. 1-fach konzentriert) und nach Infusion von Zolmitriptan dargestellt.

Nach Stimulation mit 10-fach konzentrierter IS (**IS-10X**, fein schraffierte Balken) sind im Vergleich zu den Werten nach Applikation 1-fach konzentrierter IS (**IS**, schwarze Balken) signifikant erhöhte CGRP-Konzentrationen im Liquor zu beobachten. (* $p < 0,05$)

Die Vorbehandlung mit Zolmitriptan führt zu einer Verminderung der basalen CGRP-Konzentration im Liquor (**Kontr.-Zolmitriptan**, beige Balken, # $p < 0,05$)

Nach 10-facher IS-Stimulation ließ sich in der Zolmitriptan-Gruppe jedoch kein Unterschied feststellen (**IS-10X-Zolmitriptan**, grob schraffierte Balken).

4.7 Einfluss von L-NAME auf die CGRP-Konzentration in der Vena jugularis externa vor und nach IS-Stimulation

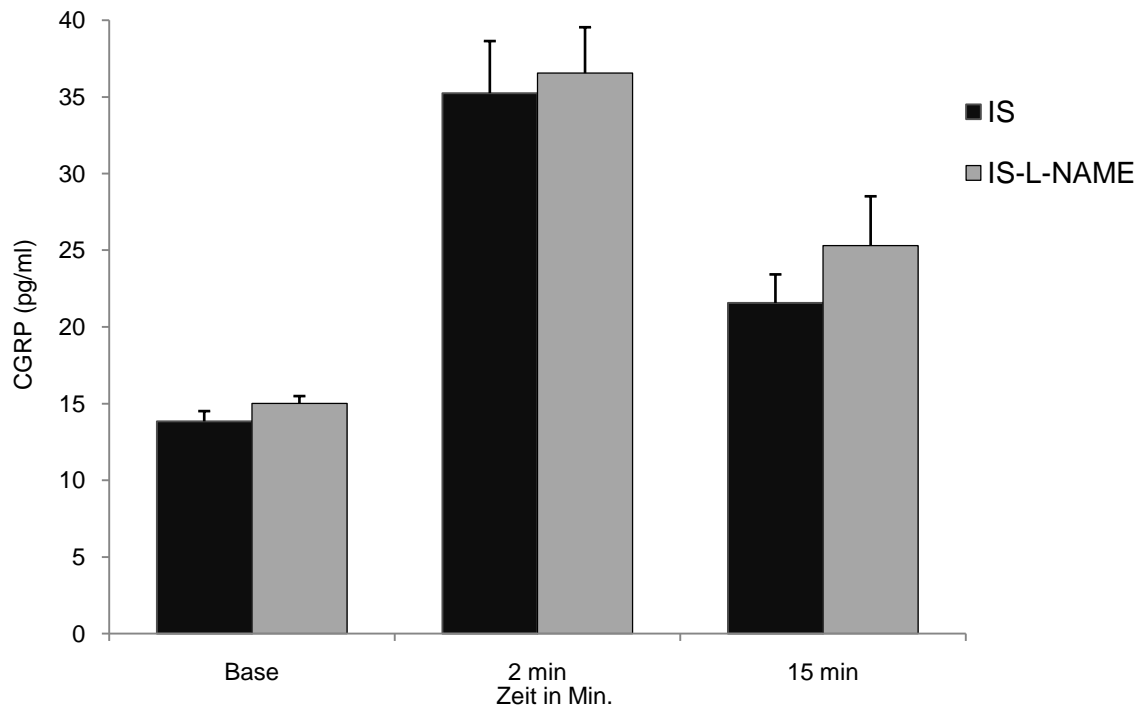
Zur Untersuchung inwieweit die pharmakologische Inhibition der NO-Synthese einen mutmaßlichen Effekt auf die CGRP-Ausschüttung haben könnte, verwendete ich den nicht-selektiv bindenden NO-Synthase-Inhibitor L-NAME. Dieser wurde vor IS-Applikation in einer Dosierung von 40 mg/kg KG infundiert (n=4).

Zu keinem Zeitpunkt ließen sich nach L-NAME-Applikation statistisch signifikante Unterschiede der jugularvenösen CGRP-Konzentrationen im Vergleich zu naiven Tieren feststellen. Nach Infusion von L-NAME betragen die Basisspiegel $15,00 \pm 1,39$ pg/ml. [*IS-L-NAME* $15,00 \pm 1,39$ pg/ml, vs. *IS*: $14,36 \pm 0,67$ pg/ml, ($p=0,648$)]. 2 Min. nach IS-Stimulation wurden Werte von $36,54 \pm 8,10$ pg/ml gemessen [2 Min.: *IS-L-NAME* $36,54 \pm 8,10$ pg/ml, vs. *IS* $36,85 \pm 3,40$ pg/ml, ($p=0,967$)]. Nach 15 Min. war die CGRP-Konzentration gegenüber dem

4. Ergebnisse

Wert naiver Tiere leicht, jedoch nicht signifikant, erhöht [15 Min.: *IS-L-NAME* $25,30 \pm 2,50$ pg/ml vs. *IS*: $22,17 \pm 1,87$ pg/ml, ($p=0,337$)].

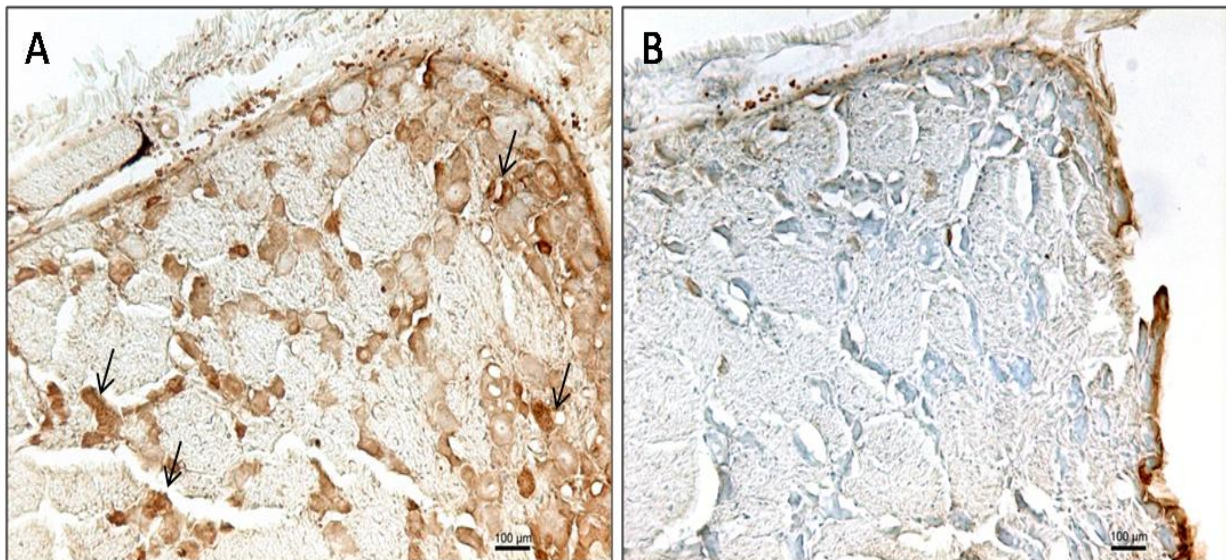
Die hier gewonnenen Daten zeigen, dass die unspezifische Inhibition der NO-Synthase durch eine Vorbehandlung mit L-NAME keinen Einfluss auf die basalen oder Stimulus-induzierten CGRP-Spiegel hat. (siehe **Abb. 12**)



Die **Abbildung 12** illustriert die CGRP-Konzentration im Blut der V. jugularis nach IS-Gabe und vorausgehender pharmakologischer Inhibition der NO-Synthase. Die Hemmung der NO-Synthase (**IS-L-NAME**) führt weder nach 2 noch nach 15 Min. zu einer signifikant verminderten bzw. erhöhten CGRP-Ausschüttung nach IS-Stimulation.

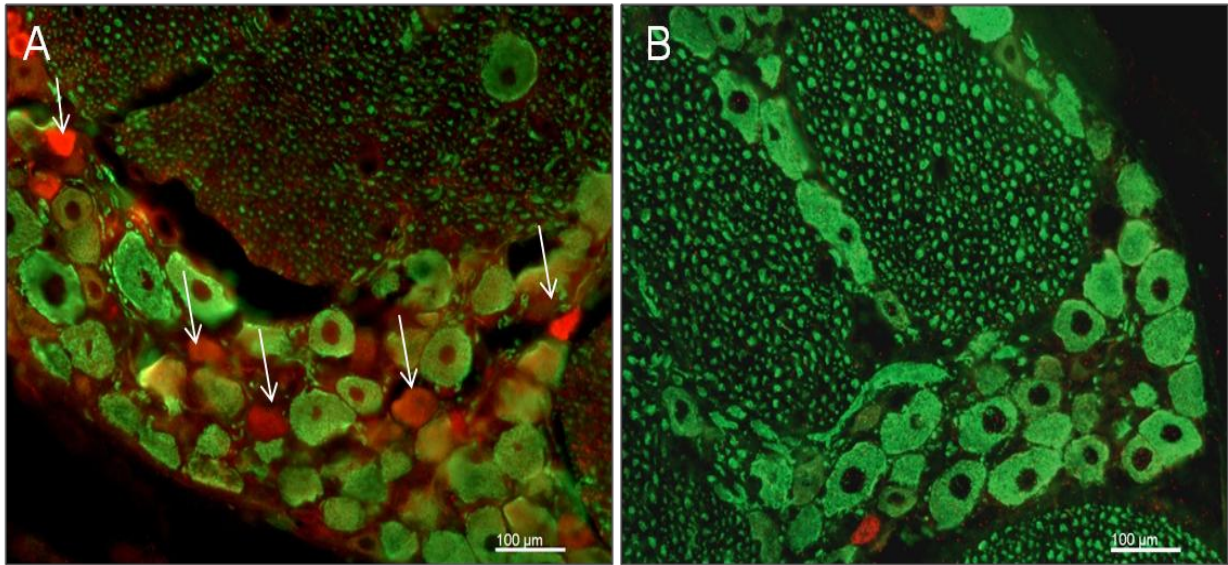
4.8 Histologische Darstellung des Ganglion trigeminale nach neonataler Capsaicin-Exposition und naiver Tiere

Zur visuellen Darstellung CGRP-positiver Fasern wurden Färbungen von Geweben naiver und CPS-exponierter Tiere angefertigt. Die immunhistologischen Färbungen des Ganglion trigeminale in der Abbildung 15 zeigten in der DAB-Visualisierung einen nahezu vollständigen Verlust CGRP-positiver Fasern in Geweben der CPS-Gruppe. Die Nissl-Hintergrundfärbung lässt die in beiden Gruppen intakten Perikarya der Ganglienzellen erkennen, die bei Abwesenheit von CGRP in der CPS-Gruppe (B) prominent bläulich erscheinen. Diese histologischen Aufnahmen belegen die Effizienz und Funktionalität der neonatalen Capsaicin-Gabe hinsichtlich der Zerstörung trigeminaler CGRP-positiver Nervenfasern. (siehe **Abb. 13**)



In der **Abbildung 13** ist eine CGRP-DAB-Nissl-Färbung des GT in 100-facher Vergrößerung dargestellt. In der DAB-Visualisierung ist der deutliche Verlust CGRP-positiver Fasern im GT nach CPS-Exposition (**B**) im Vergleich zu Geweben naiver Tiere (**A**, schwarze Pfeile) zu erkennen.

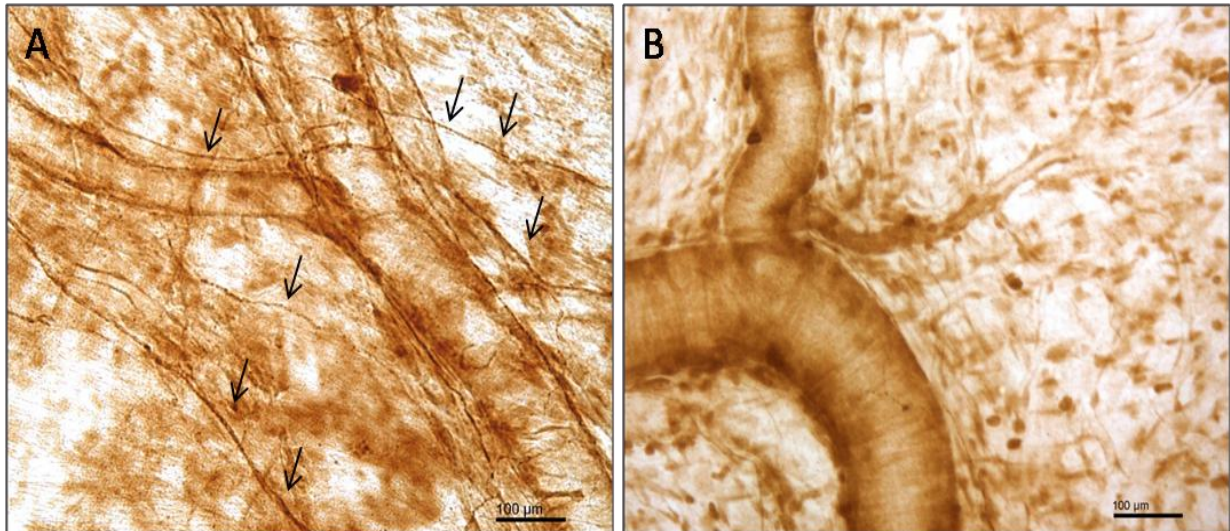
Die Doppelfärbung CGRP-positiver Neurone (rot) und Neurofilament-200-positiven (grün) Nervengewebes demonstriert wiederum einen deutlichen Verlust CGRP-haltiger Nervenfasern (**B**), während keine Anzeichen einer Reduktion NF200-positiven Nervengewebes in der CPS-Gruppe zu beobachten ist. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die neonatale Exposition mit CPS zu keinem Verlust bzw. einer Beschädigung stark myelinisierter A- β -Fasern geführt hat, sondern eine selektive Zerstörung der A δ - und C-Fasern bewirkte. (siehe **Abb. 14**)



Die **Abbildung 14** zeigt eine Doppelfläuierung von CGRP (rot) und NF-200 (grün) des GT bei 200-facher Vergrößerung. Die Doppelfläuierung demonstriert den Verlust CGRP-positiven Fasern im GT in der CPS-Gruppe (**B**) im Vergleich zu naiven Tieren (A, weiße Pfeile), wobei ein Verlust NF200-positiven Fasern in beiden Gruppen nicht festzustellen ist.

4.9 Histologische Darstellung trigeminaler Neurone der Dura mater encephali

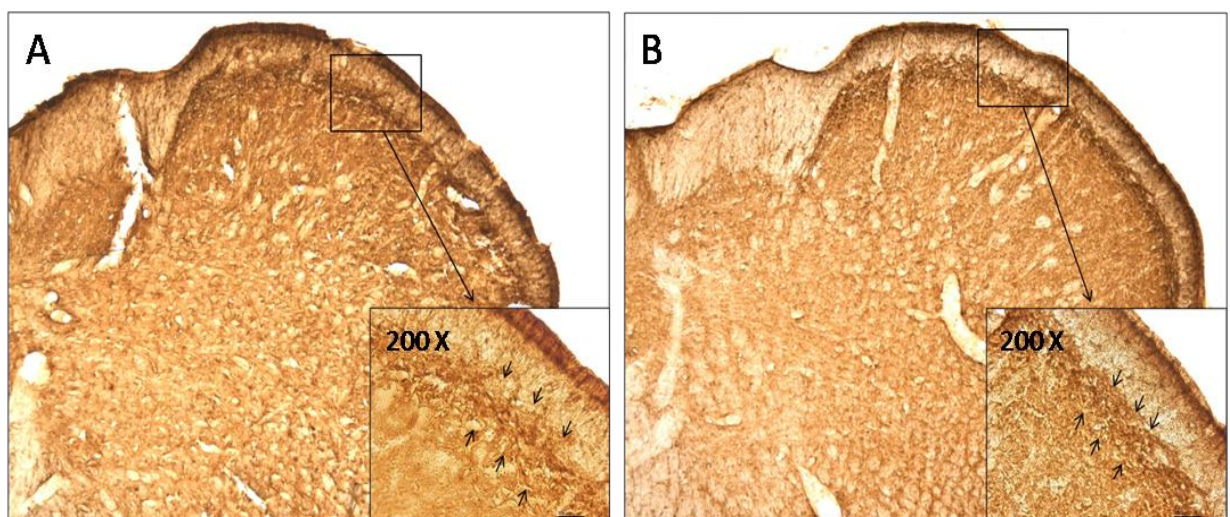
Zur Darstellung des dichten Innervationsnetzes der Dura mater encephali durch die peripheren Anteile des N. trigeminus habe ich Gewebeproben der Dura mater entnommen. Diese wurden, wie in Abschnitt 3.4.3 beschrieben, histologisch aufbereitet. Die **Abbildung 15** zeigt die DAB-Visualisierung eines primären CGRP-Antikörpers. Im Gegensatz zu histologischen Schnitten der CPS-Gruppe sind bei naiven Tieren (**Abb. 15A**) CGRP-positive Fasern deutlich darstellbar. Diese die meningealen Gefäße innervierenden Schmerzfasern scheinen als Folge der Zerstörung CGRP-haltiger Neurone wie im Ganglion trigeminale nach neonataler CPS-Applikation vollständig zu fehlen. (**Abb. 15B**)



Die **Abbildung 15** zeigt eine CGRP-DAB-Färbung der Dura mater encephali in 200-facher Vergrößerung. Gut erkennbar sind die perivaskulären CGRP-positiven Fasern (schwarze Pfeile) bei naiven Tieren (**A**) im Vergleich zur CPS-Gruppe (**B**).

4.10 Histologische Darstellung spinaler Kerngebiete des N. trigeminus

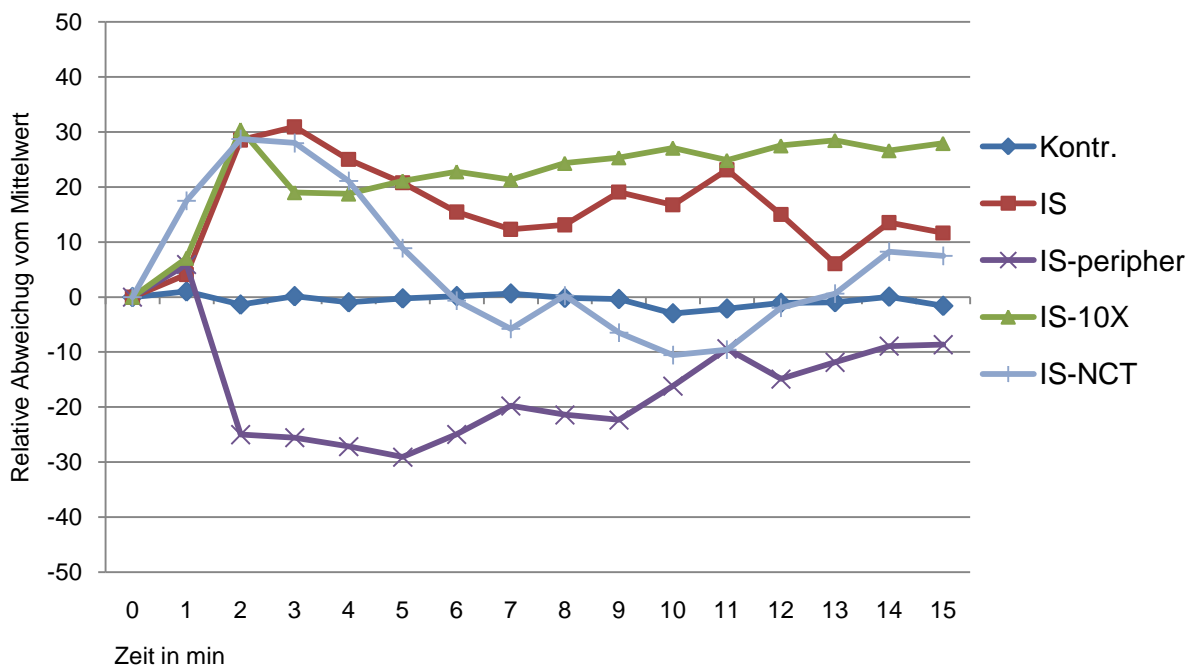
Zur Untersuchung welchen Einfluss die neonatale CPS-Behandlung auf trigeminale Neurone 2. Ordnung hat, habe ich Schnitte des Hirnstammes, in Höhe des Spinalnervs C1 im Bereich des trigeminalen Nucleus caudalis (NCT), beider Gruppen angefertigt und CGRP-positive Areale ebenfalls mittels DAB-Visualisierung dargestellt. Dabei zeigten sich keine visuellen Unterschiede bzgl. des Expressionsmusters bzw. der Quantität CGRP-positiver Fasern im Vergleich naiver Tiere (**Abb.16A**) zur CPS-Gruppe (**Abb.16B**).



Die **Abbildung 16** zeigt eine CGRP-DAB-Färbung des Hirnstammes in Höhe C1 in 50-facher und 200-facher Vergrößerung. In Schnitten naiver Tiere (**A**) und Tieren der CPS-Gruppe (**B**) zeigen sich keine unterschiedlichen Expressionsmuster des NCT auf Höhe C1 (schwarze Pfeile) in der 200-fachen Vergrößerung (Lamina I und II)

4.11 Darstellung der Messwerte des systemischen Blutdrucks nach IS-Stimulation

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb und zwischen den Gruppen zu wahren, wurden während der gesamten Dauer der Experimente der systemische Blutdruck und die physiologischen Parameter der Versuchstiere (siehe Tabelle 1) aufgezeichnet. Es zeigten sich Blutdruckschwankungen direkt nach intracisternaler und peripherer IS-Applikation. In Abbildung 17A/B sind die relativen Veränderungen (in Prozent) des systemischen Blutdruckes, abweichend von den jeweiligen durchschnittlichen Werten vor der Stimulation, dargestellt. Die Verabreichung der Kontrolllösung (NaCl 0,9 %) bewirkte keine auffälligen Veränderungen im zeitlichen Verlauf. Nach intracisternaler IS-Applikation konnte in allen anderen Gruppen zunächst ein Anstieg des Blutdrucks festgestellt werden. Die CPS-Gruppe wies nach 6 Min. einen verminderten systemischen Blutdruck auf, während nach peripherer Applikation eine deutliche Abnahme des Blutdrucks beobachtet wurde.



In **Abbildung 17A und 17B** sind die relativen Schwankungen des Blutdrucks nach IS und Vehikel-Applikation ausgehend vom zuvor gemessenen Mittelwert (in Prozent - Ordinate) illustriert.

4. Ergebnisse

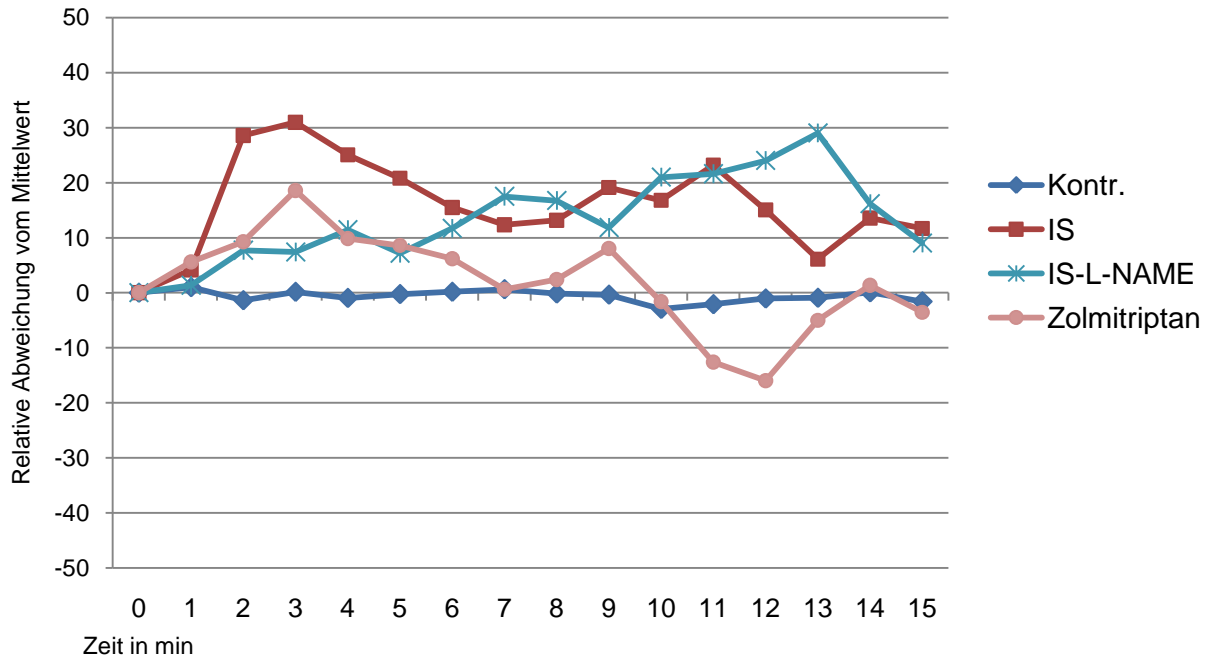


Abbildung 17B

5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Meine Untersuchungen sollen Erkenntnisse zu der fundamentalen Rolle des Neuropeptids CGRP in einem experimentellen Kopfschmerzmodell mit Relevanz zur Pathophysiologie der Migräne liefern.

Die Studien zeigen einen durch intracisternale IS-Stimulation induzierten Anstieg der CGRP-Konzentrationen im Blut der V.jugularis externa sowie im Liquor cerebrospinalis und belegen somit eine Aktivierung des trigeminalen Nervensystems durch IS-Applikation. Die neonatale intraperitoneale Gabe von CPS bewirkte eine Zerstörung der peripheren A δ - und C-Fasern, was zu einer Reduktion des induzierten Anstiegs der CGRP-Konzentrationen im Jugularvenenblut und im Liquor führte.

In einem komplementären Ansatz konnte mittels qRT-PCR-Analyse eine Reduktion CGRP-kodierender mRNA im Ganglion trigeminale nach CPS-Gabe festgestellt werden, was sich signifikant zu Proben aus dem Nucleus caudalis trigeminalis des Hirnstammes unterscheidet. Diese Daten konnten auch auf Proteinebene mit histologischen Verfahren bestätigt werden. Auch hier ist ein Verlust von CGRP-positiven Nervenfasern im Ganglion trigeminale zu beobachten.

Zusammenfassend demonstrieren meine Resultate, dass v.a. primäre trigeminale Afferenzen an der Stimulus-induzierten CGRP-Ausschüttung beteiligt sind, was eine wichtige Information aus dieser Arbeit darstellt.

Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass auch im Liquor cerebrospinalis nach IS-Stimulation eine signifikant höhere Konzentration von CGRP als nach Gabe von Vehikel gemessen werden kann. Damit verhält sich die CGRP Konzentration im Liquor analog zu derjenigen im Blut der V. jugularis externa.

In einem weiteren Schritt gelang es, eine IS-konzentrationsabhängige Ausschüttung von CGRP im Liquor und in der V. jugularis externa auf zu zeigen. Hierzu habe ich eine 1-fache und eine 10-fach konzentrierte IS verabreicht. Zugleich konnte ich darlegen, dass die basale CGRP-Ausschüttung in den Liquor durch die i.v.-Verabreichung des gut ZNS-gängigen Triptans Zolmitriptan inhibiert werden kann, nach maximalem Stimulus jedoch weder im Liquor noch im jugularvenösen Blut einen Effekt erkennen ließ.

Die Inhibition der NO-Synthase zeigte in diesem Modell keine Effekte auf die CGRP-Konzentration nach intracisternaler IS-Stimulation.

6 Diskussion

6.1 Jugularvenöse CGRP-Konzentrationen im Rahmen einer Aktivierung des trigeminalen Nervensystems im Tierexperiment

Meine Untersuchungen nach Stimulation naiver Tiere mit intracisternal applizierter Inflammatory Soup (IS) veranschaulichten einen signifikanten Anstieg der CGRP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis und der drainierenden extrazerebralen Blutzirkulation. In beiden Kompartimenten wurden erhöhte Werte nach IS Stimulation gemessen. Nach peripherer Applikation von IS dokumentieren meine Daten ebenfalls deutlich erhöhte CGRP-Spiegel im Blut der V. jugularis externa, was auf die Beteiligung v.a. primärer Afferenzen an der Neuropeptidausschüttung in diesem Modell hinweist.

Die hier durchgeführten Experimente sind in Anlehnung an Arbeiten von Hoffmann et al. [82] aus derselben Arbeitsgruppe aufgebaut. Meine Ergebnisse bestätigen die vormaligen Resultate und erweitern die Erkenntnisse.

Einen Zusammenhang zwischen der CGRP-Konzentration im Serum der das ZNS drainierenden Venen und der Aktivierung des trigeminalen Systems konnte auch in anderen tierexperimentellen Studien gezeigt werden. Dabei wurden verschiedene Stimulationsmodi verwendet, die eine Aktivierung des trigeminalen Nervensystems induzieren.

In älteren Arbeiten veranschaulichten Goadsby et al. und Zagami et al., dass durch elektrische Stimulation des Ganglion trigeminale [83] und des Sinus sagittalis superior [84] bei Katzen eine Freisetzung vasoaktiver Neuropeptide im trigeminovaskulären System induziert werden kann. Dabei wurden Steigerungsraten der CGRP-Konzentration von bis zu 85 % gemessen.

Offenhauser et al. belegten bei Ratten einen durch i.v.-Applikation von CPS induzierten CGRP-Anstieg im Jugularvenenblut sowie eine erhöhte Expression des c-fos-Proteins im Nucleus caudalis trigeminalis, als unspezifischen, indirekten Marker neuronaler Aktivierung im trigeminovaskulären System [67].

Limmroth et. al. veranschaulichten in einer 2001 publizierten Arbeit, dass durch direkte Stimulation des Ganglion trigeminale, mittels in den Rattenschädel abgesenkter Elektroden, eine Aktivierung des trigeminalen Nervensystems induziert werden kann [73]. Nach elektrischer Stimulation wurden um 130 % erhöhte CGRP-Konzentrationen und eine gesteigerte Plasmaextravasation duraler Gefäße beobachtet. Wang et al. registrierten 2 Min. nach unilateraler elektrischer Stimulation des Ganglion trigeminale in Ratten einen CGRP-Anstieg im Jugularvenenblut von 112 %. Die nur unilateral erfolgte Stimulation könnte den im Vergleich zu den hier erzielten Resultaten geringeren Anstiegswert erklären [85].

Einen weiteren Hinweis dafür, dass CGRP eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung des trigeminovaskulären Systems beizumessen ist, geben die laborexperimentellen Daten von Dux und Sánta et al. In einer mit Ratten durchgeführten Studie wurde der Effekt einer topischen Stimulation der Dura mater mit CPS auf den duralen Blutfluss untersucht. Nach Verabreichung des CGRP-Rezeptor-Antagonisten CGRP₈₋₃₇ konnte ein signifikant verminderter Blutfluss der meningealen Gefäße beobachtet werden [86].

Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen basalen CGRP-Konzentrationen (vor IS Stimulation) von ca. 15 pg/ml sind mit denen von Gupta et al. ermittelten basalen Werte einer in-vitro Studie über die CGRP-Ausschüttung in isolierten Durapräparaten vergleichbar [87]. In der gleichen Studie wurde ein Wiederaufnahmeprozess des Neuropeptids meningealer Neurone dokumentiert, der neben der Halbwertszeit des CGRP im Plasma von 7-10 Min. [88], die hier beobachteten geringeren Konzentrationen nach 15 Min. erklären könnte. Alternativ könnten die CGRP-Speicher nach initial stimulierenden Reiz depletiert sein bzw. der abnehmende stimulierende Effekt der IS durch Dilution oder Abbau dieser bedingt sein. Meine Daten sind ebenfalls in Übereinstimmung mit Eberhardt et al., die an isolierten trigeminalen Ganglienzellen in der Zellkultur eine durch inflammatorische Mediatoren induzierte CGRP-Ausschüttung aufzeigen konnten [54].

Die in meinen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse bestätigen die Resultate anderer wissenschaftlicher Arbeiten. Anhand des verwendeten Modells konnte die Hypothese verifiziert werden, dass erhöhte CGRP-Spiegel im Tierexperiment in Zusammenhang mit einer Aktivierung des trigeminalen Nervensystems stehen, da nach intracisternaler sowie peripherer intraarterieller Applikation von IS erhöhte jugularvenöse CGRP-Spiegel gemessen wurden. Diese sind als Indikator einer trigeminalen Aktivierung anzusehen.

6.2 CGRP als Aktivator des trigeminalen Nervensystems in klinisch experimentellen Studien

Die Aktivierung des trigeminalen Nervensystems und die Ausschüttung von CGRP gelten als Kernbestandteil einer akuten Migräne. In diesem Zusammenhang dokumentierten Goadsby et al. erhöhte CGRP-Spiegel bei Migränepatienten mit und ohne Aura [31]. Der Konzentrationsanstieg während akut manifester Migräneanfälle konnte dabei ausschließlich in der V. jugularis externa gemessen werden, während in der Armvene, in der Fossa cubitalis, keine Änderungen der Konzentration festgestellt wurden.

Gallai et al. verifizierten diese Beobachtung bei jugendlichen Migränepatienten. Dabei schien der Konzentrationsanstieg des Neuropeptids bei der Migräne mit Aura höher zu sein als bei der Migräne ohne Aura [89].

Diese Beobachtungen wurden in anderen Arbeiten jedoch nicht konsistent reproduziert. So ergaben Untersuchungen von Tvedskov et al. in einer Studie mit 42 Migränepatienten ohne Aura, dass während des akuten Kopfschmerzes keine Konzentrationsunterschiede der CGRP-Spiegel im Jugularvenenblut zu beobachten waren [90].

Hansen et al. veröffentlichten eine klinisch-experimentelle Arbeit und zeigten, dass die intravenöse Verabreichung von CGRP bei 86 % der Migränepatienten zur Auslösung einer Kopfschmerzsymptomatik führt. Zusätzlich beobachteten sie in geringerem Maße auch das Auftreten einer Aurasymptomatik nach CGRP-Stimulation bei Patienten mit bekannter Migräne mit Aura [91].

Lassen et. al. untersuchten in Migränepatienten die Effekte von CGRP auf den Blutfluss und die Vasomotorik zerebraler Arterien mittels Doppler-Sonografie und stellten es in Korrelation zum Auftreten des Symptoms Kopfschmerz. Die Ergebnisse konnten zwar die vasodilatatorische Potenz des Neuropeptids bestätigen, ein zeitlicher Zusammenhang zwischen der intravenösen CGRP-Infusion und dem stark verspäteten Auftreten von Kopfschmerzen war nicht festzustellen [92].

Abgesehen von diesen z.T. kontroversen Ergebnissen sprechen gleichwohl die Daten mehrerer Studien dafür, dass CGRP durch Aktivierung des trigeminalen Nervensystems v.a. an den peripheren sowie an den zentralen Nervenendigungen primärer trigeminaler Afferenzen freigesetzt wird. Insbesondere die direkten CGRP-Rezeptor-Antagonisten (Telcagepant und BIBN4096BS) wiesen in klinisch-pharmakologischen Studien eine gute Wirkung in der akuten Behandlung der Migräne auf [35, 36, 93, 94]. Dies unterstreicht die bedeutende Rolle von CGRP im Kontext zu der mit dem Migränekopfschmerz assoziierten Aktivierung des trigeminalen Nervensystems.

6.3 Untersuchungen zu den CGRP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis

Die CGRP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis im physiologischen Ruhezustand oder nach Aktivierung ist, nach meiner Kenntnis, tierexperimentell bisher nicht systematisch untersucht worden. In der Literatur konnte eine Studie von Wimalawansa et al. zu den humanen Konzentrationsverhältnissen von CGRP im physiologischen Normalzustand gefunden werden [95]. In anderen klinischen Studien wurden erhöhte CGRP-Level im Liquor v.a. in Verbindung mit dem Auftreten der Fibromyalgie [96] bzw. in einem Zusammenhang mit

Subarachnoidalblutungen [97], der Depression [98] sowie chronischer Schmerzen [99] und dem Auftreten chronischer Migränekopfschmerzen gesehen [100, 101].

6.3.1 Physiologische Grundlagen der Liquorproduktion

Der Hauptanteil des Liquor cerebrospinalis wird durch die Ependymzellen des Plexus choroideus der Ventrikel gebildet. Durch stetige Zirkulation wird der Liquor in das venöse Blut via Arachnoidalzotten der Pacchioni-Granulationen drainiert. In Abhängigkeit der jeweiligen Molekülgröße entstammen die meisten im Liquor zirkulierenden Proteine der Blutzirkulation. Ca. 20 % diese Proteinfraction werden exklusiv im ZNS synthetisiert. Zwischen Liquorraum und den zerebralen Gefäßen sorgt die Blut-Liquor-Schrankenfunktion dafür, dass die freie Diffusion und folglich auch die von CGRP zwischen beiden Kompartimenten eingeschränkt ist [102, 103].

6.3.2 Basale CGRP-Konzentration im Liquor cerebrospinalis

Im Liquor cerebrospinalis wurden basale CGRP-Konzentrationen von ca. 125 pg/ml in naiven Tieren gemessen. Hinweise zur Erklärung dieser relevanten Konzentrationen liefern Distributionsstudien von CGRP im ZNS. Diese zeigen, dass das Neuropeptid im Menschen und in der Ratte in neuronalen Zellkörpern u.a. des Hypothalamus [44], im anterioren kortikalen Regionen [104], dem Nucleus corporis mamillaris [105] und der medialen Corpora amygdaloidea [106] lokalisiert ist. Weiterhin sind CGRP-positive Neurone in Bereichen des Hippocampus, des Gyrus dentatus sowie in den ventromedialen Kernen des Thalamus und in großen Mengen im Cerebellum vorhanden [107, 108]. Zur stetig basalen CGRP-Freisetzung in den Liquorraum könnten, aufgrund ihrer direkten anatomischen Vergesellschaftung, die Regionen periventrikulärer hypothalamischer Kerngebiete, des periventrikulären Graus und der zirkumventrikulären Organe beitragen, da dort CGRP-positive Neurone lokalisiert sind [109]. Insbesondere wird CGRP in hohen Konzentrationen im Rückenmark und in den Spinalnerven exprimiert [95]. Durch die nur mit Gap-junctions versehene Epithelschicht der Pia mater herrscht ein konstanter Austausch zwischen der extrazellulären Flüssigkeit des Hirnparenchyms und dem Liquor. Es ist wahrscheinlich, dass größere Mengen des Neuropeptids in den Liquorraum gelangen. Damit ließen sich die hohen CGRP-Konzentrationen bereits im Ruhezustand erklären. Die direkte Sekretion des Neuropeptids durch den Plexus choroideus könnte eine weitere Quelle darstellen. Distributionsstudien für CGRP im ZNS in Ratten von Silverman et. al. [110] zeigten jedoch, dass neurosekretorische Epithelzellen keine größeren Mengen CGRP exprimieren. Hung Tsai et al. [111] dokumentierten dahingegen bei Ratten eine beträchtliche CGRP-mRNA-

Expression in den Ependymzellen des Organum subcommissurale. Daraus ließe sich schlussfolgern, dass diese die Ventrikelräume auskleidenden Zellen einen größeren Anteil an der CGRP-Freisetzung in den Liquor haben könnten.

Auch besteht die Möglichkeit, dass CGRP-haltige spinale Afferenzen des peripheren Nervensystems CGRP in den Liquor abgeben könnten.

Hinsichtlich der in dieser Arbeit ausgeführten Experimente kann bei einem applizierten IS-Volumen von 70 µl ein Verteilungseffekt in den gesamten Liquorraum angenommen werden. Die stetige Liquorzirkulation führt wahrscheinlich zu einer raschen Diffusion des von spinalen Afferenzen freigesetzten CGRP. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Neuropeptids ist es jedoch eher unwahrscheinlich, dass dies zu einer Akkumulation des aus spinalen Afferenzen freigesetzten CGRP in der Cisterna magna bzw. im Jugularvenenblut führt.

6.3.3 Vergleich der basalen CGRP-Konzentrationen beider Kompartimente

Der Vergleich der basalen CGRP-Konzentrationen des zerebral drainierenden Venensystems und dem Liquorraum zeigt 8-fach höhere Konzentrationen im Liquor naiver Tiere.

Beim Vergleich der Konzentrationen sollte beachtet werden, dass die Liquorzirkulation in Richtung des kortikalen Subarachnoidalraumes gerichtet ist [103]. Es ist demnach wahrscheinlich, dass CGRP kontinuierlich via Pachioni-Granulationen in den zerebral-venösen Sinus gelangt und die hohen CGRP-Spiegel im Liquor zu den Konzentrationen in der V. jugularis beitragen.

Die hier gemessenen Konzentrationsunterschiede zwischen beiden Kompartimenten lassen sich wahrscheinlich durch Verdünnungseffekte im Blut der peripheren extrakraniellen Zirkulation erklären. Ferner ließen sich die geringeren Konzentrationen des Neuropeptids im Jugularvenenblut dadurch erklären, dass CGRP ebenfalls via spinaler Arachnoidalzotten drainiert werden könnte. Nach heutiger Auffassung besteht darüber hinaus eine transependymale und lymphatische Resorption peptiderger Neurotransmitter aus dem Liquor [112]. CGRP würde infolgedessen in der V. jugularis in geringerer Menge detektiert werden.

Resultierend aus unterschiedlichen Aktivitätsraten CGRP-degradierender Proteasen, könnten divergierende Halbwertszeiten des Neuropeptids in beiden Kompartimenten zu dem Konzentrationsgefälle im Liquor vs. Jugularvenenblut beitragen. Kim et al. identifizierten in diesem Zusammenhang das Insulin-degradierende-Enzym (IDE) als CGRP-abbauendes Enzym in Plasma und Lysat murinen Rückenmarks [113]. Eine höhere Aktivität von IDE im Plasma könnte als Erklärung herangezogen werden.

6.3.4 CGRP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis nach IS-Stimulation

Im Liquor wurden analog zum Verhalten im Serum signifikant erhöhte CGRP-Spiegel gemessen. Der Konzentrationsanstieg betrug bei naiven Tieren ca. 78 %. Erklärend für diese Stimulus-induzierten CGRP-Anstiege könnte zunächst der Applikationsort der IS sein. Durch die direkte lokale Wirkung des stimulierenden Agens im Bereich der perivaskulären trigeminalen Afferenzen in der Dura und am sek. Neuron im NCT werden wahrscheinlich große Mengen des Neuropeptids in die Liquorräume freigesetzt. Zusätzlich könnte eine Akkumulation des Neuropeptids in der Cisterna magna, aus der die Proben entnommen wurden, zu den hier gemessenen Werten beitragen.

Diese Hypothese einer Freisetzung in der Dura ließe sich durch einen modifizierten experimentellen Ansatz überprüfen, indem nach peripherer IS-Infusion in die Halsgefäße eine zeitnahe CGRP-Bestimmung im Liquor erfolgte.

Auch funktionelle, u.a. durch IS verursachte, Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke sollten berücksichtigt werden. Die Blut-Liquor-Schranke ist für CGRP grundsätzlich undurchlässig [114]. Beggs et al. zeigten jedoch, dass die elektrische und chemische Stimulation peripherer C-Fasern zu einer erhöhten Permeabilitätsrate der Blut-Hirn-Schranke führt [115]. Infolgedessen könnte sich die Diffusionsrate perivaskulär freigesetzten CGRP in den mit Liquor durchströmten Subarachnoidalraum erhöhen. Dieser Effekt könnte zusätzlich durch eine CGRP ausgelöste Histaminfreisetzung aus meningealen Mastzellen potenziert werden [20]. Auch der Beitrag spinaler Afferenzen zum Stimulus-induzierten CGRP-Anstieg kann in diesem Modell nach intracisternaler IS-Verabreichung nicht gänzlich ausgeschlossen werden, erscheint aber weniger wahrscheinlich.

6.3.5 Vergleich der CGRP-Konzentrationen beider Kompartimente nach IS-Stimulation

Die Abnahmezeitpunkte für die Ermittlung der Serum- und der Liquorkonzentrationen nach IS-Stimulation waren in den hier durchgeführten Experimenten unterschiedlich (Serum: 2 und 15 Min. vs. Liquor: 20 Min.). Dies hatte technische Gründe, da Blut und Liquor im hier verwendeten experimentellen Aufbau nicht simultan entnommen werden konnten. Ich vergleiche daher die charakteristischen Verlaufskurven der Konzentrationsgipfel im peripheren Jugularvenenblut und Liquor nach Stimulation. Peripher konnten im Jugularvenenblut nach 2 Min. um 120 % bzw. nach 15 Min. um 50 % erhöhte Anstiegsraten Stimulus-induzierter CGRP-Konzentrationen festgestellt werden. Im Liquor zeigten sich hingegen 20 Min. nach IS-Stimulation eine um 80 % erhöhte Konzentration verglichen mit den Basisspiegeln. Auch die

absoluten Werte sind im Liquor signifikant höher als im Blut. Die Mechanismen zur Erklärung des Konzentrationsgefälles zwischen Liquor und Jugularvenenblut im Ruhezustand lassen sich wahrscheinlich auch auf die Konzentrationsverhältnisse nach IS-Stimulation anwenden. Der Stimulus-induzierte Konzentrationsanstieg von CGRP im Liquor verhält sich höchstwahrscheinlich analog zu dem im Jugularvenenblut. Dementsprechend könnten die peripheren CGRP-Konzentrationen im Jugularvenenblut als Funktion der zentral im Liquor bestimmten Konzentrationen angesehen werden.

6.3.6 Bedeutung der CGRP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis im Kontext der Migränepathophysiologie

Die Erkenntnisse über die peripheren Konzentrationsverhältnisse von CGRP in der V.jugularis nach IS-Applikation und trigeminaler Denervierung belegen die herausragende Rolle des Neuropeptids im Rahmen der trigeminalen Aktivierung. In diesem tierexperimentellen Modell konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass CGRP ebenfalls in einer hohen Konzentration im Liquor vorhanden ist und deren Stimulus-induzierter Gipfel einer ähnlichen Dynamik folgt. Zur Frage ob der CGRP-Konzentration im Liquor im Rahmen der Pathophysiologie primärer Kopfschmerzkrankungen eine Bedeutung zukommt liegen zur akuten Migräne nach meiner Kenntnis keine Daten vor. Jedoch berichten Sarchielli und Gallai et al. bei Patienten mit chronischen täglichen Kopfschmerzen ohne Medikamentenübergebrauch, die den derzeitigen IHS-Diagnosekriterien einer chronischen Migräne entsprechen, von erhöhten CGRP-Spiegeln im Liquor. Sie interpretierten den Anstieg als die Folge einer chronischen Aktivierung CGRP-haltiger Neurone im NCT, die zur gesteigerten Aktivierung sekundärer trigeminaler Neurone beitragen könnte [100, 101].

Der Nachweis erhöhter CGRP-Konzentrationen im Liquor während akuter Migräneanfälle ist bisher nach meiner Kenntnis nicht erbracht.

Sofern im Menschen die CGRP-Konzentration im Liquor vs. Jugularvenenblut, analog zum Tierexperiment, ebenso höher sein sollte, wäre auch der Nachweis eines CGRP-Anstiegs während der Migräneattacke leichter durchzuführen als im Jugularvenenblut.

Es stellt sich dann die Frage, inwieweit die CGRP-Konzentration im Liquor mit der klinischen Manifestation akuter Migräneanfälle korreliert und ob diese als Indikator bzw. Biomarker für die Diagnostik angewendet werden könnte. Durch die Analyse von CGRP in Patientenproben, z.B. im Rahmen von Liquoruntersuchungen zur differentialdiagnostischen Zuordnung, ließen sich etwaige Korrelationen zwischen CGRP-Spiegeln im Liquor und der klinischen Manifestation der

akuten Migräneerkrankung beweisen. Eine Zustimmung der Ethikkommission müsste vorab vorliegen.

6.4 Integrität des trigeminalen Nervensystems und Ort der CGRP-Freisetzung nach Stimulation

Die Schmerzentstehung im Rahmen der Migränepathophysiologie beruht auf Aktivierungs- und Sensibilisierungsprozessen des trigeminalen Nervensystems. Eines der Hauptziele dieser Forschungsarbeit war es zu evaluieren, von welchen Strukturen die CGRP-Ausschüttung im Rahmen dieses experimentellen Kopfschmerzmodells ausgeht. Wenngleich es sehr naheliegend ist, dass CGRP aus dem trigeminalen Nervensystem ausgeschüttet wird, ist unbekannt ob periphere oder zentrale Anteil bzw. beide hierzu beitragen. Daneben kommen andere CGRP-haltige Strukturen in Frage. Zur Erörterung dieser Fragestellung ist es wichtig die anatomischen und strukturellen Charakteristika des trigeminalen Nervensystems zu berücksichtigen. Wie in der Abb.1 dargestellt, lassen sich primäre trigeminale Afferenzen, deren Zellkörper im Ganglion trigeminale lokalisiert sind, von sekundären im Nucleus caudalis trigeminalis (NCT) umgeschalteter Neurone unterscheiden. Deren efferente Bahnen führen v.a. zu Kerngebieten des Thalamus. Die Integrität des trigeminalen Nervensystems ist eine fundamentale Voraussetzung für die Wahrnehmung des Symptoms Kopfschmerz. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden in dieser Arbeit die peripheren Anteile des N. trigeminus durch chemische Ablation primärer meningealer Afferenzen ausgeschaltet. Dies wurde durch eine überdosierte intraperitoneale Applikation von CPS in Anlehnung an Arbeiten von Jancso und Markowitz et al. in neonatalen Ratten erzielt [78, 116]. In diesen Tieren war die CGRP-Ausschüttung signifikant vermindert. Die Ausschüttung des Neuropeptids scheint demnach an die Integrität des trigeminalen Nervensystems gebunden zu sein. In meiner Arbeit gelang es die Bedeutung primärer trigeminaler Afferenzen für die Stimulus-induzierte CGRP-Ausschüttung aufzuzeigen, was nachfolgend weiter diskutiert wird.

6.4.1 Vergleich der Expressionsraten CGRP-kodierender mRNA in peripheren und zentralen Anteilen des trigeminalen Nervensystems

Zunächst wurden Proben aus dem Nucleus caudalis trigeminalis (NCT) und des Ganglion trigeminale (GT) ausschließlich naiver Tiere verglichen. Die Daten zeigen eine im GT um ca. 10-fach höhere Expressionsrate CGRP-kodierender mRNA im Vergleich zum NCT. Dieser geringere Anteil CGRP-kodierender mRNA aus dem im Hirnstamm gelegenen NCT lässt vermuten, dass hier nur geringe Mengen CGRP-Peptid synthetisiert und ausgeschüttet werden.

Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass der größte Anteil des nach IS-Gabe freigesetzten CGRP von peripheren Afferenzen ausgeschüttet wird. Im Ganglion trigeminale ist CGRP in wesentlich größerer Menge als im NCT vorhanden, was sich auch in einer hohen mRNA-Synthese widerspiegelt.

Der geringe Gehalt an CGRP im zentralen trigeminalen Nervensystem weist darauf hin, dass diese Struktur weniger relevant für die Ausschüttung von CGRP zu sein scheint. Bereits Lennerz et al. gelang es nicht in Neuronen des NCT eine CGRP-Reaktivität nachzuweisen. Dagegen exprimieren bis zu 50 % der Neurone im Ganglion trigeminale CGRP [117]. Ferner sei CGRP hauptsächlich in Neuronen kleinen und mittleren Durchmessers enthalten, was den morphologischen Charakteristika von unmyelinisierten C-Fasern entspricht.

Darüber hinaus korrelieren meine Daten hoher Expressionsraten im Ganglion trigeminale mit Arbeiten von Tajti et al. [118], die mittels in-Situ-Hybridisierung den immensen Anteil CGRP-kodierender mRNA in den Perikarya des Ganglion trigeminale visuell darstellten.

6.4.2 Auswirkungen der Capsaicin-Applikation auf struktureller Ebene - Neuroanatomische Charakteristika

Acht Wochen nach neonataler Capsaicin-Exposition zeigten histologische Untersuchungen des Ganglion trigeminale eine deutliche Reduktion CGRP-positiver Zellkörper bzw. Neurone. Auch in der Dura mater war der Anteil der CGRP-positiven Neurite signifikant reduziert. Hingegen zeigten die histologischen Färbungen des Nucleus caudalis trigeminalis keine Differenzen zwischen CPS- und Kontroll-Ratten. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass vornehmlich periphere, primäre trigeminale Afferenzen von dieser Vorbehandlung betroffen sind. Zentrale Strukturen wie sekundäre Neurone im Nucleus caudalis trigeminalis sind nicht betroffen.

Die neonatale CPS-Behandlung führt zur selektiven Zerstörung primärer afferenter trigeminaler Neurone. 50 % der humanen [29, 118] und 44 % der primär afferenten trigeminalen Neurone in Ratten enthalten CGRP [117]. Dies kann als Ursache für die hier beobachtete signifikante Reduktion CGRP-positiver Neurone in den histologischen Schnitten angesehen werden. Da nach CPS-Gabe jedoch keine Reduktion NF200-positiver Neurite festgestellt werden konnte, ergibt sich hieraus, dass die neonatale CPS-Exposition nicht zu einer strukturellen Zerstörung der Neurone führt, sondern zu einer selektiven Ablation CGRP-positiver Fasern. In dem Falle, dass CPS die Bluthirnschranke nicht überwindet und keinem aktiven Transportmechanismus unterliegt, kann davon ausgegangen werden, dass zentrale Strukturen durch die CPS-Behandlung morphologisch nicht verändert werden. Dies konnte in meiner Studie durch die histologische Untersuchung der Proben des NCT im Vergleich zu den peripheren Anteilen des GT und der

Dura gezeigt werden. Die Beobachtung, dass nach Ablation der C-Fasern keine relevanten Unterschiede hinsichtlich der CGRP-Expression im Nucleus caudalis trigeminalis naiver und mit CPS vorbehandelter Tiere festgestellt werden konnte, korrespondiert gut mit den Untersuchungen von Aita et al., die mittels immunhistochemischer Techniken die CGRP-Expressionsmuster im Nucleus caudalis trigeminalis von neonatal mit CPS behandelten Mäusen quantifizierten. In der CPS-Gruppe ließ sich dabei ebenfalls keine Abweichung hinsichtlich der histologischen Expressionsmuster CGRP-positiver Neurone im NCT feststellen [119].

6.4.3 Auswirkungen der Capsaicin-Applikation auf funktioneller Ebene - CGRP-Konzentrationen im jugularvenösen Blut und Liquor cerebrospinalis

Funktionell führte die neonatale Ablation primärer trigeminaler Afferenzen zu signifikant verringerten Stimulus-induzierten CGRP-Konzentrationen im extrakraniellen Venensystem. Im Liquor wurden ebenfalls deutlich geringere Anstiegsraten der IS-induzierten CGRP-Konzentration beobachtet. Die Ablation von A δ - und C-Fasern primärer trigeminaler Afferenzen hat, kongruent zu den strukturellen Änderungen, demnach auch funktionelle Auswirkungen. Diese Erkenntnis lässt darauf schließen, dass die induzierte CGRP-Ausschüttung sowohl in das extrakranielle venöse System als auch in den Liquor cerebrospinalis auf der Integrität des trigeminalen Nervensystems basiert. Über diese Erkenntnisse hinaus, können mit meinen Untersuchungen auch Rückschlüsse auf den Freisetzungsort des Neuropeptids gezogen werden. Da die Stimulus-induzierten CGRP-Konzentrationen eine deutliche Reduktion in der CPS-Gruppe aufweisen und hier die primären CGRP-haltigen Afferenzen, jedoch nicht sekundäre trigeminale Neurone reduziert sind, lassen sich primäre trigeminale Afferenzen als Hauptquelle der CGRP-Freisetzung nach Stimulation identifizieren.

Auch nach Deprivation CGRP-haltiger Nervenfasern in der CPS-Gruppe ist ein leichter CGRP-Anstieg durch IS sowohl im Jugularvenenblut als auch im Liquor zu beobachten. Dies deutet darauf hin, dass die neonatale CPS-Applikation nicht alle CGRP-haltigen primären Afferenzen zerstört hat, sondern einige intakte Fasern zur CGRP-Freisetzung weiterhin beitragen könnten. Kai Kai et al. berichten in diesem Zusammenhang für Ratten, dass nach Applikation der gleichen CPS-Dosis nur weniger als 50% der A δ - und C-Fasern zerstört werden [120].

Auch in anderen Arbeiten führte die neonatale CPS-Applikation zu funktionellen Veränderungen, die in einem Zusammenhang mit reduzierten CGRP-Konzentrationen gesehen werden können. Takuma et al. zeigten anhand von Proben spinaler trigeminaler Kerngebiete von Ratten, dass die neonatale CPS-Applikation funktionelle Auswirkungen auf den NCT hat, was

sich in einer Reduktion der NMDA-Rezeptor vermittelten Signalübertragung äußerte. Es konnten auch morphologische Alterationen primärer Afferenzen beobachtet werden [121].

Nozaki et al. beobachteten in Ratten nach neonataler CPS-Applikation eine 54%ige Reduktion der c-fos Expression im NCT, die durch intracisternale Provokation mit proinflammatorischen Mediatoren induziert wurde [122]. Diese Beobachtung unterstreicht die bedeutende Rolle afferenter A δ - und C-Fasern analog zu meinen Untersuchungen und damit auch die von CGRP bei der Regulation neuronaler Aktivität im NCT. Dass ein Zusammenhang zwischen der Expression von c-fos und CGRP besteht, zeigten Takhshid et al., die nach intracisternaler CGRP-Infusion gesteigerte c-fos-Expressionsraten dokumentierten [123].

In einer Arbeit von Minami et al. bewirkte die neonatale CPS-Applikation in Mäusen eine deutliche Reduktion einer durch Prostaglandin E₂ induzierten fazialen Allodynie, was wiederum die Bedeutung intakter A δ - und C-Fasern bei der Schmerzwahrnehmung und Generierung unterstreicht. Es ist anzunehmen, dass diese CGRP vermittelt sind [124].

Die basalen CGRP-Konzentrationen im Liquor und Jugularvenenblut unterschieden sich hingegen in der CPS-Gruppe nicht signifikant von denen naiver Tiere. Dies zeigt, dass die Aufrechterhaltung der Basislevel des Neuropeptids im Jugularvenenblut und Liquor nicht durch eine neonatale CPS-Exposition beeinflusst wird. Es scheint, dass die restlichen CGRP-positiven peripheren Neurone, die nicht durch CPS zerstört wurden, die Basiskonzentrationen des Neuropeptids aufrecht erhalten können. Alternativ könnten die basalen CGRP-Konzentrationen auch aus anderen Strukturen des ZNS stammen.

Die hier gemessenen CGRP-Konzentrationen könnten in Teilen auch von zentralen Strukturen stammen. Es wäre dann zu klären welche Strukturen zu diesen CGRP-Konzentrationen beitragen. Hierzu liefern die Daten der qRT-PCR-Analyse erste Hinweise. Der, wenn auch geringe, Nachweis von CGRP-mRNA im NCT impliziert, dass auch von hier CGRP freigesetzt werden kann. Damit könnten auch sekundäre trigeminale Neurone an der CGRP-Freisetzung beteiligt sein. Diese Hypothese kann durch die Ergebnisse einer Arbeit von Eftekhari et. al. [125] nicht eindeutig bestätigt werden. In einer immunhistochemischen Distributionsstudie für CGRP in spinalen trigeminalen Kerngebieten zeigten sie zwar, dass neben einem großen Anteil CGRP-positiver primärer trigeminaler Nervenfasern in den äußeren Laminae I und II, ebenfalls in die Region des NCT reichende CGRP-positive Fasern detektiert werden. Durch diese immunhistologische Untersuchung auf CGRP kann jedoch nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob das in diesen Fasern enthaltene CGRP tatsächlich in Perikarya sekundärer

trigeminaler Neurone synthetisiert wird oder via axonalen Transport den Perikarya des Ganglion trigeminale entstammt.

In der Ratte ließen sich jedoch CGRP-positive Perikarya in Nachbarschaft des Canalis centralis, der inferioren Olive und im Kerngebiet des N. Hypoglossus nachweisen. Eine CGRP-Freisetzung aus diesen Strukturen könnte ebenfalls zur CGRP-Konzentration im Liquor und Jugularvenenblut beitragen.

Lennerz et al. [117] propagieren in einer Distributionsstudie zu CGRP und seiner Rezeptorkomponenten, dass CGRP ausschließlich in den Terminalen primärer trigeminaler Afferenzen detektiert werden kann, nicht jedoch in sekundären trigeminalen Neuronen. Meine Daten der qRT-PCR zeigen jedoch, dass CGRP-Peptid in geringem Maße auch im NCT synthetisiert wird. Dies müsste durch weiterführende Untersuchungen mittels In-situ-Hybridisierung näher analysiert werden. Dabei könnte CGRP kodierende mRNA direkt in den Strukturen nachgewiesen und visualisiert werden.

6.4.4 Untersuchung der Expressionsraten CGRP-kodierender mRNA nach neonataler Capsaicin-Exposition

Um festzustellen, ob auch die Synthese von CGRP-mRNA durch CPS beeinflusst wird, wurden in weiteren Untersuchungen Gewebeproben aus dem Ganglion trigeminale und dem Nucleus caudalis trigeminalis auf die Expression CGRP-kodierender mRNA mittels qRT-PCR untersucht.

Die neonatale CPS-Gabe führte zu erheblich reduzierten Expressionsraten CGRP-kodierender mRNA im Ganglion trigeminale, nicht jedoch im Nucleus caudalis trigeminalis. Der im Vergleich zu naiven Tieren um ca. das 4-fache reduzierte Wert aus Proben des Ganglion trigeminale, verifiziert damit zunächst die Wirksamkeit der CPS-Behandlung. Neu in diesem Zusammenhang ist die Beobachtung, dass nicht nur CGRP-Protein durch CPS aus trigeminalen Neuriten depletiert wird, sondern auch die Synthese von CGRP signifikant beeinflusst wird. Diese Beobachtung war bisher nicht in der Literatur beschrieben.

Weiterhin wird deutlich, dass sekundäre trigeminale Neurone durch eine periphere CPS-Gabe in neonatale Ratten bzgl. ihrer CGRP-mRNA-Produktion nicht verändert werden. Diese Ergebnisse korrespondieren sowohl mit den immunhistologischen Untersuchungen der CGRP-Expression im trigeminalen Nervensystem meiner eigenen histologischen Daten als auch mit denen von Aita et al. [119].

Die in der CPS-Gruppe deutlich reduzierten CGRP-mRNA Syntheseraten unterstützen damit die Hypothese, dass CGRP hauptsächlich in primären trigeminalen Neuronen gebildet und

freigesetzt wird. Sekundäre Neurone tragen allenfalls nur in geringem Maße zum Stimulus-induzierten Konzentrationsanstieg des Neuropeptids bei.

6.5 Inflammatory soup im experimentellen Modell neuronaler Sensibilisierung

Perivaskuläre meningeale Nozizeptoren können durch eine chemische Stimulation, wie sie der IS-Reiz darstellt, sensibilisiert werden. Die in meiner Arbeit verwendete IS wurde in gleicher Zusammensetzung bereits in mehreren tierexperimentellen Studien zur Induktion experimenteller Sensibilisierungseffekte verwendet. Strassmann et al. zeigten in Ratten, dass die topische IS-Applikation zu einer Sensibilisierung primär afferenter trigeminaler Neurone hinsichtlich mechanischer Stimuli führt [23]. Burstein et al. konnten in einem modifizierten tierexperimentellen Ansatz eine Verbindung zwischen dem Auftreten der peripheren Sensibilisierung und zentraler Prozesse herleiten [43]. Nach topischer Applikation von IS auf die Dura mater ließ sich durch elektrophysiologische Ableitungen im Nucleus caudalis trigeminalis eine gesteigerte Mechanosensitivität duraler, orofazialer und periophthalmischer Afferenzen feststellen. Diese Experimente verdeutlichen, dass die IS-Applikation zur Sensibilisierung trigeminaler Afferenzen führen kann.

In einem ähnlichen Modell verdeutlichten Sun und Lawand et al., dass in Ratten nach intraspinaler Applikation des CGRP-Rezeptor-Antagonisten CGRP₈₋₃₇ eine Abnahme, einer durch CPS induzierten Hypersensitivität, gegenüber mechanischer Reize zu beobachten ist. Dabei schien die Höhe der CGRP-Spiegel in einem direkten Zusammenhang mit Sensibilisierungsprozessen zu stehen [126].

Es besteht die Möglichkeit, dass die in dieser Arbeit gemessenen CGRP-Konzentrationen in Jugularvenenblut und Liquor neben der Aktivierung ebenfalls Ausdruck der Sensibilisierung des trigeminalen Nervensystems sind. Dies könnte jedoch nur durch eine Modifikation der Experimente im Detail geklärt werden, indem die Schwellenwertänderungen bestimmter Reizantworten nach IS-Gabe determiniert würden. Das in dieser Arbeit verwendete Modell kann daher nicht, oder nur sehr bedingt, zur Erklärung sensibilisierender Prozesse trigeminaler Neurone beitragen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die zuvor im Paradigma einer Sensibilisierung verwendete IS ebenfalls zur Aktivierung des trigeminalen Nervensystems führt. Dies äußerte sich durch erhöhte CGRP-Spiegel sowohl in der V. jugularis als auch im Liquor cerebrospinalis.

6.6 Dosis-Wirkungs-Beziehung der applizierten IS-Konzentration

Zur Überprüfung inwieweit die quantitative CGRP-Freisetzung in Liquor und Jugularvenenblut von der verwendeten IS-Konzentration abhängig ist, wurde die 10-fache IS-Konzentration zur Stimulation appliziert. Im Vergleich zur 1-fach konzentrierten IS konnte bei Applikation 10-fach konzentrierter IS nach 2 und 15 Min. ein jeweils um den Faktor 2,2 erhöhter CGRP-Konzentrationsanstieg im Jugularvenenblut gemessen werden. Im Liquor wurde eine um das 2,8-fache gesteigerte CGRP-Ausschüttung gemessen. Die Intensivierung des Stimulus bewirkt demnach in beiden Kompartimenten eine Dosis-abhängige Steigerung der CGRP-Antwort. Dies sehe ich wiederum als Hinweis für eine direkte Beziehung der Konzentrationen des Neuropeptids in beiden Kompartimenten. Diese Dosis-abhängigen Konzentrationssteigerungen sind mit Ergebnissen von Gupta et al. vergleichbar, die in isolierten Duren eine ca. 3-fache Steigerung des freigesetzten CGRP nach Erhöhung einer stimulierend wirkenden Capsaicin-Dosis um eine log-Stufe beobachteten [87].

6.7 Pharmakologische Inhibition der CGRP-Freisetzung

In einem weiteren experimentellen Ansatz wollte ich die Möglichkeiten einer pharmakologischen Inhibition des IS-induzierten CGRP-Konzentrationsanstieges im hier verwendeten Tiermodell untersuchen. Dazu wurden den verschiedenen Gruppen, jeweils 30 Min. vor Gewinnung der ersten Blutprobe (0 Min), das entsprechende Pharmakon infundiert. Neben Zolmitriptan, einem Vertreter der 5-HT_{1B/1D}-Rezeptor-Agonisten, wurde der unspezifische NO-Synthase-Inhibitor L-NAME daraufhin untersucht, ob sie die basalen CGRP-Konzentrationen bzw. einen durch IS-Stimulation induzierten Anstieg beeinflussen.

6.7.1 Auswirkungen von L-NAME auf die CGRP-Konzentration im Jugularvenenblut

In der Gruppe der mit L-NAME behandelten Tiere wurden nach IS-Stimulation zu keinem Zeitpunkt relevante Unterschiede der CGRP-Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen. Die basale Konzentration und die Stimulus-induzierte Ausschüttung des Neuropeptids lassen sich anscheinend nicht durch L-NAME beeinflussen.

Dieses Ergebnis war zunächst nicht zu erwarten, da in mehreren experimentellen Studien ein Zusammenhang zwischen NO und der CGRP-Ausschüttung festgestellt wurde. (Siehe Punkt 1.5 [53-57]) Jedoch sind dabei andere Substanzen zur Stimulation eingesetzt worden.

Da hier keine Effekte von L-NAME beobachtet wurden, scheint es so zu sein, dass die durch IS-Stimulation induzierte CGRP-Freisetzung nicht einem NO-abhängigen Prozess unterliegt. Oshinsky et al. wiesen jedoch bei Ratten einen Zusammenhang zwischen der duralen IS-Applikation und einer daraufhin gesteigerten Reizantwort auf den NO-Donator Glyzeroltrinitrat nach [127]. Eberhardt et al. zeigten, dass die Gabe von NO-Donatoren im in-vitro-Modell trigeminaler Ganglienzellen von Ratten zu einer erhöhten CGRP-Ausschüttung nach Gabe einer ähnlichen Mischung inflammatorischer Mediatoren führt. In der gleichen Studie zeigten sie, dass isolierte trigeminale Ganglienzellen von Tieren, die L-NAME erhielten, reduzierte basale CGRP-Spiegel freisetzen [128].

Erklären ließe sich diese Diskrepanz zu meinen Daten durch die Verwendung einer unterschiedlichen L-NAME-Dosis. Eberhardt et al. verabreichten Dosen von 140 mg/Kg KG, während in dieser Arbeit eine Dosis von 40 mg/Kg KG infundiert wurde. Es besteht auch die Möglichkeit, dass die von Eberhardt et al. in der Kultur beobachteten Effekte von L-NAME zu gering sind, um in-vivo detektiert werden zu können. Auch könnte die Anwendungszeit von L-NAME 30 Min. vor IS-Applikation zu kurz gewählt sein, um die CGRP-Spiegel zu beeinflussen. Diese wurde jedoch aufgrund der Vergleichbarkeit zur Zolmitriptan-Gruppe bestimmt. Da die L-NAME-Konzentration in-vivo nach Whiting et al. jedoch einer Halbwertszeit von mehreren Stunden unterliegt, sollte 30 Min. nach Applikation ein ausreichend hoher Wirkspiegel zu erwarten sein [129]. Der Applikationszeitpunkt scheint hier dementsprechend korrekt gewählt worden zu sein.

Ob NO-abhängige Signalwege in diesem Modell beteiligt sind, ist nicht eindeutig geklärt. In dem Fall, dass CGRP unabhängig von NO freigesetzt wird, wäre eine effektive Wirkung eines NO-Synthase-Inhibitors nicht zu erwarten. Es besteht auch die Möglichkeit, dass der Einfluss von NO auf die CGRP-Freisetzung im in-vivo Modell zu gering ist, um einen relevanten Effekt via Hemmung der NO-Synthase hervor zu rufen.

Insgesamt ist die Rolle von NO in der Pathophysiologie der Migräne nicht eindeutig geklärt. Dies trifft v.a. auf die Hypothese der inflammatorisch induzierten trigeminalen Aktivierung in-vivo zu. Auch in einer klinischen Studie konnten für den iNOS-Inhibitor GW274150 keine akuten therapeutischen Effekte bei Migränepatienten festgestellt werden [130].

6.7.2 Effekt von Zolmitriptan auf die basalen CGRP-Spiegel im Liquor und in der V.jugularis

In dieser Arbeit konnte kein Effekt von Zolmitriptan auf die basale CGRP-Konzentration im Jugularvenenblut beobachtet werden. Diese Resultate sind vergleichbar mit anderen Studien, bei denen im Tierexperiment ebenfalls keine Reduktion der basalen CGRP-Plasmakonzentration nach Gabe eines Triptans detektiert werden konnte [82, 85, 131].

Hingegen zeigen meine Resultate im Liquor nach Applikation von Zolmitriptan reduzierte CGRP-Konzentrationen. Die Bestimmung der CGRP-Spiegel im Liquor nach Gabe eines Triptans ist neuartig. Meiner Kenntnis nach finden sich dazu in der Literatur keine vergleichbaren Studien.

Das divergierende Verhalten der CGRP-Spiegel in der V. jugularis vs. Liquor ließe sich durch einen Verdünnungseffekt im Jugularvenenblut erklären. Auch besteht die Möglichkeit, dass der optimale Zeitpunkt des Effekts bei Bestimmung der Basiskonzentrationen (0 Min.) in der V. jugularis verpasst wurde.

Die beobachtete Reduktion basaler CGRP-Spiegel im Liquor könnte jedoch darauf hinweisen, dass der Prozess der CGRP-Freisetzung in den Liquorraum unter basalen Bedingungen einer Regulation des 5-HT_{1B/1D}-Rezeptors unterliegt. Studien von Goadsby et al. zur zentralen Distribution von 5-HT_{1B/1D}-Rezeptoren belegen eine weit verbreitete Expression im gesamten ZNS [71]. Aufgrund der ausgeprägten Passierbarkeit Zolmitriptans durch die Blut-Hirn-Schranke, ergeben sich auch für das hier angewandte Modell somit zahlreiche potentielle Wirkungsorte in Strukturen mit Relevanz zu Kopfschmerzen. Summiert könnten diese zu der hier beobachteten Reduktion des basal freigesetzten CGRP in den Liquor beitragen [75, 132].

In diesem Zusammenhang dokumentierten Cumberbatch et al. an trigeminalen Strukturen in Ratten eine antinozizeptive Wirkung von Zolmitriptan [133]. Goadsby et al. beobachteten einen hemmenden Effekt des Triptans auf trigeminale Neurone nach elektrischer Stimulation des Ganglion trigeminale in Ratten [75]. Bartsch et al. lieferten ferner Hinweise, dass Triptane einen antinozizeptiven Effekt auf zum NCT projizierende Bahnen des ventrolateralen periaquäduktalen Graus in Ratten haben [134].

Ob im Menschen die Gabe eines Triptans zur Reduktion von CGRP im Liquor führt ist allerdings nicht bekannt. Dies müsste in klinischen Studien untersucht werden.

6.7.3 Auswirkungen von Zolmitriptan auf die durch IS-Stimulation induzierten Konzentrationsanstiege von CGRP

Der Effekt Zolmitriptans sollte auf einen maximal starken Stimulus hin untersucht werden. Daher erfolgte die Applikation von 10-fach konzentrierter IS. Die intravenöse Vorbehandlung mit Zolmitriptan zeigte weder nach 2 noch nach 15 Min. einen signifikanten Effekt hinsichtlich des durch maximale IS-Stimulation induzierten Anstiegs der CGRP-Konzentration in der V. jugularis. Diese Beobachtung steht in Diskrepanz zu Ergebnissen anderer Studien, in denen Zolmitriptan zu einer Reduktion der Stimulus-induzierten CGRP-Mengen geführt hat. Goadsby et al. dokumentierten in einer Studie mit Katzen einen inhibierenden Effekt Zolmitriptans auf die CGRP-Freisetzung im Jugularvenenblut nach elektrischer Stimulation des Sinus sagittalis superior [135]. Buzzi et al. belegten diesen Effekt für Sumatriptan [131]. Nach intracisternaler IS-Stimulation beobachteten Hoffmann et al. reduzierte jugularvenöse CGRP-Spiegel bei mit Sumatriptan vorbehandelten Ratten nach Gabe 1-fach konzentrierter IS [82]. Die Daten zeigten 2 Min. nach IS-Stimulation um ca. 40 % reduzierte CGRP-Spiegel. Demzufolge scheint die Applikation von Triptanen zu einer Reduktion Stimulus-induzierter CGRP-Spiegel in-vivo zu führen.

Die hier applizierte Konzentration von 3 mg/kg KG scheint, entsprechend der Daten anderer Studien, adäquat gewählt worden zu sein. Martino et al. bewiesen, dass Zolmitriptan-Dosen von 1,25-5 mg/kg KG eine durch Kälte induzierte Allodynie bei zuvor mit Lipopolysaccharid sensibilisierten Ratten attenuiert [136]. Nach Applikation einer Zolmitriptan-Dosis von 3 mg/kg KG in Ratten beobachteten Hoffmann et al. reduzierte CGRP-Ausschüttungen bei einer bakteriell induzierten Inflammation [137]. Durch eine vermeintliche Unterdosierung ließen sich die Ergebnisse meiner Studie demzufolge nicht erklären.

Im Liquor wurden in der Zolmitriptan-Gruppe nach IS-Stimulation ähnlich hohe CGRP-Spiegel im Vergleich zu naiven Tieren gemessen. Eine mutmaßliche Reduktion der CGRP-Konzentrationen konnte auch im Liquor nicht beobachtet werden. Es besteht die Möglichkeit, dass der Effekt von Zolmitriptan durch die Wahl des Messzeitpunktes, 20 Min. nach IS-Gabe, nicht mehr erfasst wurde.

Als Erklärung dafür, dass weder im Liquor noch in der V. jugularis ein Effekt von Zolmitriptan hinsichtlich der CGRP-Konzentration beobachtet wurde, muss wahrscheinlich auch der enorme Reiz durch die 10-fach konzentrierte IS herangezogen werden. Unter diesen Bedingungen scheint die Zolmitriptan-Applikation, auch in der hohen Dosierung von 3 mg/kg KG, wirkungslos zu sein.

Letztendlich ist nicht auszuschließen, dass Zolmitriptan in diesem Modell keinen Effekt auf die Stimulus induzierte CGRP Ausschüttung besitzt. Zur Klärung der Ursache dieser unerwarteten Beobachtung müssen weitere Untersuchungen außerhalb dieser Arbeit durchgeführt werden.

6.8 Diskussion der verwendeten Methoden

6.8.1 Applikation der Inflammatory soup

Die in den hier durchgeführten Experimenten zur Stimulation verwendete Inflammatory soup setzt sich aus verschiedenen inflammatorisch wirkenden Substanzen in Anlehnung an Arbeiten von Strassmann et al., Burstein et al. und Steen et al. zusammen [23, 43, 138].

Nach Applikation einer ähnlich zusammengesetzten IS konnten auch Ebersberger et al. eine gesteigerte CGRP-Freisetzung in-vitro beobachten [139]. Damit wurde eine Stimulation des trigeminalen Nervensystems induziert, was sich in meinen Studien durch einen Anstieg der CGRP-Konzentration im Liquor und jugularvenösen Blut darstellte. Hingegen konnten in anderen intrakraniellen Kopfschmerzmodellen, wie z.B. bei der i.v.-Applikation von NO-Donatoren durch Offenhauser et al. [67], keine zuverlässigen und reproduzierbaren peripheren CGRP-Konzentrationsanstiege gezeigt werden, was insbesondere die Wahl der IS als Stimulus in meinen Studien begründet.

6.8.2 Zusammensetzung und Konzentration der IS

Die Konzentration der IS wurde bei Applikation in 1-facher Konzentration entsprechend der von Burstein et al. verwendeten Zusammensetzung gewählt, um die intracisternale mit der topischen Applikation vergleichen zu können. Nach intracisternaler Applikation dieser IS, wurden mit CGRP-Anstiegen von 157 %, mit anderen Studien vergleichbare Werte gemessen. Hoffman et al. beobachteten nach Applikation von IS in gleicher Konzentration um 120 % erhöhte CGRP-Spiegel im ZNS drainierenden Venensystem [82]. Im in-vitro-Modell isolierter Durapräparate hingegen wurden weitaus höhere Konzentrationsanstiege nach ähnlichem Stimulus gemessen. Ebersberger et al. demonstrierten nach Stimulation mit einer modifizierten IS einen CGRP-Anstieg von 400 % [140]. Gupta et al. zeigten nach Applikation von CPS als stimulierendes Agens einen maximalen CGRP-Anstieg von 500 % [87]. Dilutionseffekte der IS im Liquor nach intracisternaler Applikation könnten erklären, warum die Verwendung einer ähnlich konzentrierten IS im in-vitro Modell zu einer deutlich höheren Konzentrationssteigerung führt. Daneben sind wahrscheinlich auch Verteilungseffekte von CGRP im Blut zu berücksichtigen.

Ich habe die IS-Konzentration in dieser Arbeit so gewählt, dass trotz des Verteilungseffekts im Liquorraum, eine ausreichende Wirkung wie bei der direkten topischen Applikation erzielt werden konnte. Die hier gemessenen Anstiegsraten der CGRP-Konzentration sind mit anderen Studien vergleichbar und zeigen, dass die IS-Konzentration in einem adäquaten Bereich gewählt wurde.

6.8.3 Verwendeter Applikationsmodus

In dem hier verwendeten Modell sollte mit großer Sicherheit IS in den Liquorraum eingebracht werden, ohne dass zuvor eine größere Manipulation des Schädels erfolgte. Daher wurde der subokzipitale Zugang mit Injektion in die Cisterna magna gewählt. Der Zugang wurde in vorangegangenen Studien verwendet und ist gut etabliert [79]. Der Applikationsort wurde so gewählt, dass eine möglichst umfangreiche Stimulation durch IS auf alle relevanten Strukturen, die an der CGRP-Ausschüttung beteiligt sein könnten gewährleistet ist.

Mittels IS-Applikation durch diesen zentralen Zugang konnte nach CPS-Behandlung zwischen dem Beitrag peripherer vs. zentraler trigeminaler Afferenzen an der CGRP-Ausschüttung differenziert werden.

Durch die intracisternale IS-Applikation werden kraniale sowie basale Anteile der Dura mater stimuliert. Basal gelegene durale Areale weisen insbesondere bei Ratten eine sehr dichte Innervation trigeminaler Afferenzen auf, was wahrscheinlich zu den hier gemessenen CGRP-Spiegeln beiträgt [27]. Andererseits birgt diese Zugangsform, v.a. durch die vorher erfolgte Präparation, die Gefahr einer unspezifischen, unphysiologischen Reizung der Dura mater.

Andere etablierte experimentelle Modelle verfolgen den Ansatz stimulierende Substanzen via kranialer Fensterungen zu applizieren [42, 43, 57, 141]. Die topische Applikation von IS auf die Dura würde wahrscheinlich weder im Liquor noch im Jugularvenenblut zu einem messbaren Anstieg der CGRP-Konzentrationen führen und wäre daher zur Beantwortung der Frage, aus welchen Strukturen der Hauptteil des Stimulus-induzierten CGRP entstammt, in dieser Arbeit nicht zielführend gewesen.

Weiterhin sollte eine intakte Dura, bei geschlossenem Liquorraum und bestehender Liquorzirkulation, erhalten werden. Zur Bestimmung der Liquorkonzentrationen des CGRP musste daher eine Methode Anwendung finden, die eine intakte Blut-Hirn-Schranken-Funktion gewährleistet. Demzufolge schien auch die direkte elektrische Stimulation des Ganglion trigeminale, wie in vielen Studien angewendet, keine Option darzustellen. Die dafür in das Ganglion trigeminale einzuführenden Elektroden würden zu einer Beschädigung der Blut-Hirn-Schranken-Funktion führen, was die Aussagekraft der im Liquor zu bestimmenden CGRP-

Konzentration in Frage stellen würde [142, 143]. Allerdings kann auch in diesem Modell nicht ausgeschlossen werden, dass die IS-Applikation selbst zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranken-Funktion führen könnte.

Limitiert wird die Aussagekraft der hier gemessenen Werte dadurch, dass der weit streuende Effekt der i.c. IS-Applikation neben dem trigeminalen Nervensystem auch periphere Neurone auf spinaler Ebene beeinflussen könnte. Um diesen Effekt weitgehend auszuschließen wurde IS ebenfalls in eine Halsarterie infundiert. Danach wurde ein vergleichbar hoher Stimulus-induzierter Anstieg der CGRP Konzentration in der V. jugularis beobachtet. Eine Beteiligung spinaler Afferenzen an der CGRP-Ausschüttung bei diesem Applikationsmodus ist jedoch sehr unwahrscheinlich. Durch die unterschiedlichen Applikationswege wurde ebenso eine intraluminale (i.a.) versus extraluminale (i.c.) Gabe von IS verglichen.

6.8.4 Neonatale Capsaicin-Exposition

Zum Zwecke einer effektiven Zerstörung CGRP-haltiger primärer trigeminaler Afferenzen, wurde Tieren der CPS-Gruppe innerhalb von 2 Tagen post partum hochdosiertes Capsaicin intraperitoneal verabreicht. Untersuchungen von Jancso et al. zeigten, dass eine initiale CPS-Applikation innerhalb der ersten 12 Lebenstage in neugeborenen Ratten zu einer nahezu vollständigen und dauerhaften Depletion peptiderger unmyelinisierter C- und A δ -Fasern führt [78, 144]. Diesem Zeitfenster entsprechend wurde die Applikation vorgenommen. Damit konnte eine permanente Zerstörung der Nervenfasern erzielt werden, was beispielsweise durch die repetitive CPS-Applikation adulter Tiere nicht gewährleistet wäre [145]. Die pharmakologische Deafferenzierung hat den Vorteil gegenüber anderen mikrochirurgischen Techniken, dass im Gegensatz zur operativen Transsektion des N.trigeminus kein zweiter operativer Eingriff notwendig ist [143]. Auch müssen keine anatomischen Variationen berücksichtigt werden und die neonatale CPS-Applikation hat stets eine bilaterale Ablation zur Folge. Weiterhin besteht der Vorteil darin, dass efferente Neurone weitgehend intakt bleiben [144]. Damit sind in diesem Modell auch die Funktionen efferenter Nervenbahnen innerhalb des Prozesses der trigeminalen Aktivierung gewahrt.

Jedoch sollte berücksichtigt werden, dass die neonatale Vorbehandlung mit CPS u.U. nicht selektiv auf primäre trigeminale Afferenzen wirkt. Es ist wahrscheinlich, dass ebenfalls afferente C- und A δ -Fasern tiefer gelegener Spinalnerven zerstört werden [146]. Wahrscheinlich tragen die von den spinalen Hinterhorn ganglien freigesetzten CGRP-Mengen jedoch nur in sehr geringem Maße zu den hier gemessenen Konzentrationen bei, da CGRP schnell degradiert und

trotz bestehender Liquorzirkulation keine Akkumulation des aus spinaler Ebene stammenden CGRP in der Cisterna magna zu erwarten ist.

Auch muss die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass die neonatale Applikation von CPS zu einer sekundären Zerstörung zentraler CGRP-haltiger Neurone führen könnte. Ritter et al. beschreiben in diesem Zusammenhang die Neurodegeneration zentraler Nervenbahnen nach Applikation von CPS in 10 Tage alten Ratten [147]. Diese Effekte sind nicht auf das sensible Nervensystem beschränkt. Degenerative Effekte ließen sich nach neonataler Applikation von CPS u.a. an axonalen Terminalen der Substantia gelatinosa des spinalen Hinterhorns, in der Area postrema, in der inferioren Olive sowie in der Retina feststellen. Auch im Nucleus caudalis trigeminalis ließ sich eine Degeneration terminaler Nervenendigungen feststellen. Holzer et al. diskutieren in einer Übersichtsarbeit langfristige Effekte der neonatalen CPS-Applikation in Ratten. Es zeigen sich demnach globale morphologische Veränderungen in nahezu allen Arealen, die primäre Afferenzen unmyelinisierter C-Fasern erhalten [145]. Neben neurochemischen Effekten, wie der Inhibition des axoplasmatischen Transports von z.B. Neurotransmittern zwischen Perikaryon und Axon [148], werden ebenfalls funktionelle Folgen der neonatalen CPS-Applikation beschrieben. So lassen sich beispielsweise Änderungen des Wärmeempfindens nach CPS-Anwendung beobachten [149].

Hiura et al. zeigen, dass die neonatale Denervierung mittels CPS zu einer Adaption des sensorischen Systems mit der Folge einer veränderten Nozizeption führt. CPS führt in 2 Tage alten Mäusen zu einer reaktiven neuronalen Aussprossung intakt gebliebener C-Fasern im dorsalen Hinterhorn sowie zu einer gestörten Entwicklung inhibitorischer Interneurone [150].

Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die neonatale Applikation von CPS auch einen Effekt auf sekundäre und tertiärer trigeminale Nervenbahnen hat, welches sich auf die CGRP-Ausschüttung in dem hier verwendeten Modell auswirken könnte. Bei Applikation eines supramaximalen Stimulus in Form der hier verwendeten IS ist jedoch anzunehmen, dass diese Adaptionsvorgänge in nur geringem Maße zu den hier gemessenen CGRP-Spiegeln beitragen bzw. als Störfaktor fungieren.

6.8.5 Konzentrationsbestimmungen von CGRP im Blut und Liquor cerebrospinalis

Die hier verwendeten Techniken zur Konzentrationsbestimmung des Neuropeptids im Liquor wurden in Abschnitt 3.3.4 detailliert beschrieben. Bei den Konzentrationsmessungen wurden geringe Abweichungen festgestellt, die in den Ergebnisdarstellungen durch den Standardfehler des Mittelwertes angezeigt wurden. Ein Grund für diese geringen Abweichungen ist die interindividuelle Variabilität der Tiere und ebenso eine Variabilität der Messungen der

verschiedenen ELISA-Ansätze. In jedem Ansatz wurde eine individuelle Standardkurve bestimmt, was zu Abweichungen der CGRP-Level verschiedener Ansätze geführt haben könnte. Durch eine randomisierte Zuordnung der Proben wurde dieser Effekt minimiert. Bei der Bestimmung der CGRP-Konzentrationen im Liquor war nach Stimulation eine Streuung der Messwerte zu beobachten. Da jeweils nur maximal 50 µl Probenmaterial gewonnen werden konnten, liegt auch hierin eine mögliche Ursachenquelle. Wahrscheinlich führen auch Verdünnungseffekte des Probenmaterials zu den Konzentrationsabweichungen. Um diesen Effekt zu minimieren, wurden alle Experimente mit Ratten durchgeführt, da diese höhere Liquorvolumina als z.B. Mäuse aufweisen. Trotz dieser Variabilität und der geringen Abweichungen der verwendeten ELISA-Ansätze gelang es in dieser Arbeit sehr gut reproduzierbare Daten mit absoluten Werten zu generieren.

6.8.6 Messung der physiologischen Parameter

Während aller Experimente wurden die physiologischen Parameter Körpertemperatur, arterieller CO₂-Partialdruck, arterieller O₂-Partialdruck, arterieller pH-Wert und der systemische Blutdruck bestimmt. Abweichungen im Säure-Base-Haushalt wurden durch eine Adaption der Atemfrequenz entgegengewirkt. Hinsichtlich der Temperatur, dem pCO₂ und dem pO₂ ließen sich nur geringe Abweichungen feststellen. (siehe Tabelle 1) Der systemische Blutdruck wies dahingegen nach IS-Stimulation Schwankungen auf. Die intracisternale Applikation von IS stellt einen starken Reiz auf das Atmungs- und Kreislaufzentrum der Medulla oblongata dar. Dies könnte den initialen Anstieg des systemischen Blutdruckes nach IS-Gabe um bis zu 30 % erklären. Es ist anzunehmen, dass dieser Effekt die Folge der IS-Applikation bzw. des raschen Anstiegs der CGRP-Konzentration ist, da die Gabe von Vehikel in den Kontrolltieren zu keiner Änderung des systemischen Blutdrucks führte. Da diese Beobachtung mit einem von Fischer et al. beschriebenen Anstieg des systemischen Blutdrucks nach intracisternaler CGRP-Administration korreliert, besteht auch die Möglichkeit, dass die CGRP-Konzentrationsanstiege via Stimulation des Kreislaufzentrums in der Medulla oblongata einen Einfluss auf den systemischen Blutdruck haben könnten [151]. Aufgrund der vasodilatorischen Potenz wäre jedoch eher ein Blutdruckabfall bei peripherer CGRP-Wirkung zu erwarten gewesen.

Die Blutdruckwerte wurden in den hier durchgeführten Experimenten primär zur Veranschaulichung und Kontrolle der physiologischen Parameter bestimmt und wurden rein exemplarisch dargestellt. Eine Korrelation mit den gemessenen CGRP-Konzentrationen im Jugularvenenblut konnte nicht beobachtet werden.

7 Zusammenfassung

Die Aktivierung des trigeminovaskulären Systems kann als Grundlage pathophysiologischer Prozesse von Migränekopfschmerzen angesehen werden. Diese führt im Tierexperiment zu einer Ausschüttung von CGRP, was zur Vasodilation meningealer Gefäße mit weiteren konsekutiven Veränderungen, wie Protein-Austritt in das Gewebe bzw. zur Modulation der neuronalen Aktivität im trigeminalen Kerngebiet im Hirnstamm führt.

Klinisch experimentelle Studien belegen in ihrer Gesamtheit einen kausalen Zusammenhang zwischen der Kopfschmerzgenese und der CGRP-Freisetzung sowie der CGRP-Bindung an seinen Rezeptor. Die Blockade der CGRP-Bindung führt zu einer eindrucksvollen Besserung des Migränekopfschmerzes.

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden inflammatorisch wirkende Mediatoren in Form einer Inflammatory soup (IS), einem stark stimulierenden Agens, in die Cisterna magna von Ratten appliziert. Dabei ließen sich signifikante Anstiege der CGRP-Konzentrationen im Blut der V. jugularis externa und im Liquor cerebrospinalis feststellen. Auch eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen IS-Konzentration und CGRP Ausschüttung konnte dargestellt werden.

Entsprechend der hier generierten Resultate konnte ich bewiesen, dass hauptsächlich primäre Afferenzen an der Stimulus-induzierten CGRP-Freisetzung beteiligt sind. Hierzu wählte ich eine chemische Ablation primärer, afferenter A δ - und C-Fasern mittels Capsaicin-Gabe im Neugeborenenalter. Durch verschiedene histologische Verfahren und molekularbiologische Untersuchungen konnte der morphologische und biochemische Effekt der Capsaicin-Gabe nachgewiesen werden.

Ich konnte zeigen, dass die Denervierung durch neonatale Capsaicin-Exposition mit einem Verlust von CGRP-positiven Neuriten in der Dura mater und einer Reduktion primärer CGRP-positiver Neurone im Ganglion trigeminale einhergeht, während im Nucleus caudalis trigeminalis keine Veränderungen auffällig waren. Diese Resultate sind kongruent zu den Daten der quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR). Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der CGRP-mRNA im Ganglion trigeminale versus Gewebe naiver Tiere und ebenso kein Effekt in Hirnstammproben des Nucleus caudalis trigeminalis. Funktionell ließ sich in den denervierten Tieren eine signifikante Reduktion Stimulus-induzierter CGRP-

Konzentrationen sowohl im Jugularvenenblut als auch im Liquor cerebrospinalis feststellen. Die Basisspiegel des Neuropeptids wurden hingegen nicht beeinflusst.

Die Resultate implizieren zudem, dass zur Aufrechterhaltung der Ruhekonzentrationen von CGRP entweder die wenigen noch intakten primären Afferenzen ausreichend sind oder ggf. andere Zellverbände im ZNS zur basalen CGRP-Konzentration beitragen und die CGRP-Ruheausschüttung der denervierten Strukturen kompensieren.

Erstmals gelang es den direkten Vergleich von CGRP im Liquor und peripheren Blut in einem experimentellen Kopfschmerzmodell zu untersuchen und aufzuzeigen, dass hier ein annähernd paralleles Verhalten der CGRP-Konzentration vorliegt. Bemerkenswert sind die Konzentrationsunterschiede zwischen der CGRP-Konzentration im Liquor und den direkt ableitenden Blutleitern des Gehirns. Bereits in Ruhe werden im Liquor ca. um 9-fach höhere CGRP-Konzentration gemessen.

Ableitend aus der Beobachtung sehr hoher CGRP-Konzentrationen im Liquor stellt sich die Frage, ob CGRP im Liquor als Marker einer akuten Migräne dienen könnte. Dies kann jedoch nur in weiterführenden klinischen Studien beantwortet werden. Auch die Frage der Spezifität einer CGRP-Konzentrationserhöhung für die Migräne, insbesondere im Vergleich zu anderen Kopfschmerzen, müsste im Rahmen einer klinischen Untersuchung eruiert werden.

In dieser Arbeit wurde darüber hinaus untersucht, inwieweit die CGRP-Spiegel in diesem Modell durch eine pharmakologische Intervention beeinflusst werden. Dazu wurden jeweils der NO-Synthase-Inhibitor L-NAME sowie der 5-HT_{1B/D}-Rezeptor-Agonist Zolmitriptan i.v. verabreicht. Die Gabe des NO-Synthase-Inhibitors ergab keine Unterschiede hinsichtlich der CGRP-Spiegel in der V. jugularis vor und nach IS-Stimulation. Dies impliziert, dass die CGRP-Ausschüttung zumindest in diesem experimentellen Tiermodell nicht durch eine NO Blockade attenuiert werden kann. Die Verabreichung von Zolmitriptan führte zur Reduzierung der basalen Ruhekonzentration von CGRP im Liquor, nicht jedoch im Blut der V. jugularis. Auch nach maximalem Stimulus mit 10-fach konzentrierter IS ließ sich kein inhibierender Effekt des Triptans auf die Aktivierung des trigeminalen Nervensystems feststellen.

8 Versuchsparameter und Messwerte

Tabelle 1: Physiologische Parameter der Versuchsgruppen vor IS-Gabe

	IS/Kontr.	CPS	IS-Peripher	IS- 10X
Temperatur	36,95 ± 0,04	36,9 ± 0,06	36,97 ± 0,07	36,98 ± 0,03
pCO₂	37,18 ± 2,80	36,4 ± 2,87	38,62 ± 3,45	39,01 ± 3,66
pO₂	140,09 ± 9,59	137,0 ± 9,51	137,85 ± 4,51	139,19 ± 5,91
pH	7,38 ± 0,02	7,40 ± 0,03	7,38 ± 0,03	7,41 ± 0,02
Blutdruck	118,13 ± 7,37	111,0 ± 7,45	109,83 ± 14,1	116,2 ± 10,1

	Kontr.-peripher	L-NAME	Zolmitriptan
Temperatur	36,97 ± 0,07	36,94 ± 0,04	36,95 ± 0,05
pCO₂	38,62 ± 3,45	35,91 ± 4,12	37,5 ± 1,03
pO₂	137,85 ± 4,51	133,76 ± 10,95	135,6 ± 4,83
pH	7,38 ± 0,03	7,39 ± 0,02	7,38 ± 0,03
Blutdruck	109,83 ± 14,2	117,1 ± 14,57	116,4 ± 14,4

Tabelle 2: CGRP-Konzentration im Plasma – absolute Werte (pg/ml)

	IS n=10	IS-CPS n=12	Kontr. n=5	Kontr.- CPS n=5
0 Min.	14,36 ± 0,67	15,33 ± 1,04	15,55 ± 1,67	13,08 ± 1,03
2 Min.	36,85 ± 3,40	19,08 ± 1,08	16,31 ± 2,17	13,61 ± 0,84
15 Min.	22,17 ± 1,87	21,93 ± 2,48	15,16 ± 1,47	14,71 ± 0,47

	IS-10X n=5	IS-10X-Zolmitriptan n=5	IS-L-NAME n=5
0 Min.	13,89 ± 1,23	18,07 ± 0,88	15,00 ± 1,39
2 Min.	58,64 ± 3,58	77,59 ± 8,45	36,54 ± 8,10
15 Min.	30,99 ± 3,65	46,20 ± 11,03	25,30 ± 2,50

	IS-peripher n=4	Kontr.-peripher n=4
0 Min.	8,37 ± 0,55	7,17 ± 0,30
2 Min.	61,00 ± 3,48	7,50 ± 0,41
15 Min.	21,13 ± 2,96	7,47 ± 0,51

Tabelle 3: CGRP-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis

	Gruppe	Anzahl	CGRP in pg/ml
Werte 20 Min. nach IS-Stimulation	IS	n=5	222,60 ± 13,34
	IS-CPS	n=5	142,21 ± 15,63
	Kontr.	n=5	125,44 ± 11,57
	Kontr.-CPS	n=5	100,95 ± 5,89
	IS-10X	n=5	633,62 ± 72,21
	IS-10X-Zolmitriptan	n=6	620,19 ± 94,49
	Kontr.-Zolmitriptan	n=5	76,60 ± 11,42

Tabelle 4: Vergleich der relativen Werte der qRT-PCR

Gruppe	Naive n=10	CPS n=10
GT	0,0778 ± 0,001	0,0212 ± 0,002
NCT	0,0074 ± 0,004	0,0062 ± 0,003

Tabelle 5: Vergleich der verschiedenen Zeitpunkte der CGRP-Bestimmung innerhalb der Versuchsgruppen (t-Test bei verbundenen Stichproben)

Gruppe	IS n=10	IS-CPS n=12	Kontr. n=5	Kontr.-CPS n=4
0 Min. vs. 2 Min.	p=0,000	p=0,051	p=0,345	p=0,498
0 Min. vs. 15 Min.	p=0,001	p=0,021	p=0,226	p=0,293
2 Min. vs. 15 Min.	p=0,001	p=0,200	p=0,298	p=0,345

Gruppe	IS n=5	IS-10X-Zolmitriptan n=5	IS-L-NAME n=5
0 Min. vs. 2 Min.	p=0,004	p=0,002	p=0,040
0 Min. vs. 15 Min.	p=0,005	p=0,061	p=0,003
2 Min. vs. 15 Min.	p=0,006	p=0,002	p=0,135

Gruppe	IS-peripher n=4	Kontr.peripher n=4
0 Min. vs. 2 Min.	p=0,001	p=0,485
0 Min. vs. 15 Min.	p=0,020	p=0,626
2 Min. vs. 15 Min.	p=0,002	p=0,963

Tabelle 6: Vergleich der Stichproben der CGRP-Konzentrationen im Serum zwischen den Versuchsgruppen (t-Test bei unverbundenen Stichproben)

Gruppe	IS vs. Kontr.	IS vs. IS-CPS	IS-CPS vs. Kontr.-CPS	IS vs. IS-10X
0 Min.	p=0,447	p=0,444	p=0,082	p=0,718
2 Min.	p=0,001	p=0,001	p=0,210	p=0,002
15 Min.	p=0,026	p=0,941	p=0,015	p=0,330
Δ2 Min_ absolut	p=0,001	p=0,000	p=0,119	p=0,001
Δ15Min_ absolut	p=0,001	p=0,674	p=0,095	p=0,042
Δ2Min_ relativ	p=0,001	p=0,001	p=0,216	p=0,003
Δ15Min_ relativ	p=0,002	p=0,740	p=0,512	p=0,000

Gruppe	IS-10X vs. IS-10X- Zolmitriptan	IS vs. IS-L-NAME	IS-peripher vs. Kontr.-peripher
0 Min.	p=0,220	p=0,648	p=0,105
2 Min.	p=0,062	p=0,967	p=0,001
15 Min.	p=0,227	p=0,337	p=0,018
Δ2Min_ absolut	p=0,104	p=0,893	p=0,001
Δ15Min_ absolut	p=0,352	p=0,299	p=0,005
Δ2Min_ relativ	p=0,904	p=0,630	p=0,000
Δ15Min_ relativ	p=0,584	p=0,310	p=0,004

Tabelle 7: Vergleich der Stichproben der CGRP-Konzentrationen im Liquor zwischen den Versuchsgruppen (t-Test bei unverbundenen Stichproben)

Gruppe	
IS vs. Kontr.	p=0,001
IS-CPS vs. Kontr.-CPS	p=0,200
IS vs. IS-CPS	p=0,004
Kontr. vs. Kontr.-CPS	p=0,960
IS vs. IS-10X	p=0,041
IS-10X vs. IS-10X-Zolmi	p=0,916
IS-10X vs. Kontr.Zolmi	p=0,804
Kontr. vs. Kontr-Zolmi	p=0,017

9 Literaturverzeichnis

1. Ruiz de Velasco, I., et al., *Quality of life in migraine patients: a qualitative study*. Cephalalgia, 2003. **23**(9): p. 892-900.
2. Radtke, A. und Neuhauser, H., *Prevalence and burden of headache and migraine in Germany*. Headache, 2009. **49**(1): p. 79-89.
3. Olesen, J., et al., *The economic cost of brain disorders in Europe*. Eur J Neurol, 2012. **19**(1): p. 155-62.
4. Russell, M.B., et al., *Migraine without aura and migraine with aura are distinct clinical entities: a study of four hundred and eighty-four male and female migraineurs from the general population*. Cephalalgia, 1996. **16**(4): p. 239-45.
5. Ashkenazi, A., et al., *Improved identification of allodynic migraine patients using a questionnaire*. Cephalalgia, 2007. **27**(4): p. 325-9.
6. Headache Classification Subcommittee of the International Headache Society, *The international classification of headache disorders*. Cephalalgia, 2004. **Suppl 24**: p. 1-151.
7. Messlinger, K., *Anatomy and physiology of head pain*. The headaches, 2006. **3rd edn**: p. 95-109.
8. Lawson, S.N., McCarthy, P.W., und Prabhakar, E., *Electrophysiological properties of neurones with CGRP-like immunoreactivity in rat dorsal root ganglia*. J Comp Neurol, 1996. **365**(3): p. 355-66.
9. Lazarov, N.E., *Comparative analysis of the chemical neuroanatomy of the mammalian trigeminal ganglion and mesencephalic trigeminal nucleus*. Prog Neurobiol, 2002. **66**(1): p. 19-59.
10. Knight, Y.E. und Goadsby, P.J., *The periaqueductal grey matter modulates trigeminovascular input: a role in migraine?* Neuroscience, 2001. **106**(4): p. 793-800.
11. Yarnitsky, D., et al., *2003 Wolff Award: Possible parasympathetic contributions to peripheral and central sensitization during migraine*. Headache, 2003. **43**(7): p. 704-14.
12. Goadsby, P.J. und Akerman, S., *The trigeminovascular system does not require a peripheral sensory input to be activated - migraine is a central disorder Focus on 'Effect of cortical spreading depression on basal and evoked traffic in the trigeminovascular sensory system'*. Cephalalgia, 2012. **32**(1): p. 3-5.
13. Olesen, J., *Cerebral and extracranial circulatory disturbances in migraine: pathophysiological implications*. Cerebrovasc Brain Metab Rev, 1991. **3**(1): p. 1-28.
14. Tfelt-Hansen, P.C. und Koehler, P.J., *One hundred years of migraine research: major clinical and scientific observations from 1910 to 2010*. Headache, 2011. **51**(5): p. 752-78.

15. Hadjikhani, N., et al., *Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(8): p. 4687-92.
16. Bolay, H., et al., *Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model*. Nat Med, 2002. **8**(2): p. 136-42.
17. Lambert, G.A., Michalicek, J., und Regaglia, F., *Responses of the dural circulation to electrical stimulation of the trigeminal ganglion in the cat*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1997. **24**(6): p. 377-90.
18. Tran Dinh, Y.R., et al., *Cerebral vasodilation after the thermocoagulation of the trigeminal ganglion in humans*. Neurosurgery, 1992. **31**(4): p. 658-62; discussion 663.
19. Reuter, U. und May, A., *Voraussetzungen für das Symptom Kopfschmerz*. Schmerz, 2004. **18**(5): p. 357-62.
20. Raddant, A.C. und Russo, A.F., *Calcitonin gene-related peptide in migraine: intersection of peripheral inflammation and central modulation*. Expert Rev Mol Med, 2011. **13**: p. e36.
21. Bowen, E.J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha stimulation of calcitonin gene-related peptide expression and secretion from rat trigeminal ganglion neurons*. J Neurochem, 2006. **96**(1): p. 65-77.
22. Levy, D., et al., *Mast cell degranulation activates a pain pathway underlying migraine headache*. Pain, 2007. **130**(1-2): p. 166-76.
23. Strassman, A.M., Raymond, S.A., und Burstein, R., *Sensitization of meningeal sensory neurons and the origin of headaches*. Nature, 1996. **384**(6609): p. 560-4.
24. Wright, A., *Recent concepts in the neurophysiology of pain*. Man Ther, 1999. **4**(4): p. 196-202.
25. Bernstein, C. und Burstein, R., *Sensitization of the trigeminovascular pathway: perspective and implications to migraine pathophysiology*. J Clin Neurol, 2012. **8**(2): p. 89-99.
26. Dodick, D. und Silberstein, S., *Central sensitization theory of migraine: clinical implications*. Headache, 2006. **46 Suppl 4**: p. S182-91.
27. Edvinsson, L. und Uddman, R., *Neurobiology in primary headaches*. Brain Res Brain Res Rev, 2005. **48**(3): p. 438-56.
28. Wimalawansa, S.J., *Calcitonin gene-related peptide and its receptors: molecular genetics, physiology, pathophysiology, and therapeutic potentials*. Endocr Rev, 1996. **17**(5): p. 533-85.
29. Eftekhari, S., et al., *Differential distribution of calcitonin gene-related peptide and its receptor components in the human trigeminal ganglion*. Neuroscience, 2010. **169**(2): p. 683-96.

30. Archbold, J.K., et al., *Structural insights into RAMP modification of secretin family G protein-coupled receptors: implications for drug development*. Trends Pharmacol Sci, 2011. **32**(10): p. 591-600.
31. Goadsby, P.J., Edvinsson, L., und Ekman, R., *Vasoactive peptide release in the extracerebral circulation of humans during migraine headache*. Ann Neurol, 1990. **28**(2): p. 183-7.
32. Juhasz, G., 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**(3): p. 461-70.
33. Cady, R.K., et al., *Elevated saliva calcitonin gene-related peptide levels during acute migraine predict therapeutic response to rizatriptan*. Headache, 2009. **49**(9): p. 1258-66.
34. Asghar, M.S., et al., *Evidence for a vascular factor in migraine*. Ann Neurol, 2011. **69**(4): p. 635-45.
35. Olesen, J., et al., *Calcitonin gene-related peptide receptor antagonist BIBN 4096 BS for the acute treatment of migraine*. N Engl J Med, 2004. **350**(11): p. 1104-10.
36. Connor, K.M., et al., *Randomized, controlled trial of telcagepant for the acute treatment of migraine*. Neurology, 2009. **73**(12): p. 970-7.
37. Juhasz, G., 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**(3): p. 179-83.
38. Gulbenkian, S., Uddman, R., und Edvinsson, L., *Neuronal messengers in the human cerebral circulation*. Peptides, 2001. **22**(6): p. 995-1007.
39. Lundberg, J.M., et al., *Co-existence of substance P and calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin*. Eur J Pharmacol, 1985. **108**(3): p. 315-9.
40. Theoharides, T.C., et al., *The role of mast cells in migraine pathophysiology*. Brain Res Brain Res Rev, 2005. **49**(1): p. 65-76.
41. Vause, C.V. und Durham, P.L., *Calcitonin gene-related peptide differentially regulates gene and protein expression in trigeminal glia cells: findings from array analysis*. Neurosci Lett, 2010. **473**(3): p. 163-7.
42. Burstein, R. und Jakubowski, M., *Analgesic triptan action in an animal model of intracranial pain: a race against the development of central sensitization*. Ann Neurol, 2004. **55**(1): p. 27-36.
43. Burstein, R., et al., *Chemical stimulation of the intracranial dura induces enhanced responses to facial stimulation in brain stem trigeminal neurons*. J Neurophysiol, 1998. **79**(2): p. 964-82.
44. Ho, T.W., Edvinsson, L., und Goadsby, P.J., *CGRP and its receptors provide new insights into migraine pathophysiology*. Nat Rev Neurol, 2010. **6**(10): p. 573-82.

45. Gu, X.L. und Yu, L.C., *The colocalization of CGRP receptor and AMPA receptor in the spinal dorsal horn neuron of rat: a morphological and electrophysiological study.* Neurosci Lett, 2007. **414**(3): p. 237-41.
46. Ebersberger, A., et al., *Differential effects of calcitonin gene-related peptide and calcitonin gene-related peptide 8-37 upon responses to N-methyl-D-aspartate or (R, S)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionate in spinal nociceptive neurons with knee joint input in the rat.* Neuroscience, 2000. **99**(1): p. 171-8.
47. Storer, R.J., Akerman, S., und Goadsby, P.J., *Calcitonin gene-related peptide (CGRP) modulates nociceptive trigeminovascular transmission in the cat.* Br J Pharmacol, 2004. **142**(7): p. 1171-81.
48. Messlinger, K., *Migraine: where and how does the pain originate?* Exp Brain Res, 2009. **196**(1): p. 179-93.
49. Yun, H.Y., Dawson, V.L., und Dawson, T.M., *Neurobiology of nitric oxide.* Crit Rev Neurobiol, 1996. **10**(3-4): p. 291-316.
50. Brecht, D.S., *Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology.* Free Radic Res, 1999. **31**(6): p. 577-96.
51. Nozaki, K., et al., *Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries.* J Cereb Blood Flow Metab, 1993. **13**(1): p. 70-9.
52. Messlinger, K., et al., *CGRP and NO in the Trigeminal System: Mechanisms and Role in Headache Generation.* Headache, 2012.
53. Strecker, T., Dux, M., und 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**(6): p. 489-96.
54. Eberhardt, M., et al., *Calcitonin gene-related peptide release from intact isolated dorsal root and trigeminal ganglia.* Neuropeptides, 2008. **42**(3): p. 311-7.
55. Bellamy, J., et al., *Nitric oxide regulation of calcitonin gene-related peptide gene expression in rat trigeminal ganglia neurons.* Eur J Neurosci, 2006. **23**(8): p. 2057-66.
56. Koulchitsky, S., et al., *Biphasic response to nitric oxide of spinal trigeminal neurons with meningeal input in rat--possible implications for the pathophysiology of headaches.* J Neurophysiol, 2004. **92**(3): p. 1320-8.
57. Koulchitsky, S., Fischer, M.J., und Messlinger, K., *Calcitonin gene-related peptide receptor inhibition reduces neuronal activity induced by prolonged increase in nitric oxide in the rat spinal trigeminal nucleus.* Cephalalgia, 2009. **29**(4): p. 408-17.
58. Tassorelli, C. und Joseph, S.A., *Systemic nitroglycerin induces Fos immunoreactivity in brainstem and forebrain structures of the rat.* Brain Res, 1995. **682**(1-2): p. 167-81.
59. Olesen, J., *The role of nitric oxide (NO) in migraine, tension-type headache and cluster headache.* Pharmacol Ther, 2008. **120**(2): p. 157-71.

60. Olesen, J., Iversen, H.K., und Thomsen, L.L., *Nitric oxide supersensitivity: a possible molecular mechanism of migraine pain*. Neuroreport, 1993. **4**(8): p. 1027-30.
61. Olesen, J., Thomsen, L.L., und Iversen, H., *Nitric oxide is a key molecule in migraine and other vascular headaches*. Trends Pharmacol Sci, 1994. **15**(5): p. 149-53.
62. Afridi, S.K., Kaube, H., und Goadsby, P.J., *Glyceryl trinitrate triggers premonitory symptoms in migraineurs*. Pain, 2004. **110**(3): p. 675-80.
63. Rees, D.D., et al., *Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo*. Br J Pharmacol, 1990. **101**(3): p. 746-52.
64. Lassen, L.H., et al., *Nitric oxide synthase inhibition: a new principle in the treatment of migraine attacks*. Cephalalgia, 1998. **18**(1): p. 27-32.
65. Lassen, L.H., et al., *Nitric oxide synthase inhibition in migraine*. Lancet, 1997. **349**(9049): p. 401-2.
66. Hoskin, K.L., Bulmer, D.C., und Goadsby, P.J., *Fos expression in the trigeminocervical complex of the cat after stimulation of the superior sagittal sinus is reduced by L-NAME*. Neurosci Lett, 1999. **266**(3): p. 173-6.
67. Offenhauser, N., et al., *CGRP release and c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis of the rat following glyceryltrinitrate infusion*. Cephalalgia, 2005. **25**(3): p. 225-36.
68. De Col, R., Koulchitsky, S.V., und Messlinger, K.B., *Nitric oxide synthase inhibition lowers activity of neurons with meningeal input in the rat spinal trigeminal nucleus*. Neuroreport, 2003. **14**(2): p. 229-32.
69. Ferrari, M.D., et al., *Oral triptans (serotonin 5-HT(1B/1D) agonists) in acute migraine treatment: a meta-analysis of 53 trials*. Lancet, 2001. **358**(9294): p. 1668-75.
70. Longmore, J., et al., *Comparison of the vasoconstrictor effects of rizatriptan and sumatriptan in human isolated cranial arteries: immunohistological demonstration of the involvement of 5-HT1B-receptors*. Br J Clin Pharmacol, 1998. **46**(6): p. 577-82.
71. Goadsby, P.J. und Knight, Y.E., *Direct evidence for central sites of action of zolmitriptan (311C90): an autoradiographic study in cat*. Cephalalgia, 1997. **17**(3): p. 153-8.
72. Amrutkar, D.V., et al., *mRNA expression of 5-hydroxytryptamine 1B, 1D, and 1F receptors and their role in controlling the release of calcitonin gene-related peptide in the rat trigeminovascular system*. Pain, 2012. **153**(4): p. 830-8.
73. Limmroth, V., et al., *An in vivo rat model to study calcitonin gene related peptide release following activation of the trigeminal vascular system*. Pain, 2001. **92**(1-2): p. 101-6.
74. Martin, G.R., et al., *Receptor specificity and trigemino-vascular inhibitory actions of a novel 5-HT1B/1D receptor partial agonist, 311C90 (zolmitriptan)*. Br J Pharmacol, 1997. **121**(2): p. 157-64.

75. Goadsby, P.J. und Hoskin, K.L., *Inhibition of trigeminal neurons by intravenous administration of the serotonin (5HT)1B/D receptor agonist zolmitriptan (311C90): are brain stem sites therapeutic target in migraine?* Pain, 1996. **67**(2-3): p. 355-9.
76. Martin, G.R., *Pre-clinical pharmacology of zolmitriptan (Zomig; formerly 311C90), a centrally and peripherally acting 5HT1B/1D agonist for migraine.* Cephalalgia, 1997. **17 Suppl 18**: p. 4-14.
77. Dalpiaz, A., et al., *Quantitative determination of zolmitriptan in rat blood and cerebrospinal fluid by reversed phase HPLC-ESI-MS/MS analysis: Application to in vivo preclinical pharmacokinetic study.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2012. **901**: p. 72-8.
78. Jancso, G., Kiraly, E., und Jancso-Gabor, A., *Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones.* Nature, 1977. **270**(5639): p. 741-3.
79. Mitsikostas, D.D., et al., *Non-NMDA glutamate receptors modulate capsaicin induced c-fos expression within trigeminal nucleus caudalis.* Br J Pharmacol, 1999. **127**(3): p. 623-30.
80. Jakubowski, M., et al., *Sensitization of central trigeminovascular neurons: blockade by intravenous naproxen infusion.* Neuroscience, 2007. **148**(2): p. 573-83.
81. Bustin, S.A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.* J Mol Endocrinol, 2000. **25**(2): p. 169-93.
82. Hoffmann, J., et al., *Intracisternal injection of inflammatory soup activates the trigeminal nerve system.* Cephalalgia, 2009. **29**(11): p. 1212-7.
83. Goadsby, P.J., Edvinsson, L., und 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**(2): p. 193-6.
84. Zagami, A.S., Goadsby, P.J., und Edvinsson, L., *Stimulation of the superior sagittal sinus in the cat causes release of vasoactive peptides.* Neuropeptides, 1990. **16**(2): p. 69-75.
85. Wang, X., et al., *Selective inhibition of 5-HT7 receptor reduces CGRP release in an experimental model for migraine.* Headache, 2010. **50**(4): p. 579-87.
86. Dux, M., Santha, P., und Jancso, G., *Capsaicin-sensitive neurogenic sensory vasodilatation in the dura mater of the rat.* J Physiol, 2003. **552**(Pt 3): p. 859-67.
87. Gupta, S., et al., *Evidence for CGRP re-uptake in rat dura mater encephali.* Br J Pharmacol, 2010. **161**(8): p. 1885-98.
88. Brain, S.D. und Grant, A.D., *Vascular actions of calcitonin gene-related peptide and adrenomedullin.* Physiol Rev, 2004. **84**(3): p. 903-34.
89. Gallai, V., et al., *Vasoactive peptide levels in the plasma of young migraine patients with and without aura assessed both interictally and ictally.* Cephalalgia, 1995. **15**(5): p. 384-90.

90. Tvedskov, J.F., et al., *No increase of calcitonin gene-related peptide in jugular blood during migraine*. Ann Neurol, 2005. **58**(4): p. 561-8.
91. Hansen, J.M., et al., *Calcitonin gene-related peptide triggers migraine-like attacks in patients with migraine with aura*. Cephalalgia, 2010. **30**(10): p. 1179-86.
92. Lassen, L.H., et al., *Involvement of calcitonin gene-related peptide in migraine: regional cerebral blood flow and blood flow velocity in migraine patients*. J Headache Pain, 2008. **9**(3): p. 151-7.
93. Ho, T.W., et al., *Randomized controlled trial of an oral CGRP receptor antagonist, MK-0974, in acute treatment of migraine*. Neurology, 2008. **70**(16): p. 1304-12.
94. Villalon, C.M. und Olesen, J., *The role of CGRP in the pathophysiology of migraine and efficacy of CGRP receptor antagonists as acute antimigraine drugs*. Pharmacol Ther, 2009. **124**(3): p. 309-23.
95. Wimalawansa, S.J. und MacIntyre, I., *The presence of calcitonin gene-related peptide in human cerebrospinal fluid*. Brain, 1987. **110** (Pt 6): p. 1647-55.
96. Vaeroy, H., et al., *Modulation of pain in fibromyalgia (fibrositis syndrome): cerebrospinal fluid (CSF) investigation of pain related neuropeptides with special reference to calcitonin gene related peptide (CGRP)*. J Rheumatol Suppl, 1989. **19**: p. 94-7.
97. Juul, R., et al., *Alterations in perivascular dilatory neuropeptides (CGRP, SP, VIP) in the external jugular vein and in the cerebrospinal fluid following subarachnoid haemorrhage in man*. Acta Neurochir (Wien), 1995. **132**(1-3): p. 32-41.
98. Mathe, A.A., et al., *Increased concentration of calcitonin gene-related peptide in cerebrospinal fluid of depressed patients. A possible trait marker of major depressive disorder*. Neurosci Lett, 1994. **182**(2): p. 138-42.
99. Lindh, C., et al., *Low calcitonin gene-related, peptide-like immunoreactivity in cerebrospinal fluid from chronic pain patients*. Neuropeptides, 1999. **33**(6): p. 517-21.
100. Sarchielli, P., et al., *Levels of nerve growth factor in cerebrospinal fluid of chronic daily headache patients*. Neurology, 2001. **57**(1): p. 132-4.
101. Gallai, V., et al., *Glutamate and nitric oxide pathway in chronic daily headache: evidence from cerebrospinal fluid*. Cephalalgia, 2003. **23**(3): p. 166-74.
102. Reiber, H., *Dynamics of brain-derived proteins in cerebrospinal fluid*. Clin Chim Acta, 2001. **310**(2): p. 173-86.
103. Reiber, H., *Proteins in cerebrospinal fluid and blood: barriers, CSF flow rate and source-related dynamics*. Restor Neurol Neurosci, 2003. **21**(3-4): p. 79-96.
104. Dobolyi, A., et al., *Calcitonin gene-related peptide-containing pathways in the rat forebrain*. J Comp Neurol, 2005. **489**(1): p. 92-119.

105. Spratt, D.P. und Herbison, A.E., *Projections of the sexually dimorphic calcitonin gene-related peptide neurons of the preoptic area determined by retrograde tracing in the female rat*. J Comp Neurol, 2002. **445**(4): p. 336-46.
106. Li, N., et al., *Involvement of CGRP and CGRP1 receptor in nociception in the basolateral nucleus of amygdala of rats*. Neurosci Lett, 2008. **443**(3): p. 184-7.
107. Edvinsson, L. und Ho, T.W., *CGRP receptor antagonism and migraine*. Neurotherapeutics, 2010. **7**(2): p. 164-75.
108. Edvinsson, L., et al., *Cerebellar distribution of calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its receptor components calcitonin receptor-like receptor (CLR) and receptor activity modifying protein 1 (RAMP1) in rat*. Mol Cell Neurosci, 2011. **46**(1): p. 333-9.
109. Skofitsch, G. und Jacobowitz, D.M., *Calcitonin gene-related peptide: detailed immunohistochemical distribution in the central nervous system*. Peptides, 1985. **6**(4): p. 721-45.
110. Silverman, J.D. und Kruger, L., *Calcitonin-gene-related-peptide-immunoreactive innervation of the rat head with emphasis on specialized sensory structures*. J Comp Neurol, 1989. **280**(2): p. 303-30.
111. Hung Tsai, M., et al., *Novel distribution of calcitonin gene-related peptide in rodent subcommissural organs*. Neuroreport, 2003. **14**(14): p. 1851-6.
112. Kapoor, K.G., et al., *Cerebrospinal fluid outflow: an evolving perspective*. Brain Res Bull, 2008. **77**(6): p. 327-34.
113. Kim, Y.G., et al., *Peptidomics approach to elucidate the proteolytic regulation of bioactive peptides*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(22): p. 8523-7.
114. Edvinsson, L., Nilsson, E., und Jansen-Olesen, I., *Inhibitory effect of BIBN4096BS, CGRP(8-37), a CGRP antibody and an RNA-Spiegelmer on CGRP induced vasodilatation in the perfused and non-perfused rat middle cerebral artery*. Br J Pharmacol, 2007. **150**(5): p. 633-40.
115. Beggs, S., et al., *Peripheral nerve injury and TRPV1-expressing primary afferent C-fibers cause opening of the blood-brain barrier*. Mol Pain, 2010. **6**: p. 74.
116. Markowitz, S., Saito, K., und Moskowitz, M.A., *Neurogenically mediated leakage of plasma protein occurs from blood vessels in dura mater but not brain*. J Neurosci, 1987. **7**(12): p. 4129-36.
117. Lennerz, J.K., et al., *Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system: differences between peripheral and central CGRP receptor distribution*. J Comp Neurol, 2008. **507**(3): p. 1277-99.
118. Tajti, J., et al., *Messenger molecules and receptor mRNA in the human trigeminal ganglion*. J Auton Nerv Syst, 1999. **76**(2-3): p. 176-83.

119. Aita, M., Maeda, T., und Seo, K., *The effect of neonatal capsaicin treatment on the CGRP-immunoreaction in the trigeminal subnucleus caudalis of mice*. Biomed Res, 2008. **29**(1): p. 33-42.
120. Kai-Kai, M.A. und Che, Y.M., *Distribution of arginine-vasopressin in the trigeminal, dorsal root ganglia and spinal cord of the rat; depletion by capsaicin*. Comp Biochem Physiol A Physiol, 1995. **110**(1): p. 71-8.
121. Takuma, S., *Effect of neonatal capsaicin treatment on neural activity in the medullary dorsal horn of neonatal rats evoked by electrical stimulation to the trigeminal afferents: an optical, electrophysiological, and quantitative study*. Brain Res, 2001. **906**(1-2): p. 1-12.
122. Nozaki, K., Moskowitz, M.A., und Boccalini, P., *CP-93,129, sumatriptan, dihydroergotamine block c-fos expression within rat trigeminal nucleus caudalis caused by chemical stimulation of the meninges*. Br J Pharmacol, 1992. **106**(2): p. 409-15.
123. Takhshid, M.A., et al., *Expression of spinal cord Fos protein in response to intrathecal adrenomedullin and CGRP in conscious rats*. Brain Res, 2004. **1020**(1-2): p. 30-6.
124. Minami, T., et al., *Involvement of primary afferent C-fibres in touch-evoked pain (allodynia) induced by prostaglandin E2*. Eur J Neurosci, 1999. **11**(6): p. 1849-56.
125. Eftekhari, S. und Edvinsson, L., *Calcitonin gene-related peptide (CGRP) and its receptor components in human and rat spinal trigeminal nucleus and spinal cord at C1-level*. BMC Neurosci, 2011. **12**: p. 112.
126. Sun, R.Q., Lawand, N.B., und Willis, W.D., *The role of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in the generation and maintenance of mechanical allodynia and hyperalgesia in rats after intradermal injection of capsaicin*. Pain, 2003. **104**(1-2): p. 201-8.
127. Oshinsky, M.L. und Gomonchareonsiri, S., *Episodic dural stimulation in awake rats: a model for recurrent headache*. Headache, 2007. **47**(7): p. 1026-36.
128. Eberhardt, M., et al., *Glyceroltrinitrate facilitates stimulated CGRP release but not gene expression of CGRP or its receptor components in rat trigeminal ganglia*. Neuropeptides, 2009. **43**(6): p. 483-9.
129. Whiting, M.J., et al., *Determination of NG-nitro-L-arginine and NG-nitro-L-arginine methyl ester in plasma by high-performance liquid chromatography*. J Chromatogr B Biomed Appl, 1994. **660**(1): p. 170-5.
130. Hoivik, H.O., et al., *Lack of efficacy of the selective iNOS inhibitor GW274150 in prophylaxis of migraine headache*. Cephalalgia, 2010. **30**(12): p. 1458-67.
131. Buzzi, M.G., et al., *Dihydroergotamine and sumatriptan attenuate levels of CGRP in plasma in rat superior sagittal sinus during electrical stimulation of the trigeminal ganglion*. Neuropharmacology, 1991. **30**(11): p. 1193-200.
132. Goadsby, P.J., *Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics*. Trends Mol Med, 2007. **13**(1): p. 39-44.

133. Cumberbatch, M.J., Hill, R.G., und Hargreaves, R.J., *The effects of 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptor agonists on trigeminal nociceptive neurotransmission in anaesthetized rats*. Eur J Pharmacol, 1998. **362**(1): p. 43-6.
134. Bartsch, T., Knight, Y.E., und Goadsby, P.J., *Activation of 5-HT(1B/1D) receptor in the periaqueductal gray inhibits nociception*. Ann Neurol, 2004. **56**(3): p. 371-81.
135. Goadsby, P.J. und Edvinsson, L., *Joint 1994 Wolff Award Presentation. Peripheral and central trigeminovascular activation in cat is blocked by the serotonin (5HT)-1D receptor agonist 311C90*. Headache, 1994. **34**(7): p. 394-9.
136. Martino, G. und Perkins, M.N., *Tactile-induced ultrasonic vocalization in the rat: a novel assay to assess anti-migraine therapies in vivo*. Cephalalgia, 2008. **28**(7): p. 723-33.
137. Hoffmann, O., et al., *Triptans reduce the inflammatory response in bacterial meningitis*. J Cereb Blood Flow Metab, 2002. **22**(8): p. 988-96.
138. Steen, K.H., Steen, A.E., und Reeh, P.W., *A dominant role of acid pH in inflammatory excitation and sensitization of nociceptors in rat skin, in vitro*. J Neurosci, 1995. **15**(5 Pt 2): p. 3982-9.
139. Ebersberger, A., 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**(3): p. 901-7.
140. Ebersberger, A., et al., *Effect of sympathetic and parasympathetic mediators on the release of calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E from rat dura mater, in vitro*. Cephalalgia, 2006. **26**(3): p. 282-9.
141. Levy, D., Burstein, R., und Strassman, A.M., *Calcitonin gene-related peptide does not excite or sensitize meningeal nociceptors: implications for the pathophysiology of migraine*. Ann Neurol, 2005. **58**(5): p. 698-705.
142. Bergerot, A., et al., *Animal models of migraine: looking at the component parts of a complex disorder*. Eur J Neurosci, 2006. **24**(6): p. 1517-34.
143. Reuter, U., Sanchez del Rio, M., und Moskowitz, M.A., *Experimental models of migraine*. Funct Neurol, 2000. **15 Suppl 3**: p. 9-18.
144. Jancso, G. und Kiraly, E., *Sensory neurotoxins: chemically induced selective destruction of primary sensory neurons*. Brain Res, 1981. **210**(1-2): p. 83-9.
145. Holzer, P., *Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons*. Pharmacol Rev, 1991. **43**(2): p. 143-201.
146. Hiura, A., *Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons*. Arch Histol Cytol, 2000. **63**(3): p. 199-215.
147. Ritter, S. und Dinh, T.T., *Capsaicin-induced neuronal degeneration in the brain and retina of preweanling rats*. J Comp Neurol, 1990. **296**(3): p. 447-61.

148. McDougal, D.B., Jr., et al., *Neonatal capsaicin and guanethidine and axonally transported organelle-specific enzymes in sciatic nerve and in sympathetic and dorsal root ganglia*. J Neurosci, 1983. **3**(1): p. 124-32.
149. Hori, T. und Tsuzuki, S., *Thermoregulation in adult rats which have been treated with capsaicin as neonates*. Pflugers Arch, 1981. **390**(3): p. 219-23.
150. Hiura, A., et al., *Age-related changes in the response to thermal noxious heat and reduction of C-fibers by neonatal treatment with capsaicin*. Somatosens Mot Res, 1999. **16**(2): p. 115-21.
151. Fischer, J.A. und Born, W., *Novel peptides from the calcitonin gene: expression, receptors and biological function*. Peptides, 1985. **6 Suppl 3**: p. 265-71.

Erklärung an Eides statt

„Ich, Sascha Wecker, erkläre, dass die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

Die Bedeutung primärer und sekundärer trigeminaler Neurone für die Ausschüttung von Calcitonin Gene-Related Peptide in einem tierexperimentellen Migräne-Modell

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 22.05.2013

Danksagung

Ein besonderes Wort des Dankes möchte ich an meinen Doktorvater Herrn PD Dr. med. Uwe Reuter aus der Klinik für Neurologie der Charité für die Überlassung des Themas der Arbeit richten. Vor allem möchte ich ihm aber für die herausragende Betreuung, seine Geduld, die Heranführung an das wissenschaftliche Arbeiten und verschiedene Techniken im Labor danken. Er war mir stets ein verlässlicher Ansprechpartner, Motivator und Ratgeber.

Herrn Dr. med. Jan Hoffmann aus der Klinik für Neurologie danke ich besonders für die ausführliche und strukturierte Einführung in die Thematik und die laborexperimentelle Arbeit sowie für die anregenden Diskussionen bzgl. der wissenschaftlichen Fragestellung.

Frau Sonja Blumenau aus der Abteilung für Experimentelle Neurologie möchte ich für Ihre großartige technische Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der Experimente danken.

Frau Dr. rer. nat. Martina Füchtemeier bin ich für Ihre zahlreichen Ratschläge bzgl. der Durchführung und damit dem Gelingen der Tierpräparation und Anfertigung der Experimente sehr verbunden.

Besonders möchte ich mich bei meinen sehr geschätzten Freunden Julie Hoffmann, Jean-Marie Strasser, Arne Salomon, Julia Schneider, Anja Kahl und Andreas Maxeiner für Ihre stetige Unterstützung, motivierenden Worte und unvergesslichen Momente während meiner Studienzeit in Berlin bedanken.

Sibylle Schaffhauser danke ich von ganzem Herzen für Ihre emotionale Unterstützung und das Durchlesen des Manuskriptes.

Ohne den Rückhalt meiner Mutter Judith Wecker, die mich stets in meinem Vorhaben und während des gesamten Studiums unterstützte, wäre die Fertigstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen. Ihr gilt mein höchster Respekt und Dank!

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Originalarbeit:

Hoffmann J, **Wecker S**, Neeb L, Dirnagl U., Reuter U.

Primary trigeminal afferents are the main source for stimulus-induced CGRP release into jugular vein blood and CSF

Cephalalgia, 2012. 32(9): S. 659-67

(Die Abbildungen 13 und 14 der Dissertationsschrift wurden ebenfalls als Titelbild des Journals *Cephalalgia*, Ausgabe 32/9, Juli 2012 publiziert)

Konferenzbeiträge:

Hoffmann J, **Wecker S**, Reuter U.

The induced release of CGRP by peripheral and central administration of inflammatory soup does not depend on nitric oxide

IHS-Konferenz, Berlin, Juni 2011

Hoffmann J, **Wecker S**, Neeb L, Dirnagl U, Reuter U.

Neonatal capsaicin treatment inhibits inflammatory soup induced release of calcitonin gene-related peptide

Migraine Headache Congress – EHMTIC, Nizza, Oktober 2010